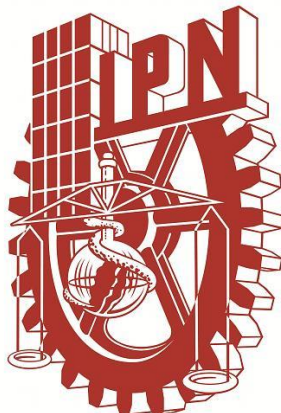


**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



**COMPORTAMIENTO SEXUAL DE MACHOS DE *Aedes aegypti*  
INFECTADOS CON  
*Metarhizium anisopliae***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**JAVIER ALFONSO GARZA HERNÁNDEZ**

**CUIDAD DE REYNOSA, TAMAULIPAS. A SEPTIEMBRE DEL 2015**

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



COMPORTAMIENTO SEXUAL DE MACHOS DE *Aedes aegypti* INFECTADOS  
CON  
*Metarhizium anisopliae*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

JAVIER ALFONSO GARZA HERNÁNDEZ

CUIDAD DE REYNOSA, TAMAULIPAS. A SEPTIEMBRE DEL 2015



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. el día 3 del mes Junio del año 2015, el que suscribe Javier Alfonso Garza Hernández alumno del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro A110582 adscrito a Centro de Biotecnología Genómica manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez, Dr. Juan Santiago Salas Benito y cede los derechos del trabajo titulado "Comportamiento sexual de machos de *Aedes aegypti* infectados con *Metarhizium anisopliae*." al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Blvd. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Javier Alfonso Garza Hernández



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. siendo las 12:00 horas del día 03 del mes de Junio del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada:

Comportamiento sexual de machos de *Aedes aegypti* infectados con *Metarhizium anisopliae*

Presentada por el alumno:

|                  |                  |                       |   |   |   |   |
|------------------|------------------|-----------------------|---|---|---|---|
| <u>Garza</u>     | <u>Hernández</u> | <u>Javier Alfonso</u> |   |   |   |   |
| Apellido paterno | Apellido materno | Nombre(s)             |   |   |   |   |
| Con registro:    |                  |                       |   |   |   |   |
| A                | 1                | 1                     | 0 | 5 | 8 | 2 |

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

  
Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez

  
Dr. Juan Santiago Salas Benito

  
Dr. Victor Ricardo Moreno Medina

  
Dr. Xianwu Guo

  
Dra. Ninfa María Rosas García

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dr. Miguel Ángel Reyes López



## DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis con todo mi cariño y respeto a mis Padres Sr. Javier Alfonso Garza Isida y Sra. María Imelda Hernández García.

Además a,

M. en C. Stephanie Viridiana Laredo Tiscareño, por su cariño, apoyo y paciencia.

*“Escribo por el solo placer de escribir, para mí solo, sin ninguna finalidad de dinero o publicidad. En mi pobre vida, tan vulgar y tranquila, las frases son aventuras y no recojo otras flores que las metáforas”*

*Flaubert, Gustave*

*¡Ay Nos Vemos Raza!*

*Eulalio González “El Piporro”*

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente agradezco al Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez por haberme brindado su atención y apoyo durante el desarrollo de esta tesis. También otorgo mi agradecimiento al Dr. Filiberto Reyes Villanueva por haberme concedido su tiempo y consejos para desarrollar los experimentos de este trabajo. Además de tener su amistad y considerarlo como uno de mis mejores amigos que he tenido.

Igualmente agradezco al Dr. Erick de Jesús de Luna Santillana por sus consejos y apoyo a lo largo de mi carrera y por haberme brindado su sincera amistad. Y a mis asesores Dr. Juan Santiago Salas Benito, Dr. Víctor Ricardo Moreno Medina, Dr. Xianwu Guo y Dra. Ninfa María Rosas García por su guía durante esta tesis.

Asimismo agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme brindado el apoyo económico para cursar satisfactoriamente mi postgrado, además por haberme otorgado la oportunidad de realizar una estancia internacional en la Universidad Estatal de Osun, Nigeria. De igual manera, agradezco al IPN por la Beca de Estimulo Institucional de Formación de Investigadores los apoyos brindados durante los 8 semestres del mi postgrado.

Y finalmente agradezco a mis padres, el Sr. Javier Alfonso Garza Isida y la Sra. María Imelda Hernández García que me brindaron todo su apoyo durante toda mi carrera de postgrado.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| PORTADA.....                                                                                                                                                                  | 1  |
| CONTRAPORTADA.....                                                                                                                                                            | 2  |
| ACTA DE SESIÓN DE<br>DERECHOS.....                                                                                                                                            | 3  |
| ACTA DE REVISIÓN DE TESIS.....                                                                                                                                                | 4  |
| DEDICATORIA.....                                                                                                                                                              | 5  |
| AGRADECIMIENTOS.....                                                                                                                                                          | 6  |
| ÍNDICE DE CONTENIDO.....                                                                                                                                                      | 7  |
| 1. JUSTIFICACIÓN.....                                                                                                                                                         | 13 |
| 2. OBJETIVOS.....                                                                                                                                                             | 17 |
| Objetivo general.....                                                                                                                                                         | 17 |
| Objetivos específicos.....                                                                                                                                                    | 17 |
| 3. HIPÓTESIS.....                                                                                                                                                             | 19 |
| 4. Capítulo I.....                                                                                                                                                            | 20 |
| Revisión de literatura acerca de la epidemiología del dengue. De la biología,<br>ecología y control de <i>Aedes aegypti</i> con el uso de <i>Metarhizium anisopliae</i> ..... | 20 |
| El dengue: la enfermedad, una descripción general .....                                                                                                                       | 21 |
| Historia del dengue.....                                                                                                                                                      | 21 |
| Distribución geográfica y clasificación taxonómica de <i>A. aegypti</i> .....                                                                                                 | 23 |
| Ciclos de transmisión del virus del dengue .....                                                                                                                              | 25 |
| Bionomía de <i>A. aegypti</i> .....                                                                                                                                           | 27 |
| Competencia vectorial de <i>A. aegypti</i> .....                                                                                                                              | 31 |
| El comportamiento sexual de <i>A. aegypti</i> .....                                                                                                                           | 33 |
| El proceso de cópula en <i>A. aegypti</i> .....                                                                                                                               | 35 |
| Situación epidemiológica actual del dengue .....                                                                                                                              | 42 |
| Situación epidemiológica actual para México del dengue .....                                                                                                                  | 44 |
| Control y erradicación de <i>A. aegypti</i> .....                                                                                                                             | 47 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Hongos anamorfos (imperfectos) entomopatógenos: con énfasis en <i>M. anisopliae</i> .....                                                                                                                                                                                                                    | 50  |
| <i>M. anisopliae</i> en el biocontrol de mosquitos vectores.....                                                                                                                                                                                                                                             | 52  |
| Auto-diseminación de <i>M. anisopliae</i> en el vector del dengue <i>A. aegypti</i> .....                                                                                                                                                                                                                    | 55  |
| 5. Capítulo II.....                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 61  |
| Efecto de la espermatogénesis, comportamiento de cópula y transferencia de conidias de machos de <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) contaminados con <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ascomycota: Hypocreales) .....                                                                                    | 61  |
| RESUMEN .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 62  |
| INTRODUCCIÓN.....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 64  |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 67  |
| RESULTADOS .....                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 80  |
| DISCUSIÓN .....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 87  |
| CONCLUSIONES.....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 91  |
| 6. Capítulo III .....                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 93  |
| Evaluar en semi-campo la competencia intrasexual entre un macho de <i>Aedes aegypti</i> contaminado con <i>Metarhizium anisopliae</i> y un macho sano además de evaluar la capacidad de autodiseminación del hongo utilizando diferentes densidades de machos dentro de una población finita de hembras..... | 93  |
| RESUMEN .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 94  |
| INTRODUCCIÓN.....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 96  |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 99  |
| RESULTADOS .....                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 104 |
| DISCUSIÓN .....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 107 |
| CONCLUSIONES.....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 110 |
| 7. ANEXOS .....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 112 |
| 8. LITERATURA CITADA.....                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 114 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Distribución de <i>A. aegypti</i> en las Américas.....                                                                                             | 23 |
| Figura 2. Distribución geográfica de <i>A. aegypti</i> .....                                                                                                 | 24 |
| Figura 3. Ciclos de transmisión del virus del dengue.....                                                                                                    | 26 |
| Figura 4. Ciclo de vida del vector primario del dengue <i>A. aegypti</i> .....                                                                               | 28 |
| Figura 5. Micrografía de barrido de un huevo de <i>A. aegypti</i> .....                                                                                      | 29 |
| Figura 6. Morfología de <i>A. aegypti</i> .....                                                                                                              | 30 |
| Figura 7. Series de tiempo de casos de dengue, número de casos recientes y abundancia de <i>A. aegypti</i> en una zona urbana de Rio de Janeiro, Brasil..... | 31 |
| Figura 8. Rutas migratorias y sitios de desarrollo para la propagación del DENV.....                                                                         | 32 |
| Figura 9. Sección longitudinal de la cabeza de un macho de <i>A. aegypti</i> mostrando el sitio donde se localiza el órgano de Tambour.....                  | 36 |
| Figura 10. Aspecto ventral de los claspers de un macho virgen de <i>A. aegypti</i> .....                                                                     | 37 |
| Figura 11. Fotografía de un corte histológico sagital de la unión de los aparatos sexuales en <i>A. aegypti</i> .....                                        | 37 |
| Figura 12. Planisferio mostrando las regiones con casos de dengue.....                                                                                       | 43 |
| Figura 13. Estimaciones globales de dengue a través del tiempo. Comparación de los casos de dengue a nivel mundial desde los años de 1985 al 2010.....       | 43 |
| Figura 14. Panorama de casos de dengue en México por año, 2000-2011.....                                                                                     | 45 |
| Figura 15. Áreas con casos de dengue en México.....                                                                                                          | 46 |
| Figura 16. Productos utilizados en el control químico de <i>A. aegypti</i> .....                                                                             | 48 |
| Figura 17. Morfología de <i>M. anisopliae</i> .....                                                                                                          | 51 |

|                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 18. Medias de sobrevivencia de hembras de <i>A. aegypti</i> confinadas con un macho virgen contaminado con conidias de <i>B. bassiana</i> . .....                                      | 56 |
| Figura 19. Proporción de cuatro categorías de hembras de <i>A. aegypti</i> confinadas con un macho contaminado con conidias de 2 cepas de <i>B. bassiana</i> .....                            | 57 |
| Figura 20. Proceso de auto-diseminación de conidias de <i>M. anisopliae</i> de machos a hembras de <i>A. aegypti</i> .. .....                                                                 | 58 |
| Figura 21. Curvas de sobrevivencia de <i>A. aegypti</i> expuestos durante 48 h a una concentración de $6 \times 10^9$ conidias secas $m^{-1}$ . .....                                         | 58 |
| Figura 22. Rango de diseminación del virus del dengue desde el intestino medio hasta cabeza.....                                                                                              | 60 |
| Figura 23. Tira de papel pellón como sustrato de oviposición de <i>A. aegypti</i> . .....                                                                                                     | 68 |
| Figura 24. Larvas de <i>A. aegypti</i> alimentándose de croquetas para perro finamente molidas. ....                                                                                          | 69 |
| Figura 25. Ilustración de la forma de los conidióforos de <i>M. anisopliae</i> . Tomada de Goettel y Inglis (1997). .....                                                                     | 70 |
| Figura 26. Órganos reproductores disecados de <i>A. aegypti</i> para el conteo de espermatozoides.....                                                                                        | 74 |
| Figura 27. Media ( $\pm$ ES) de la proporción de la sobrevivencia acumulativa basada en los valores de probabilidad calculados mediante el modelo de Kaplan-Meier.....                        | 80 |
| Figura 28. Media ( $\pm$ SE) del número relativo de espermatozoides producidos durante 5 días por machos de <i>A. aegypti</i> contaminados y expuestos al hongo <i>M. anisopliae</i> .. ..... | 82 |
| Figura 29. Comparación del tiempo total requerido por machos de <i>A. aegypti</i> para copular sucesivamente con 5 hembras.. .....                                                            | 83 |
| Figura 30. Tiempo inter-cópula registrado en machos de <i>A. aegypti</i> confinados sucesivamente con 5 hembras vírgenes.. .....                                                              | 84 |

|                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 31. Conidias de <i>M. anisopliae</i> pegadas sobre la cutícula de los tarsos delanteros de un macho.. .....                 | 85  |
| Figura 32. Estación biológica (fabricado por grupo Xaxeni®, Edo. de México, México) utilizada en los bioensayos de semi-campo..... | 101 |
| Figura 33. Media ( $\pm$ EE) de las 4 categorías de hembras confinadas con un macho contaminado y un macho sano.. .....            | 104 |
| Figura 34. Machos de <i>A. aegypti</i> utilizados para determinar la competencia intra-sexual.. .....                              | 105 |
| Figura 35. Media ( $\pm$ EE) de las 5 categorías de hembras confinadas con machos contaminados y machos sanos.....                 | 106 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>A. aegypti</i> según el NCBI. ....                                               | 24 |
| Cuadro 2. Duración del coito en <i>A. aegypti</i> . Tomado de Jones y Wheeler (1965). .                                   | 38 |
| Cuadro 3. Presencia de inseminación durante cópulas interrumpidas en <i>A. aegypti</i> ..<br>.....                        | 39 |
| Cuadro 4. Comparación de la capacidad de inseminación de diferentes poblaciones<br>de machos de <i>A. aegypti</i> .. .... | 40 |
| Cuadro 5. Detección de poliandria en hembras de <i>A. aegypti</i> con numerosos ciclos<br>gonotróficos.....               | 41 |
| Cuadro 6. Entidades mexicanas más afectadas por casos de dengue durante julio de<br>2012. ....                            | 46 |
| Cuadro 7. Clasificación taxonómica de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> .....                                     | 52 |

## 1. JUSTIFICACIÓN

El virus del dengue (DENV) es un flavivirus con 4 variantes serológicas transmitidas a los seres humanos por la picadura de hembras infecciosas de *Aedes aegypti* y *A. albopictus*; ambos considerados como vectores primario y secundario, respectivamente (Halstead, 2007). El DENV se considera el arbovirus (acrónimo del inglés *arthropod borne viruses*) más importante del mundo ya que en las últimas 2 décadas su incidencia se ha incrementado más de 30 veces debido a la creciente expansión demo-geográfica y se estima que alrededor del 50% de la población mundial está en riesgo de contraer la enfermedad (Gubler, 2002). Anualmente se registran entre 50 a 100 millones de casos de dengue a nivel mundial, con un índice de mortalidad mayor al 2.5 % (Bhatt *et al.* 2013). Debido a la carencia de una vacuna o de fármacos anti-virales (Thisyakorn y Thisyakorn), la única estrategia para el control del DENV es por medio de la eliminación de las poblaciones del vector (Rodríguez-Pérez *et al.* 2012). Ésta se lleva a cabo mediante la educación comunitaria para eliminar criaderos larvales y por la aplicación de larvicidas y adulticidas químicos, ambos suministrados por las secretarías de salud correspondientes a cada zona urbana/rural que es históricamente endémica al DENV (San Martín y Brathwaite, 2007). Sin embargo, ambos métodos son inefectivos debido a que la comunidad no coopera al control cultural (eliminación de cacharros) y la aplicación indiscriminada de insecticidas químicos tiene como consecuencia que las poblaciones del vector generen resistencia a estos productos (Macoris *et al.* 2003, Gubler 2011). No obstante, desde hace más de 5 años, expertos mundiales examinaron detalladamente los estudios publicados sobre el control

vectorial con insecticidas químicos y concluyeron que hasta la fecha, no se ha demostrado con rigor científico que los insecticidas disminuyan las poblaciones del vector a tal grado de interrumpir los ciclos de transmisión del DENV, ya que cada año el dengue sigue siendo re-emergente (Esu *et al.* 2010). Esta situación aunada a los altos índices de la arbovirosis, fundamenta y justifica la urgencia de buscar opciones alternas para llevar a cabo un control eficiente del vector, sin generar problemas ambientales o de resistencia a químicos. Por ello, se ha pensado en el biocontrol, utilizando depredadores, patógenos y parásitos naturales para la regulación de las poblaciones de insectos (WHO, 1982).

Se han documentado ampliamente estrategias alternativas de biocontrol como es el uso de: 1) depredadores (copépodos, larvas de *Toxorhynchites spp.*, peces y nematodos), 2) extractos de plantas y 3) microorganismos (bacterias, protozoarios, virus y hongos) (Rodríguez-Pérez *et al.* 2012, WHO, 1982). Sin embargo, estos métodos están enfocados al control larvario y no orientados hacia la fase adulta que es la que funge como vector del DENV. Sin embargo, desde hace más de una década, equipos mundiales de investigación se han enfocado en estudiar a los hongos entomopatógenos como una herramienta prometedora para el biocontrol de mosquitos vectores de enfermedades (Rodríguez-Pérez *et al.* 2012, Scholte *et al.* 2005). Recientemente, el hongo *M. anisopliae* ha sido altamente estudiado a nivel mundial para el biocontrol de mosquitos vectores (Scholte *et al.* 2003, Scholte *et al.* 2004, Scholte *et al.* 2006, Scholte *et al.* 2007, Howard *et al.* 2010) incluyendo al vector del dengue *A. aegypti* (Scholte *et al.* 2007, de Paula, *et al.* 2008). Se ha

documentado que las micosis causan daños en la capacidad vectorial de los mosquitos, disminuyendo significativamente la mortalidad y fecundidad (Scholte *et al.* 2006, Garza-Hernández *et al.* 2013). Sin embargo, en esos estudios se evaluó la infección exponiendo mosquitos directamente a superficies impregnadas con conidias (Farenhorst y Knols 2010). Los resultados fueron alentadores, pero se ha documentado que exposiciones frecuentes a altas dosis de conidias (mayores a  $1.6 \times 10^{10}$  conidias/m<sup>2</sup>) pueden causar alteraciones en el sistema inmunológico generando anticuerpos de defensa relacionados con enfermedades respiratorias (alergias y asma) en los humanos (Barbieri *et al.* 2005, Ward *et al.* 2011). Por ello, se buscó una alternativa para la diseminación de conidias intra-domiciliarmente, la cual se realizó en fase de laboratorio utilizando machos de *A. aegypti* contaminados con conidias de *B. bassiana* (García-Munguía *et al.* 2011) o *M. anisopliae* (Reyes-Villanueva *et al.* 2011).

Los resultados derivados de tales investigaciones fueron muy prometedores, sin embargo, no han sido registradas a nivel de laboratorio y semi-campo las variables que interfieren el comportamiento poligámico de los machos de *A. aegypti* para transmitir conidias a las hembras. Además, se desconoce la cantidad de conidias que los machos adquieren después de ser contaminados con *M. anisopliae*, ni las cargas conidiales que estos machos transfieren a las hembras durante la cópula. De igual manera se desconoce qué sucede con la espermatogénesis de los machos contaminados con conidias. Además, se desconoce qué sucede con la

autodiseminación en semi-campo, y qué sucede cuando se presenta la competencia intra-sexual entre machos contaminados con el hongo y sanos.

Por consiguiente, estos parámetros aún no evaluados ayudarán a comprender mejor el comportamiento y desempeño sexual de los machos de *A. aegypti* durante la autodiseminación de conidias de *M. anisopliae* con el fin de llevar esta tecnología a campo y optarla en las campañas de control vectorial del virus del dengue.



## 2. OBJETIVOS

### Objetivo general

Analizar las variables relacionadas con el comportamiento de cópula en machos de *A. aegypti* durante la auto-diseminación de *M. anisopliae* en condiciones de laboratorio y semi-campo.

### Objetivos específicos

1. Realizar una revisión de los antecedentes más relevantes de la bionomía de *A. aegypti*, comportamiento de cópula, epidemiología actual del dengue, su biocontrol y la auto-diseminación de *M. anisopliae* (capítulo I).
2. Estimar la sobrevivencia y la tasa de infección en machos vírgenes expuestos por 24 horas a  $6 \times 10^8$  conidias mL<sup>-1</sup> de *M. anisopliae* (capítulo II).
3. Determinar la media ( $\pm$  EE) de conidias que un macho virgen adquiere después de ser confinado por 24 horas con  $6 \times 10^8$  conidias ml<sup>-1</sup> de *M. anisopliae* (capítulo II).
4. Estimar la media ( $\pm$ EE.) de conidias que las hembras adquieren durante 5 cópulas sucesivas con un solo macho contaminado con conidias de *M. anisopliae* (capítulo II).

5. Estimar los intervalos en minutos (media  $\pm$  EE) para que machos contaminados por 2 y 24 horas realice 5 cópulas sucesivas. (capítulo II).
6. Estimar la tasa de espermatozoides diaria en machos contaminados con conidias de *M. anisopliae* (capítulo II).
7. Registrar en semi-campo y en una población finita de hembras de *A. aegypti*, la tasa de auto-diseminación del hongo *M. anisopliae* entre un macho contaminado con conidias y uno sano (capítulo III)
8. Registrar en una población finita de hembras de *A. aegypti* la tasa de auto-diseminación del hongo *M. anisopliae* utilizando diferentes poblaciones de machos contaminados con conidias (capítulo III).

### **3. HIPÓTESIS**

El comportamiento poligámico sexual de machos de *Aedes aegypti* no se perderá ni disminuirá debido a la patogenicidad del hongo *Metarhizium anisopliae*. Además la competencia intra-sexual a nivel de semi-campo será igual entre machos contaminados con conidias y sanos.

#### **4. CAPÍTULO I**

**Revisión de literatura acerca de la epidemiología del dengue, de la biología, ecología y control de *Aedes aegypti* con el uso de *Metarhizium anisopliae***

## **El dengue: la enfermedad, una descripción general**

El Dengue es la arbovirosis más importante de las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Monath, 1994). Es una enfermedad causada por un virus (DENV) de RNA del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* con 4 variantes serológicas: DENV-1, DENV-2, DENV-3 Y DENV-4 y para los cuales no se existe cura ni vacuna (Whitehead *et al.* 2007, Bhatt *et al.* 2013, Halstead 2013). *A. aegypti* (Linneo) y *A. albopictus* (Skuse) son los principales vectores y son clasificados como primario y secundario, respectivamente (Kamgang *et al.* 2012). En México, el DENV es hiperendémico dado que circulan los 4 serotipos (Ibáñez-Bernal *et al.* 1997), y ambos vectores se encuentran en el país compitiendo en ciertas zonas geográficas rurales y urbanas (Ibáñez-Bernal y Martínez-Campos 1994, Reyes-Villanueva *et al.* 2013); por lo que es la enfermedad más importante transmitida por artrópodos vectores debido a su alta morbilidad y descontrol (Dantés *et al.* 2014, Torres-Galicia *et. al.* 2014).

## **Historia del dengue**

La palabra dengue deriva de la lengua nativa Suajili (dialecto Africano que se habla en Tanzania y Kenia) “*ki denka pepo*” lo que quiere decir “convulsión por calambre causada por un espíritu maligno” (Brown, 1996). Según Nobuchi (1979), probablemente el primer reporte registrado históricamente sobre dengue fue en China entre los años de 265 a 420 a. C. y publicado durante la dinastía Chin; fue una enfermedad llamada “agua venenosa” ya que esa enfermedad estaba asociada a “mosquitos emergentes del agua”. Posteriormente Rush (1789) enfatiza en que las

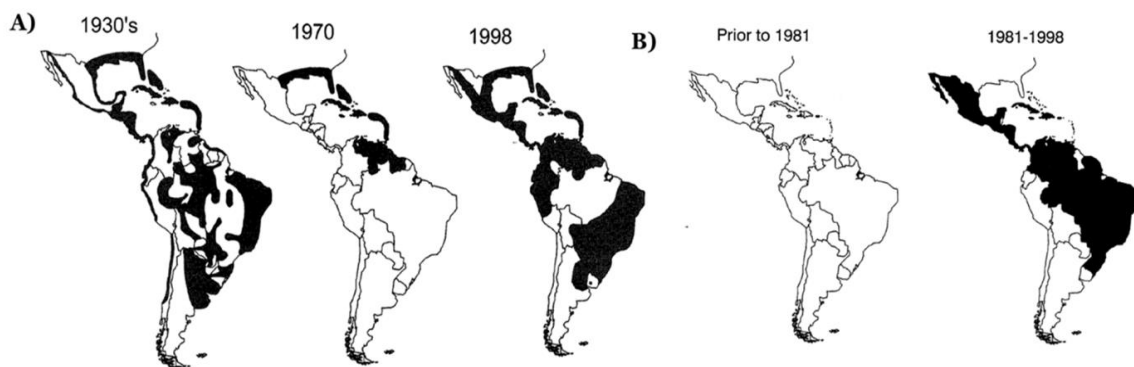
primeras notas sobre dengue fueron por descripciones médicas sospechosas a esta enfermedad y ocurridas a mediados y finales del siglo XVIII. Mientras que los primeros reportes de grandes epidemias confirmadas por dengue fueron en las indias francesas del oeste en 1635 y en Panamá en 1699, posteriormente entre los años de 1779 y 1780 en Batavia (Qakarta), Cairo y Philadelphia, indicando que su dispersión mundial comenzó hace más de 200 años (Gubler 1998, Ligon 2004).

Es de gran importancia resaltar que el médico Cubano Carlos Juan Finlay y Barrés (Camagüey, Cuba, 3 de diciembre de 1833 – La Habana, Cuba, 19 de agosto de 1915) descubrió y describió por primera vez la importancia del vector infeccioso a través de la teoría metaxénica de la transmisión de enfermedades por agentes biológicos, aplicándola a la fiebre amarilla y dengue. En sus notas científicas, él propuso que la fiebre amarilla y dengue son transmitidos por un agente causal, el mosquito *A. aegypti*, sin embargo sus teorías estuvieron en duda por la comunidad científica, y esto pasó desapercibido mundialmente (Delgado-García 2010).

Después, trabajo similar al del Dr. Finlay, en 1903 en Beirut, Siria, el científico H. Graham describió que el dengue no es una enfermedad contagiosa cuando hay ausencia de mosquitos. En su trabajo, Graham aisló pacientes que fueron recién picados por mosquitos que se habían alimentado de enfermos y determinó que a los 6 días comienza la etapa febril; 15 años más tarde, en 1918, J. B. Cleland, B. Bradley, W. MacDonald demostraron claramente que *A. aegypti* es el

vector del dengue (Dwight, 1975). Durante la segunda guerra mundial (década de los 40's), se describió y publicó que *A. aegypti* es el vector del dengue, que existían distintos serotipos circulantes y que es una enfermedad emergente asociada a las regiones tropicales (Wilder-Smith y Gubler 2008).

Posteriormente se describieron epidemias de dengue y dengue hemorrágico en Manila, Filipinas durante los años de 1953 a 1954. Después en la década de los 60's, el dengue se esparció drásticamente en las islas del Pacífico y en las Américas (Figura 1) causando graves epidemias (Gubler, 2002).



**Figura 1. Distribución de *A. aegypti* en las Américas en 1930, 1970 y 1998.** (A) Situación del dengue hemorrágico en las Américas desde antes de 1981 a 1998 (B). Tomada y editada de Gubler (1998).

### **Distribución geográfica y clasificación taxonómica de *A. aegypti***

*A. aegypti* es una de las especies más importantes de la familia *Culicidae*, del orden Díptera, y su primera descripción taxonómica fue realizada por Linneo en 1762 (Christophers, 1960). Es un mosquito originario del cinturón tropical Africano

donde vive naturalmente en la selva y deposita sus huevos en huecos naturales o artificiales con agua (Christophers 1960, Moore *et al.* 2013). Es una especie cosmopolita y debido a su comportamiento altamente endofágico y antropofílico se explica su primer lugar como vector del dengue en el mundo (Christophers 1960). Su distribución ocurre a lo largo de las regiones tropicales y subtropicales, es decir, habita entre los paralelos 35°N y 35°S (Fig. 2), y por debajo de los 1200 MSNM, aunque existen registros donde se ha encontrado el lugares de hasta los 2400 MSNM (Rogers *et al.* 2011).



**Figura 2. Distribución geográfica de *A. aegypti*;** las líneas punteadas delimitan los paralelos de distribución Tomada de: WHO, 2012; <http://apps.who.int/ithmap/>.

Su clasificación taxonómica según: “The National Center for Biotechnology Information” (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se muestra en el cuadro 1.

**Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *A. aegypti* según el NCBI.**

|                                  |
|----------------------------------|
| <b>Clasificación Taxonómicas</b> |
|----------------------------------|



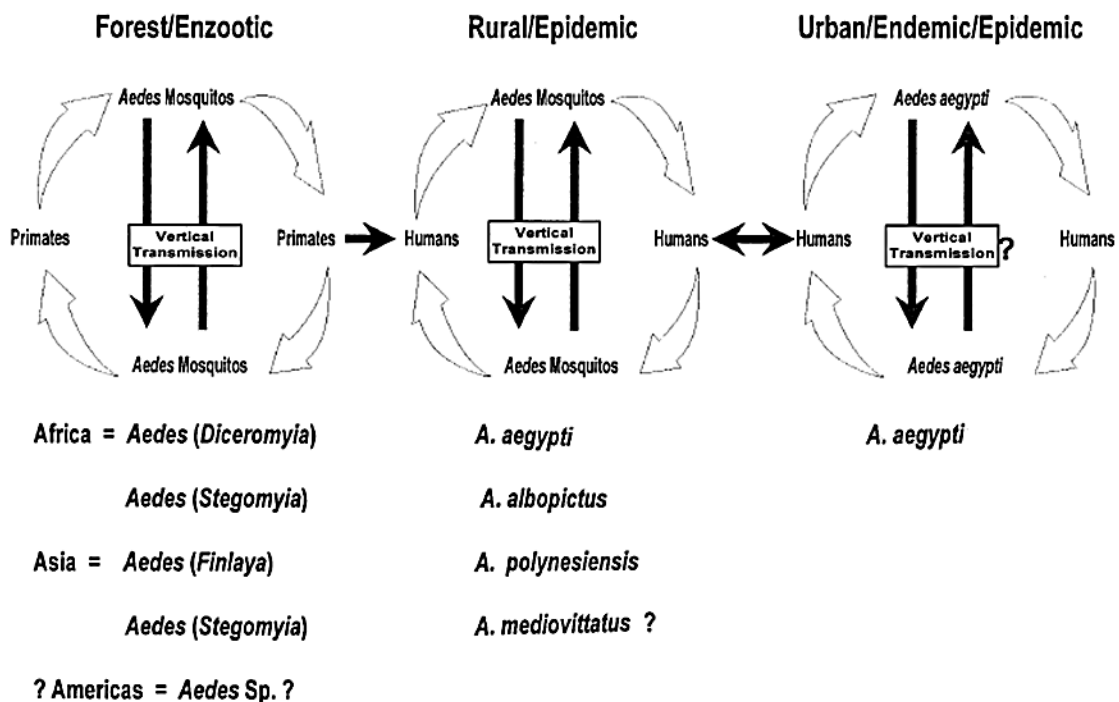
|           |                  |
|-----------|------------------|
| Reino     | <i>Animalia</i>  |
| Phyllum   | <i>Artropoda</i> |
| Clase     | <i>Insecta</i>   |
| Orden     | <i>Diptera</i>   |
| Familia   | <i>Culicidae</i> |
| Género    | <i>Aedes</i>     |
| Subgénero | <i>Stegomyia</i> |
| Especie   | <i>aegypti</i>   |

### **Ciclos de transmisión del virus del dengue**

La transmisión enzoótica del virus del dengue (DENV) (Figura 3) se lleva a cabo exclusivamente en las zonas selváticas mediante una transmisión local (sin diseminarse a aéreas urbanas) entre los primates inferiores y mosquitos endémicos del género *Aedes spp.* (Gubler, 1998, Rodríguez-Pérez *et al.* 2012). Sin embargo, la transmisión puede cambiar a ciclos epidémicos, donde el dengue se disemina a través de comunidades rurales aisladas o a islas donde la población humana es muy baja e inmunológicamente susceptible favoreciendo la diseminación viral, la cual desaparece rápidamente debido al aumento de la inmunidad de la población, es decir, crean anticuerpos de memoria para el DENV (Gubler, 1998).

No obstante, el ciclo de transmisión más importante, desde el punto de vista de salud pública, ocurre en las zonas endémicas/epidémicas de las regiones tropicales. En estas zonas los virus son mantenidos en el modelo de transmisión horizontal: mosquito-humano-mosquito- humano-mosquito, etc. (Figura 3), donde a menudo, múltiples serotipos circulan dentro de una zona geográfica

(hiperendemicidad) (Gubler, 1998, Rodríguez-Pérez *et al.* 2012). Recientemente, en Tailandia y con ayuda de pruebas de biología molecular, científicos han aislado de un paciente febril, un nuevo serotipo del dengue, clasificado como DENV-5, no obstante este serotipo está estrictamente confinado a los ciclos de transmisión selváticos (Normile, 2013).



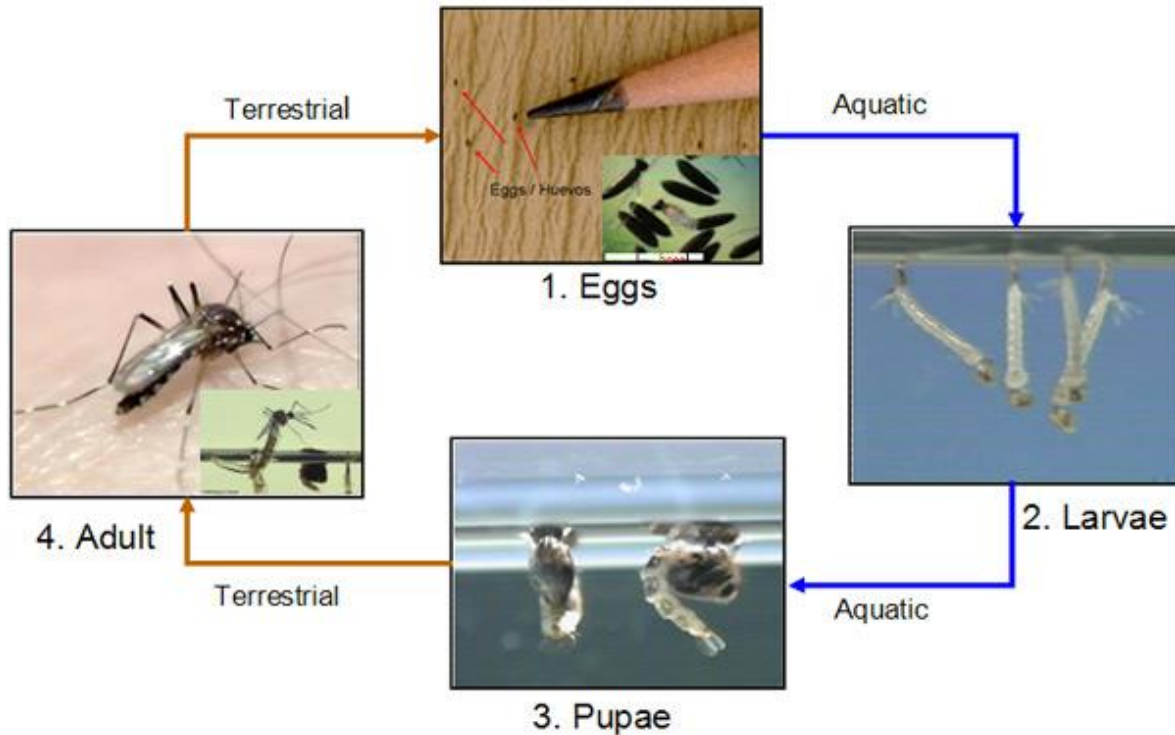
**Figura 3. Ciclos de transmisión del virus del dengue.** Tomada de (Gubler, 1998).

Además del ciclo de transmisión horizontal, se ha reportado que existe la transmisión transovárica o vertical donde el modelo viral es: *A. aegypti*- *A. aegypti* (Martins *et al.* 2012). En Oaxaca, México, se ha reportado este tipo de transmisión viral de los serotipos 2, 3 y 4 (Torres-Galicia *et al.* 2014).

En zonas urbanas *A. aegypti* es el vector primario debido a su alta antropofilia, endofagia y endofilia (Pates y Curtis 2005), *A. albopictus* es secundario y prefiere zonas rurales y sombreadas por su menor antropofilia y endofagia, y por el contrario que *A. aegypti*, *A. albopictus* es mayormente exofágico y zoofílico (Bevins, 2008). En el noreste de México, coexisten actualmente ambas especies, compitiendo intrínsecamente por el hábitat y los hospederos (Reyes-Villanueva *et al.* 2013).

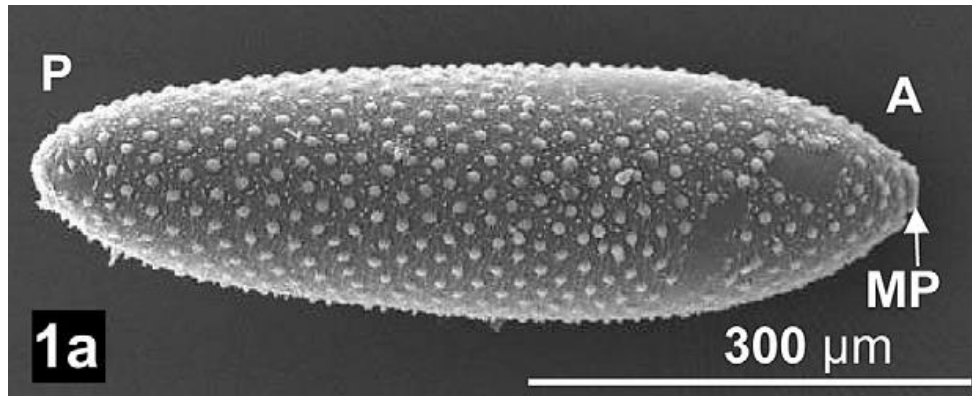
### **Bionomía de *A. aegypti***

*A. aegypti* es una especie altamente antropofílica, endofílica y endofágica (Gluber, 1998). Su ciclo biológico (Figura 4) comienza cuando las hembras grávidas ovipositan en el margen inmediato a la superficie de agua limpia y almacenada en neumáticos, baterías viejas, botellas, floreros, macetas, etc. (Gluber, 1998).



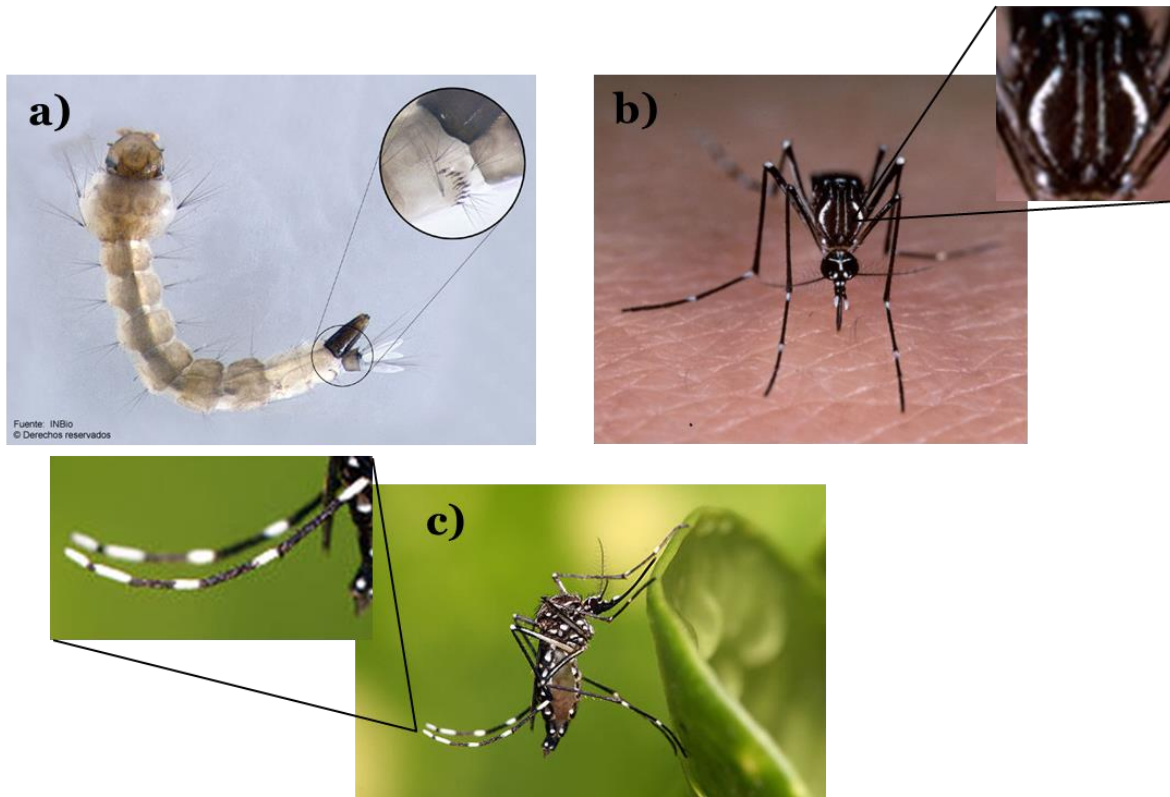
**Figura 4. Ciclo de vida del vector primario del dengue *A. aegypti*.**  
Tomado de: [http://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m\\_lifecycle.html](http://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m_lifecycle.html).

Durante la embriogénesis, los huevos son de color blanco y de un promedio de  $625.65 \mu\text{m}$  ( $\pm 19.91$ ) mm de largo y  $155.45 \mu\text{m}$  ( $\pm 14.86$ ) de ancho (Figura 5), después de 2-3 días se tornan negros para posteriormente eclosionar si las condiciones ambientales son las óptimas (Suman *et al.* 2011), de lo contrario pueden sobrevivir a la desecación y temperaturas extremas por un periodo promedio de hasta 7 meses (Christophers 1960).



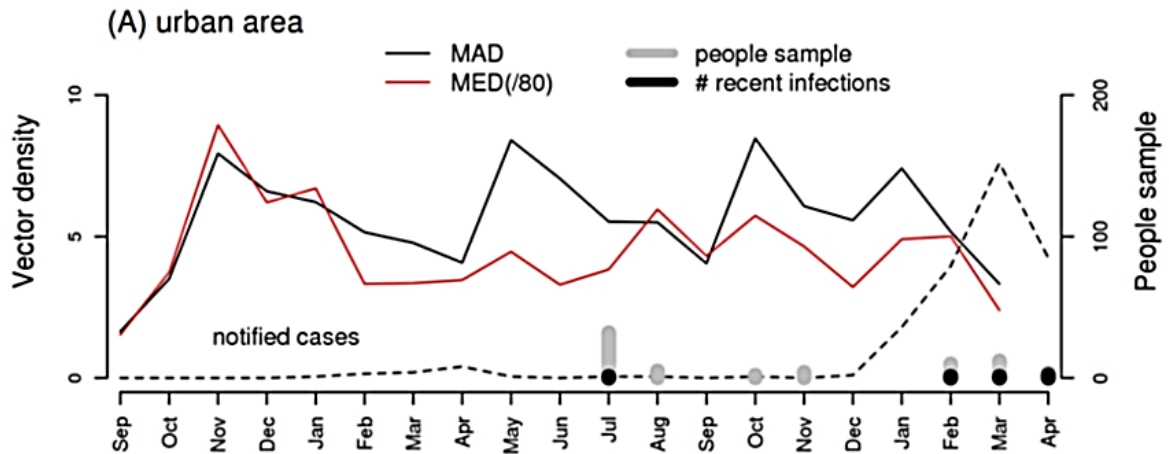
**Figura 5. Micrografía de barrido de un huevo de *A. aegypti*.** Tomado de Suman *et al.* (2011).

Después que una larva eclosiona pasa por cuatro estadios o fases de muda, comenzando con una longitud de aproximadamente 1 mm hasta alcanzar de 6 - 7 mm en su última muda; su morfología típica es la de poseer fuertes espículas torácicas laterales quitinizadas, un peine de escamas unilineal en el octavo segmento y un sifón corto, que se destaca por su color negro [Andrew y Bar \(2013\)](#) (Figura 6a). Su alimentación consiste principalmente de zoo y fitoplancton. Después, se transforma en pupa y su desarrollo se completa en un periodo de 1 a 3 días a una temperatura variable entre de 28 y 32°C (Christophers 1960). El adulto es un mosquito de color negro, con diseños blanco-plateados formados por escamas claras que se disponen en forma de 'lira' en el pronotum (Figura 6b), también tienen un anillado color plateado-blanco a nivel de tarsos, tibia y fémures (Figura 6c) (Christophers 1960).



**Figura 6. Morfología de *A. aegypti*.** a) larva con espículas en la parte anterior del sifón, b) pronotum con forma de lira y c) tarsos blancos.

El vuelo de dispersión de esta especie es aproximadamente 100 m, por lo que viven restringidamente en un área doméstica hasta su muerte, y por lo que los casos de dengue comúnmente están asociados a una vivienda o en agregados de viviendas, tomando como punto céntrico una con casos positivos al DENV (Figura 7) (Yoon *et al.* 2012, Honório *et al.* 2009). La hembra casi siempre pasa su vida cerca del sitio de emergencia, principalmente si existen buenas condiciones físicas y disponibilidad de alimento (Christophers 1960). La dispersión de los machos es igualmente corta y éstos se alimentan del néctar de flores o de otra fuente de azúcares (Christophers 1960).



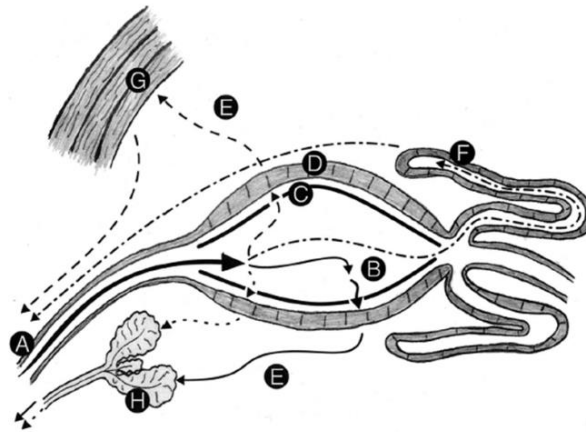
**Figura 7. Series de tiempo de casos de dengue, número de casos recientes y abundancia de *A. aegypti* en una zona urbana de Rio de Janeiro, Brasil.** MAD: media de adultos y MED (/80): media de huevos de *A. aegypti*. Tomado de (Honório *et al.* 2009).

### Competencia vectorial de *A. aegypti*

En mosquitos, la competencia vectorial está definida como la capacidad de infectarse con un patógeno, permitir su reproducción y/o replicación y transmitirlo hacia la población huésped, y esta característica depende de factores intrínsecos y extrínsecos (Hardy *et al.* 1983). Se define como periodo de incubación extrínseca (PIE), el tiempo que transcurre desde la picadura de una hembra virémica hasta que el virus llega a glándulas salivales y los días entre dos alimentaciones a repleción o entre dos oviposiciones, se denomina ciclo gonotrófico (CG) (Christophers 1960).

Por otro lado, *A. aegypti* es un mosquito competente en transmitir todos los serotipos del DENV (Henchal y Putnak 1990). Esta habilidad (competencia

vectorial) de propagar el DENV horizontalmente comienza cuando el mosquito se alimenta de sangre virémica de un hospedero, la cual llega al intestino medio (IM); posteriormente el virus atraviesa las barreras de competencia vectorial (Figura 8), primeramente la barrera del IM donde se replica en el epitelio, después sale por la barrera de escape del IM para replicarse por segunda vez en tejidos grasos. Finalmente atraviesa el hemocele para llegar a las glándulas salivales y poder transmitirlo a un hospedero; estas barreras intrínsecas, son las responsables de determinar la competencia vectorial del DENV (Bosio *et al.* 1998).



**Figura 8. Rutas migratorias y sitios de desarrollo para la propagación del DENV.** De A) hasta H) son los sitios de desarrollo del virus y son representados con líneas. Ingestión de la sangre virémica (A), el virus (—) entra al intestino medio (IM) (B), posteriormente a las células del epitelio del IM (D), se replica, sale de las células y viaja en hemocele (E) hasta glándulas salivales (H), donde se replica nuevamente. El DENV reside ahí hasta que es inyectado a un nuevo hospedero humano. (Las letras C, G y F se refieren a la ruta de infección para los parásitos de la Malaria). Tomado de Beerntsen *et al.* (2000).

Además de las barreras de competencia vectorial, existen otros factores intrínsecos que afectan la transmisión horizontal del DENV como son innumerables factores poligénéticos de *A. aegypti*, la carga viral y el origen geográfico del DENV.



También, los factores extrínsecos (ambientales) como la disponibilidad de alimento en la etapa larval, el tamaño corporal del mosquito adulto, patógenos en el mosquito, temperatura, humedad relativa, etc. afectan la competencia vectorial del DENV. (Alto *et al.* 2008, Bosio *et al.* 1998).

Por otro lado, en culícidos, cuando existe congruencia entre una sola alimentación de sangre y una oviposición para un CG, se denomina concordancia gonotrófica. Y si la hembra se alimenta en varias ocasiones de manera parcial (“pre-gravidez”) o completa y tiene varias oviposiciones, el vector tiene discordancia gonotrófica (Swelengrebel, 1929, Gillies, 1955). *A. aegypti* es discordante debido a la ingesta de comidas múltiples (MacDonald, 1956). También el tamaño corporal se relaciona con el volumen de sangre ingerida y cuando la longitud alar es < 2.7 mm esa hembra requerirá una 2da comida a repleción en 24-36 h (Feinsod y Spielman, 1980). Según Alto *et al.* (2008), el PIE está positivamente correlacionado con el tamaño corporal de los mosquitos, y este es dependiente de la densidad larvaria, competencia inter o intra-específica y disposición de alimento.

### **El comportamiento sexual de *A. aegypti***

Charles R. Darwin en 1874 y posteriormente Angus J. Bateman en 1948, definen que la reproducción y el “*fitness*”, son características evolutivas muy

importantes en la vida de un organismo, incluyendo los insectos; en términos de comportamiento sexual, se define “*fitness*” como una medida relativa cuantitativa que estima el éxito reproductivo de un organismo (o de un genotipo) comparado con otro organismo (o de un genotipo) o grupo de organismos (o de genotipos), en consecuencia hay muchas variables competitivas en el comportamiento sexual de una especie (Emlen y Orings 1977, Bonduriansky 2001), en este caso en *A. aegypti*.

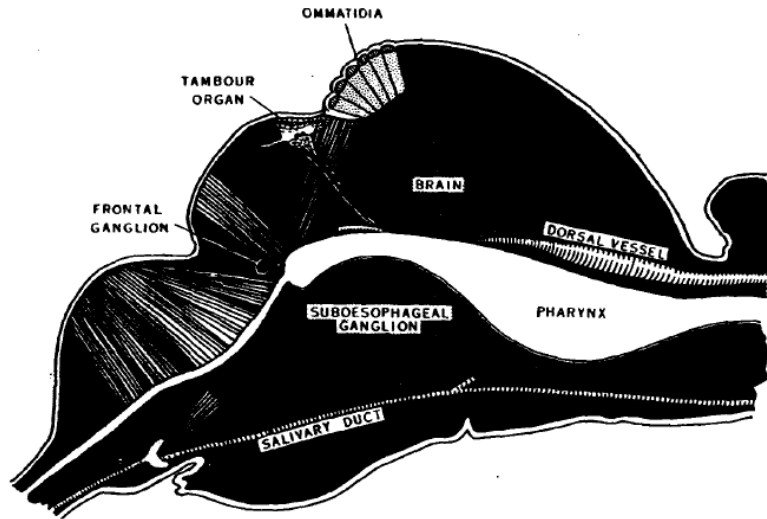
### **Antecedentes destacados en el estudio del comportamiento sexual en *A. aegypti***

Según (Jones y Pilitt (1973)), la primera descripción documentada del comportamiento de cópula en *A. aegypti* fue publicada por Godeheu de Riville en 1760. Fue Louis M. Roth en 1948 quien realizó un estudio amplio sobre las variables cuantitativas y cualitativas del comportamiento reproductivo de *A. aegypti* como es el proceso de reconocimiento intra-específico macho-hembra. Spielman (1964) describió con detalle los mecanismos de unión de los aparatos sexuales externos del macho y la hembra durante la cópula. Posteriormente Jones y Wheeler (1965) realizaron un estudio muy detallado sobre los factores involucrados durante el coito y re-exploró los periodos de cópula en espacios libres intra-domicilio (Jones y Pilitt 1973). Ponlawat y Harrington (2007) realizaron estudios más específicos sobre el “*fitness*” de los machos, donde demostraron que la edad y el tamaño corporal influyen directamente en la espermatogénesis. Subsecuentemente, Ponlawat y Harrington (2009) determinaron que la edad y tamaño corporal están asociados al éxito reproductivo dependiente del número de inseminaciones de los machos.

Actualmente existe una extensa información disponible acerca del comportamiento sexual de *A. aegypti*, sin embargo, hasta la fecha son muy pocos los estudios que se han llevado a cabo describiendo las poblaciones silvestres del vector.

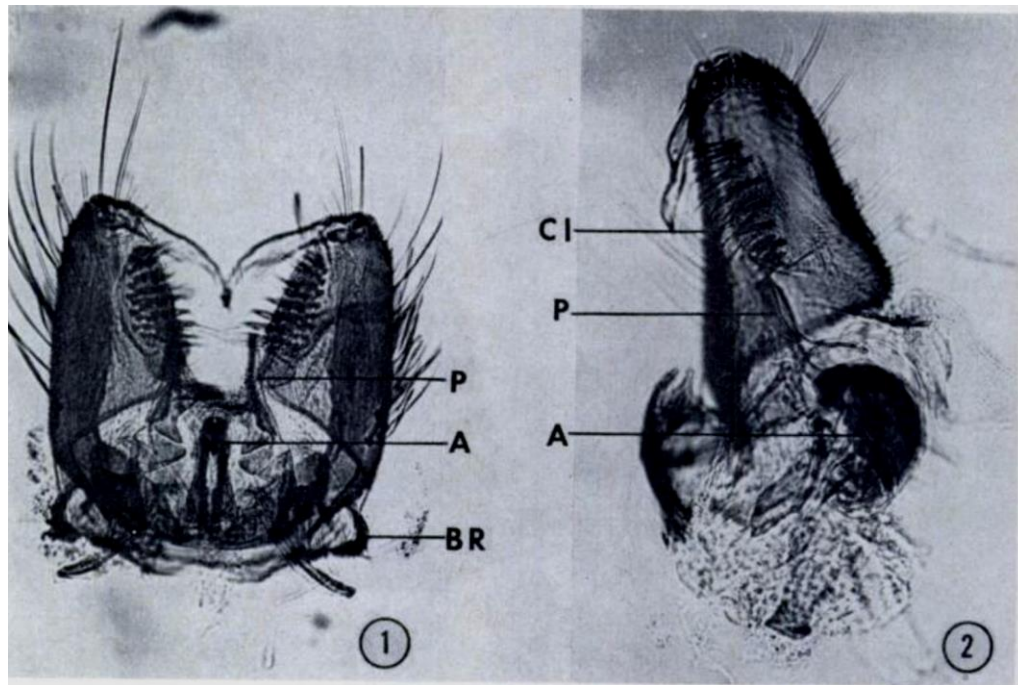
### **El proceso de cópula en *A. aegypti***

A diferencia del comportamiento de los Anophelinos, que generalmente copulan al aire libre y en grandes enjambres que se forman al crepúsculo del día, *A. aegypti* suele copular intra-domiciliarmente, en bajas densidades y cerca de los humanos (Hartberg 1971). La cópula comienza cuando los machos usan el órgano de Tambour (correctamente llamado “*Antennal pulsating organ*” (Harbach y Knight 1981) o Johnston's organ (Johnston 1855) localizado en las antenas (Figura 9), como fonoreceptores para detectar las vibraciones alares del vuelo de las hembras (Day 1955); se ha demostrado que los machos detectan 380 Hz de frecuencia provenientes del vuelo de las hembras (Göpfert *et al.* 1999). Esta frecuencia detectada por los machos, es la señal sexual primaria para la localización de una hembra para abordarla con precisión durante el vuelo (Roth, 1948).

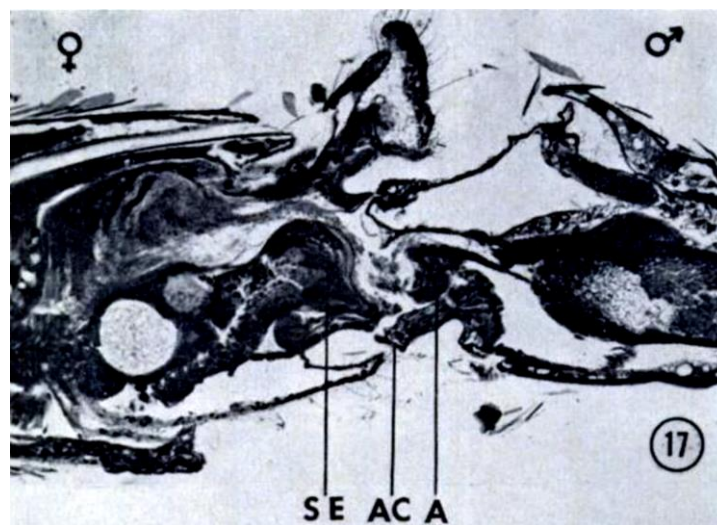


**Figura 9. Sección longitudinal de la cabeza de un macho de *A. aegypti* mostrando el sitio donde se localiza el órgano de Tambour.** Tomado de Day (1955).

Durante el abordaje y para hacer contacto genital, el macho utiliza sus tarsos delanteros para sostener a la hembra de los fémures de las patas traseras, así el macho puede colocarse en 2 posturas, “*belly-to-belly*” y/o “*face-to-face*” y con arreglos corporales que varían de los 45° a 90° (Jones y Pilitt 1973, Spielman, 1964). Después, los *claspers* del macho enganchan la *cerci* de la hembra (Figura 10) para que el lóbulo basal de los *claspers* sea introducido al plato post-genital de la hembra (Spielman, 1964). Así, el *aedeagus* es insertado en la entrada hacia la espermoteca para eyaculación (Figura 11) y terminar con el coito (Jones y Wheeler 1965).



**Figura 10. Aspecto ventral de los clasplers de un macho virgen de *A. aegypti*.** Iniciales: P= Paraprocto, A= Aedeagus BR= Anil basal y CL= Clasper. Tomado de Spielman (1964).



**Figura 11. Fotografía de un corte histológico sagital de la unión de los aparatos sexuales de un macho virgen (derecha) y una hembra (izquierda) en *A. aegypti*.** Iniciales: A: aedeagus, AC: cono anal y SE: entrada a espermateca. Tomado de Spielman (1964).

Se han hecho estudios sobre la carga de esperma en espermatecas y se ha observado que del tiempo del coito durante el proceso de apareamiento dura entre 2 y 22.8 s. (Cuadros 2 y 3). Sin embargo, esto es muy variable con tiempos de cópula con rangos de 4 a 59 s, teniendo un promedio de 16 s (Roth 1948).

**Cuadro 2. Duración del coito en *A. aegypti*.** Tomado de Jones y Wheeler (1965).

**TABLE II**  
*Copulatory behavior and potency of a single six-day-old male Aedes aegypti when offered 12 virgin females in a 20-minute period*

| Virgin female number<br>in order of presenta-<br>tion to the male | Seconds of coitus | Notes                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                                                 | 10.2              | Female escaped after coitus                                                                             |
| 2                                                                 | 13.6              | Bursa full; 2 thecae with sperm                                                                         |
| 3                                                                 | 14.2              | Bursa partially filled; 2 thecae with sperm                                                             |
| 4                                                                 | 22.4              | Bursa partially filled; 1 theca with sperm                                                              |
| 5                                                                 | 10.8              | Female dislodged the male; female not inseminated                                                       |
| 6                                                                 | 68.0              | Uninseminated                                                                                           |
| 7                                                                 | 13.8              | Female dislodged male; female not inseminated                                                           |
| 8                                                                 | 25.8              | Uninseminated                                                                                           |
| 9                                                                 | —                 | Male repeatedly attempted to clasp female's terminalium but aedeagus did not erect                      |
| 10                                                                | 22.8              | Uninseminated                                                                                           |
| 11                                                                | —                 | Male repeatedly erected aedeagus but did not establish good genital contact; uninseminated              |
| 12                                                                | —                 | Male erected aedeagus but only feebly clasped female's cerci and did not establish good genital contact |

**Cuadro 3. Presencia de inseminación durante cópulas interrumpidas en *A. aegypti*.** Tomado de Jones y Wheeler (1965).

| Duration of mating (seconds) | Proportion of females containing semen |
|------------------------------|----------------------------------------|
| 1                            | 0/2                                    |
| 2                            | 3/10                                   |
| 3                            | 2/6                                    |
| 4                            | 4/9                                    |
| 5                            | 4/5                                    |
| 6                            | 6/6                                    |

Ahora bien, los machos de *A. aegypti* son poligámicos (Cuadro 4), es decir, copulan e inseminan a más de una hembra en su vida. Para ello, los machos acumulan líquido seminal en las glándulas accesorias y espermatozoides en la vesícula seminal (en los vasos deferentes). Estos componentes del semen se agotan al cuarto día; se ha reportado que durante los primeros 30 minutos del primer día, el macho cópula en rápida sucesión con 8 hembras vírgenes, y un promedio de 5.8 hembras quedan inseminadas; esto es 6 de 8, o sea el 75% de cópulas exitosas, después agota su semen, pero existen machos que pueden recuperar el semen con un día de inactividad sexual, mientras que otros requieren hasta 7 días (Roth 1948). También se han reportado machos con alta agresividad sexual y que después de 4 ciclos de 7 días c/u de cópula-inactividad sexual, inseminaron a lo largo de su vida un promedio de 17.6 hembras; de hecho, existe el récord de que un solo macho fue capaz de inseminar 21 hembras en *A. aegypti* en toda su vida (Foster y Lea 1975). Jones (1972) estimó que los machos pueden llegar a copular hasta 18 veces después de estar expuestos a 2 harems (grupos de hembras) en un periodo de 24 horas.

**Cuadro 4. Comparación de la capacidad de inseminación de diferentes poblaciones de machos de *A. aegypti*.** Tomado de (Foster y Lea 1973).

Table 2. Insemination capacity of male *Aedes aegypti*, comparing strains

| Strain                | Average no. of females inseminated per normal male* at each mating series and cumulatively† (in parentheses) |                        |                        |                        |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                       | 1st series (8 females)                                                                                       | 2nd series (5 females) | 3rd series (5 females) | 4th series (5 females) |
| University of Georgia | 5.8                                                                                                          | 3.7 (9.7)              | 3.2 (13.3)             | 2.5 (17.6)             |
| Athens                | 5.7                                                                                                          | 3.9 (10)               |                        |                        |
| Rockefeller           | 5.6                                                                                                          | 4.0 (9.8)              |                        |                        |

En el caso de las hembras de *A. aegypti* se ha tenido el concepto de que son monógamas, es decir, que son inseminadas por un solo macho de por vida (Craig 1967). La monogamia es inducida por los machos, debido a un complejo de proteínas reproductivas (mRGPs) sintetizadas en sus glándulas accesorias (PGRM). Este conjunto de glicoproteínas, que son llamadas “proteínas matronas”, son inyectadas durante el coito a la hembra para evitar una segunda inseminación; este mecanismo bloquea la entrada de semen en cópulas posteriores y vuelve a las hembras refractarias, es decir, incapaces de volver a ser inseminadas aunque ocurra otra cópula (Craig 1967, Sirot *et al.* 2008). No obstante, se ha comprobado que en situaciones especiales (por ejemplo, inseminaciones incompletas por la interrupción de la cópula), existe un cierto grado de poliandria, es decir, que pueden aceptar y utilizar espermatozoides de machos en su segundo coito (Gwadz y Craig 1970). Williams y Berger (1980) demostraron que existen múltiples cópulas después de 4 ciclos gonotrófico, es decir, que existe una relación entre la poliandria y la actividad



gonotrófica de las hembras (Cuadro 5). Spielman *et al.* (1967) reportaron que una hembra copuló por segunda ocasión y fue inseminada después de una semana de la primera cópula. Esto sugiere que las mRGP's "maduran" después de 6 h para evitar la inseminación múltiple, sin embargo esto es variable y puede tardar hasta 7 días (Spielman *et al.* 1967).

**Cuadro 5. Detección de poliandria en hembras de *A. aegypti* con numerosos ciclos gonotróficos.** Tomado de Williams y Berger (1980).

Table 1. (Experiment I). Observed insemination rates in experimental groups\* of *Aedes aegypti* (females exposed to a 4:1 ratio of males and bounced for 10 minutes).

| Group*       | No. Dissected | First Exposure to Males |                                   | Second Exposure to Males |                     | No. of Blood Meals |             |     |
|--------------|---------------|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|-------------|-----|
|              |               | Days Post-Emergence     | Inseminated Only On This Exposure |                          | Days Post-Emergence |                    | Inseminated |     |
|              |               |                         | No.                               | (%)                      |                     |                    | No.         | (%) |
| A            | 108           | 28                      | 60                                | (55.6)                   | —                   | —                  | 0           |     |
| B            | 114           | 4                       | 100                               | (87.7)                   | 14                  | 14                 | (12.3)      | 0   |
| C            | 106           | 4                       | 94                                | (88.7)                   | 28                  | 12                 | (11.3)      | 0   |
| D            | 109           | 4                       | 98                                | (89.9)                   | 14                  | 11                 | (10.1)      | 2   |
| E            | 114           | 4                       | 105                               | (92.1)                   | 21                  | 9                  | (7.9)       | 5   |
| Aver. of B-E | 110.75        | —                       | —                                 | —                        | —                   | 11.5               | (10.38)     | —   |
| F            | 125           | 4                       | 86                                | (68.8)                   | 28                  | 39                 | (31.2)      | 7   |
| G            | 103           | 28                      | 80                                | (77.7)                   | —                   | —                  | —           | 7   |

\* See section on Materials and Methods for description of the groups.

Helinski *et al.* (2012) encontraron que existe un promedio del 14 % de poliandria en hembras silvestres de *A. aegypti* que fueron expuestas a machos silvestres por 48 h. Esto demuestra que los comportamientos copulatorios en poblaciones silvestres han sido poco estudiados, no obstante esto es necesario para comprender la ecología, evolución y etología de *A. aegypti*, ya que la frecuencia de

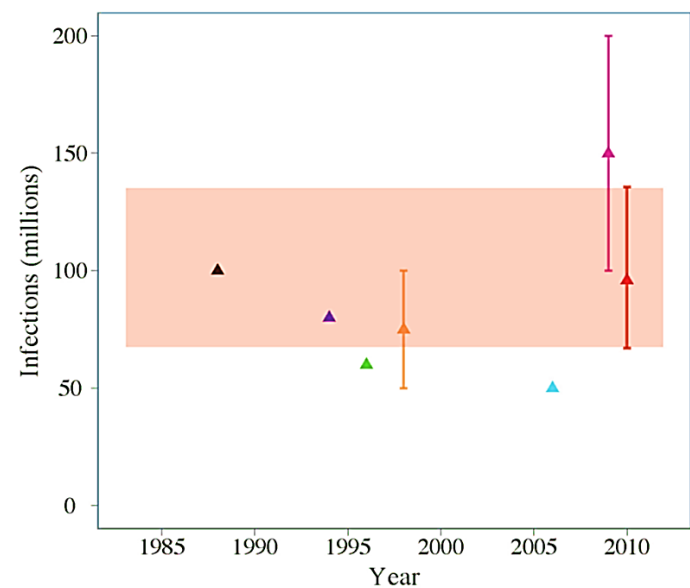
inseminación puede ser un elemento clave para determinar el grado de éxito de un programa de biocontrol.

### **Situación epidemiológica actual del dengue**

Según Bhatt *et al.* (2013), en las últimas décadas ha aumentado enormemente la incidencia de dengue en el mundo. Más de 2500 millones de personas (más del 50% de la población mundial) están en riesgo de contraer la enfermedad en más de 100 países afectados por epidemias (Figura 12). La WHO calcula que cada año se producen entre 50 millones y 100 millones de infecciones por el DENV en el mundo, no obstante, esta cifra es dinámica ya que hay variaciones a través del tiempo debido a los cambios climáticos cíclicos mundiales (Fig. 13), sin embargo, recientemente se han hecho predicciones usando enfoques matemáticos y cartográficos de los casos anuales de dengue y se estima que hay 390 millones (Bhatt *et al.* 2013).



**Figura 12. Planisferio mostrando las regiones con casos de dengue;** representados con círculos rojos y recopilados por HealthMap, <http://www.healthmap.org/dengue/es/>



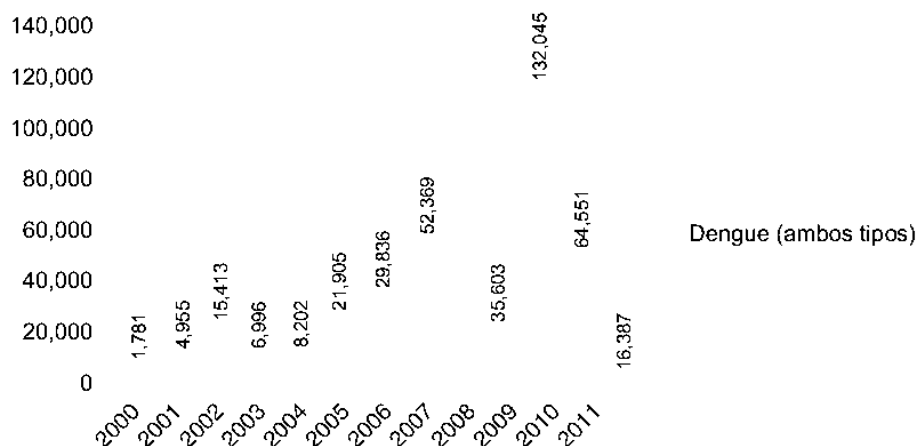
**Figura 13. Estimaciones globales de dengue a través del tiempo.** Comparación de los casos de dengue a nivel mundial desde los años de 1985 al 2010: ▲ Halstead *et al.* 1988, ▲ Monath *et al.* 1994, ▲ Rodhain *et al.* 1996, ▲ Rigau-Perez *et al.* 1998, ▲ TDR/WHO. 2006, ▲ Beatty *et al.* 2009, ▲ Bhatt *et al.* 2013. Tomado de Bhatt *et al.* (2013).

Puede afirmarse que hoy día en las Américas existen condiciones epidemiológicas y sociales similares a las que favorecieron el agravamiento del dengue hemorrágico en Asia durante la década de 1950-1960; hay altas densidades del vector junto con la circulación de los cuatro serotipos del virus y un hacinamiento de poblaciones marginadas en los cinturones de pobreza de las grandes ciudades (Gómez y San Martín 2012). En 1995, el dengue fue la arbovirosis más importante; su distribución e impacto son comparables con los de la malaria y hay un estimado de 2.5 millones de personas que viven en áreas de riesgo (Gubler 2002).

### **Situación epidemiológica actual para México del dengue**

En México, el dengue se ha convertido en la enfermedad más importante entre las Enfermedades Transmitidas por Vector (ETVS), tal y como sucedió en la epidemia del 2009 con más de 130, 000 casos nacionales (Figura 14). De acuerdo con el actual Programa de Acción Específico de Dengue (PAED), la enfermedad se encuentra presente en nuestro país con variaciones anuales en su incidencia y brotes epidémicos de diferentes magnitudes, principalmente en los estados de la región sur-sureste, Pacífico y Golfo de México (Figura 15). En estas regiones, la transmisión se presenta con mayor persistencia en 7 entidades federativas, incluyendo Veracruz, Oaxaca y Yucatán, las cuales concentran 8 de cada 10 casos confirmados (Cuadro 6). Las instituciones de seguridad social se encargan de atender entre 5 y 6 de cada 10 mexicanos con la enfermedad, en tanto la Secretaría de Salud (SSA) y otras instituciones de población abierta, brindan atención médica

al resto de la población y sólo una proporción menor se atiende en instituciones privadas (Gómez y San Martín 2012).



**Figura 14. Panorama de casos de dengue en México por año, 2000-2011.**

Fuente: elaboración propia con base en información del CENAVECE: Anuarios de Morbilidad 2000-2010/ Panorama Epidemiológico de Dengue, Cierre 2011.

Dentro de los factores que podrían explicar la presencia y aumento de los casos de dengue, destacan los relacionados con el clima que influyen en la intensidad y duración de las temporadas de lluvia y frecuencia de huracanes; deficientes servicios urbanos como carencia de agua potable, inadecuada disposición final de basura y desechos de viviendas, así como la falta de percepción de riesgos y nulas medidas de autoprotección y prevención de la población (Halstead, 2008).



**Figura 15. Áreas con casos de dengue en México;** los círculos rojos representan los casos de dengue. <http://www.healthmap.org/dengue/es/>

**Cuadro 6. Entidades mexicanas más afectadas por casos de dengue durante julio de 2012.**

| No. | ESTADO         | NÚMERO DE CASOS CONFIRMADOS |     | TOTAL CONFIRMADOS |
|-----|----------------|-----------------------------|-----|-------------------|
|     |                | FD                          | FHD |                   |
| 1   | Yucatán        | 793                         | 725 | 1,518             |
| 2   | Veracruz       | 676                         | 487 | 1,163             |
| 3   | Chiapas        | 473                         | 432 | 905               |
| 4   | Campeche       | 600                         | 113 | 713               |
| 5   | Guerrero       | 389                         | 203 | 592               |
| 6   | Tabasco        | 429                         | 95  | 524               |
| 7   | Oaxaca         | 230                         | 174 | 404               |
| 8   | Nuevo León     | 395                         | 1   | 396               |
| 9   | Quintana Roo   | 155                         | 218 | 373               |
| 10  | Morelos        | 286                         | 75  | 361               |
|     | Resto del país | 1,008                       | 65  | 873               |

Fuente: Elaboración propia con base en información de SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue.

## **Control y erradicación de *A. aegypti***

Las principales medidas de control vectorial son la educación comunitaria y la aplicación de insecticidas (Gómez y San Martín 2012). La primera se basa en la eliminación de depósitos artificiales de agua (criaderos), la cual es poco efectiva debido a la falta de atención y cuidado de la población como consecuencia del pobre nivel educativo de los estratos socioeconómicos más bajos. El control químico consiste en la aplicación masiva de insecticidas para matar las larvas (temephos 1% mejor conocido como abate) y adultos (malatión-ULV) (Gómez y San Martín 2012) (Figura 16). Sin embargo, este control es desordenado porque los larvicidas frecuentemente se aplican sobre recipientes que podrían destruirse o recogerse, además los adulticidas se usan excesivamente en dosis de ultra bajo volumen en las áreas donde no hay transmisión de dengue (Esu *et al.* 2010, Gómez y San Martín 2012).



**Figura 16. Productos utilizados en el control químico de *A. aegypti*.** a) se muestra la aplicación de malatión en ULV y b) se encuentra el temephos o abate al 1%.

En México, también se han utilizado piretroides como adulticidas, aplicados como rociamiento residual, mosquiteros impregnados o rociamiento espacial. Específicamente para el control del dengue, la mezcla de permetrina + esbiol + butóxido de piperonilo entró en uso después de que el malatión fue suspendido como adulticida para el control de *A. aegypti* (CENAPRECE 2011).

Sin embargo, existen poblaciones Mexicanas de mosquitos mutantes que han desarrollado resistencia a este tipo de insecticidas, ya que las aplicaciones masivas e irracionales han generado alteraciones en las actividades de las enzimas metabólicas de detoxificación, predominantemente en esterasas y glutatión transferasas del citocromo P450s (Hemingway *et al.* 2004) y mutaciones en los genes que codifican para las proteínas encargadas del canal de la bomba de potasio ("the voltage-gated sodium channel"), mecanismo llamado de "knockdown" o "kdr"



(Bregues *et al.* 2003). También, las poblaciones de mosquitos han desarrollado resistencia cruzada entre piretroides y al Dicloro Difenil Tricloroetano o comúnmente llamado DDT, esta mutación llamada V1016I, es de amplia distribución en México y se incrementó durante los años de 1996 al 2009 (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2007).

Este fenómeno de resistencia se explica sobre la base de los factores multidimensionales dependientes de la ecología, fisiología, bioquímica y genética de los vectores, que varía con la especie, las poblaciones y la localización geográfica (Brown, 1996). Sin embargo, la aplicación irracional de los insecticidas químicos, causa que las poblaciones de mosquitos se vuelvan resistentes a los insecticidas químicos (Macoris *et al.* 2003).

Debido a que muchas poblaciones de mosquitos son resistentes a los insecticidas químicos, se han desarrollado nuevas estrategias para su control, entre ellas, el control biológico. Este tipo de control se basa en el uso de depredadores, parásitos y patógenos naturales como copépodos, peces larvivoros, hongos, nematodos, etc. (Rodríguez-Pérez *et al.* 2012). Esta media de control es recomendable debido a su bajo costo de producción, persistencia en el medio, no induce resistencia y sobre todo, es inocuo al ecosistema (WHO, 1982).

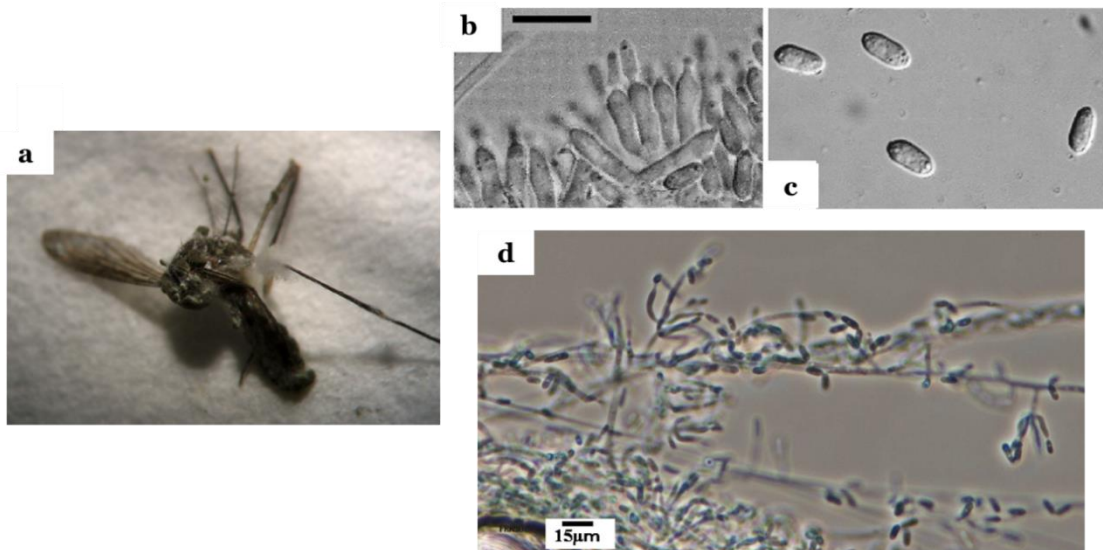
Recientemente el interés del biocontrol de mosquitos mediante el uso de hongos entomopatógenos resurgió, debido a la continua resistencia a insecticidas y porque su uso es restringido a los mosquitos adultos que son los causantes de

epidemias y pandemias re-emergentes como la malaria, dengue y filariasis (Garza-Hernández *et al.* 2013, Scholte *et al.* 2004).

### **Hongos anamorfos (imperfectos) entomopatógenos: con énfasis en *M. anisopliae***

Los primeros estudios sobre hongos entomopatógenos se reportaron en 1835, con observaciones de Agostino Bassi sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin en el gusano de la seda, *Bombix mori* L., y con *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin por Metchnikoff contra el coleóptero *Anisoplia austriaca* (Herbst) (Quintela y McCoy 1998). Las micosis en insectos causan epizootias que rápidamente diezman las poblaciones ejerciendo un control natural (Tanada y Kaya, 1993). Todos los insectos son susceptibles a estos patógenos y en mosquitos, la literatura mundial abunda sobre los géneros *Lagenidium*, *Coelomomyces* y *Culicinomyces* como parásitos de larvas de mosquitos y lepidópteros (Scholte *et al.* 2004). No obstante, estos hongos no han sido exitosos en el biocontrol de mosquitos, porque su ciclo biológico involucra más de un huésped y porque las esporas flageladas son de vida corta y susceptibles al secado lo cual no ha permitido una formulación efectiva y barata (Lacey *et al.* 2001). Los hongos con mayor potencial contra insectos vectores son especies de los géneros *Beauveria spp.* y *Metarhizium spp.*, cuyo efecto ha sido evaluado básicamente contra larvas (Scholte *et al.* 2004). Sin embargo, recientemente se han hecho pruebas contra adultos teniendo resultados muy prometedores en el biocontrol de mosquitos (Rodríguez-Pérez *et al.* 2012).

Scholte *et al.* (2004) proponen la clasificación taxonómica de *M. anisopliae* y lo clasifican dentro de la clase Deuteromycetes y grupo Hyphomycetes, sin embargo, Humber (2007) re-analiza su taxonomía y los re-agrupa tal y como se muestra en el cuadro 7; ambos géneros son hongos filamentosos facultativos ya que son saprobios e hipogeos que infectan a insectos por medio de conidias (Humber, 2007). Según Bischoff *et al.* (2009), la morfología de *M. anisopliae* es la siguiente: 1) micelio verde generalmente creciendo externamente sobre la cutícula de insectos, 2) hifas cenocíticas y lisas, 3) conidióforos en racimos, 4) conidias de 6-8  $\mu\text{m}$  de largo x 1-2  $\mu\text{m}$  de ancho, lisas de color verde y con extremos redondeados y 5) agrupadas en cadenas regulares debido a la agregación por elongación de las mismas conidias (Figura 17).



**Figura 17. Morfología de *M. anisopliae*.** a) micelio verde creciendo sobre la cutícula de un insecto, b y d) conidióforos en racimo, c) conidias con extremos redondeados y d) agregación de conidias.

Las infecciones ocurren vía cuticular, con infecciones directas o por vía horizontal, entre individuos de la misma especie (Baverstock *et al.* 2010). El proceso patogénico comprende mecanismos tóxicos-mecánicos. Este proceso comienza cuando ocurre la adhesión de las conidias a la epicutícula del insecto, después éstas germinan y forman un tubo germinal que, al momento de perforar la epicutícula mediante un complejo de exoquitinasas, liberan proteasas y lipasas que digieren azúcares y lípidos de la procutícula (exocutícula y endocutícula), después las hifas atraviesan la epidermis y la membrana basal para diseminarse internamente en el hemocele del insecto (Scholte *et al.* 2004). Una vez colonizado el hemocele del insecto, el hongo se nutre de la trehalosa de la hemolinfa, además secreta toxinas (destruxinas, beuvericinas, etc.) que matan al huésped por inanición, deshidratación y daños mecánicos (Ortiz-Urquiza *et al.* 2010, Xia *et al.* 2002).

**Cuadro 7. Clasificación taxonómica de *B. bassiana* y *M. anisopliae* según Humber (2007).**

| <b>Clasificación Taxonómicas</b> |            |                |                  |
|----------------------------------|------------|----------------|------------------|
| <b>Reino</b>                     | Fungi      | <b>Clase</b>   | Sordariomycetes  |
| <b>Subreino</b>                  | Dikarya    | <b>Orden</b>   | Hypocreales      |
| <b>Phyllum</b>                   | Ascomycota | <b>Familia</b> | Calavicipitaceae |

***M. anisopliae* en el biocontrol de mosquitos vectores**

Los ascomicetos mitospóricos son patógenos naturales de insectos (Bidochka *et al.* 2005). Existen diferentes aislados o cepas (genotipos) de *M. anisopliae* var. *anisopliae* y *B. bassiana* que son comercializados y utilizados como micoinsecticidas (Ortiz-Urquiza *et al.* 2010), sin embargo, no existe hasta la fecha ningún formulado comercial diseñado para el biocontrol de mosquitos adultos vectores (Lacey *et al.* 2001). *M. anisopliae* es el más utilizado en las campañas experimentales para el biocontrol de la malaria (Scholte *et al.* 2006). Este hongo tiene 4 variedades y dos son las más importantes: *M. anisopliae* var. *anisopliae* y *M. anisopliae* var. *acridum* antes conocida como la especie, *M. flavoviridae* (Bischoff *et al.* 2009). La primera infecta huéspedes que van desde arácnidos y garrapatas, hasta más de 5 órdenes de insectos (Hajek 2000) y comprenden más de 200 especies, incluyendo mosquitos culícidos (Scholte *et al.* 2004). No obstante casi toda la literatura versa sobre patogenicidad y virulencia en larvas y aunque se ha documentado que las larvas son altamente susceptibles a la infección (Daoust y Roberts 1982), las conidias son altamente susceptibles a los ecosistemas acuáticos ya que germinan y pierden su efectividad (Bin y Mitsuaki 2006), por lo que su uso es impráctico en este estadio.

El primer reporte donde se evaluó el efecto de un hongo entomopatógeno sobre mosquitos adultos fue reportado por Nnakumusana (1985) usando *Aspergillus parasiticus* versus larvas de *A. aegypti*, pero hizo el seguimiento hasta los adultos sobrevivientes en los cuales evaluó mortalidad y fecundidad, pero no infectando adultos. Fue hasta Scholte *et al.* (2003) donde se demostró que adultos

de *Cx. quinquefasciatus* y *An. gambiae* fueron susceptibles y murieron al ser expuestos a conidias secas de *M. anisopliae* con un  $TL_{50}$  de 4 – 6 días; este último fue el segundo reporte contra mosquitos vectores adultos. Posteriormente, en un reporte consecutivo, Scholte *et al.* (2004) evaluó el efecto de la auto-diseminación (vía cópula) de conidias de *M. anisopliae* de hembras a machos de *An. gambiae*, y encontraron un 10.7 y 33.3% de mortalidad en las proporciones utilizando proporciones de 1:1 y 1:10 (hembras: machos). Este último fue el primer reporte donde se evaluó el comportamiento sexual durante la auto-diseminación de *M. anisopliae* en mosquitos culícidos vectores, sin embargo, no evaluaron la infección de machos hacia hembras. Posteriormente, Scholte *et al.* (2005) observaron que concentraciones de  $10^6$  y  $10^7$  conidias  $ml^{-1}$  ( $TL_{50} = 6.7$  días) con *M. anisopliae* redujeron en 51% las hembras que se alimentaron de sangre en el segundo CG, y también una reducción del 29% en fecundidad, de 65 a 46 huevos en hembras sanas e infectadas, respectivamente; todos estos trabajos fueron evaluados sobre el vector de la malaria.

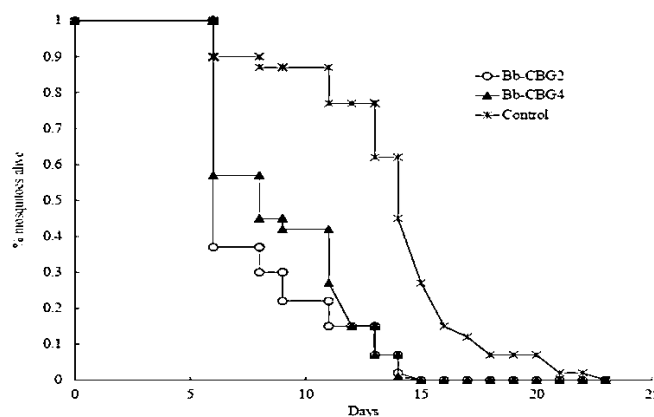
Referente a vectores del DENV, Scholte *et al.* (2007) realizaron el primer reporte donde se evaluó la infección de *M. anisopliae* versus adultos de *A. aegypti* y *A. albopictus*. Aplicaron  $1.6 \times 10^{10}$  conidias/ $m^2$  sobre una manta de color negro como sitio de reposo para adultos en jaulas. Hubo una mortalidad de 87 % en *A. aegypti* y de 89 % en *A. albopictus*. El  $TL_{50}$  fue de 3.1 y 4.1 días para machos y hembras de *A. aegypti*, respectivamente. Los valores de la  $TL_{50}$  para mosquitos sanos varió desde 17.7 días para hembras y hasta 19.7 para machos de *A. albopictus*. Pero,

nuevamente, ellos no evaluaron transmisión por cópula sino por contacto directo. El segundo reporte sobre *M. anisopliae* contra los vectores del dengue fue en Brasil (De Paula *et al.* 2008). Después de examinar 15 aislados de cada hongo, evaluaron los tres más virulentos de *M. anisopliae*. La concentración fue de  $1 \times 10^9$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  ( $5 \times 10^6$  conidias/ $\text{cm}^2$ ) en un papel filtro confinando por 48 h a 50 hembras de *A. aegypti* y también impregnando telas de algodón (30 x 20 cm) de color negro en jaulas grandes (115 x 70 x 75 cm) con la misma concentración en “spray” ( $2.2 \times 10^7$  conidias/ $\text{cm}^2$ ) por 7 días. En el papel filtro, los aislados más virulentos fueron dos de *M. anisopliae* con un  $\text{TL}_{50}$  de 3 días y uno de *B. bassiana* con 5 días. Para las jaulas, el 70% de los mosquitos tratados murieron, contra 20% en el control; el  $\text{TL}_{50}$  fue de 4 días y las hembras control duraron 30-40 días. Pero, nuevamente no se incluyó nada de transmisión vía cópula. En este estudio en Brasil se demostró que *M. anisopliae* reduce la sobrevivencia de una población de hembras del vector del dengue en un 30% en siete días post-exposición al hongo, y esto significa una factibilidad real de que la micosis trunque la incubación extrínseca del DENV en el vector.

### **Auto-diseminación de *M. anisopliae* en el vector del dengue *A. aegypti***

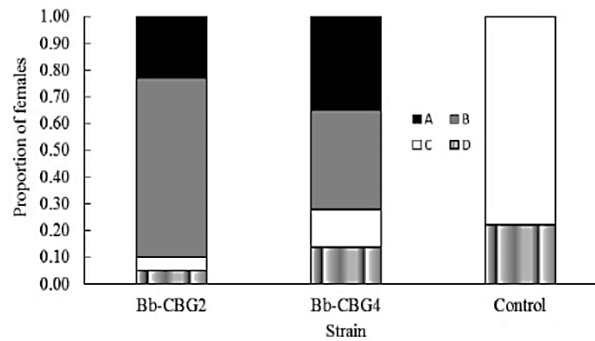
En insectos, la diseminación vía cópula es un tipo de transmisión horizontal y es conocida como auto-diseminación, ya que ocurre dentro de organismos de la misma especie y generación (Baverstock *et al.* 2010). Este proceso de auto-diseminación de hongos entomopatógenos vía cópula en insectos hematófagos está

poco documentada en la literatura. El primer estudio se realizó en África con la mosca tsetse *Glossina morsitans morsitans* infectando machos y hembras con conidias de *M. anisopliae* y *B. bassiana*; se registraron mortalidades del 90-100% en ambos sexos (Kaaya y Okech 1990). En *A. aegypti* el primer trabajo sobre auto-diseminación fue por García-Munguía *et al.* (2011) evaluando la transmisión por cópula de dos aislados altamente virulentos de *B. bassiana*, mostrando una  $TL_{50}$  de 5-7 días (Figura 18). Además, aunque hubo machos contaminados con conidias que copularon pero no inseminaron a las hembras, estos pudieron diseminar las conidias debido al contacto mecánico durante el proceso (Figura 19). Así, aunque haya o no inseminación hay transmisión de conidias vía auto-diseminación por cópula. Por otro lado, la patogénesis de ambos hongos ocasionó prácticamente una esterilización en las pocas hembras que lograron ovipositar ya que la media no pasó de 2 huevos/hembra.



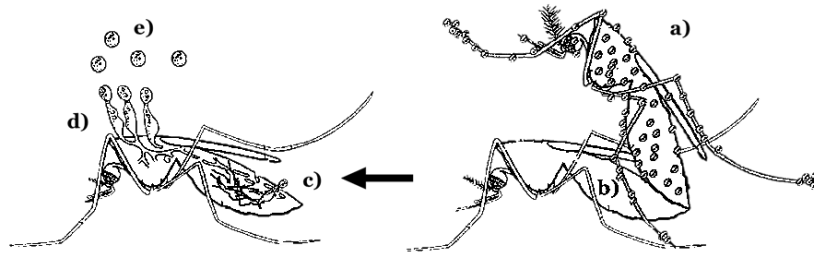
**Figura 18. Medias de supervivencia de 40 hembras de *A. aegypti* confinadas con un macho virgen contaminado con conidias de *B. bassiana* más un control.** Tomada de García-Munguía *et al.* (2011).



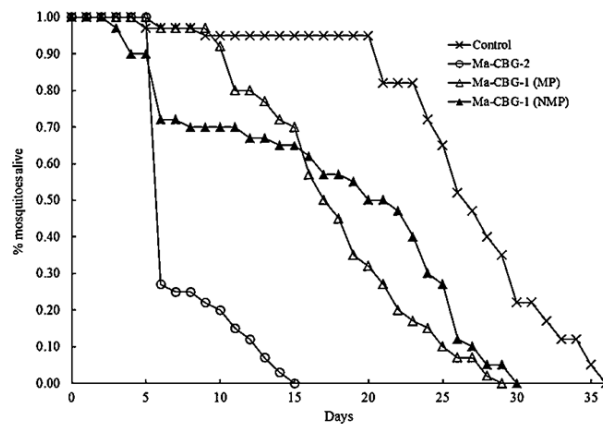


**Figura 19. Proporción de cuatro categorías de hembras de *A. aegypti* confinadas con un macho contaminado con conidias de 2 cepas de *B. bassiana* más un control (machos sanos).** Símbolos: A= Inseminadas (I) esporuladas (E), B= No I E, C= I no E, D= No I no E. (Tomada de García-Munguía *et al.* 2011).

Posterior a este reporte, Reyes-Villanueva *et al.* (2011) evaluó la virulencia de dos aislados de *M. anisopliae* durante su auto-diseminación mediante machos a hembras de *A. aegypti* (Figura 20). Aquí, confinaron 1 macho contaminado con  $6 \times 10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  con 20 hembras sanas y encontraron un 1 aislado altamente virulento (Ma-CBG-2) y 2 medianamente virulentos (Ma-CBG-1, re-aislado y no re-aislado del mosquito), con  $\text{TL}_{50}$  de 6, 17 y 20 días, respectivamente (Figura 21). Además, el aislado más virulento redujo en un 70 % la fecundidad de las hembras, es decir, las hembras que se infectaron al copular con machos contaminados con conidias, exhibieron una media de huevos de  $23.3 \pm 6.42$ / hembra, mientras que la media del control fue de  $76.32 \pm 1.50$  huevos/ hembra.



**Figura 20. Proceso de auto-diseminación de conidias de *M. anisopliae* de machos a hembras de *A. aegypti*.** a) macho impregnado con conidias, b) intercambio de conidias a la hembra mediante vía cópula, c) germinación de conidias-ingreso del tubo germinal a la hemolinfa y liberación de toxinas y enzimas- d) salida de los conidióforos para la expulsión de conidias y e) diseminación de conidias al medio ambiente. Tomado y modificado de Scholte *et al.* (2004).

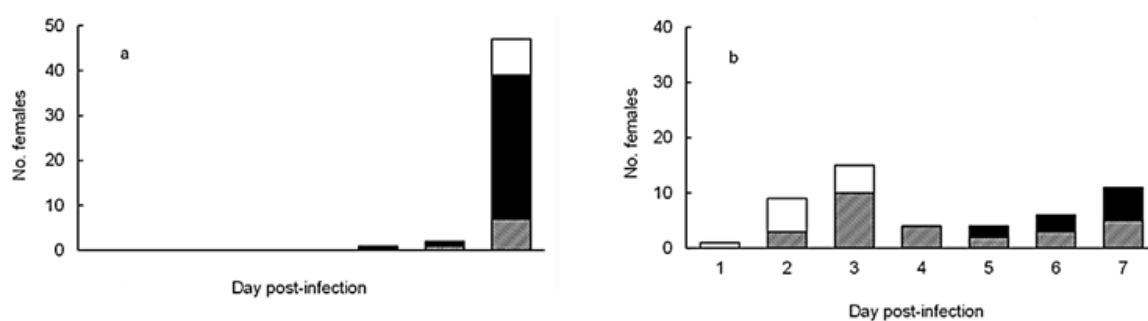


**Figura 21. Curvas de sobrevivencia de *A. aegypti* expuestos durante 48 h a una concentración de  $6 \times 10^9$  conidias secas  $m^{-1}$  Tomada de (Reyes-Villanueva *et al.* 2011).**

En estos 2 últimos trabajos la metodología se fundamentó en la poligamia del machos de *A. aegypti* para auto-diseminar conidias a las hembras; ya que se sabe

que un macho puede llegar a copular hasta 18 veces después de estar expuestos a 2 harems (grupos de hembras) en un periodo de 24 horas (Jones, 1973).

Recientemente, Garza-Hernández *et al.* (2013) evaluó a nivel laboratorio el potencia de *M. anisopliae* para reducir la capacidad vectorial de *A. aegypti* para diseminar el DENV-2. Se encontró que *M. anisopliae* induce un 78% de mortalidad en mosquitos infectados con el DENV y que en los sobrevivientes al día 7 (día promedio de término del periodo de incubación extrínseca (PIE) del virus), sólo el 12 % (6 de 50) presentó potencial para transmitir el virus, mientras que en los mosquitos solo infectados con el virus, el 64 % (32 de 50) completó su PIE a los 7 días (Figura 22). Además se encontró que la virulencia de *M. anisopliae* y del DENV-2 en mosquitos co-infectados disminuye su fecundidad en más del 50%, comparados con los sanos y el tiempo para completar su primer ciclo gonotrófico de 2 a 5 días.



**Figura 22. Rango de diseminación del virus del dengue desde el intestino medio hasta cabeza.** Hembras de *A. aegypti* sin virus (cuadros blancos), con virus del dengue en intestino medio (cuadros grises) y con virus en intestino y estómago (cuadros negros). Evaluación al día 7 post-infección del DENV-2; a: mosquitos con infección viral, b: mosquitos co-infectados, con *M. anisopliae* y DENV-2. Tomado y editado de (Garza-Hernández *et al.* 2013).

Este es el primer reporte donde se evaluó la capacidad vectorial de *A. aegypti* co-infectados con *M. anisopliae* y el DENV, sin embargo aún se desconoce el impacto del hongo en las poblaciones silvestres de *A. aegypti* y los parámetros que son esenciales en la auto-diseminación y para implementar un programa de control vectorial.

## 5. CAPÍTULO II

**Efecto de la espermatogénesis, comportamiento de cópula y transferencia de conidias de machos de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) contaminados con *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales)**

---

Publicado como:

**ARTICULO ENVIADO Y EN UNA SEGUNDA REVISION EN LA REVISTA DE PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASE, DESPUES DE DETERMINAR CORRECCIONES MAYORES POR EL EDITOR.**

## RESUMEN

**Antecedentes.** El dengue es la enfermedad arboviral de mayor prevalencia a nivel mundial. Su control cultural se torna difícil en las comunidades de estrato socio-económico bajo y el control químico, mediante la aplicación de insecticidas, es muy costoso y errático. Una herramienta potencial y novedosa de biocontrol es el uso de machos contaminados con hongos entomopatógenos con el fin de autodiseminar, por medio de cópulas, las conidias hacia las hembras. En este estudio se evaluaron parámetros reproductivos y el potencial de autodiseminación de machos de *Aedes aegypti* contaminados con *Metarhizium anisopliae*.

**Metodología/Resultados.** Machos de *A. aegypti* fueron expuestos por 24 h a  $6 \times 10^7$  conidias  $\text{cm}^{-2}$  de *M. anisopliae*. Se evaluó el efecto sobre la espermatogénesis, el tiempo requerido para que un acto de cópula ocurra y la habilidad de autodiseminar conidias a hembras vírgenes. Después de que los machos se expusieran por 24 h a las conidias, la espermatogénesis (número de espermias) descendió un 38 % y 87 % en el 1er y 5to día post-contaminación, respectivamente. Además los machos contaminados incrementaron el tiempo requerido para copular sucesivamente con 5 hembras vírgenes. El macho contaminado que copuló más rápidamente invirtió un tiempo de 110 min, mientras que en el control fue de 50 min. Los machos contaminados con *M. anisopliae* fueron capaces de autodiseminar las conidias. A pesar del hecho de que en la 5ta cópula la carga de conidias transferidas a las hembras se reduce un 94 %, aun así, los machos siguen diseminando conidias en un

promedio de  $4.90 \times 10^3 \pm 1.45 \times 10^3$  conidias mL<sup>-1</sup> (promedio de conidias contadas en grupos o pooles de 3 hembras).

**Conclusión.** En machos contaminados con *M. anisopliae* la espermatogénesis se reduce considerablemente (87 %) al 5to día post-infección, además tal infección extiende en 1 h la actividad de los machos de copular exitosamente a 5 hembras. En confinamiento, los machos pueden transferir un promedio de 1,600 conidias durante la 1ra y 5ta cópula. Este es el primer estudio sobre la carga de conidias de *M. anisopliae* en mosquitos, y la evaluación del comportamiento de cópula en machos de *A. aegypti* contaminados con conidias de *M. anisopliae*. Con esta información, se realizarán estudios posteriores en semi-campo para evaluar este método de biocontrol dirigido al vector del dengue *A. aegypti*.

## INTRODUCCIÓN

*Aedes aegypti* (L.) es el vector principal de los cuatro serotipos del virus del dengue (WHO 2009, Torres-Galicia *et al.* 2014). Aunque su control mediante la remoción larval es muy efectivo, la única manera rápida de interrumpir los ciclos de transmisión viral es por medio del control químico, sin embargo esto es costoso, no se aplica de manera sistemática y consistente (Esu *et al.* 2010, Simmons *et al.* 2012). La escasez de enemigos naturales de *A. aegypti* (Hembree 1979, Laird 1985) ha dejado un campo amplio para estudio del biocontrol con hongos entomopatógenos. *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* han sido evaluados contra larvas mediante la exposición directa de conidias suspendidas en agua o aceite y por el contacto indirecto de mosquitos posados en telas o mallas negras impregnadas con altas cantidades de conidias (Clark *et al.* 1968, Scholte *et al.* 2007, Paula *et al.* 2011, Darbro *et al.* 2011, Paula *et al.* 2013, Carolino *et al.* 2014). Ya ha sido evaluada la transferencia de conidias de machos a hembras en confinamiento (García-Munguía *et al.* 2011) y se sabe que un solo macho contaminado por 24 h con conidias de *M. anisopliae* y confinado con 30 hembras vírgenes causa un 50 % de mortalidad a los 7 días con un 90 % de esporulación y reducción del 99 % de la fecundidad (Reyes-Villanueva *et al.* 2011). Recientemente se encontró que sólo el 22 % de hembras de *A. aegypti* contaminadas con *M. anisopliae* y alimentadas artificialmente con sangre humana mezclada con virus del dengue tipo 2 sobrevivieron al 7mo día post-contaminación del hongo y sólo a una fracción de estas (12 %) se les detectó el virus en cabeza (Garza-Hernández *et al.* 2012).



La autodiseminación es un proceso biológico que implica la transferencia de agentes infecciosos de individuos infectados a otros individuos sanos de la misma generación durante el contacto físico requerido durante la cópula (Baverstock *et al.* 2010, Shah y Pell 2010). Este proceso de diseminación ha sido estudiado contra plagas de cultivos agrícolas (Vega *et al.* 2009, Klein y Lacey 1999, Moslim *et al.* 2011). Sin embargo, para vectores de enfermedades humanas, este concepto ha sido estudiado insuficientemente. Esto fue primeramente reportado en estudios donde se autodiseminó *M. anisopliae* y *B. bassiana* en la mosca tse-tsé *Glossina morsitans morsitans* (Kaaya 1990, Maniania y Ekesi 2013). Se sabe que los machos poligámicos de *A. aegypti* no discriminan entre hembras vírgenes o copuladas cuando comienzan su actividad sexual, y sólo la terminan cuando vacían sus vesículas seminales de semen (Foster y Lea 1975). Un macho es capaz de copular con más de 30 hembras durante los primeros 30 minutos de confinamiento (Roth 1948), sin embargo sólo 5 a 7 hembras quedan inseminadas (Spielman 1964). La autodiseminación de *M. anisopliae* de machos a hembras (Reyes-Villanueva 2011) puede permitir la realización de un control vectorial integrado a través de liberaciones intradomicilio de machos contaminados con conidias. Además, es esencial y relevante conocer el número de encuentros sexuales debido a que es el primer contacto durante el comportamiento sexual en *A. aegypti* (Roth 1948). Finalmente, antes de comenzar liberaciones en semi-campo e intradomiciliarmente, es crítico investigar el efecto del hongo sobre el desempeño sexual de machos contaminados con conidias.

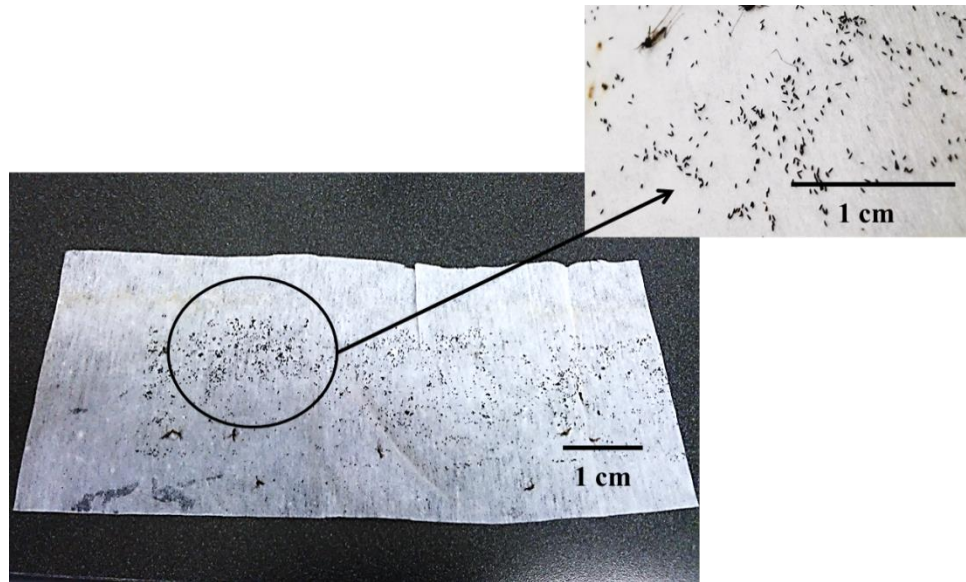
Los objetivos principales de este estudio fueron:

- 1.** Examinar la influencia de *M. anisopliae* sobre la espermatogénesis en los primeros 5 días post-confinamiento de los machos de *A. aegypti* a las conidias.
- 2.** Evaluar el efecto de la micosis sobre el tiempo (minutos) que los machos invierten para copular 5 hembras sucesivamente.
- 3.** Estimar la carga de conidias en machos contaminados y en hembras después de la 1<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> cópula con el mismo macho contaminado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cría de mosquitos

Se colectaron intra-domiciliariamente 100 larvas de *A. aegypti* procedentes de Guadalupe, Nuevo León, México (25° 40' 27" Norte y 100° 15' 07" Oeste). Estas se mantuvieron en un recipiente de plástico conteniendo 3 L de agua destilada con 5 g de alimento para perro (Pedigree® balance natural) finamente molido. Después, en la fase de pupa, se confinaron en una jaula entomológica de 20 x 20 x 20 cm para la emergencia de adultos. Los adultos se alimentaron con solución de sacarosa al 5% colocada dentro de un dispensario de alimentación. Posteriormente, y después de la fase teneral, las hembras se alimentaron con sangre humana (tesista como voluntario) durante 15 min. Al tercer día post-alimentación, se introdujo a la jaula una tasa de cerámica negra de 350 mL con 100 mL de agua destilada con una tira de papel pellón de 20 x 5 cm enrollada que sirvió como sustrato de oviposición (Figura 23). Después de la oviposición, los huevos fueron confinados dentro de una bolsa Ziploc® de 25 x 35 cm para completar embriogénesis.



**Figura 23. Tira de papel pellón como sustrato de oviposición de *A. aegypti*.**

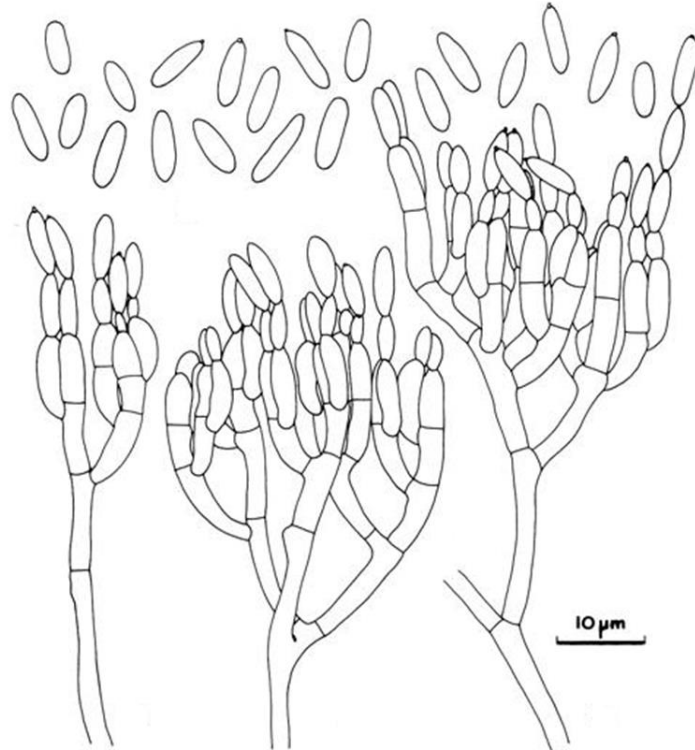
Posteriormente, los huevos fueron eclosionados colocándolos dentro de una charola de plástico con 500 mL de agua destilada (hervida y dejándola enfriar a una temperatura de 37°C). Las larvas fueron mantenidas a una densidad de 200 larvas/L y alimentadas en intervalos de 2 días con 3 g de croquetas para perro (Pedigree® balance natural) finamente molido (Figura 24). Posteriormente, las larvas, pupas y adultos fueron tratados como se describió previamente.



**Figura 24. Larvas de *A. aegypti* alimentándose de croquetas para perro finamente molidas.**

#### Mantenimiento y manejo de *M. anisopliae*

Se utilizó la cepa de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Metschnikoff), Sorokin (1883) registrada y depositada como Ma-CBG-2 en el departamento de agricultura de los Estados Unidos de América (USDA) y con código NRRL 50366 [ver Reyes-Villanueva (2011) para información de la cepa] Para la construcción del cepario, se sembraron 10 cajas Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) como medio nutritivo y se incubaron en obscuridad a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C y  $55 \pm 10\%$  de H. R. durante 20 días. Después, observando bajo microscopio la forma y desarrollo de los conidióforos (Figura 25), se identificó el hongo mediante las claves taxonómicas de Goettel e Inglis (1997). Para el mantenimiento de la cepa, se inocularon conidias de *M. anisopliae* en 5 tubos de ensaye con 10 mL de PDA y se mantuvieron a 4°C. Cada 6 meses se resembró el hongo y se pasó por huésped para recobrar virulencia.



**Figura 25. Ilustración de la forma de los conidióforos de *M. anisopliae*.** Tomada de Goettel e Inglis (1997).

#### Preparación de la suspensión de conidias

Para la producción de la suspensión de conidias, se cultivó el hongo en 30 placas Petri con PDA suplementado con estreptomicina (100mg/L) como bactericida. Después, las cajas se mantuvieron a  $25 \pm 2$  °C en oscuridad durante 20 días. Posteriormente, se observó bajo microscopio el desarrollo de conidióforos para asegurar la pureza del cultivo. Subsecuentemente, se realizó la cosecha de conidias adicionando 5 mL de solución Tween-Salina 0.85% (0.85% NaCl 0.25% Tween 20-Polyoxyethylene-20-Sorbitan Monolaurato, MBG- # Cat. 9691T-Research Organics, INC. Cleveland, Ohio, USA-) a cada caja Petri y se removieron las conidias

con una varilla “L” de vidrio estéril y se transfirieron a tubos Falcon de 50 mL. Después, se centrifugo la suspensión a 5000 rpm durante 5 min, posteriormente se descartó el sobrenadante y se agregaron 50 mL de solución Tween-salina. Inmediatamente, la suspensión se homogenizó en vortex a 1500 rpm durante 5 min. Posteriormente, se calculó la concentración de conidias realizando conteos en una cámara Neubauer (Hausser Scientific®, Horsham, PA) utilizando un microscopio compuesto en objetivo de 40 X. Finalmente, la dosis experimental para los bioensayos se ajustó a  $6 \times 10^8$  conidias mL<sup>-1</sup>. La suspensión control fue una solución de Tween-salina al 0.85 % sin conidias.

#### Caracterización fisiológica de *M. anisopliae*

La caracterización fisiológica del hongo se estimó mediante la viabilidad de las conidias, evaluando la tasa de germinación. Este método consistió en inocular 5 alícuotas de 3 µL de la suspensión de conidias a una concentración de  $6 \times 10^8$  conidias mL<sup>-1</sup> en una caja Petri con PDA. Después, se incubó a 27 °C por 24 h y posteriormente se agregaron 3 µL de lactofenol (Cat. 61335, Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA) en cada halo de germinación para detener el desarrollo del hongo. Inmediatamente después se cortó en un cuadro la porción de PDA donde se inoculó la suspensión de conidias y se colocó sobre porta y cubre objetos (25 x 75 cm y 20 x 20 mm respectivamente). Después se registró el número de conidias germinadas (aquellas cuyo tubo germinativo fuera dos veces mayor al diámetro de la conidia).

## Preparación de machos de *A. aegypti* para ser utilizados como transportadores de conidias de *M. anisopliae*

Para contaminar los machos con conidias, primeramente 5 mL de la suspensión de conidias se distribuyeron uniformemente sobre un papel filtro Whatman® de nitrocelulosa de 5 cm de diámetro con poro de 0.5 µm (NY, USA). Después, el papel filtro se transfirió dentro de una cámara de filtración por vacío marca Corning® (No. Cat. 430053 NY, USA) durante 20 min y se dejó secar dentro de una caja Petri durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Después del periodo de secado, el papel filtro se colocó dentro de la cámara de infección. Posterior a esto, con ayuda de un aspirador manual, machos vírgenes grandes (en promedio de 2.57 ( $\pm 0.84$ ) mm de longitud alar) de 4 a 7 días de edad, se introdujeron en la cámara de infección y se confinaron por un periodo de 24 h. Además se colocó sobre la cámara de infección un dispensario de azúcar al 5 % como alimento para los machos. Después, los mosquitos se transfirieron a recipientes cilíndricos de plástico estériles de 1 m<sup>3</sup>, donde se confinaron hasta ser utilizados en los tratamientos de los bioensayos.

## Sobrevivencia e infección (tasa de esporulación) de machos expuestos a *M. anisopliae*

Para evaluar la sobrevivencia, 3 repeticiones de 25 machos vírgenes de 4 a 7 días de edad se confinaron por 24 horas en 3 cámaras de infección, mientras que otros 3 grupos de igual número de machos se confinaron en cámaras de infección

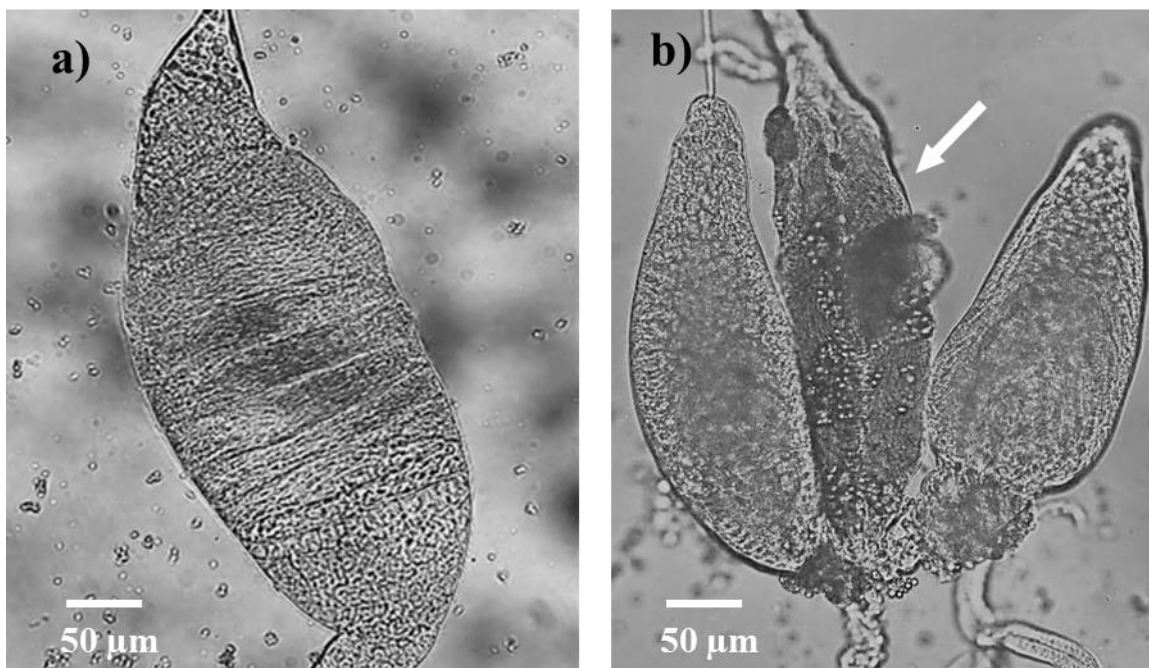


pero sólo con la solución control. Después del periodo de confinamiento, los machos de cada grupo se transfirieron a un frasco de plástico transparente de 1 L, tapado con malla blanca y con un dispensador de sacarosa al 5 % y se registró la mortalidad diariamente. Los mosquitos cadáveres se retiraban diariamente e inmediatamente fueron lavados 2 veces por 5 s en hipoclorito de sodio al 1 % y fueron puestos en cámara húmeda para facilitar la esporulación del hongo. La mortalidad diaria se analizó mediante el modelo no paramétrico de Kaplan-Meier utilizando el procedimiento PROC LIFETEST METHOD=KM PLOTS =(S). Este análisis permitió calcular la probabilidad diaria de sobrevivencia. La tasa de esporulación (índice de infección), fue analizada mediante una comparación con  $\chi^2$  utilizando el PROC NPAR1WAY (análisis no paramétrico). Ambos análisis fueron hechos en SAS 9.0 (Schlotzhauer y Littell 1997).

#### Aislamiento de espermatozoides

Bajo un microscopio estereoscopio y utilizando agujas de disección (< 0.5 mm de diámetro) se extrajeron las testas y vesículas seminales de machos vírgenes (Figura 26) y éstos se colocaron dentro de una placa de plástico para cultivo celular (*culture multi-well plate*) (Corning, Tewksbury MA, USA) conteniendo 50  $\mu$ L de amortiguador salino de fosfatos (*phosphate-buffered saline*) (PBS). Para extraer los espermatozoides de los órganos, éstos se desgarraron con las agujas de disección. En cada disección, la punta de la aguja se colocó en medio de la placa de plástico para cultivo celular y ésta se lavó con 150  $\mu$ L de PBS para obtener un volumen final total de 200  $\mu$ L de solución. La solución se homogenizó utilizando una pipeta P10 y

se tomó una muestra de 5  $\mu$ L, la cual se dispensó en un pozo de un porta-objetos cóncavo (*single concave microscope slide*) (Bioquip, Rancho Grande, CA, USA). El porta-objetos cóncavo se dejó secar por 1 h a temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C). Los tejidos se fijaron en etanol al 70 % y se tiñeron con colorante de Giemsa (*Giemsa dye*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 1 h. Después del teñido, se realizaron 5 lavados con un 1 mL de agua destilada y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente por 1 h. Finalmente, las cabezas de los espermatozoides (teñidos de colores rosa o rojo) se observaron y contaron a través un microscopio compuesto con objetivo de 40X y ocular de 10X.



**Figura 26. Órganos reproductores disecados de *A. aegypti* para el conteo de espermatozoides.** Fotografía tomada con aumento de 400X a través de microscopía ocular. Testa (a), y vesícula seminal (b) la flecha blanca indica el contenido de espermatozoides en la vesícula seminal.

## Producción de espermatozoides en machos de *A. aegypti* contaminados con *M. anisopliae*

Se evaluó la producción de espermatozoides en machos contaminados con *M. anisopliae*. Tres tratamientos fueron realizados: 1) machos expuestos a las conidias por 2 h, 2) por 24 h y 3) machos control, solo expuestos al filtro sin conidias. Cada tratamiento constó de 3 repeticiones. Por cada tratamiento, 3 lotes de alrededor de 600 huevos (tomados de diferentes colonias) fueron sumergidos en 3 bandejas de plástico transparente conteniendo 1 litro de agua destilada a 37 °C (se tuvieron un total de 9 bandejas para los 3 tratamientos). Después de 24 h, por cada repetición, 300 larvas de 1<sup>er</sup> estadio fueron transferidas a charolas de plástico de 50 x 50 x 10 cm conteniendo 5 litros de agua destilada (60 larvas/L). Las larvas se alimentaron diariamente hasta el estadio de pupa, con 1.5 g de croquetas para perro (Pedigree®) finamente molidas. Después, 100 pupas pequeñas (mayormente de las pupas pequeñas emergen adultos macho) fueron transferidas a un bote de plástico de 1 L, tapado con malla tul y con un dispensario de azúcar. Después de la emergencia de los adultos, inmediatamente las pocas hembras se extrajeron del bote de plástico para mantener los machos vírgenes. Antes de comenzar con el conteo de espermatozoides, se estimó el tamaño de los machos, se calculó el promedio de la longitud alar (Nasci 1990) de 25 machos por cada repetición. Después, los machos de 2 días de edad fueron expuestos al hongo según cada tratamiento y control, por lo tanto se iniciaron las disecciones con machos de 3 días de edad; las disecciones fueron desde el 1<sup>er</sup> al 5<sup>o</sup> día post-exposición al hongo. Para esto, se extrajeron

diariamente 10 machos al azar de cada repetición/tratamiento (n= 50 por replicación por 10 días consecutivos).

Antes del análisis estadístico, para estabilizar las varianzas, los datos fueron transformados mediante la raíz cuadrada. Las medias ( $\pm$  EE) de espermatozoides por cada tratamiento/día fueron analizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía en combinación a la prueba de Ryan *post hoc* (Schlotzhauer y Littell 1997).

#### Efecto de *M. anisopliae* sobre la capacidad sexual de machos de *A. aegypti*

Este bioensayo se hizo para determinar el impacto de *M. anisopliae* sobre el tiempo (en minutos) que requiere un solo macho de *A. aegypti* para copular sucesivamente 5 hembras diferentes. Se establecieron los siguientes tratamientos: machos expuestos a las conidias por 2 h, 2) por 24 h y 3) machos control, sólo expuestos al filtro sin conidias. Cada tratamiento fue repetido 3 veces (una repetición en cada jaula) con 20 machos por replica. Inmediatamente después de la exposición a las conidias o al papel filtro sin conidias, los 20 machos por repetición fueron aislados individualmente en un frasco transparente de plástico de 1 L, cubierto con malla tul y con un dispensario de azúcar. Después, para evitar el estrés de los machos, estos se dejaron reposar por 30 min antes de ser expuestos a las hembras. Posteriormente, se confinaron sucesivamente 5 hembras vigentes por cada

macho. Se observó el comportamiento sexual para cada macho de las 9:00 am hasta que terminara la 5ª cópula). Aquí, “cópula” se definió como el contacto genital directo durante al menos 10 s (Roth 1948). Inmediatamente después de la cópula, la hembra copulada fue extraída con un aspirador bucal y se ingresó una segunda, así sucesivamente hasta la 5ª cópula. Dos variables fueron registradas: 1) “tiempo total”, definido como el tiempo desde el ingreso de la 1ª hembra hasta la 5ª cópula y 2) tiempo “inter-cópula” definido como el tiempo entre una cópula y otra. Estas variables fueron registradas con la ayuda de dos personas más el tesista y con el uso de cronómetros manuales.

Se construyeron 2 bases de datos para el análisis de este experimento, una para el tiempo total y otra para el tiempo inter-cópula. Para el tiempo total 60 datos fueron reunidos por cada tratamiento y la base completa se construyó con un total de 180 datos; mientras que para la base del tiempo inter-cópula, fue formada con 300 datos (5 datos por macho, 60 machos) por tratamiento, con un total de 900 datos se construyó la base completa (todos los datos de las 2 bases fueron transformados mediante la raíz cuadrada para estabilizar las varianzas). Los datos de ambas bases fueron analizados mediante un ANOVA y prueba de Ryan *post hoc* (Schlotzhauer y Littell 1997). Para el tiempo total, la variable explicatoria fue el tratamiento, mientras que para tiempo inter-cópula fue tratamiento y número de cópulas.

## Estimación de la carga de conidias en machos exuestos a *M. anisopliae* y en hembras copuladas por un macho contaminado

Para los conteos en machos expuestos a las conidias de *M. anisopliae* se utilizaron 2 metodologías: 1) Conteos mediante cámara de Neubauer: aquí, 3 grupos de 100 machos vírgenes de 4 a 7 días de edad se confinaron por 24 horas en 3 cámaras de infección. Después del confinamiento, se transfirieron a 3 botes de plástico de 1 L tapados con malla de tul. Posteriormente, se seleccionaron al azar 60 machos por cada grupo para formar 3 grupos de 20 “pools” de 3 mosquitos por “pool”. Inmediatamente después se ingresaron a un congelador de -4 °C durante 20 minutos para matarlos; cada “pool” se almacenó en tubos de Eppendorf de 1.5 mL conteniendo 500 µL de solución removedora de conidias (Tween 20 al 1%, Triton X al 0.05 % diluidos en solución salina al 0.85%). Después, para remover las conidias de la cutícula de los mosquitos, cada tubo se colocó en vortex (máxima velocidad) durante 1 s, 3 veces. Posteriormente los mosquitos fueron descartados y la suspensión se centrifugo a 5000 rpm por 5 min. Después la pastilla de conidias fue re-suspendidas en 250 µL de solución removedora más 55 µL de azul de lactofenol 1.16 g/mL. Finalmente cada pool fue analizado para determinar la cantidad de conidias por mosquito (ver metodología de conteos en hemocitómetro en la sección de anexos). 2) Conteo mediante microscopio electrónico de barrido (MEB) para microfotografía de escaneo: 10 machos vírgenes de 4 a 7 días de edad se confinaron por 24 horas en una cámara de infección, después se guardaron individualmente a -20 °C en tubos Eppendorf de 0.5 mL hasta su análisis. Posteriormente, a cada mosquito se le removieron las patas delanteras, las cuales se visualizaron mediante

el MEB para la detección de conidias de *M. anisopliae* (ver protocolo de montaje en la sección de anexos).

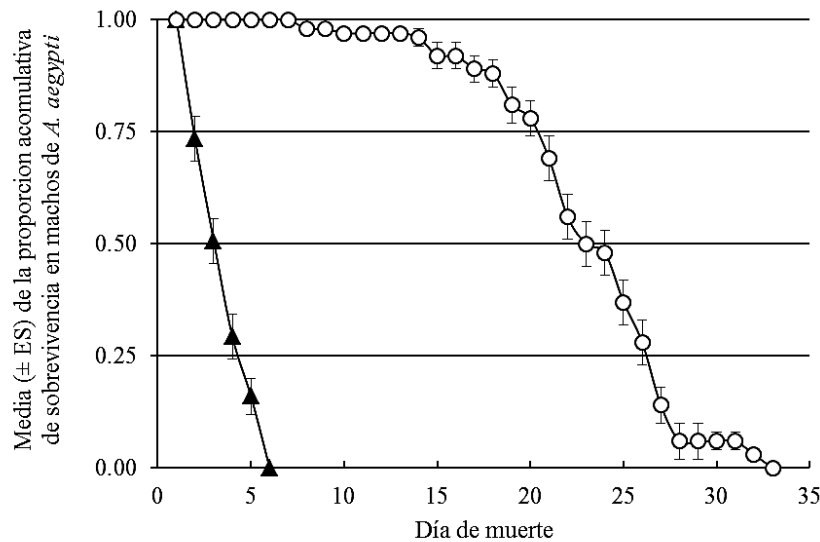
Para los conteos en hembras copuladas por un macho contaminado: 60 machos vírgenes contaminados con conidias se colocaron individualmente dentro de vasos de plástico transparente de 1 L tapados con una malla de tul. Después se ingresó 1 hembra virgen por cada macho. Al finalizar la cópula, se retiraron las hembras e inmediatamente después se ingresó otra hembra. Así sucesivamente hasta completar la quinta cópula. Se formaron 20 “pooles” de 3 mosquitos por “pool” de la 1° y 5° cópula (tratamiento 1 y 2). Los pooles se guardaron a -20 °C en un tubo Eppendorf de 500 µL. Para el conteo de las conidias, las hembras se trataron como se describe previamente en el B2. Este bioensayo se repitió 3 veces.

Posteriormente, los datos fueron normalizados utilizando raíz cuadrada para estabilizar las varianzas. Después, las cargas de conidias en machos las encontradas en hembras después de la 1a y 5ª cópula con el mismo macho, fueron comparadas mediante una ANOVA y una prueba de Ryan *post hoc* para en SAS.

## RESULTADOS

### Sobrevivencia de machos de *A. aegypti*

Todos los machos de *A. aegypti* contaminados con conidias, murieron dentro de seis días post-contaminación. Los  $TL_{50}$  de estos machos contaminados y de los sanos fue de  $3.69 \pm 0.16$  días y  $23.62 \pm 0.58$  días, respectivamente  $\chi^2 = 168.96$ ,  $df=1$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figura 27). El rango de esporulación en cadáveres de los machos contaminados fue un 100 %, lo que indica que todos los machos sucumbieron a causa de la patogénesis del hongo.

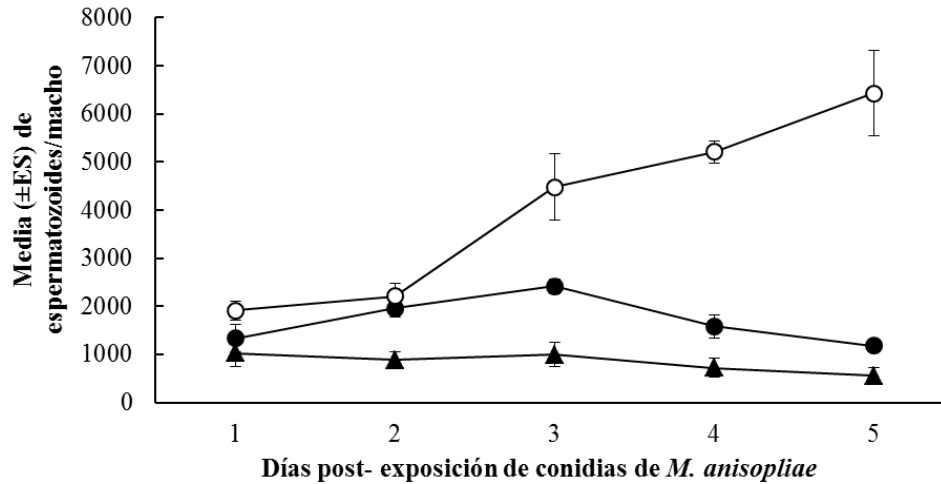


**Figura 27. Media ( $\pm$ ES) de la proporción de la supervivencia acumulativa basada en los valores de probabilidad calculados mediante el modelo de Kaplan-Meier.** Los tratamientos son: machos contaminados con conidias (triángulos negros) y machos sanos (círculos blancos); ( $n=75$  machos por tratamiento, para formar 3 réplicas de 25 insectos).

Producción de espermatozoides (espermatogénesis) en machos de *A. aegypti* expuestos a *M. anisopliae*



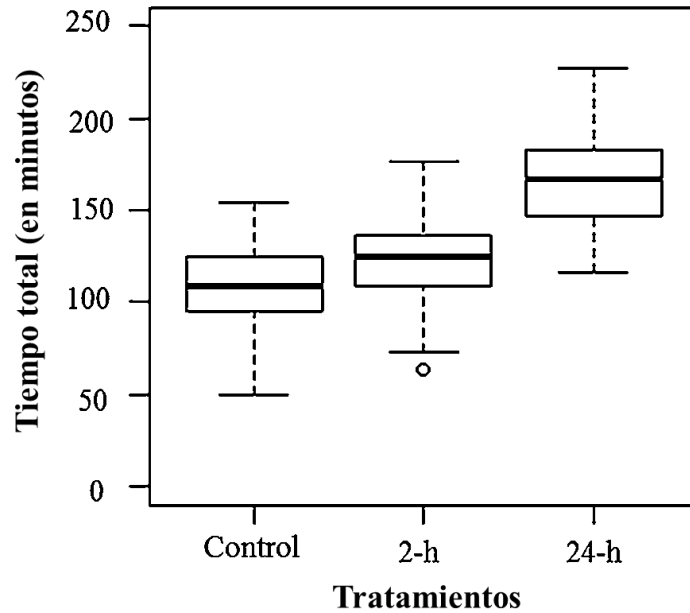
Durante el 1er día post-infección en los machos contaminados con el hongo, la media ( $\pm$  EE) de espermatozoides en los machos con 2h y 24h post-exposición fue de  $1,336 \pm 285$  y  $1,029 \pm 271$ , respectivamente, un 30 % y 46 % menos que en los machos sanos que tuvieron  $1,913 \pm 198$  espermatozoides ( $F= 82.01$ ,  $df= 2$ ,  $p < 0.0006$ ). Posteriormente, al 5° día post-infección, los machos con 2h y 24h post-exposición tuvieron una media de  $1,181 \pm 96$  y  $550 \pm 164$  espermatozoides, respectivamente; estos valores fueron 82% y 91% menores a los de los machos sanos, con  $6,428 \pm 884$  espermatozoides ( $F= 121.10$ ,  $df= 2$ ,  $p < 0.0001$ ). A través de los 5 días de evaluación, la espermatogénesis en machos expuestos a las conidias de *M. anisopliae* se redujo un 12% y 46% en los machos de los tratamientos de 2h y 24h post-exposición, mientras que la producción de espermatozoides en los machos sanos, se incrementó en un 70 % (Figura 28). El análisis *post hoc* también muestra diferencias significativas para la producción de esperma al 3er ( $F= 531.96$ ,  $df= 2$ ,  $p < 0.0001$ ) y 4to día ( $F= 1,302.72$ ,  $df= 2$ ,  $p < 0.000$ ). No hubo diferencias entre el tamaño corporal de los machos (promedio ( $\pm$  EE) de longitud alar de  $2.22 (\pm 0.05$  mm),  $n=30$ ).



**Figura 28. Media ( $\pm$ SE) del número relativo de espermatozoides producidos durante 5 días por machos de *A. aegypti* contaminados y expuestos al hongo *M. anisopliae*. Los tratamientos son: machos expuestos por 24 h (triángulos negros) y 2h (círculos negros) a conidias de *M. anisopliae* y sanos (círculos blancos).**

#### Efecto de *M. anisopliae* sobre el desempeño sexual de machos de *A. aegypti*

El tiempo total requerido para que los machos de los tratamientos 24-h de exposición, 2-h de exposición y controles copularan sucesivamente con 5 hembras fue de  $166.51 \pm 2.98$ ,  $120.35 \pm 3.34$  y  $109.08 \pm 2.80$  minutos, respectivamente (Figura 29).



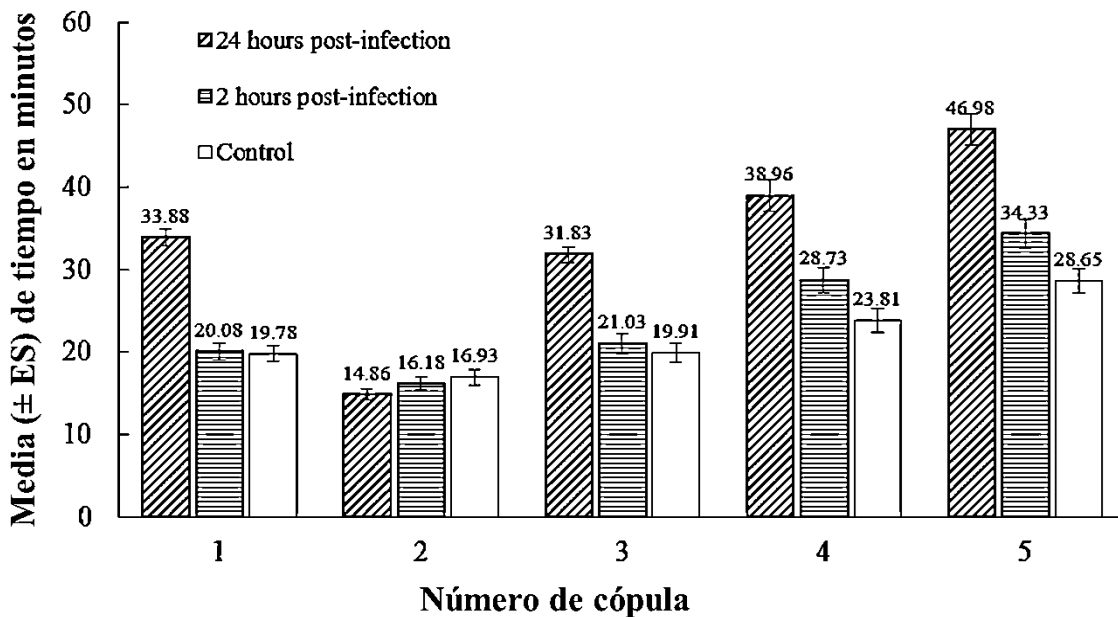
**Figura 29. Comparación del tiempo total requerido por machos de *A. aegypti* para copular sucesivamente con 5 hembras.** Para cada tratamiento, cada macho se expuso a  $6 \times 10^7$  conidia  $\text{cm}^{-2}$  de *M. anisopliae* durante 2 h, 24 h y control.

El tiempo total requerido para las 5 cópulas sucesivas no difirió entre los tratamientos de 2 h de exposición y el control, sin embargo, el tiempo total invertido por los machos expuestos por 24 h fue un 34% más largo que los machos control ( $F= 42.88$ ,  $df= 2$ ,  $p < 0.0020$ ). Para los machos contaminados del tratamiento de 24 h de exposición, el tiempo total para realizar las 5 copulas sucesivas fue de 110 y 220 minutos, mientras que en el control fue de 50 a 150 minutos (Figura 29).

Ahora bien, el tiempo inter-cópula disminuyó significativamente desde la 1a cópula a la 2da, después se incrementó en la 5ta cópula en todos los tratamientos (Figura

30). Además, se encontró que no hay diferencias significativas en la 2da cópula sino desde la 3ra a la 5ta ( $F= 57.32$ ,  $df =2$ ,  $p < 0.0001$ ).

Los machos del tratamiento de 24 h de exposición a *M. anisopliae* presentaron un retraso en el comportamiento de cópula con un promedio ( $\pm$  EE) de  $33.88 \pm 1.04$  minutos y  $46.98 \pm 1.90$  en la 1a y 5ta cópula respectivamente; esto quiere decir que comenzaron a copular después que los machos de 2h de exposición y los controles (Figura 30). Para la 1a cópula, este tiempo es 40% y 57% más largo que en el tratamiento de 2 h de exposición a *M. anisopliae* ( $20.08 \pm 0.97$  minutos) y que en los mosquitos controles ( $19.78 \pm 0.94$  minutos). Además, el tiempo inter-cópula para el tratamiento de 2 h de exposición y el control fue de  $34.33 \pm 1.68$  y  $28.65 \pm 1.45$  minutos para la 5ta cópula (Figura 30).

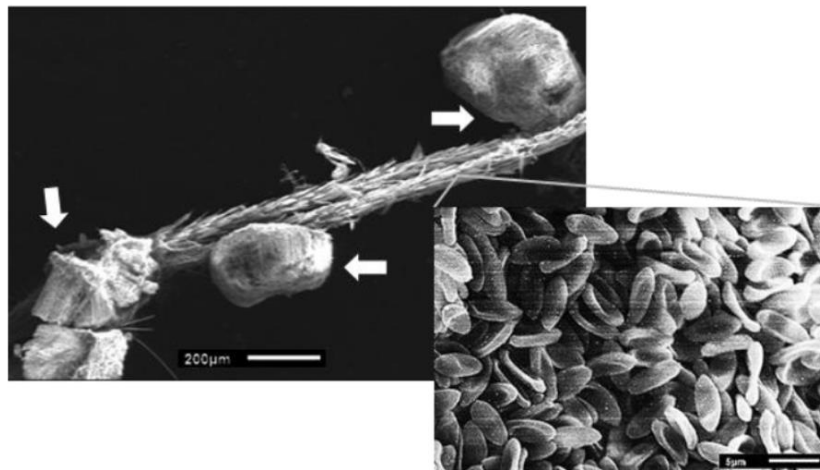


**Figura 30. Tiempo inter-cópula registrado en machos de *A. aegypti* confinados sucesivamente con 5 hembras vírgenes. Los tratamientos**

fueron: machos con 24 h y 2h de exposición a *M. anisopliae*, más control (machos sanos); n = 75 machos por tratamiento.

Estimación de la carga de conidias en machos expuestos a *M. anisopliae* y en hembras copuladas por machos contaminados

La carga media ( $\pm$  EE) de conidias estimada en grupos (“pooles”) de tres machos fue de  $1.45 \times 10^5 \pm 6.94 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ . Las fotografías hechas por el MEB, indicaron que se forma una película de conidias en la cutícula del mosquito, además que formas poliédricas de conidias se pegan a la cutícula de los tarsos frontales (Figura 31). La carga media ( $\pm$  EE) de conidias estimada por “pool” de 3 hembras que participaron en la 1a y 5ta cópula fue de  $8.22 \times 10^4 \pm 2.27 \times 10^3$  y  $4.90 \times 10^3 \pm 1.45 \times 10^3$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Además, la carga de conidias de las hembras que participaron en la 5ta cópula fue un 94% más baja que en las hembras que participaron en la 1a copula y con sólo el 3% que la carga que adquieren los machos ( $F= 334.29$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0.0001$ ).



**Figura 31. Conidias de *M. anisopliae* pegadas sobre la cutícula de los tarsos delanteros de un macho.** Las flechas blancas indican las formas

poliédricas adquiridas por las conidias; la intersección de las líneas grises indica la película de conidias pegadas en los tarsos delanteros del macho.

## DISCUSIÓN

Una herramienta potencial de biocontrol que aquí ha sido propuesta es la liberación de machos de *A. aegypti* contaminados con conidias de *M. anisopliae*, para diseminarlas a través de las poblaciones silvestres de hembras. De este modo, para brindar información básica, se examinó el efecto de la infección de *M. anisopliae* sobre la espermatogénesis en machos de *A. aegypti*, el tiempo requerido para copular y la autodiseminación de conidias hacia hembras. A través de cada uno de estos parámetros, los resultados indican que el potencial reproductivo de los machos contaminados con conidias se reduce considerablemente. Aquí, la estimación del grado de la actividad sexual que un macho es capaz de llevar a cabo, es relevante debido a que los machos contaminados con *M. anisopliae* portan una alta cantidad de conidias adheridas a sus tarsos, esta parte de las extremidades es utilizada en el comportamiento de cópula (Roth 1948).

La espermatogénesis en *A. aegypti* ha sido estudiada en su mayoría en relación a los mosquitos transgénicos o mosquitos portadores de la bacteria *Wolbachia spp* y estimando la calidad y cantidad de espermatozoides transferidos a las hembras. (Bader y Williams 2012, Ponlawat y Harrington 2007, Ponlawat y Harrington 2009, Richardson y Williams 2013). Estudios previos en *A. aegypti* demuestran que la cantidad de espermatozoides por macho varía de 3,000 a 9,000 en los primeros 3 a 5 días de edad (Ponlawat y Harrington 2007), esta variación marcada depende del tamaño y de la edad fisiológica de los machos (Ponlawat y

Harrington 2007), además se sabe que la variación en la temperatura en los criaderos larvales tiene influencia positiva sobre este parámetro (Bader y Williams 2012). En este estudio, la variación en la temperatura y densidad larvaria estuvo controlada para minimizar la variación del tamaño corporal y, en consecuencia, la cantidad de espermatozoides. En machos sanos, el promedio de espermatozoides aumentó de 1,900 a 6,400 (70%) desde el 1er al 5to día, pero en machos de los tratamientos de 2h y 24 h de exposición a las conidias, este promedio descendió en el 1er día post-infección en 1,300 y 1,029 espermatozoides, respectivamente.

Para entender nuestros resultados sobre la poligamia de los machos, es necesario analizar el trabajo de Roth (1948), quien evalúa la cópula de *A. aegypti* y menciona en sus resultado que “los machos de *A. aegypti* copulan o aparentan copular en más de 30 ocasiones con hembras en los primeros 30 minutos de confinamiento”, mientras que en otro trabajo se reporta que los machos pueden llegar a copular hasta con 22 hembras de por vida (Foster y Lea 1975). En el presente estudio, aunque los machos fueron confinados individualmente en botes de 1L, éstos comenzaron a copular después de los 20 minutos de confinamiento. Sin embargo, en la investigación de semi-campo (descrita en el siguiente capítulo) enfocada en la liberación de machos a nivel de estación biológica, se ha observado que los machos, después de liberarlos, inmediatamente comienzan el proceso de cópula. Por otro lado, los machos son atraídos por cualquier hembra en vuelo, independiente de su edad cronológica y fisiológica; estos son capaces de copular o intentar copular con hembras vírgenes o ya copuladas, o con hembras jóvenes o viejas (Oliva *et al.* 2014). El único motivo por el que el macho detiene su



comportamiento de cópula es por el agotamiento del esperma, que puede recuperarlo en al menos 3 días estando posado sin ninguna actividad física (Jones 1967, Spielman 1964).

Información acerca de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) para contaminar machos o hembras de *A. aegypti* con conidias de *M. anisopliae* es escasa; en un estudio reciente reportaron que la  $DL_{50}$  tiene un rango de variación que va desde las 3,000 y 50,000 conidias  $mL^{-1}$  de *M. anisopliae* de una cepa de la India (Kapoor *et al.* 2013). En este estudio se encontró que un solo macho adquiere una media de 48,000 conidias  $mL^{-1}$  y durante su 1er y 5ta cópula, éste disemina alrededor de 27, 000 y 1.600, respectivamente. A pesar de que la diseminación de las conidias disminuye en un 94% en 5ta cópula, esta carga de conidias es suficiente para que las hembras queden infectadas, de hecho se sabe que una carga aproximada de 25 conidias es suficiente para que un mosquito quede infectado y muera (Scholte *et al.* 2004). Por otro lado, el efecto de la patogénesis de *M. anisopliae* en machos de *A. aegypti* retrasa el comienzo de la cópula y el tiempo de inter-cópula, sin embargo, esto no es obstáculo para que estos machos contaminados copulen y autodiseminen conidias a las hembras (Reyes-Villanueva *et al.* 2011).

Este comportamiento de cópula en los machos de *A. aegypti* es una ventaja prometedora para el propósito de esta investigación; la liberación de machos contaminados con conidias puede asegurar una alta tasa de encuentros sexuales y de este modo diseminar conidias de *M. anisopliae* dentro de la población de hembras. Además, esta investigación es la base para los próximos estudios a nivel de

semi-campo y para fundamentar las liberaciones en campo en un programa de control vectorial.

## CONCLUSIONES

1. Los machos de *A. aegypti* expuestos por 24h a conidias de *M. anisopliae* tienen una vida media de 3.7 días.
2. Aunque los machos contaminados con conidias quedan prácticamente estériles, esto no impide que su comportamiento sexual se pierda.
3. Cuando los machos son expuestos a las conidias, estos adquieren una cantidad suficiente para diseminarlas a las hembras al menos hasta la 5ta cópula.
4. En comparación a los machos sanos, los contaminados con conidias tardan más tiempo en comenzar su comportamiento de cópula y en realizar intercópulas, sin embargo, esto no es obstáculo para que estos pierdan su agresividad sexual.

## **PERSPECTIVAS**

Es necesario evaluar la competencia intra-sexual entre machos contaminados con conidias y sanos, además de evaluar la autodiseminación a nivel de semi-campo, esto con el propósito de reforzar el fundamento de las liberaciones en campo para diseminar las conidias a las poblaciones de hembras silvestres del vector del dengue.

## 6. CAPÍTULO III

---

**Evaluar en semi-campo la competencia intrasexual entre un macho de *Aedes aegypti* contaminado con *Metarhizium anisopliae* y un macho sano además de evaluar la capacidad de autodiseminación del hongo utilizando diferentes densidades de machos dentro de una población finita de hembras**

## RESUMEN

**Antecedentes.** *M. anisopliae* es un hongo entomopatógeno que ha tenido resultados prometedores en el control integral de vectores. Recientemente ha sido investigado el proceso de autodiseminación y el comportamiento sexual de machos contaminados con conidias. En este estudio se evaluó, a nivel de semi-campo, la competencia intra-sexual entre un macho de *Aedes aegypti* contaminado con *Metarhizium anisopliae* y un macho sano y se evaluó la capacidad de autodiseminación del hongo utilizando diferentes densidades de machos dentro de una población finita de hembras.

**Metodología/Resultados.** En este estudio se realizaron 2 bioensayos. En el bioensayo 1 se evaluó, durante 10 días (4 h/día), la competencia intra-sexual entre 1 macho contaminado con  $6 \times 10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  y marcado con un polvo fluorescente rojo y un macho sano marcado con un polvo fluorescente amarillo, ambos liberados en una estación biológica con 20 hembras vírgenes de *A. aegypti* en su interior. Las variables dependientes fueron las tasas de inseminación e intentos de cópula realizados por cada uno de los machos. En el bioensayo 2 se liberaron diferentes densidades de machos (1 y 5) con 20 hembras confinadas en la estación biológica. Se formaron 4 tratamientos: **t1**- 1 macho contaminado y marcado con rojo, **t2**- 5 machos contaminados y marcados con rojo, **t3**- 1 macho sano y marcado con amarillo y **t4**- 5 machos sanos y marcados con amarillo. Cada tratamiento se repitió durante 10 días (4 h/día). Las variables dependientes fueron las tasas de inseminación e intentos de cópula realizados en cada uno de los tratamientos. Se

utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias mediante prueba de Ryan *post hoc* para analizar cada una de las variables dependientes de cada bioensayo. En el bioensayo 1, no hubo diferencias significativas entre el número de hembras inseminadas entre un macho contaminado y un sano, la media ( $\pm$  EE) de hembras inseminadas fue de 5.5 ( $\pm$  0.50) y 5.6 ( $\pm$  0.40), respectivamente; además hubo una media de hembras inseminadas ( $\pm$  EE) de 3.5 ( $\pm$  0.50) que fueron inseminadas por cualquiera de los 2 machos y 5.4 ( $\pm$  0.33) que no fueron inseminadas por ningún macho. En el bioensayo 2, no hubo diferencia significativa entre el número de hembras inseminadas por 1 y 5 machos contaminados, la media ( $\pm$  EE) de hembras inseminadas fue de 13.85 ( $\pm$  1.63) y 15.85 ( $\pm$  2.04), respectivamente. Esta misma situación ocurrió con los machos sanos, la media ( $\pm$  EE) de hembras inseminadas por 1 y 5 machos sanos fue de 14.35 ( $\pm$  1.53) y 15.32 ( $\pm$  1.74), respectivamente.

**Conclusiones.** Los machos contaminados y los sanos inseminan el mismo número de hembras en las primeras 4 horas de liberación. Además, 1 macho contaminado con conidias es capaz de tener los mismos encuentros de cópula que 5 machos contaminados con conidias.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, el uso de *M. anisopliae* contra mosquitos vectores de enfermedades es una extensa línea de investigación desde que se evaluó el potencial de infección de este hongo por medio de contacto directo contra *Anopheles gambiae* s.s. (Scholte *et al.* 2003, Scholte *et al.* 2006) y *A. aegypti* (Scholte *et al.* 2007) y por medio de autodiseminación sólo en *Anopheles gambiae* s.l. (Scholte *et al.* 2004). Estudios recientes de nuestra línea de investigación basada en el comportamiento de cópula de los machos de *A. aegypti* para autodiseminar conidas a las hembras (García-Munguía *et al.* 2011, Reyes-Villanueva *et al.* 2011), demuestran que tal micosis en hembras pueden frenar el periodo de incubación extrínseca del DENV (Garza-Hernández *et al.* 2012). Sin embargo, existe la duda de cuál será el efecto de este fenómeno cuando se implementa en campo, con condiciones naturales no controladas y con competencia intra-específica entre los mosquitos silvestres.

Existen pocos trabajos en la literatura mundial que evalúen a nivel de semi-campo y campo el potencial de un hongo entomopatógeno *versus* mosquitos vectores. Por ejemplo, en Tanzania se colocaron mantas negras impregnadas con conidias de *M. anisopliae* y se colocaron dentro de chozas habitadas por residentes de la comunidad. Posterior al tratamiento, se demostró la reducción de las poblaciones silvestres de *An. gambiae* s.s. y de la malaria en más del 90% (Scholte *et al.* 2005). Una situación similar sucedió en otra comunidad africana, aquí se impregnaron con conidias de *M. anisopliae* depósitos (jarras, jarrones, tanques) de agua potable y hubo una reducción en las poblaciones silvestres de *An. gambiae* s.s.



(Farenhorst *et al.* 2008). En un estudio reciente, se demostró por medio de un dispositivo impregnado con conidias y que fuese atractivo para mosquitos, el control de poblaciones silvestres e intra-domicilio *An. arabiensis* (Lwetoijera *et al.* 2010). No obstante, aún más escasa es la literatura que demuestre la efectividad de *M. anisopliae* versus *A. aegypti* a nivel de semi-campo o campo. Recientemente, se evaluó la capacidad de infección de *M. anisopliae* utilizando mantas impregnadas con conidias y colocadas en la veranda de una casa a diferentes días; aquí se encontró que cuando las trampas son dejadas a la intemperie, pierden su capacidad de infección, ya que las conidias pierden su virulencia en un 60% a los 18 días, sin embargo, cuando las trampas son dejadas por 2 a 4 días el TL<sub>50</sub> para hembras que tuvieron contacto con las conidias fue de 4 a 7 días (Carolino *et al.* 2014).

Aunque estos bioensayos tienen resultados prometedores, la metodología utilizada para diseminar las conidias es por contacto directo, es decir, los mosquitos necesitan ser atraídos por la trampa y después posarse en ella. Por el contrario, nuestras investigaciones utilizan la autodiseminación de machos a hembras (Reyes-Villanueva *et al.* 2011). En el capítulo anterior de esta investigación, se evaluaron, a nivel de laboratorio, diferentes parámetros relacionados con el comportamiento de cópula de machos contaminados con conidias. Se encontró que un macho es capaz de autodiseminar esporas dentro de las poblaciones de hembras y que pueden diseminar las conidias durante las cópulas y los intentos de cópula. Sin embargo, antes de liberar machos contaminados en campo, es necesario conocer su comportamiento en semi-campo y fundamentar la efectividad de este método. Por ello, este estudio tuvo como objetivos evaluar, en una estación biológica colocada al

aire libre, la competencia intra-sexual entre un macho de *Aedes aegypti* contaminado con *Metarhizium anisopliae* y un macho sano y evaluar la capacidad de autodiseminación del hongo utilizando diferentes densidades de machos dentro de una población finita de hembras.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cría de mosquitos

Para este experimento se utilizó una colonia de *A. aegypti* de generación F<sub>5-7</sub>. Los mosquitos fueron criados a una densidad baja de 100 larvas/litro para producir machos y hembras de tamaño grande con una longitud alar de aproximadamente 2.8 a 3 mm. Todos los machos y hembras utilizadas en este estudio fueron vírgenes, alimentadas con azúcar y tratadas como se menciona en el capítulo anterior.

### Infección de machos con *M. anisopliae*

Machos de 4 a 7 días de edad y alimentados con azúcar fueron expuestos por 24 h a  $6 \times 10^8$  conidias mL<sup>-1</sup>. Se empleó la cepa Ma-CBG-2 de *M. anisopliae* (recién pasada por hospedero y en PDA) y la suspensión de conidias se obtuvo y manipuló según lo previamente reportado por García-Munguía (2011).

### Marcaje de machos con polvos fluorescentes

Para marcar los mosquitos con polvos fluorescentes (Bioquip®, Cal. USA), se utilizó la metodología desarrollada por Verhulst *et al.* (2013). Antes del marcaje, 20 machos vírgenes de *A. aegypti* (usada para todas las repeticiones de cada tratamiento para los dos bioensayos) se anestesiaron con frío (4°C/5 m) y se colocaron dentro de un cono de papel de 180 mL. Después una jeringa de 5 ml con aguja de 0.6 × 25 mm se llenó de polvo fluorescente hasta la marca de 0.5 mL. El polvo se inyectó dentro del cono para formar una nube de polvo y asegurar el

marcaje de todos los mosquitos. Después, éstos fueron introducidos en un bote transparente de 1 L para después ser utilizados en los bioensayos. Se utilizó un polvo fluorescente de color rojo para marcar los machos contaminados con conidias y un polvo amarillo para marcar los machos sanos.

### Estación biológica

Se construyó un invernadero de plástico blanco con dimensiones de 3 m de ancho, 6 m de largo y 2.8 m de alto. La construcción se modificó implementando una puerta de seguridad en la entrada e incorporando un piso de madera forrada con una tela blanca; a 1 m sobre el invernadero se colocó una malla sombra para evitar la incidencia directa de los rayos solares y regular la temperatura (Figura 32). La estación biológica fue colocada en la parte noroeste del jardín del Centro de Biotecnología Genómica-IPN (CBG-IPN) (Reynosa, Tamaulipas, México). Antes de los bioensayos, se regó con agua a los lados del invernadero para incrementar la humedad relativa del lugar.



**Figura 32. Estación biológica (fabricado por grupo Xaxeni®, Edo. de México, México) utilizada en los bioensayos de semi-campo. a. puerta doble de seguridad, b. entradas de aire y c. malla sombra.**

Bioensayo 1: competencia intra-sexual entre un macho de *Aedes aegypti* contaminado con *Metarhizium anisopliae* y un macho sano

Para evaluar la competencia intra-sexual, 20 hembras vírgenes y sanas fueron liberadas a las 3: 50 pm dentro de la estación biológica. Pasados 10 min (4:00 pm), 1 macho contaminado con  $6 \times 10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  por 24 h y marcado con polvo fluorescente rojo y un macho sano marcado con polvo fluorescente amarillo fueron liberados simultáneamente. Los machos se dejaron en confinamiento con las hembras por un periodo de 4 h (7:00 pm). Después, los machos y las hembras se recapturaron con un moto-aspirador CDC (John W. Hock Co. Model 1412, FL, USA). Posteriormente, las hembras se sacrificaron colocándolas a  $4^\circ\text{C}/30$  m. Después, cada una de las hembras se visualizó bajo estereoscopio para determinar partículas de polvo fluorescente (rojo o amarillo) en el cuerpo de la hembra. Posteriormente, se determinó inseminación o no inseminación mediante detección de espermatozoides en espermatecas (Reyes-Villanueva *et al.* 2011). Este experimento se repitió a lo largo de 10 días (10 repeticiones).

Las variables dependientes de este bioensayo son: 1) hembras inseminadas por un macho contaminado (marcadas en rojo), 2) hembras inseminadas por un macho sano (marcadas en amarillo), 3) hembras inseminadas por cualquier macho (marcadas con rojo y amarillo) y 4) hembra no inseminadas (sin color). Estas variables se analizaron mediante un ANOVA y las medias se contrastaron *post hoc* mediante el análisis de Ryan. Finalmente se construyó un histograma representando la media ( $\pm$ ES) de las variables dependientes.

## Bioensayo 2: capacidad de autodiseminación del hongo utilizando 1 y 5 machos liberados con 20 hembras de *A. aegypti*

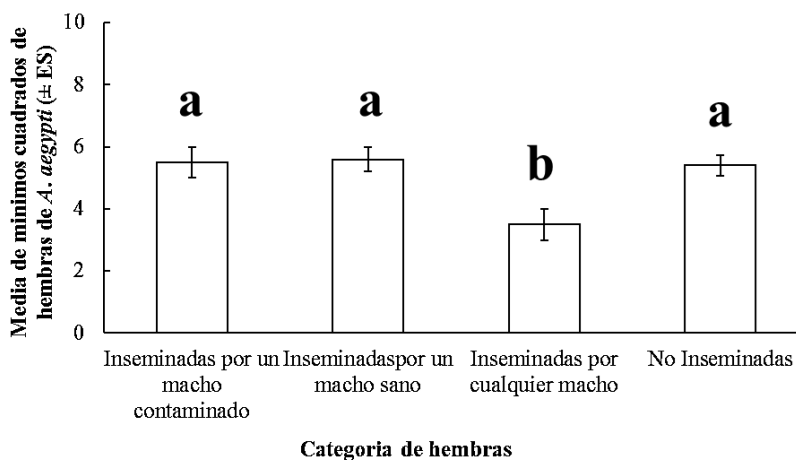
Para evaluar la capacidad de autodiseminación de *M. anisopliae* con 2 densidades de machos y liberados con 20 hembras de *A. aegypti* se formaron los siguientes tratamientos más sus controles: **1)** 1 macho contaminado versus 20 hembras, **2)** 1 macho sano versus 20 hembras, **3)** 5 machos contaminados versus 20 hembras, **4)** 5 machos sanos versus 20 hembras. Cada tratamiento y control se repitió individualmente por 10 días. Los mosquitos de cada tratamiento se manejaron de igual manera que en el bioensayo anterior.

Las variables dependientes de cada tratamiento fueron: inseminadas, 2) no inseminadas, 3) intentos de cópula. Estas variables se analizaron mediante un ANOVA y las medias se contrastaron *post hoc* mediante el análisis de Ryan. Finalmente se construyó un histograma representando la media ( $\pm$ EE) de las variables dependientes.

## RESULTADOS

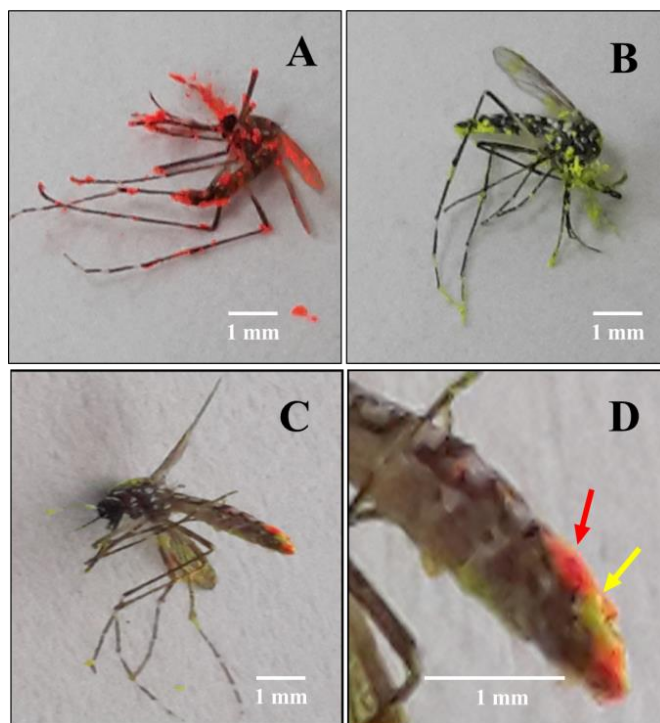
Competencia intra-sexual entre un macho de *Aedes aegypti* contaminado con *Metarhizium anisopliae* y un macho sano

En este bioensayo no hubo diferencias significativas entre el número de hembras inseminadas entre un macho contaminado (con polvo rojo) y un sano (con polvo amarillo) ( $F= 145.56$ ,  $df= 19$ ,  $p= 0.436$ ); la media ( $\pm$  EE) de hembras inseminadas fue de  $5.5 (\pm 0.50)$  y  $5.6 (\pm 0.40)$ , respectivamente. La media ( $\pm$  EE) de hembras inseminadas por cualquiera de los dos machos fue de  $3.5 (\pm 0.50)$ , es decir, a estas hembras se les detectó ambos polvos (Figura 34). La media ( $\pm$  EE) de hembras que no fueron inseminadas fue de  $5.4 (\pm 0.33)$ . En la figura 33 se muestra el histograma de las medias de las variables dependientes y su comparación por prueba de Ryan *post hoc*.



**Figura 33. Media ( $\pm$  EE) de las 4 categorías de hembras confinadas con un macho contaminado y un macho sano.** Las letras arriba de las barras representan la comparación de medias analizadas por medio de la prueba de Ryan; medias con mismas letras denotan diferencia no significativa.



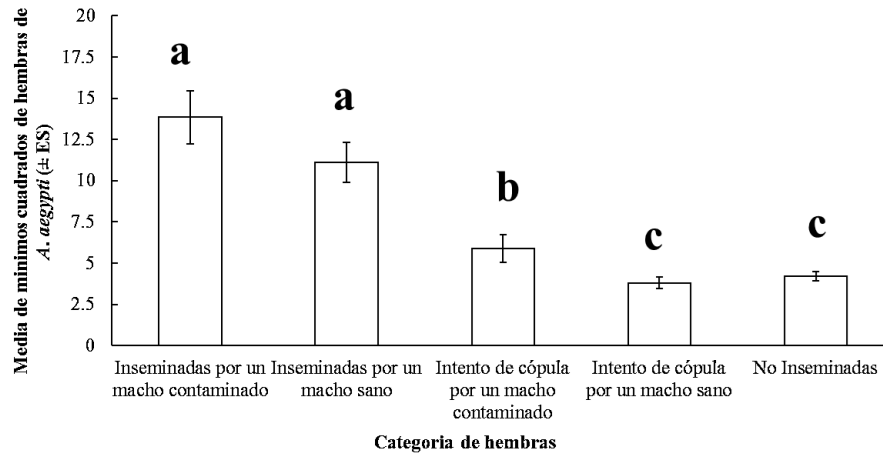


**Figura 34. Machos de *A. aegypti* utilizados para determinar la competencia intra-sexual.** A: macho contaminado con conidias y marcado en rojo; B: macho sano y marcado en amarillo. C: hembra de *A. aegypti* “copulada” por ambos machos; D: genitales externos que demuestran que fue abordada por ambos machos.

Capacidad de autodiseminación del hongo utilizando 1 y 5 machos liberados con 20 hembras de *A. aegypti*

En el bioensayo 2, no hubo diferencia significativa entre el número de hembras inseminadas por 1 y 5 machos contaminados, la media ( $\pm$  EE) de hembras inseminadas fue de 13.85 ( $\pm$  1.63) y 15.85 ( $\pm$  2.04), respectivamente ( $F= 234$ ,  $df= 19$ ,  $p= 0.18$ ) (Figura 35). Esta misma situación ocurrió con los machos sanos, la media ( $\pm$  EE) de hembras inseminadas por 1 y 5 machos sanos fue de 14.35 ( $\pm$  1.53) y 15.32 ( $\pm$  1.74), respectivamente ( $F= 154$ ,  $df= 19$ ,  $p= 0.23$ ) (Figura 35). Además, la media ( $\pm$  EE) de intentos de cópula realizados por machos contaminados con conidias fue de

5.90 ( $\pm$  0.85) y no fue significativo ( $F= 134$ ,  $df= 19$ ,  $p= 0.09$ ) al compararlo con los macho sanos que presentaron una media de ( $\pm$  EE) intentos de cópula de 3.80 ( $\pm$  0.35).



**Figura 35. Media ( $\pm$  EE) de las 5 categorías de hembras confinadas con machos contaminados y machos sanos.** Los machos tuvieron 2 componentes: 1 y 5 machos por cada tratamiento. Las letras arriba de las barras representan la comparación de medias analizadas por medio de la prueba de Ryan; medias con mismas letras denotan diferencia no significativa.

## DISCUSIÓN

En general, la diseminación de hongos entomopatógenos ocurre dentro de las poblaciones de insectos por las distintas actividades y movimientos de los hospederos (Baverstock *et al.* 2010). Los insectos infectados con conidias pueden cambiar los comportamientos de trofóaxis, comunicaciones táctil, aseo (“*grooming*”; en insectos sociales) (Schmid-Hempel 1988) y el comportamiento de cópula (Baverstock *et al.* 2010, Reyes-Villanueva *et al.* 2011). Durante los 2 bioensayos de semi-campo, consideramos que la diseminación de conidias de *M. anisopliae* a hembras fue por medio de encuentros sexuales debido al estado fisiológico de las hembras (vírgenes) y al comportamiento natural de los machos (vírgenes y polígamos) para comenzar el comportamiento sexual (Reyes-Villanueva *et al.* 2011). Está bien documentado que la selección intra-sexual (competencia de machos dentro de la misma especie) depende del tamaño y la edad cronológica de los machos (Helinski y Harrington 2011).

En el bioensayo 1 se evaluó la capacidad intra-sexual entre los machos contaminados con conidias y los machos sanos. Cuando los machos compitieron sexualmente para captura de la hembra y realizar la cópula, los machos contaminados tenían 48 horas post-infección con *M. anisopliae*, durante esta etapa patológica, el estado fisiológico del hongo está en fase de crecimiento y nutrición del micelio, es decir, el hongo comienza a perforar la cutícula y consumir nutrientes para invadir el insecto (Moino *et al.* 2002, Seye *et al.* 2009). Ya se ha documentado que cuando los mosquitos están infectados con algún entomopatógeno, estos disminuyen su “*fitness*”, es decir, los machos reducen la tasa de inseminación o

realizan inseminaciones incompletas (Gwadz y Craig 1970). En nuestros resultados, no hubo diferencia en la tasa de inseminación de los machos contaminados con el hongo y los machos sanos, es decir, los machos contaminados inseminaron el mismo número de hembras que los machos sanos (Figura 33). Curiosamente, hubo un 20 % de las hembras que fueron inseminadas por cualquiera de los machos, es decir, las hembras tuvieron encuentros sexuales mixtos, con los machos contaminados y machos sanos (Figura 34). Se sabe que los machos no discriminan entre una hembra ya inseminada (Helinski et. al 2012), ya que el “atrayerente” para que los machos identifiquen a una hembra para su cópula es por medio de la longitud de onda alar que las hembras emiten (Roth, 1948).

Ahora bien, los resultados del bioensayo 2 demuestran que la tasa de inseminación realizada por 1 y 5 machos fue del 70 % de las hembras, no obstante, los machos (1 y 5) tienen contacto directo con más del 90 % de las hembras (Figura 35), es decir, aunque no haya inseminación, hay intentos de cópula, en consecuencia transferencia de conidias (García-Munguía *et al.* 2011, Reyes-Villanueva *et al.* 2011). Scholte *et al.* (2004), demostraron que cuando machos y hembras de *Anopheles gambiae* s.s. contaminadas con *M. anisoplaie* son confinados en la misma proporción, no hay diferencia entre el número de inseminadas y no inseminadas pero cuando la proporción es 1 macho confinado con 10 hembras, el número de hembras no inseminadas es mayor, sin embargo, ellos no evaluaron competencia intra-sexual.

Existen pocos trabajos a nivel de semi-campo donde se evalúe la capacidad de *M. anisopliae* para infectar insectos vectores de enfermedades. Paula *et al.* (2013) evaluaron, a nivel de semi-campo, 5 telas negras impregnadas con conidias de *M. anisopliae* para el control de intra-domicilio de *A. aegypti*. Es este trabajo se obtuvieron resultados prometedores ya que se redujo la sobrevivencia de hembras en un 62% a los 7 días post-exposición de las conidias. Sin embargo, este trabajo utilizó el contacto directo para contaminar a los mosquitos y no la autodiseminación. A pesar de la alta mortalidad, cuando las telas negras son colocadas al aire libre, las conidias pierden diariamente su viabilidad y se ha encontrado que al segundo día solo un 40% de las conidias son capaces de infectar mosquitos (Carolino *et al.* 2014).

Según los resultados del bioensayo 2, 1 macho es capaz de contaminar una media de 16 hembras, sin embargo, en condiciones naturales, sugerimos que la proporción utilizada en los programas de liberación sea de 1 macho por cada 3 hembras y así asegurar la autodiseminación del hongo dentro de las poblaciones silvestres de *A. aegypti*.

Este estudio de semi-campo, nos comprueba que la competencia intra-específica entre machos contaminados y sanos es la misma. Además de que 1 macho es capaz de autodiseminar conidias en cópulas reales e intentos de cópula.

## CONCLUSIONES

1. Los machos contaminados y los sanos inseminan el mismo número de hembras en las primeras 4 horas de liberación.
2. Las conidias de *M. anisopliae* son autodiseminadas en cópulas reales e intentos de cópula.
3. 1 macho contaminado con conidias es capaz de tener los mismos encuentros de cópula que 5 machos contaminados con conidias.

## **PERSPECTIVAS**

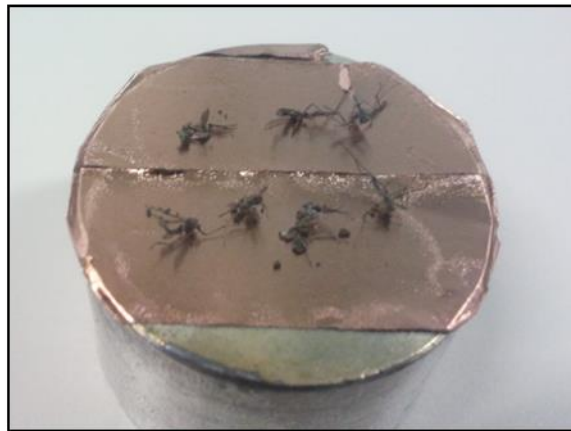
Antes de que este método de control vectorial sea optado como un método de biocontrol efectivo, es necesario realizar liberaciones de machos de *A. aegypti* contaminados con *M. anisopliae* para estimar la reducción de las poblaciones silvestres de hembras de *A. aegypti* a nivel de campo.

Además antes, durante y después de las liberaciones de machos, es necesario evaluar la dispersión de éstos, así como la epidemiología del DENV y entomología de los vectores del dengue.

## 7. ANEXOS

### Protocolo para el montaje y visualización de *Aedes aegypti* en el microscopio electrónico y de barrido (MEB)

1. Se anestesia con frio (20 min a 4°C) 1 mosquito de *A. aegypti*.
2. Con unas pinzas de disección el mosquito se coloca sobre un tubo forrado con cinta de cobre:

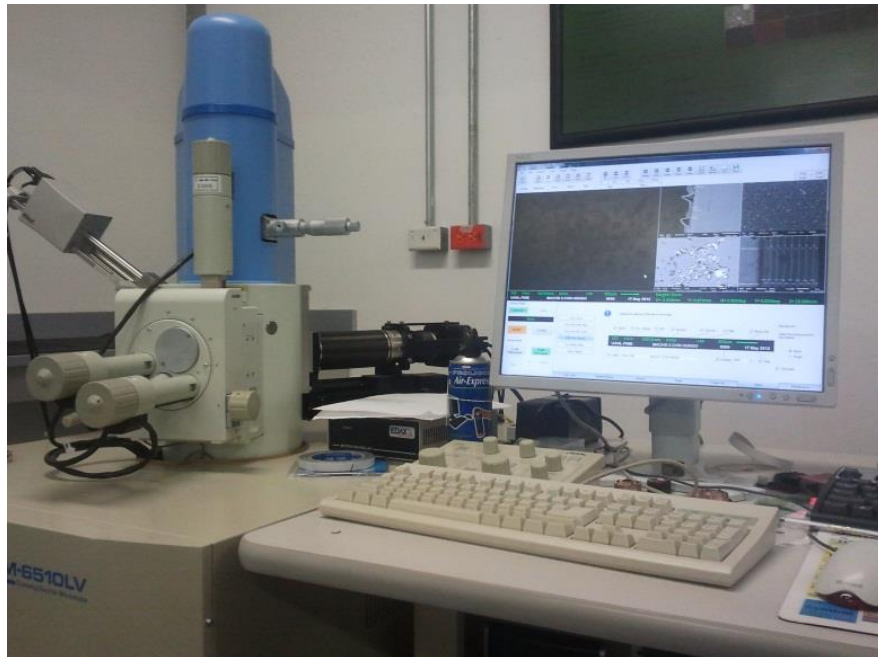


3. El tubo se cubre con partículas de oro mediante una recubridora DENTON VACUUM:





4. Los mosquitos son visualizados mediante el MEB:



## LITERATURA CITADA

Alto, B. W., L. P. Lounibos, C. N. Mores and M. H. Reiskind (2008). "Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275(1633): 463-471.

Andrew, J. and A. Bar (2013). "Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Adult Mosquito." *Annual Review and Research in Biology* 3(1): 52-69.

Bader, C. A. and C. R. Williams (2012). "Mating, ovariole number and sperm production of the dengue vector mosquito *Aedes aegypti* (L.) in Australia: broad thermal optima provide the capacity for survival in a changing climate." *Physiological Entomology* 37: 136-144.

Barbieri, R. T., J. Croce, R. F. Gandra, E. Gagete, C. R. Paula and W. Gambale (2005). "Allergenic extracts from *Metarhizium anisopliae*: Obtainment and characterization." *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 15(2): 131-139.

Baverstock, J., H. E. Roy and J. K. Pell (2010). "Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors." *Journal of the International Organization for Biological Control* 55(1): 88-102.

Beerntsen, B. T., A. A. James and B. M. Christensen (2000). "Genetics of mosquito vector competence." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(1): 115-137.

Bhatt, S., P. W. Gething, O. J. Brady, J. P. Messina, A. W. Farlow, C. L. Moyes, J. M. Drake, J. S. Brownstein, A. G. Hoen, O. Sankoh, M. F. Myers, D. B. George, T. Jaenisch, G. R. W. Wint, C. P. Simmons, T. W. Scott, J. J. Farrar and S. I. Hay (2013). "The global distribution and burden of dengue." *Nature* 469(7446): 504-507.

Bin, W. and S. Mitsuaki (2006). "Density dynamics of an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* introduced into fresh water." *Bulletinn of Forestry and Forest Products Research Institute* 5(3): 227-233.

Bischoff, J. F., S. A. Rehner and R. A. Humber (2009). "A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage." *Mycologia* 101(4): 512-530.

Bonduriansky, R. (2001). "The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence." *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 76(3): 305-339.

Bosio, C. F., B. J. Beaty and W. C. Black (1998). "Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59(6): 965-970.

Brengues, C., N. J. Hawkes, F. Chandre, L. McCarroll, S. Duchon, P. Guillet, S. Manguin, J. C. Morgan and J. Hemingway (2003). "Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene." *Medical and Veterinary Entomology* 17(1): 87-94.

Brown, G. (1996). "Dengue Fever." *Dengue Prevention News* 56(16): 1-4.

Carolino, A., A. Paula, C. Silva, T. Butt and R. Samuels (2014). "Monitoring persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)." *Parasites and Vectors* 7: 198.

Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) (2011). NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. México, El Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE).

Clark, T. B., W. R. Kellen, T. Fukuda and J. E. Lindegren (1969). "Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes." *Journal of Invertebrate Pathology* 11: 1-7.

Craig, B. G. (1967). "Mosquitoes: Female Monogamy Induced by Male Accessory Gland Substance." *Science* 156(3781): 1499-1501.

Christophers, S. R. S. (1960). *Aedes aegypti* (L.). The Yellow Fever Mosquito its Life History, Bionomics and Structure Cambridge, UK, The Syndics of the Cambridge at the University Press.

Dantés, H. G., J. A. Farfán-Ale and E. Sarti (2014). "Epidemiological Trends of Dengue Disease in Mexico (2000–2011): A Systematic Literature Search and Analysis." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(11): e3158.

Daoust, R. A. and D. W. Roberts (1969). "Virulence of natural and insect passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae." *Journal of Invertebrate Pathology* 40: 107-117.

Darbro, J. M., R. I. Graham, B. H. Kay, P. A. Ryan and M. B. Thomas (2011). "Evaluation of entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito." *Biocontrol Science and Technology* 21: 1027-1047.

Day, M. F. (1955). "A new sense organ in the head of the mosquito and other nematoceros flies." *Australian Journal of Zoology* 3(3): 330-335.

De Paula, A. R., E. S. Brito, C. R. Pereira, M. P. Carrera and R. Samuels (2008). "Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for dengue vector control." *Biocontrol Science and Technology* 18: 1017-1025.

Delgado-García, G. (2010). "Trascendencia de la obra científica del doctor Carlos J . Finlay." *Revista Biomédica* 21(701): 239-246.

Dengue Map- CDC. (2014). "Informes Recientes sobre Casos Locales o Importados de Dengue Recopilados de Informes Oficiales." 2014.

Dwight, P. W. (1975). *The Deadly Triangle- A Brief History of Medical and Sanitary Entomology*. Los Angeles, California, USA, Natural History Museum of Los Angeles County.

Emlen, S. T. and W. Orings (1977). "Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems." *Science* 197(4300): 215-223.

Esu, E., A. Lenhart, L. Smith and O. Horstick (2010). "Effectiveness of peridomestic space spraying with insecticide on dengue transmission; systematic review." *Tropical Medicine and International Health* 15(5): 619–631.

Farenhorst, M. and B. G. J. Knols (2007). "Fungal entomopathogens for the control of adult mosquitoes: a look at the issues." *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting* 18: 51-59.

Farenhorst, M. and B. G. J. Knols (2010). "A novel method for standardized application of fungal spore coatings for mosquito exposure bioassays." *Malaria Journal* 9(27): 1-9.

Farenhorst, M., J. C. Mouatcho, C. K. Kikankie, B. D. Brooke, R. H. Hunt, M. B. Thomas, L. L. Koekemoer, B. G. J. Knols and M. Coetzee (2009). "Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(41): 17443-17447.

Feinsod, F. M. and A. Spielman (1980). "Nutrient-mediated juvenile hormone secretion in mosquitoes." *Journal of Insect Physiology* 26: 113-117.

Foster, A. W. and O. A. Lea (1973). "Renewable fecundity of male *Aedes aegypti* following replenishment of seminal vesicles and accessory glands." *Journal of Insect Physiology* 21(10): 1085-1090.

García-Munguía, A. M., J. A. Garza-Hernández, E. A. Rebollar-Tellez, M. A. Rodríguez-Pérez and F. Reyes-Villanueva (2011). "Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes." *Parasites and Vectors* 4(1): 1-24.

Garza-Hernández, J. A., M. A. Rodríguez-Pérez, M. I. Salazar, T. L. Russell, M. A. Adeleke, E. D. J. de Luna-Santillana and F. Reyes-Villanueva (2013). "Vectorial Capacity of *Aedes aegypti* for Dengue Virus Type 2 Is Reduced with Co-infection of *Metarhizium anisopliae*." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7(3): e2013.

Gillies, M. T. (1955). "The pre-gravid phase of ovarian development in *Anopheles funestus*." Annual of Tropical Medicine and Parasitology 49: 320-325.

Goettel, M. S. and G. D. Inglis (1997). Fungi: Hyphomycetes. In: Manual of techniques in Insect Pathology. San Diego, USA, Academic press.

Gómez, H. and J. L. San Martín (2012). Estrategia Mesoamericana para la Prevención y Control Integrado del Dengue Plan dengue. México, Instituto Nacional de Salud Pública-Organización Panamericana de la Salud: 1-89.

Göpfert, M. C., H. Briegel and D. Robert (1999). "Mosquito hearing: sound-induced antennal vibrations in male and female *Aedes aegypti*." The Journal of Experimental Biology 202(20): 2727-2738.

Gubler, D. J. (1998). "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever." Clinical Microbiology Reviews 11(3): 480-496.

Gubler, D. J. (2002). "Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century." Trends in Microbiology 10(2): 100-103.

Gubler, D. J. (2011). "Prevention and Control of *Aedes aegypti*-borne Diseases: Lesson Learned from Past Successes and Failures." Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 19(3): 111-114.



Gwadz, R. W. and B. G. J. Craig (1970). "Female Polygamy due to Inadequate semen transfer in *Aedes aegypti*." *Mosquito News* 30(9): 355-360.

Hajek, A. E. and R. J. St. Leger (1994 ). "Interactions between fungal pathogens and insect hosts." *Annual Review of Entomology* 39(1): 293-322.

Halstead, B. S. (2008). "Dengue Virus–Mosquito Interactions." *Annual Review of Entomology* 53(12): 15.11-15.19.

Halstead, B. S. (2013). "Identifying protective dengue vaccines: Guide to mastering an empirical process." *Vaccine* 31: 4501– 4507.

Harbach, E. R. and L. K. Knight (1981). "Corrections and Additions to Taxonomists Glossary of Mosquito Anatomy." *Mosquito Systematics* 13(2): 201-217.

Hardy, J. L., E. J. Houk, L. D. Kramer and W. C. Reeves (1983). "Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses." *Annual Review of Entomology* 28: 229-262.

Hartberg, W. K. (1971). "Observations on the mating behaviour of *Aedes aegypti* in nature." *Bulletin of the World Health Organization* 45(6): 847-850.

Helinski, M. E. and L. C. Harrington (2011). "Male Mating History and Body Size Influence Female Fecundity and Longevity of the Dengue Vector *Aedes aegypti*." *Journal of Medical Entomology* 48(2): 202-211.

Helinski, M. E. H., L. Valerio, L. Facchinelli, T. W. Scott, J. Ramsey and L. C. Harrington (2012). "Evidence of polyandry for *Aedes aegypti* in semifield enclosures." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 86(4): 635-641.

Hembree, S. C. (1979). "Preliminary report on some mosquito pathogens from Thailand." *Mosquito News* 39: 575-582.

Hemingway, J., N. J. Hawkes, L. McCarroll and H. Ranson (2004). ""The Molecular Basis of Insecticide Resistance in Mosquitoes"." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 3(7): 653-665.

Henchal, E. A. and R. J. Putnak (1990). "The Dengue Viruses." *Clinical Microbiology Reviews* 3(4): 376-396.

Honório, N. A., R. M. R. Nogueira, C. T. Codeço, M. S. Carvalho, O. G. Cruz, M. D. A. F. M. Magalhães, J. M. G. de Araújo, E. S. M. de Araújo, M. Q. Gomes, L. S. Pinheiro, C. da Silva Pinel and R. Lourenço-de-Oliveira (2009). "Spatial evaluation and modeling of Dengue seroprevalence and vector density in Rio de Janeiro, Brazil." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(11): e545.

Howard, A. F. V., C. J. M. Koenraadt, M. Farenhorst, B. G. J. Knols and W. Takken (2010). "Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*." *Malaria Journal* 9(168): 1-9.

Humber, R. A. (2007). Recent phylogenetically based reclassifications of fungal pathogens of invertebrates. New York, USA, ARSEF.

Ibanez-Bernal, S. and C. Martinez-Campos (1994). "Aedes albopictus in Mexico." *American Mosquito Control Association* 10(2): 231–232.

Johnston, C. (1855). "Auditory Apparatus of the Culex Mosquito." *Quarterly Journal of Microscopical Science* 3: 97-102.

Jones, J. C. (1973). "A study on the fecundity of male *Aedes aegypti*\*." *Journal of Insect Physiology* 19: 435-439.

Jones, J. C. and D. R. Pilitt (1973). "Observations on the sexual behavior of free-flying *Aedes aegypti* mosquitoes." *Biological Bulletin* 144(6): 480-488.

Jones, J. C. and R. E. Wheeler (1965). "An analytical study coitus *Aedes aegypti*." *Journal of Morphology* 117(3): 401-423.

Jones, J. C. and R. E. Wheeler (1965). "Studies on spermathecal filling in *Aedes aegypti* (Linnaeus). I. Description." *Biological Bulletin* 129(1): 134-150.

Kaaya, G. P. and M. A. Okech (1990). "Horizontal transmission of mycotic infection in adult tsetse, *Glossina morsitans morsitans*." *Entomophaga* 35(4): 589-600.

Kamgang, B., E. Nchoutpouen, F. Simard and C. Paupy (2012). "Notes on the blood-feeding behavior of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon." *Parasites and Vectors* 5(1): 1-4.

Kapoor, M., P. V. Pawar, M. Joseph, A. Sen and M. V. Deshpande (2013). "Evaluation of biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* strains against larvae and adults of *Aedes aegypti* (L.)." *Journal of Biological Control* 27: 194–203.

Klein, M. G. and L. A. Lacey (1999). "An attractant trap for autodissemination of entomopathogenic fungi into populations of the Japanese beetle *Popilla japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae)." *Bulletin of Entomological Research* 9: 151–158.

Lacey, L. A., R. Frutos, H. K. Kaya and P. Vail (2001). "Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?" *Biological Control* 21(3): 230-248.

Laird, M. (1985). "Biological control of mosquitoes." *bulletin of American Mosquito Control Association* 6: 216-218.

Ligon, L. B. (2004). "Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment, and prevention." *Seminars in Pediatric Infectious Disease* 16(1): 60-65.

Lwetoijera, D. W., R. D. Sumaye, E. P. Madumla, D. R. Kavishe, L. L. Mnyone, T. L. Russell and F. O. Okumu (2010). "An extra-domiciliary method of delivering entomopathogenic fungus, *Metharizium anisopliae* IP 46 for controlling adult populations of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*." *Parasites and Vectors* 3(1): 1-6.

MacDonald, W. W. (1956). "*Aedes aegypti* in Malaya. II Larval and adult biology." *Annual of Tropical Medicine and Parasitology* 50: 399-414.

Macoris, M. D. L. G., M. T. M. Andrighetti, L. Takaku, C. M. Glasser, V. C. Garbeloto and J. E. Bracco (2003). "Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides." *Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 98(5).

Maniania, N. K. and S. Ekesi (2013). "The use of entomopathogenic fungi in the control of tsetse flies." *Journal of Invertebrate Pathology* 112 S83-S88.

Moino, J. A., A. S. Batista, L. R. Biaggioni, M. O. Pedro, J. Neves and P. R. Manoel (2002). "External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria*

*bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*." *Scientia Agricola* 59(2): 267-273.

Monath, T. P. (1994). "Dengue: the risk to developed and developing countries." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(7): 2395-2400.

Moore, M., M. Sylla, L. Goss, M. W. Burugu, R. Sang, L. W. Kamau, E. U. Kenya, C. Bosio, M. D. L. Munoz, M. Sharakova and W. C. Black (2013). "Dual African Origins of Global *Aedes aegypti* s.l. Populations Revealed by Mitochondrial DNA." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7(4): e2175.

Moslim, R., N. Kamarudin and M. B. Wahid (2011). "Trap for the auto dissemination of *Metarhizium anisopliae* in the management of rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*." *Journal of Oil Palm Research* 23: 1011-1017.

Nasci, R. S. (1990). "Relationship of wing length of adult dry weight in several mosquito species." *Journal of Medical Entomology* 27: 716-719.

National Center for Biotechnology Information. (2014). "Taxonomic Classification." 2014.

Nnakumusana, E. S. (1985). "Laboratory infection of mosquito larvae by entomopathogenic fungi with particular reference to *Aspergillus parasiticus* and its

effect on fecundity and longevity of mosquitoes exposed to conidial infections in larval stages." *Current Science* 54: 1221–1228.

Nobuchi, H. (1979). "The symptoms of a dengue-like illness recorded in a Chinese medical encyclopedia." *Kanpo Rinsho* 26: 422–425.

Normile, D. (2013). "Surprising New Dengue Virus Throws A Spanner in Disease Control Efforts." *Science* 342(6157): 415.

Oliva, C. F., D. Damiens and M. Q. Benedict (2014). "Male reproductive biology of *Aedes* mosquitoes." *Acta Tropica* 132: S12-19.

Ortiz-Urquiza, A., L. Riveiro-Miranda, C. Santiago-Álvarez and E. Quesada-Moraga (2010). "Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*." *Journal of Invertebrate Pathology* 105(3): 270-278.

Pates, H. and C. Curtis (2005). "Mosquito behavior and vector control." *Annual Review of Entomology* 50: 53-70.

Paula, A., A. Carolino, C. Silva, C. Pereira and R. Samuels (2013). "Testing fungus impregnated cloths for the control of adult *Aedes aegypti* under natural conditions." *Parasites and Vectors* 6: 256.

Paula, A., A. Carolino, C. Silva and R. Samuels (2011). "Susceptibility of adult female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding." *Parasites and Vectors* 9: 91.

Ponlawat, A. and L. C. Harrington (2007). "Age and body size influence male sperm capacity of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)." *Journal of Medical Entomology* 44(3): 422-426.

Ponlawat, A. and L. C. Harrington (2009). "Factors associated with male mating success of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80(3): 395-400.

Quintela, E. D. and C. W. McCoy (1998). "Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid." *Journal of Invertebrate Pathology* 72(3): 220-230.

Reyes-Villanueva, F., J. A. Garza-Hernández, A. M. García-Mungía, P. Tamez-Guerra, A. F. V. Howard and M. A. Rodríguez-Pérez (2011). "Dissemination of *Metarhizium anisopliae* of low and high virulence by mating behavior in *Aedes aegypti*." *Parasites and Vectors* 4(1): 1-7.



Reyes-Villanueva, F., J. A. Garza-Hernandez, A. M. Garcia-Munguia, A. F. V. Howard, A. I. Ortega-Morales, M. A. Adeleke and M. A. Rodriguez-Perez (2013). "*Aedes albopictus* in northeast Mexico: An update on adult distribution and first report of parasitism by *Ascogregarina taiwanensis*." *Journal of Vector Borne Diseases* 50(9): 202-205.

Richardson, A. J. and C. R. Williams (2013). "Inter-population mating success in Australian dengue vector mosquitoes: effects of laboratory colonization and implications for the spread of transgenics." *Journal of Vector Ecology* 38: 111-119.

Rodriguez-Perez, M. A., A. F. V. Howard and F. Reyes-Villanueva (2012). *Biological Control of Dengue Vectors, Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics. Integrated Pest Management and Pest Control – Current and Future Tactics.* D. S. Soloneski. Rijeka, Croatia, InTech. 369: 241-271.

Rogers, D. J., A. J. Wilson, S. I. Hay and A. J. Graham (2006). "The Global Distribution of Yellow Fever and Dengue." *Advances in Parasitology* 62: 181–220.

Roth, L. M. (1948). "A Study of Mosquito Behavior. An Experimental Laboratory Study of the Sexual Behavior of *Aedes aegypti* (Linnaeus)." *American Midland Naturalist* 40(2): 265-352.

Rush, A. B. (1951 (1789)). "An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780." *The American Journal of Medicine* 11(5): 546–550.

Saavedra-Rodriguez, K., L. Urdaneta-Marquez, S. Rajatileka, M. Moulton, A. E. Flores, I. Fernandez-Salas, J. Bisset, M. Rodriguez, P. J. McCall, M. J. Donnelly, H. Ranson, J. Hemingway and W. C. Black (2007). "A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*." *Insect Molecular Biology* 16(6): 785-798.

San Marín, J. L. and O. Brathwaite-Dick (2007). "La Estrategia de Gestión Integrada para la Prevención y el Control del Dengue en la Región de las Américas." *Revista Panamericana de Salud Publica* 21(1): 55-63.

Schlotzhauer, S. D. and R. C. Littell (1997). *SAS® System for Elementary Statistical Analysis*. USA, Cary, NC: SAS Institute Inc.

Schmid-Hempel, P. (2003). "Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 357-366.

Scholte, E.-J., B. G. J. Knols, R. A. Samson and W. Takken (2004). "Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review." *Journal of Insect Science* 4: 1-19.

Scholte, E.-J., B. G. J. Knols and W. Takken (2006). "Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity." *Journal of Invertebrate Pathology* 91(1): 43-49.

Scholte, E.-J., B. N. Njiru, R. C. Smallegange, W. Takken and B. G. J. Knols (2003). "Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*." *Malaria Journal* 2(29): 1-8.

Scholte, E.-J., W. Takken and B. G. J. Knols (2007). "Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*." *Acta Tropica* 102(3): 1-9.

Seye, F., O. Faye, M. Ndiaye, E. Njie and J. Marie Afoutou (2009). "Pathogenicity of the Fungus, *Aspergillus clavatus*, isolated from the locust, *Oedaleus senegalensis*, against larvae of the mosquitoes *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*." *Journal of Insect Science* 9(53): 1-7.

Shah, P. A. and J. K. Pell (2003). "Entomopathogenic fungi as biological control agents." *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 413-423.

Simmons, C. P., J. J. Farrar, C. N. van Vinh and W. B. (2012). "Current Concepts: Dengue." *The New England Journal of Medicine*: 366: 1423-1432.

Sirof, L. K., R. L. Poulson, M. C. McKenna, H. Girnary, M. F. Wolfner and L. C. Harrington (2008). "Identity and transfer of male reproductive gland proteins of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: potential tools for control of female feeding and reproduction." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(2): 176-189.

Spielman, A. (1964). "The Mechanics of Copulation in *Aedes aegypti*." *Biological Bulletin* 120(10): 324-344.

Spielman, A., M. G. Leahy and V. Skaff (1967). "Seminal Loss in Repeatedly Mated Female *Aedes aegypti*." *Biological Bulletin* 132: 404-412.

Suman, D. S., A. R. Shrivastava, S. C. Pant and B. D. Parashar (2011). "Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with egg surface morphology and morphometrics using scanning electron microscopy." *Arthropod Structure and Development* 40(5): 479-483.

Swellengrebel, N. H. (1929). "La dissociation des fonctions sexuelles et nutritives (Dissociation gono-trophique) d' *Anopheles macullipennis* comme cause du paludisme dans les pays-bas et ses rapports avec "Infection domiciliaire"." *Annales de l'Institut Pasteur* 43: 1370-1389.

Tanada, Y. and H. K. Kaya (1993). *Insect Pathology*. London, UK, Academic Press.

Thisyakorn, U. and C. Thisyakorn (2013). "Latest developments and future directions in dengue vaccines." *Therapeutic Advances in Vaccines* 2(1): 3-9.

Torres-Galicia, I., D. Cortés-Poza and I. Becker (2014). "Dengue en México: análisis de dos décadas." *Gaceta Médica de México* 150: 122-127.

Vega, F. E., P. F. Dowd, L. A. Lacey, J. K. Pell, D. M. Jackson and M. G. Klein (2000). Dissemination of beneficial microbial agents by insects. In *Field manual of techniques in invertebrate pathology*. Netherlands, Springer

Ward, M. D. W., Y. J. Chung, L. B. Copeland and D. L. Doerfler (2011). "Allergic Responses Induced by a Fungal Biopesticide *Metarhizium anisopliae* and House Dust Mite Are Compared in a Mouse Model." *Journal of Toxicology* (2011).

Whitehead, S. S., J. E. Blaney, A. P. Durbin and B. R. Murphy (2007). "Prospects for a dengue virus vaccine." *Nature Reviews Microbiology* 5(7): 18-528.

Wilder-Smith, A. and D. J. Gubler (2008). "Geographic expansion of dengue: the impact of international travel." *The Medical Clinics of North America* 92(6): 1377-1390.

Williams, R. W. and A. Berger (1980). "The relation of female polygamy to gonotrophic activity in the ROCK strain of *Aedes aegypti*." Mosquito News 40(4): 597-604.

World Health Organization (1982). Biological Control of Vectors of Disease. Sixth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Geneva, World Health Organization.

World Health Organization (1982). Biological control of vectors of disease. Sixth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Geneva.

World Health Organization (2009). Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva.

Xia, Y., J. M. Clarkson and A. K. Charnley (2002). "Trehalose-hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*." Journal of Invertebrate Pathology 80(3): 139-147.

Yoon, I.-k., A. Getis, J. Aldstadt, A. L. Rothman, D. Tannitisupawong, C. J. M. Koenraadt, T. Fansiri, J. W. Jones, A. C. Morrison, R. G. Jarman, A. Nisalak, M. P. M. Jr and S. Thammapalo (2012). "Fine Scale Spatiotemporal Clustering of Dengue Virus Transmission in Children and *Aedes aegypti* in Rural Thai Villages." PLoS Neglected Tropical Diseases 6(7): e1730.

