



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

## SUSCEPTIBILIDAD Y ALTERACIONES POR DIFLUBENZURON EN LARVAS DE *Aedes aegypti*

ABRAHAM MONTAÑO REYES

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y  
DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe, **Abraham Montaña Reyes**, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **María Celina Micaela Llanderal Cázares**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis “**Susceptibilidad y alteraciones por diflubenzurón en larvas de *Aedes aegypti***”, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Estado de México a 24 de mayo de 2019

Abraham Montaña Reyes

Firma y nombre del alumno


Vo. Bo. del Consejero

La presente tesis titulada: **Susceptibilidad y alteraciones por diflubenzurón en larvas de *Aedes aegypti*** realizada por el alumno: **Abraham Montaña Reyes** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

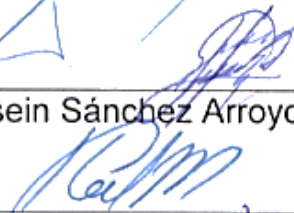
MAESTRO EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA

  
Dra. María Celina Micaela Llanderal Cázares

ASESOR

  
Dr. Hussein Sánchez Arroyo

ASESORA

  
Dra. Kalina Miranda Perkins

ASESOR

  
M. en C. Jorge Manuel Valdez Carrasco

Montecillo, Texcoco, Estado de México, mayo de 2019

## SUSCEPTIBILIDAD Y ALTERACIONES POR DIFLUBENZURON EN

### LARVAS DE *Aedes aegypti*

Abraham Montaña Reyes, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

### RESUMEN

Las benzoilfenilureas inhiben la síntesis de quitina e interfieren con el proceso de muda en artrópodos. En este trabajo se evaluó el efecto del diflubenzurón en larvas de tercer instar de *Aedes aegypti*. Se determinó la susceptibilidad al producto y con microscopía de luz y electrónica se documentaron las alteraciones ocasionadas. La relación entre las concentraciones aplicadas y la mortalidad de las larvas fue directamente proporcional. Las CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> fueron de 0.23 y 0.47 ppm, respectivamente. Se obtuvo un valor de la pendiente de 4.12, que indica la homogeneidad de la población utilizada en el estudio. El modelo se aceptó con base en el valor de la X<sup>2</sup> de 0.0105. Las principales alteraciones observadas fueron incapacidad para completar la muda, reducción de la movilidad, fragmentación de la cutícula antigua, división poco notable de los segmentos corporales y deformación de estructuras caudales. Se incluyen imágenes de la ultraestructura en las que se notaron zonas de ruptura en la cutícula, separación entre la cutícula, la epidermis y los músculos y estos últimos con un arreglo desorganizado. En concentraciones bajas, a partir de 0.15 ppm, el diflubenzurón provoca alteraciones en el comportamiento y morfología de *Ae. aegypti*.

**Palabras clave:** Culicidae, insecto vector, regulador del crecimiento, inhibidor de la síntesis de quitina, actividad biológica.

**SUSCEPTIBILITY AND ALTERATIONS BY DIFLUBENZURON IN LARVAE OF  
*Aedes aegypti***

**Abraham Montaña Reyes, M. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2019.**

**ABSTRACT**

Benzophenyl ureas inhibit chitin synthesis and interfere with the molting process in arthropods. In this work, the effect of diflubenzuron on third-instar larvae of *Aedes aegypti* was evaluated. The susceptibility to the product was determined, and the alterations generated were shown through light and electron microscopy. LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> were 0.23 and 0.47 ppm, respectively. A slope value of 4.12 was obtained, which indicates the homogeneity of the population used in the study. The model was accepted based on the X<sup>2</sup> value of 0.0105. The main alterations observed were the incapacity to complete the molt, a reduction of mobility, the fragmentation of the old cuticle, a division of the body segments that was not evident, and the deformation of the caudal structures. Images of the ultrastructure are included, where breaking zones in the cuticle were observed, separation of the cuticle, the epidermis and the muscles, and these latter with a disorganized arrangement. In low concentrations, from 0.15 ppm, diflubenzuron causes alterations in the behavior and morphology of *Ae. aegypti*.

**Keywords:** Culicidae, insect vector, growth regulator, inhibitor of chitin synthesis, biological activity.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, por abrirme las puertas de la institución y darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría para continuar con mi formación profesional.

A la Dra. Celina Llanderal Cazares, por brindarme su confianza para aceptarme como su alumno, por su paciencia, sus consejos y enseñanzas y sin lugar a duda todo el apoyo y guía para la realización de este trabajo, es una gran persona con la que estaré siempre agradecido. Muchas gracias Dra.

Al Mtro. Jorge Valdez Carrasco, por su ayuda en la parte de toma y procesamiento de imágenes, sus observaciones al trabajo y le agradezco por haber compartido su conocimiento conmigo, gracias.

A la Dra. Kalina Miranda Perkins, porque estuvo pendiente de los avances del trabajo, así como de sus observaciones y apoyo.

Al Dr. Husein Sánchez Arroyo, por sus aportaciones al presente trabajo, que a pesar de la distancia, siempre atendió a las dudas que surgieron.

A la Dra. Laura Delia Ortega Arenas por sus observaciones y sugerencias al presente trabajo.

A la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias del Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad 1, del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por su disposición y apoyo en el procesamiento de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido, observación y toma de fotografías.

A La Dra. Reyna Lara Martínez del Laboratorio de Microscopía Electrónica, Departamento de Biología Celular, en la Facultad de Ciencias de la UNAM, por brindarme su apoyo en el procesamiento del material biológico, observación y toma de fotografías en el microscopio electrónico de transmisión.

Al laboratorista Oscar Moreno Cernas, por el apoyo para realizar los bioensayos. Por compartirme consejos, platicas y sobre todo brindarme su amistad, muchas gracias.

Al laboratorista Oscar Vega Ortiz, por su compañerismo y apoyo brindado en la preparación de material biológico.

A todos los profesores, que me dieron clases durante mi estancia en el Colegio, me permitieron ampliar mi conocimiento, muchas gracias.

A mis compañeros del laboratorio de Fisiología: Rosario, Norma, Ricardo, Uriel y Manuel. Y a mis compañeros que conocí durante esta etapa, hicieron que mi estancia en esta institución fuera muy amena.

## DEDICATORIA

### **A mi familia:**

Especialmente a mi mamá, por todos sus esfuerzos, consejos, porque siempre has confiado y creído en mí, apoyándome en todas las decisiones que he tomado en la vida, algunas un poco locas, por fomentarme el deseo de superación y triunfo en la vida, sin ella no lograría llegar hasta donde hoy me encuentro. Gracias por todo el cariño y amor que me has dado siempre. Te amo mamá.

A mi hermana Mary, que a pesar de la distancia está al pendiente de mí y me da su apoyo y ánimos para seguir adelante. Te quiero mucho hermanita.

A mis sobrinos Toño y Sebastián, espero que mi trabajo y esfuerzo les sirva como fuente inspiración para que se superen día a día y luchen por un futuro mejor. Nunca dejen de soñar y realicen lo que les guste siempre con mucho amor y dedicación. Los amo con todo mi corazón

A Oscar Gamaliel, por tu apoyo incondicional y amor a lo largo de estos dos años deseando que sean muchos más, Siempre me das ánimos y palabras de aliento para seguir adelante. Gracias amor.



## CONTENIDO

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
DEDICATORIA .....	viii
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo general .....	3
2.2. Objetivos particulares.....	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
3.1. Importancia de <i>Aedes aegypti</i> .....	4
3.2. Ciclo biológico.....	4
3.2.1. Huevos .....	5
3.2.2. Larvas.....	5
3.2.3. Pupas.....	6
3.2.4. Adultos .....	6
3.3. Reguladores del crecimiento de insectos (RCI) .....	8
3.4. Inhibidores de la síntesis de quitina.....	8
3.5. Diflubenzurón .....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1. Material biológico .....	10
4.2. Bioensayos .....	11
4.3. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).....	13
4.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).....	13
4.5. Análisis estadístico .....	14
5. RESULTADOS.....	15
6. DISCUSIÓN .....	24
7. CONCLUSIONES .....	27
8. LITERATURA CITADA.....	28

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Mortalidad de larvas de tercer instar de <i>Aedes aegypti</i> 12 días después de la aplicación de diflubenzurón.....	15
<b>Cuadro 2.</b> Concentraciones letales de diflubenzuron en larvas de tercer instar <i>Aedes aegypti</i> .....	15

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> (OMS, 2018).....	4
Figura 2. <i>Aedes aegypti</i> . Macho (a), hembra (b) y postura en reposo (c). (CENAPRECE, 2014).....	7
Figura 3. Fórmula estructural del diflubenzuron. ....	9
Figura 4. Colonia de <i>Aedes aegypti</i> . ....	10
Figura 5. Disco con masas de huevos de <i>Aedes aegypti</i> .....	11
Figura 6. Concentraciones intermedias de DFB y vasos con larvas de tercer instar de <i>Aedes aegypti</i> .....	12
Figura 7. Aspecto morfológico de larvas de tercer ínstar de <i>Aedes aegypti</i> del grupo testigo (a) y expuestas a diflubenzuron a 0.4 ppm (b), 0.8 ppm (c) y 1.0 ppm (d). Escalas: 1 mm.....	17
Figura 8. Alteraciones morfológicas en larvas de <i>Aedes aegypti</i> expuestas a concentraciones de 0.15 ppm (a), 0.6 ppm (b y c), 0.8 ppm (d) y 1.0 ppm (e y f) de diflubenzurón. Escalas: 500 µm. ....	18
Figura 9. Microscopía electrónica de barrido de larvas de tercer instar de <i>Aedes aegypti</i> del grupo testigo (a) y tratadas con DFB en concentraciones de 0.15 ppm (b), 0.25 ppm (c y d), 0.4 ppm (e) y 0.6 ppm (f y g). cv: cutícula vieja, pa: papilas anales, si: surcos intersegmentales, sr: sifón respiratorio.....	19
Figura 10. Alteraciones histológicas ocasionadas por diflubenzurón en larvas de tercer instar de <i>Aedes aegypti</i> . Testigo (a), 0.1 ppm (b), 0.15 ppm (c), 0.25 ppm (d), 0.4 (e) y 0.6 ppm (f).cu: cutícula, ep: epidermis, ie: invaginaciones de la epidermis, rc: ruptura cuticular, sce: separación entre la cutícula y la epidermis.....	22
Figura 11. Electromicrografías de cutícula, epidermis y músculo de larvas de tercer ínstar de <i>Aedes aegypti</i> del grupo testigo (a y g) y tratadas a concentraciones de 0.25 ppm (c), 0.4 ppm (b y e) y 0.6 ppm (d, f y h) de DFB. c: citoplasma, dc: desprendimientos cuticulares, de: desmosomas, e: epidermis,en: endocutícula, ep: epicutícula, es:	

espacio subcuticular, m: mitocondria, n: núcleo, pm: patrones de  
músculo estriado, pr: puntos de refuerzo, rc: ruptura de la cutícula,  
re: retículo endoplásmico rugoso. .... 23

## 1. INTRODUCCIÓN

Los mosquitos son responsables de la transmisión de diversos patógenos y parásitos de importancia médica como son virus, bacterias y nematodos, causantes de enfermedades graves que anualmente ocasionan la muerte de alrededor de un millón de personas en el mundo (Becker *et al.*, 2010; American Mosquito Control Association 2018). En particular, el mosquito hematófago *Aedes aegypti*, es el principal vector de chikungunya y de pandemias de flavivirus, como dengue, zika, fiebre amarilla y otras enfermedades virales, cuyo hábitat está estrechamente relacionado con las condiciones dentro y fuera de los hogares donde se establecen las poblaciones humanas (Rozendaal, 1997; Beserra *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2018; World Health Organization, 2018).

En México el principal método de control para este vector es la aplicación de insecticidas, principalmente piretroides, organofosforados y carbamatos, pero estos químicos también afectan la salud humana, provocan la disminución de organismos benéficos y causan contaminación ambiental (Argueta *et al.*, 2011; Gutiérrez-Ramírez *et al.*, 2013; Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades, 2016). El peligro que representa el manejo de sustancias tóxicas y la contaminación provocada por ciertos insecticidas, así como los derivados de su degradación, obligan a investigar nuevos productos químicos selectivos, poco persistentes y de menor toxicidad para el hombre y el ambiente (Martínez, 1999). Los compuestos que interfieren con rutas metabólicas restringidas a ciertos grupos son importantes por su especificidad y su uso se ha incrementado (Belinato *et al.*, 2013; Merzendorfer, 2013).

De acuerdo con este último concepto, existe un grupo de compuestos clasificados como reguladores del crecimiento de insectos (RCI), los cuales actúan en ciertos procesos fisiológicos esenciales para su desarrollo normal, son selectivos en su modo de acción, solo actúan sobre las especies objetivo y se utilizan para controlar diversas plagas de insectos, incluidos los mosquitos, las cucarachas y las pulgas (Tunaz y Uygun, 2003; Fulton *et al.*, 2013).

Los RCI incluyen juvenoides y ecdisoides, que han sido empleados en las últimas décadas como una alternativa prometedora al uso de insecticidas

habituales (Aguilera *et al.*, 2001). El diflubenzurón (DFB), un regulador de crecimiento de tipo ecdisoide, es una benzoilfenilurea que inhibe la síntesis de quitina y por lo tanto interfiere con la muda, además de que ocasiona cambios estructurales en la matriz peritrófica y células del cuerpo graso de *Captotermes formosanus*, inhibe la emergencia de los adultos de *Musca domestica* y *Diaphorina citri* y reduce el peso de la cutícula y de los niveles de quitina en *Schistocerca gregaria*, entre otros efectos (Morales-Ramos *et al.*, 2006; Tilak *et al.*, 2010; Tiwari *et al.*, 2012; Tail *et al.*, 2015).

Las larvas de mosquito tratadas con DFB mueren durante la muda, debido a que no logran eliminar por completo la cutícula antigua y los individuos que sobreviven mueren en la etapa de pupa o durante la emergencia de los adultos (World Health Organization, 2006). Se ha reportado que el DFB tiene efecto ovicida en *Aedes* y *Culex* (Suman *et al.*, 2013) y reduce la emergencia de adultos y el potencial reproductivo de *Ae. aegypti* (Kamal y Khater, 2010; Jahan *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta el momento de la revisión no hay reportes que muestren las alteraciones morfológicas ocasionadas por acción del DFB en larvas de *Ae. aegypti*. Con base en lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo mostrar evidencia ilustrada de los efectos causados por el DFB en larvas de *Ae. aegypti*, mediante microscopía de luz y electrónica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

- ❖ Mostrar evidencia ilustrada mediante microscopía de luz y electrónica de las alteraciones ocasionadas por diflubenzuron en larvas de *Ae. aegypti*.

### 2.2. Objetivos particulares

- ❖ Determinar la toxicidad de diflubenzurón en larvas de *Ae. aegypti*.
- ❖ Describir los cambios de comportamiento y alteraciones morfológicas causadas por DFB.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. Importancia de *Aedes aegypti*

Las enfermedades propagadas por mosquitos ocasionan la muerte de más de un millón de personas en todo el mundo. El mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) es una especie de importancia médica, debido a su capacidad para transmitir diversos virus causantes de enfermedades como Zika, dengue, chikungunya y fiebre amarilla, entre otras. Más de la mitad de la población mundial se encuentra en áreas donde está presente este mosquito debido a que es especie domiciliaria o peridomiciliaria, es decir, que está adaptado a vivir cerca del ser humano, entorno en donde encuentra lugares ideales para su desarrollo y consigue alimento fácilmente (Faccioli, 2011; American Mosquito Control Association, 2018; World Health Organization, 2018).

#### 3.2. Ciclo biológico

El ciclo de vida de *Ae. aegypti* comprende las etapas de huevo, cuatro estadios larvales, pupa y adulto (Figura 1). Nelson (1986) y Chico Aldama *et al.* (2001) describen las características de cada uno de los estados que se presentan a continuación:

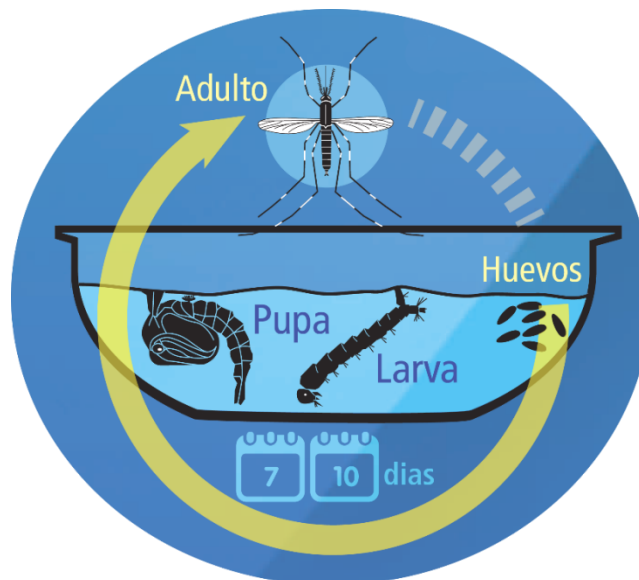


Figura 1. Ciclo biológico de *Aedes aegypti* (OMS, 2018).



### **3.2.1. Huevos**

Miden aproximadamente 1.0 mm de longitud, presentan forma de cigarro, y son depositados por encima del nivel del agua en las paredes de los recipientes. Al momento de la postura son blancos, pero rápidamente adquieren un color negro brillante. Son fecundados durante la postura, si el ambiente es húmedo y cálido el desarrollo embrionario se completa en 48 h, pero este tiempo puede prolongarse hasta cinco días a temperaturas bajas. Eclosionan en dos a tres días, pero algunos lo hacen en los primeros 15 min de contacto con el agua y otros hasta que son hidratados varias veces. Transcurrido este periodo, los huevos son capaces de resistir largos periodos de desecación y temperaturas extremas, hasta por un año. La capacidad de resistencia a la desecación es uno de los principales obstáculos para el control del mosquito, condición que además permite su movilización a grandes distancias en recipientes secos.

### **3.2.2. Larvas**

Los individuos que emergen inician un ciclo de cuatro estadios larvales acuáticos y, como en la mayoría de los insectos holometábolos, esta fase es el período de mayor alimentación y crecimiento. Pasan la mayor parte del tiempo alimentándose de material orgánico sumergido o acumulado en las paredes y el fondo del recipiente, para lo cual utilizan las cerdas bucales en forma de abanico. Se distinguen a simple vista de las de otros géneros por la posición de reposo casi vertical a la superficie del agua y nadan con un movimiento serpentino característico.

Se asemejan a otras larvas de mosquitos por la forma de la cabeza, el tórax ovoide y el abdomen de nueve segmentos. El segmento posterior y anal del abdomen presenta cuatro papilas anales para la regulación osmótica y pueden diferenciarse de otras especies por su sifón más corto en comparación con el de otros culícidos.

Los tres primeros estadios se desarrollan rápidamente, mientras que el cuarto demora más tiempo, por un mayor aumento de tamaño y peso. En condiciones extremas, como baja temperatura y escasez de alimento, el cuarto

estadio larval puede prolongarse desde varias semanas hasta siete meses, previo a su transformación en pupa. No resisten temperaturas inferiores a los 10 °C o superiores a 45 °C.

La duración del desarrollo larval depende de la temperatura, la disponibilidad de alimento y la densidad de larvas en el recipiente. En condiciones óptimas, con temperaturas de 25 °C a 29 °C, el período desde la eclosión hasta la pupación puede ser de cinco a siete días, pero comúnmente dura de 7 a 14 días.

### **3.2.3. Pupas**

Representan un estado de reposo en el que se producen importantes modificaciones anatómico-fisiológicas hasta la aparición de los adultos. Reaccionan inmediatamente a estímulos externos tales como la vibración y se desplazan activamente por todo el recipiente. Se mantienen en la superficie del agua debido a que tienen la propiedad de flotar, lo que facilita la emergencia del adulto. El período pupal dura de dos a tres días en condiciones favorables, con temperaturas entre 28 °C y 32 °C, pero las variaciones extremas de temperatura pueden retardar este período. La pupa tiene en la base del tórax un par de tubos respiratorios o trompetas que atraviesan la superficie del agua y permiten la respiración. En la base del abdomen poseen un par de remos, paletas o aletas natatorias.

### **3.2.4. Adultos**

Son de color oscuro con bandas blancas en las bases de los segmentos tarsales y un característico diseño en forma de lira en el mesonoto. La hembra tiene antenas con setas cortas, escasas y palpos de un tercio de longitud de la probóscide, mientras que el macho presenta antenas plumosas con pelos largos, abundantes y palpos del tamaño de la probóscide (Figura 2).

Dentro de las 24 h siguientes a la emergencia pueden aparearse y se inicia la etapa reproductora del insecto. El apareamiento regularmente se realiza durante el vuelo, pero en algunas ocasiones se lleva a cabo en una superficie horizontal o vertical. El macho sujeta el ápice del abdomen de la hembra con su terminalia,

inserta su edeago dentro del receptáculo genital de la hembra y la bolsa copulatrix y la llena de espermatozoides, que pasa a la espermateca en uno o dos minutos. Esa inseminación es suficiente para fecundar todos los huevos que la hembra produce durante toda su vida.

Las hembras son las únicas que succionan sangre, y su ingestión es necesaria como fuente de proteína para el desarrollo de los huevos. Su actividad se lleva a cabo principalmente durante las primeras horas o a la media mañana y a media tarde o al anochecer. Generalmente, después de cada alimentación sanguínea se desarrolla un lote de aproximadamente 200 huevos que pueden ser depositados en distintos lugares y puede volver alimentarse.

La oviposición generalmente se produce hacia el final de la tarde, cuando la hembra grávida es atraída hacia recipientes oscuros o sombreados, con paredes duras sobre las que deposita sus huevos, para lo que prefiere aguas relativamente limpias con poco contenido de materia orgánica. La posición de los huevos a pocos milímetros de la superficie del agua permite que estos maduren, y en la próxima lluvia, al subir el nivel de agua del recipiente, los huevos eclosionan al entrar en contacto con el agua. El ciclo completo de huevo a adulto se completa en óptimas condiciones de temperatura y alimentación en 10 días.

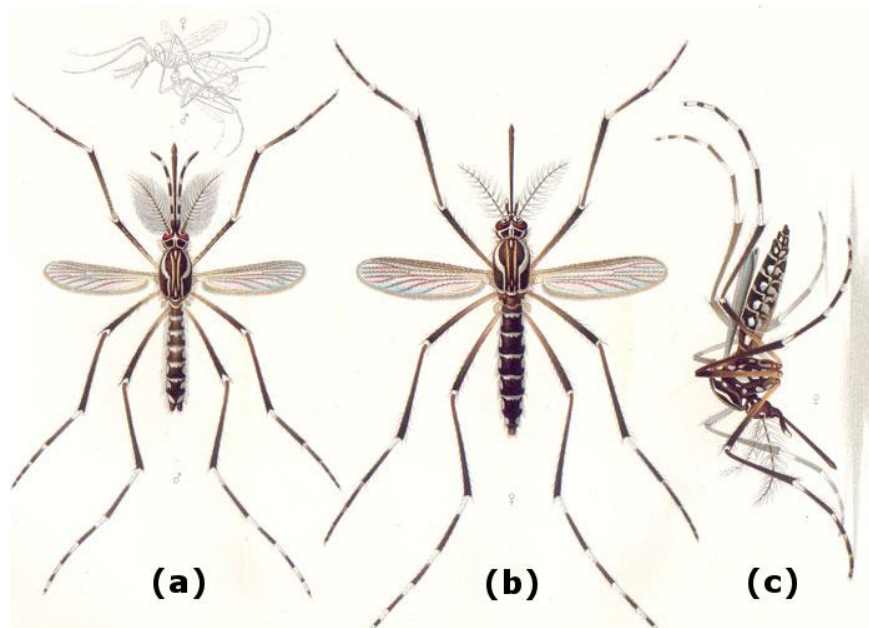


Figura 2. *Aedes aegypti*. Macho (a), hembra (b) y postura en reposo (c). (CENAPRECE, 2014).

### **3.3. Reguladores del crecimiento de insectos (RCI)**

Los RCI se encuentran dentro del grupo de insecticidas bioquímicos y son clasificados como hormonas mímicas (juvenoides) e inhibidores del desarrollo (ecdísoides). Su acción fundamental se basa en inhibir vías o procesos bioquímicos específicos del crecimiento, desarrollo y reproducción de diversas especies de insectos, en los que provocan la muerte debido a alteraciones en los procesos de regulación de células u órganos, mediados por hormonas. Son considerados compuestos biológicamente específicos, no tóxicos al hombre ni a los mamíferos, biodegradables y menos propensos al desarrollo de resistencia fisiológica (Mulla *et al.*, 1986; Aguilera *et al.*, 2001; Tunaz y Uygun, 2003).

### **3.4. Inhibidores de la síntesis de quitina**

Los inhibidores de la síntesis de la quitina (benzoilfenilureas) son normalmente incluidos dentro del grupo de los reguladores del crecimiento de los insectos, aunque la terminología correcta sería "inhibidores del desarrollo de los insectos" (IDI), ya que sus efectos están dirigidos concretamente a la inhibición de un proceso vital, la muda, y no a la regulación del crecimiento como lo hacen los RCI clásicos, como los análogos de la hormona juvenil (Grosscurt y Jongsma 1987). Becker *et al.* (2010) mencionan que las benzoilfenilureas presentan tres características únicas: 1) En general son más tóxicos cuando son ingeridos por el organismo objetivo, por lo que la aplicación de estos RCI debe coincidir con la alimentación de éste, 2) La máxima actividad "ventana de actividad" ocurre en etapas específicas del desarrollo del insecto, principalmente durante los picos altos de síntesis de quitina, o sea que la susceptibilidad de las larvas es mayor antes de cada muda. Por tanto, los tratamientos deben aplicarse ya sea en el momento de mayor susceptibilidad de los insectos o alternativamente lograr una residualidad suficiente para abarcar la siguiente "ventana de actividad" y 3) Tienen la capacidad de prolongar la etapa larvaria después de la exposición a una dosis tóxica. Durante la etapa susceptible, el insecto puede estar en un estado agonizante durante muchos días antes de morir.

### 3.5. Diflubenzurón

El diflubenzurón es una benzoilfenilurea (Figura 3) clasificado como RCI que interrumpe la muda (Grafton-Cardwell *et al.*, 2005). Este compuesto controla efectivamente estadios inmaduros de muchas especies de plagas de insectos, especialmente de los órdenes Coleoptera, Diptera y Lepidoptera (Eisler, 1992). Después de la aplicación de diflubenzurón los estados de desarrollo de determinados insectos sufren trastornos, especialmente en la muda siguiente, que generalmente les ocasionan la muerte. Aun cuando la siguiente ecdisis se logra producir hasta un cierto grado, el insecto no es capaz de liberarse del resto de la exuvia. Frecuentemente es posible observar un exudado de grandes gotas de hemolinfa en el cuerpo de los insectos afectados (Klein-Koch, 1977). Al igual que otros RCI, el diflubenzurón desempeña una función crítica en el manejo integrado de plagas (MIP), ya que es un atractivo reemplazo para los organofosforados y carbamatos, en gran medida debido a su baja toxicidad para mamíferos y alta selectividad (Grafton-Cardwell *et al.*, 2005).

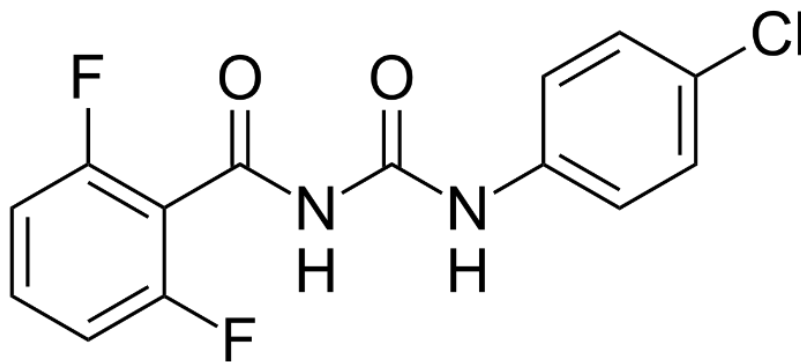


Figura 3. Fórmula estructural del diflubenzurón.

En cuanto al mecanismo de acción del diflubenzurón en insectos, existen varias teorías que mencionan la inhibición de: a) el transporte de UDP-N-acetil glucosamina a través de las membranas, b) la deposición de la cutícula y la formación de fibrillas, c) la formación de quitina y la activación de quitinasas y fenoloxidasas relacionadas con el catabolismo de la quitina y d) la síntesis del ácido desoxirribonucleico (Darvas, 1997).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Material biológico

La determinación específica de *Aedes aegypti* se corroboró con las claves de Carpenter y LaCasse (1974). Tanto la cría y mantenimiento de la colonia de mosquitos, como los bioensayos, se llevaron a cabo en el insectario del Programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Montecillo. El establecimiento de la colonia se realizó en una cámara de cría con condiciones controladas (temperatura de  $27 \pm 2$  °C, humedad relativa de  $70 \pm 5\%$  y fotoperiodo 12:12 h) (Figura 4). Primeramente se colocó un disco con masas de huevos de *Ae. aegypti*, cepa Nueva Orleans, en una bandeja plástica previamente llenada con aproximadamente 12 litros de agua; después de la eclosión, las larvas fueron separadas en varias bandejas con agua para tener densidades poblacionales apropiadas y lograr un desarrollo óptimo de ellas. Las larvas fueron alimentadas con croquetas para hámster.



Figura 4. Colonia de *Aedes aegypti*.

El periodo larval transcurrió durante seis a ocho días en las bandejas de plástico. El agua se cambió cada tercer día para evitar la formación de una capa de nata en la superficie, que pudiera ocasionar la muerte de las larvas por asfixia. Las pupas fueron recolectadas en recipientes de plástico con 500 mL de agua y puestas en jaulas entomológicas de 80x50x50 cm. Para alimentar a los adultos machos se colocó un recipiente con agua azucarada a una concentración de 10%, que consistió en un frasco cuya tapa tenía un orificio en el centro para introducir una porción de algodón, mientras que las hembras fueron alimentadas cada tercer día con sangre de un hámster inmovilizado durante 15 min y al mismo tiempo se realizaba el cambio de agua azucarada. Para obtener nuevos discos con masas de huevos se introdujo en la jaula un recipiente con agua cubierto con papel kraft® para que las hembras ovipositaran. Los discos recuperados eran almacenados a la intemperie y posteriormente se utilizaron para los bioensayos (Figura 5).



Figura 5. Disco con masas de huevos de *Aedes aegypti*.

#### 4.2. Bioensayos

Para los bioensayos se siguió el método propuesto por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2005). Se empleó una formulación comercial de diflubenzurón (Caronte® SC 21.95%). La ventana de respuesta biológica se determinó mediante una serie de concentraciones seriales



de DFB de 1.0%, 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%, 0.00001% y 0.000001%, diluidas en agua de grifo y así encontrar el intervalo de entre el 5 y 100% de mortalidad de las larvas. De cada concentración se tomó 1.0 mL, que se adicionó en vasos de plástico previamente llenados con 100 mL de agua y en cada uno de ellos se introdujeron 25 larvas de tercer instar de *Ae. aegypti*. El grupo control consistió en un recipiente con el mismo volumen de agua y número de larvas. Se realizaron tres repeticiones por concentración. Para los datos de mortalidad se consideraron como muertas a las larvas que carecían de movimiento o presentaban alteración de éste en cuanto a rapidez y frecuencia de visitas a la superficie.

Posteriormente se incluyeron cinco dosis intermedias entre el intervalo de mortalidad, las cuales fueron 0.15, 0.25, 0.4, 0.6, 0.8 ppm de DFB y se evaluaron bajo las condiciones descritas anteriormente para la ventana biológica (Figura 6).



Figura 6. Concentraciones intermedias de DFB y vasos con larvas de tercer instar de *Aedes aegypti*.



Posterior a la aplicación de los tratamientos se realizaron observaciones durante 12 días de las larvas tratadas para compararlas con las del grupo control en cuanto a movilidad, capacidad para mudar, ruptura del integumento, avance al siguiente estadio y cualquier anomalía que pudiera observarse. Las larvas muertas fueron retiradas diariamente de los vasos para su observación en fresco con un microscopio Zeiss®, Stereo Discovery V20. Con una cámara digital Canon® EOS 50D se realizaron tomas fotográficas de los ejemplares que presentaron alteraciones morfológicas ocasionadas por el DFB.

#### **4.3. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)**

Para la observación en MEB, solo las larvas expuestas a dosis entre 0.1 y 0.6 ppm de DFB y las testigo fueron fijadas en glutaraldehído al 3%, durante 24 horas; posteriormente se lavaron por un minuto en dos ocasiones con amortiguador de fosfatos (pH 7.3), y después se deshidrataron en una serie gradual de alcohol etílico (10, 30, 50, 70 y 90 100%), para secarlas a punto crítico con CO<sub>2</sub> y bañarlas en oro. Las muestras fueron montadas en platinas metálicas y observadas en un microscopio Hitachi® modelo SU1510 a 10 y 15 kV, en el Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad 1, del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

#### **4.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)**

Se utilizaron larvas tratadas a dosis de 0.1, 0.15, 0.25, 0.4 y 0.6 ppm y del grupo control, que fueron fijadas en una solución de glutaraldehído y paraformaldehído (2.5%/4%) por 24 horas. Se hicieron cinco lavados con amortiguador de fosfatos (7.3 pH) durante cinco minutos cada uno. La postfijación de los ejemplares se realizó con tetraóxido de osmio (1%) por tres horas, posteriormente una tinción en bloque con acetato de uranilo (0.5%) para el contraste de capas y una deshidratación en serie gradual de alcohol etílico (30-100%), con dos cambios de 10 minutos. Para eliminar el exceso de alcohol las muestras se sometieron a tres cambios de 10 minutos de óxido de propileno (agente intermediario). Se realizaron preinclusiones con óxido de propileno con

Epon en diluciones 3:1, 2:1 y 1:1, e inclusión en resina epóxica fresca en moldes planos durante 48 horas. La polimerización de las muestras fue a 60° C durante 24 a 48 horas. Con un ultramicrotomo Leica Ultracut R se obtuvieron cortes en serie de 60 nm de espesor, que fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión JEOL<sup>®</sup>, modelo JEM1010 del Laboratorio de Microscopía Electrónica, Departamento de Biología Celular, en la Facultad de Ciencias de la UNAM.

#### **4.5. Análisis estadístico**

La mortalidad causada por cada concentración de DFB se sometió a un análisis Probit (Finney, 1971) mediante el programa estadístico SAS 9.4 para Windows (SAS Institute, 2012), para estimar las CL<sub>50</sub>, y CL<sub>90</sub> expresadas en ppm con sus respectivos límites fiduciales al 95 % de confianza (LF) y pendiente.

## 5. RESULTADOS

El DFB ocasionó una mortalidad en las larvas de *Ae. aegypti* en relación directa a las concentraciones (Cuadro 1) y la toxicidad se evidenció en las concentraciones letales estimadas mediante el análisis Probit, con los valores que se muestran en el Cuadro 2. No hubo traslape entre los límites fiduciales de la CL50 y la CL90, lo que indica que hay diferencia entre ellas. La mortalidad ocasionada por el DFB se obtuvo en un solo ciclo de concentraciones, lo que se ve reflejado en el valor de la pendiente y muestra que la población fue homogénea. El modelo se aceptó con base en el valor de la  $\chi^2$  de 0.0105 ( $p < 0.0001$ ).

**Cuadro 1.** Mortalidad de larvas de tercer instar de *Aedes aegypti* 12 días después de la aplicación de diflubenzurón.

Concentración (ppm)	Mortalidad (%)
1.0	100
0.8	99
0.6	99
0.4	82
0.25	43
0.15	30
0.1	7
Testigo	0.0

**Cuadro 2.** Concentraciones letales de diflubenzurón en larvas de tercer instar *Aedes aegypti*.

Parámetros estadísticos			
CL <sub>50</sub> LF	CL <sub>90</sub> LF	b±EE	$\chi^2$
0.23 (0.21-0.25)	0.47 (0.42-0.53)	4.12 ± 0.43	0.0105

CL= Concentración letal (ppm). LF= Límites fiduciales al 95%. b±EE= Pendiente ± Error Estándar.  $\alpha = 0.05$ .  $P < 0.0001$ .

Durante los bioensayos se observaron cambios de comportamiento en las larvas tratadas con 0.25, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 ppm de DFB, como disminución gradual de los movimientos ascendentes a la superficie del agua y por lo tanto de la frecuencia de respiración en comparación con las larvas del grupo testigo.

Las larvas tratadas con las diferentes concentraciones evidenciaron una morfología alterada. En la Figura 7a se muestra la morfología general de larvas del grupo testigo, con el cuerpo de forma cilíndrica y alargada, de tonalidad blanquecina, excepto la cabeza y el sifón de color café, debido a que son zonas esclerosadas. La cabeza de forma esférica y en la parte ventral los peines bucales. El tórax globular con setas laterales largas. El abdomen con segmentos definidos y presencia de setas laterales. En la parte caudal se encuentra el sifón respiratorio, tubular y esclerosado y ventral a éste el segmento anal pequeño, con una placa en posición dorsal y al final las papilas anales transparentes. Entre las diversas alteraciones morfológicas, con 0.4 ppm de DFB se observaron larvas con la apariencia de “cabeza doble”, que son individuos que aún tienen la cutícula de la cápsula cefálica del instar anterior, de la cual no consiguen liberarse (Figura 7b). En otros casos, a concentraciones de 0.8 ppm y 1.0 ppm, la cutícula de la cápsula cefálica se fragmenta sin desprenderse (Figura 7c y 7d), alteración que se presentó con mayor frecuencia. En la Figura 7c se observa que el cuerpo de las larvas tratadas con 0.8 ppm de DFB adquiere un aspecto frágil y aplanado. En dosis de 1.0 ppm las larvas presentan ensanchamiento del tórax, como se aprecia en la Figura 7d.

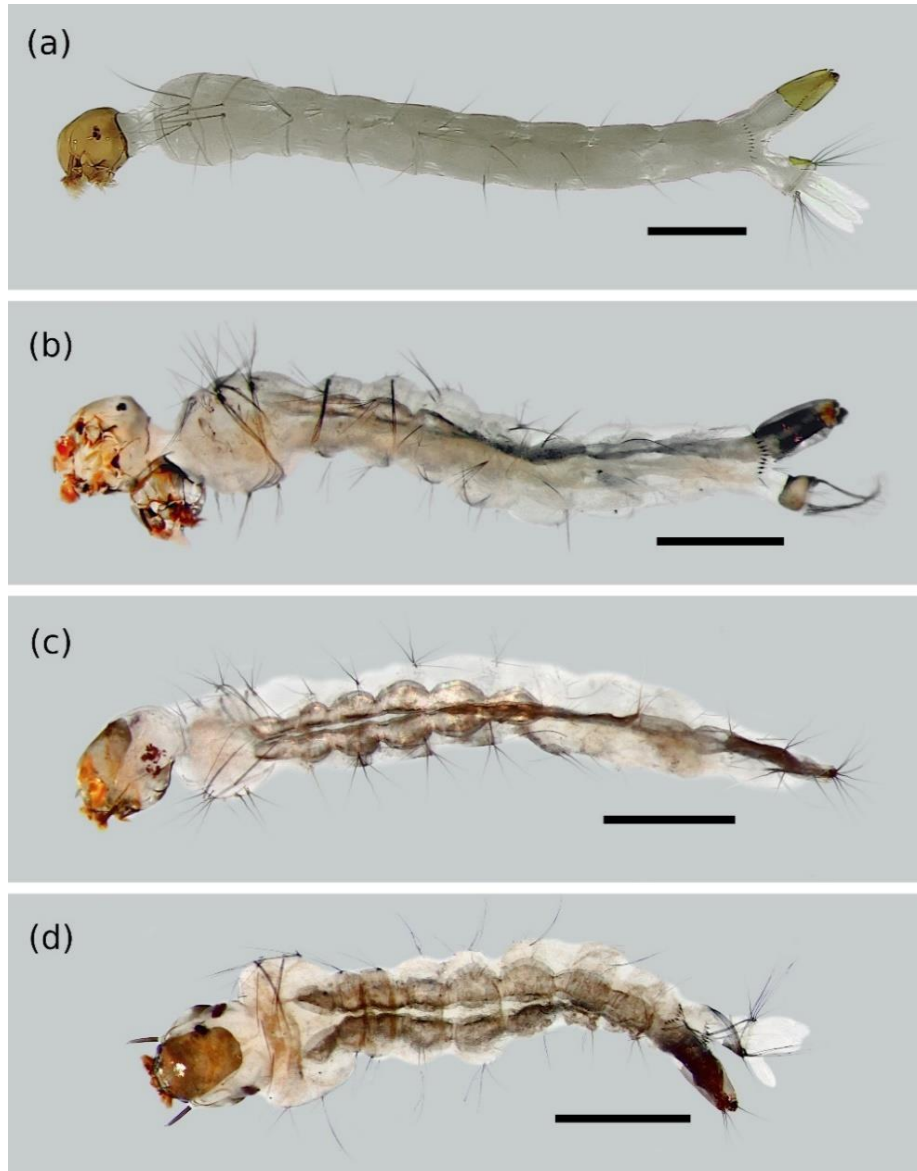


Figura 7. Aspecto morfológico de larvas de tercer ínstar de *Aedes aegypti* del grupo testigo (a) y expuestas a diflubenzuron a 0.4 ppm (b), 0.8 ppm (c) y 1.0 ppm (d). Escalas: 1 mm.

Con mayor aumento se encontró que larvas expuestas a 0.15 ppm de DFB presentaron extrusión de una masa amorfa blanca proveniente del tubo digestivo, como se ve en la Figura 8a, aunque sus movimientos eran normales y podían permanecer vivas durante varios días sin llegar a pupar. A una concentración de 0.6 ppm algunas larvas tuvieron ensanchamiento de la parte caudal (Figura 8b) y también presentaron la “cabeza doble” como se describió anteriormente (Figura

8c). En el caso de la concentración de 0.8 ppm, los ejemplares sufrieron una degradación avanzada del contenido del cuerpo en la región del tórax y adelgazamiento de la pared del cuerpo, además de aspecto transparente (Figura 8d). Finalmente, a la concentración de 1.0 ppm, las larvas presentaron expansión de los troncos traqueales como se aprecia en la Figura 8e y la fragmentación de la cutícula de la cápsula cefálica que en ciertos casos está por desprenderse (Figura 8f).

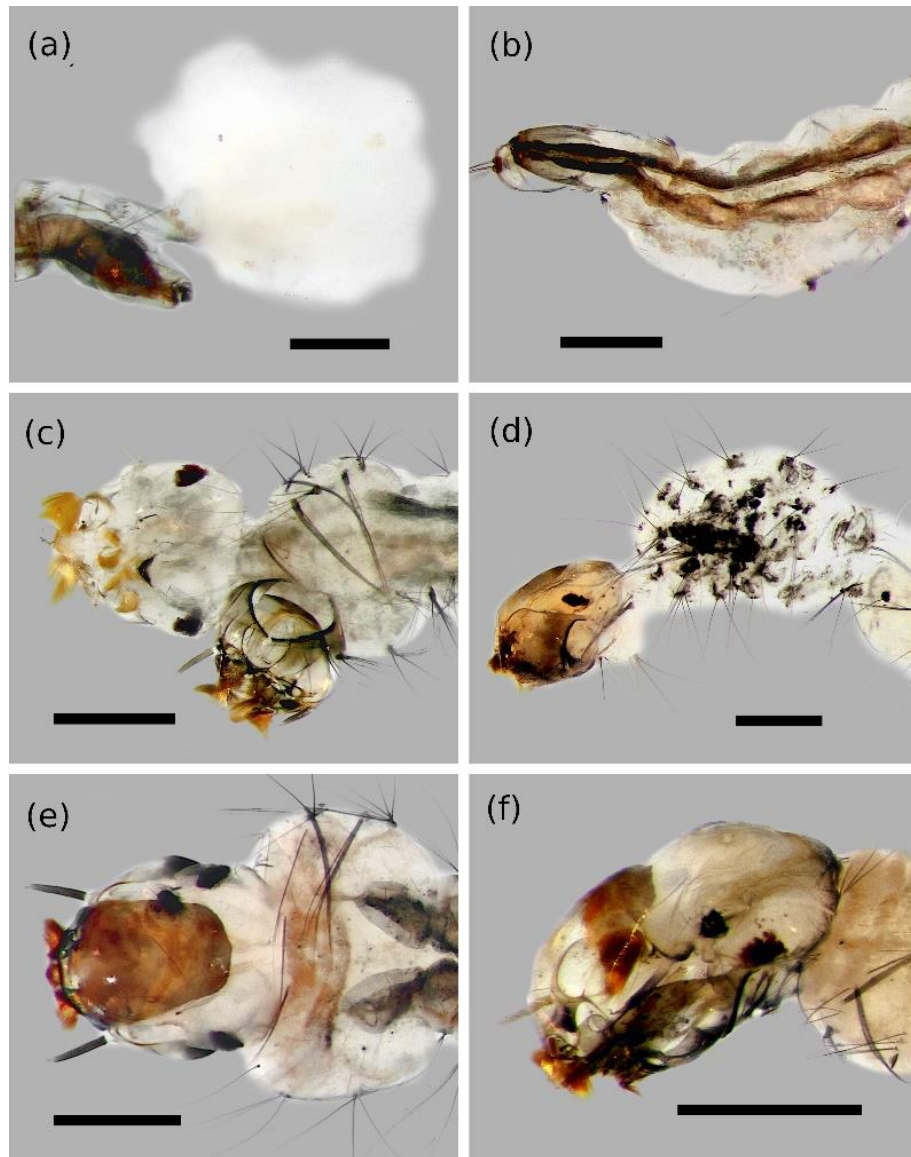


Figura 8. Alteraciones morfológicas en larvas de *Aedes aegypti* expuestas a concentraciones de 0.15 ppm (a), 0.6 ppm (b y c), 0.8 ppm (d) y 1.0 ppm (e y f) de diflubenzurón. Escalas: 500

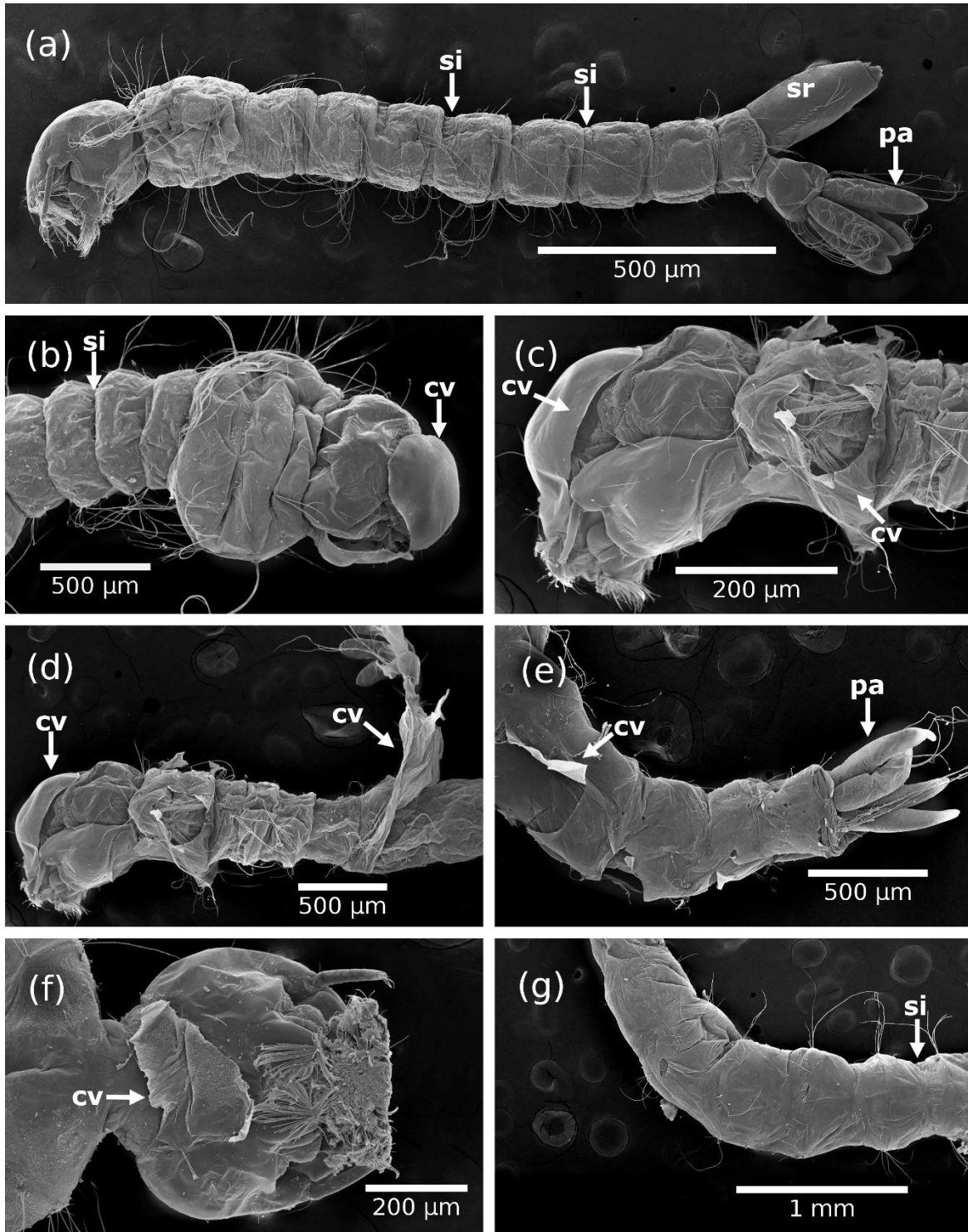


Figura 9. Microscopía electrónica de barrido de larvas de tercer instar de *Aedes aegypti* del grupo testigo (a) y tratadas con DFB en concentraciones de 0.15 ppm (b), 0.25 ppm (c y d), 0.4 ppm (e) y 0.6 ppm (f y g). cv: cutícula vieja, pa: papilas anales, si: surcos intersegmentales, sr: sifón respiratorio.

En la Figura 9 se observan imágenes de individuos tanto del grupo testigo como de los tratados con DFB, que se procesaron para su observación en MEB, lo que permitió tener un panorama detallado de los daños ocasionados en la cutícula y las estructuras externas. Las larvas de grupo testigo (Figura 9a) lucían un aspecto alargado con morfología robusta y segmentación bien marcada, sifón respiratorio tubular con la inclinación normal cercana a los 45° y papilas anales alargadas. El producto interfirió en el proceso de la muda al impedir la liberación de la cutícula vieja, que se observa con el rompimiento de la cápsula cefálica que no se alcanzó a desprender, aún en las concentraciones bajas (Figuras 9b y 9c), además de desprendimientos y deformaciones de la cutícula del tórax y del abdomen (Figura 9c y 9d) que dejan expuesta la cutícula del siguiente instar que al parecer también está alterada. La concentración de 0.6 ppm provocó un alto grado de alteración en la región cefálica, con ruptura y desprendimiento de la cutícula ventral (Figura 9f), y división poco notable de los segmentos corporales, hasta su desaparición (Figura 9g). En la región caudal (Figura 9e) se distinguen zonas con ruptura superficial de la cutícula de los segmentos caudales y deformación de las papilas anales.

La Figura 10 muestra los cortes semifinos (1  $\mu\text{m}$ ) obtenidos de las larvas testigo y tratadas con DFB. En la Figura 10a se observa una ligera separación entre la cutícula y la epidermis de larvas testigo. A 0.1 ppm se amplía la separación entre ambas (Figura 10b), que aumenta en relación directa con la concentración, hasta el grado de desprenderse por completo a una concentración de 0.15 ppm (Figura 10c). Las alteraciones que se presentaron a 0.25 y 0.4 ppm fueron el desarrollo de invaginaciones o espacios en la misma epidermis, que dejan zonas donde la cutícula se encuentra expuesta a una posible ruptura (Figura 10d) y la formación de protuberancias por la extensión de la epidermis hacia el hemocele (Figura 10e). Finalmente, la concentración de 0.6 ppm ocasionó un alto grado de separación entre la cutícula y la epidermis (Figura 10f).



En los cortes ultrafinos de larvas del grupo testigo se distinguió a la epicutícula como una línea continua y oscura y a la endocutícula formada por lamelas bien marcadas, así como puntos de refuerzo (hemidesmosomas) que unen a la endocutícula con la epidermis (Figura 11a). Tanto en larvas del grupo testigo como en los tratamientos se distinguió un citoplasma con abundante retículo endoplásmico rugoso, mientras que en la epidermis y en los músculos se observaron numerosas mitocondrias. En la Figura 11b se aprecia la separación entre la cutícula y la epidermis, causada por la aplicación de 0.4 ppm, misma que se prolonga hasta causar el desprendimiento en diversas áreas del integumento, como se observa en la Figura 11c. Larvas expuestas a concentraciones de 0.4 y 0.6 ppm de DFB tuvieron una cutícula con protuberancias amorfas a manera de desprendimientos cuticulares o islas (Figura 11d y 11e), cuyo incremento en las zonas donde se localizan, ocasiona grietas que rompen la cutícula (Figura 11f). La Figura 11g muestra los haces musculares de larvas del grupo testigo, los cuales se observan compactados y se pueden distinguir las bandas Z, en comparación con las larvas expuestas a 0.6 ppm de DFB que presentan haces musculares separados por espacios y una posible degradación de las membranas plasmáticas. Entre la epidermis y los músculos se observaron desmosomas (Figura 11h). En las tráqueas no se observó daño, pero sí plegamiento de la unión entre el sifón respiratorio y las tráqueas.

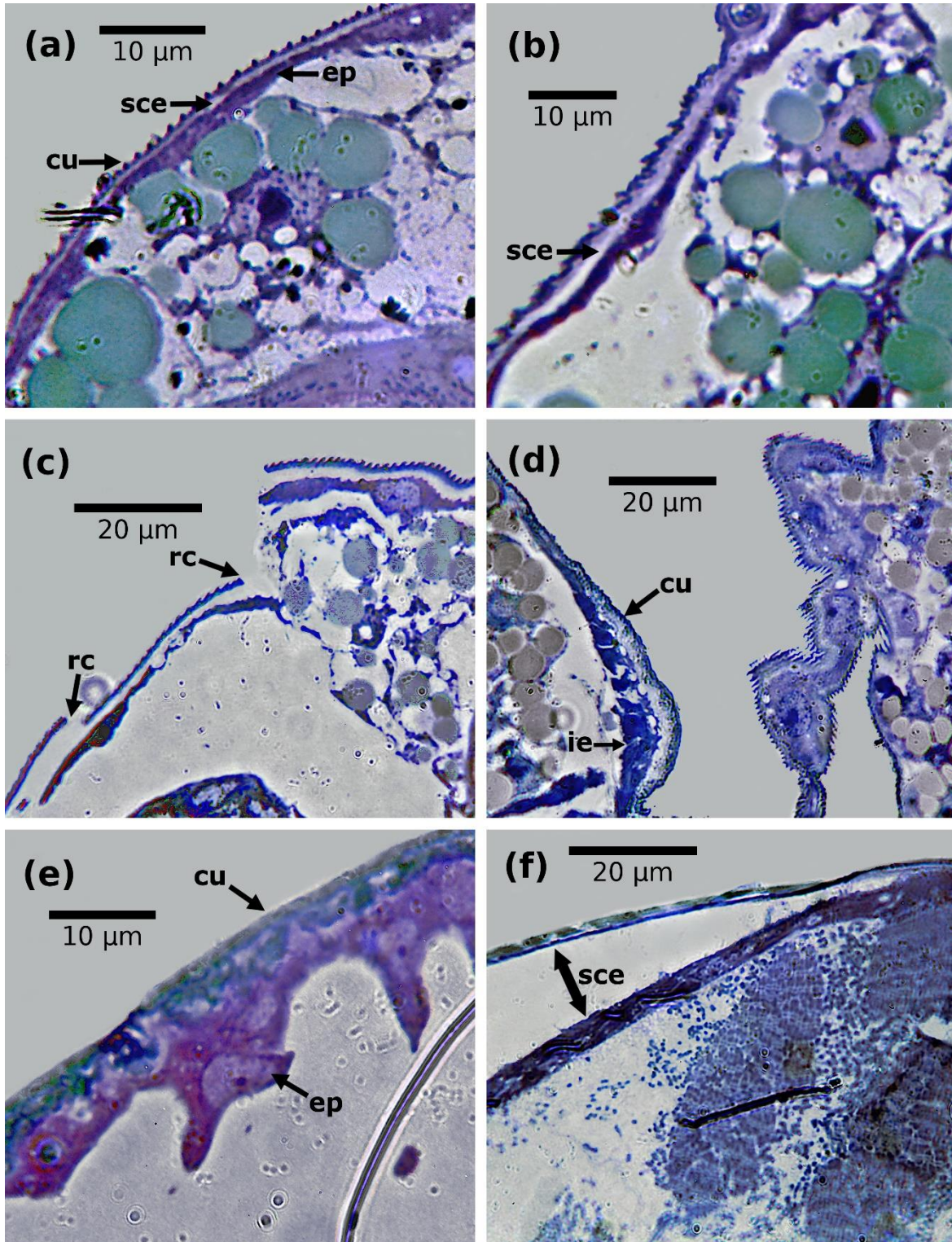


Figura 10. Alteraciones histológicas ocasionadas por diflubenzurón en larvas de tercer instar de *Aedes aegypti*. Testigo (a), 0.1 ppm (b), 0.15 ppm (c), 0.25 ppm (d), 0.4 (e) y 0.6 ppm (f).cu: cutícula, ep: epidermis, ie: invaginaciones de la epidermis, rc: ruptura cuticular, sce: separación entre la cutícula y la epidermis.

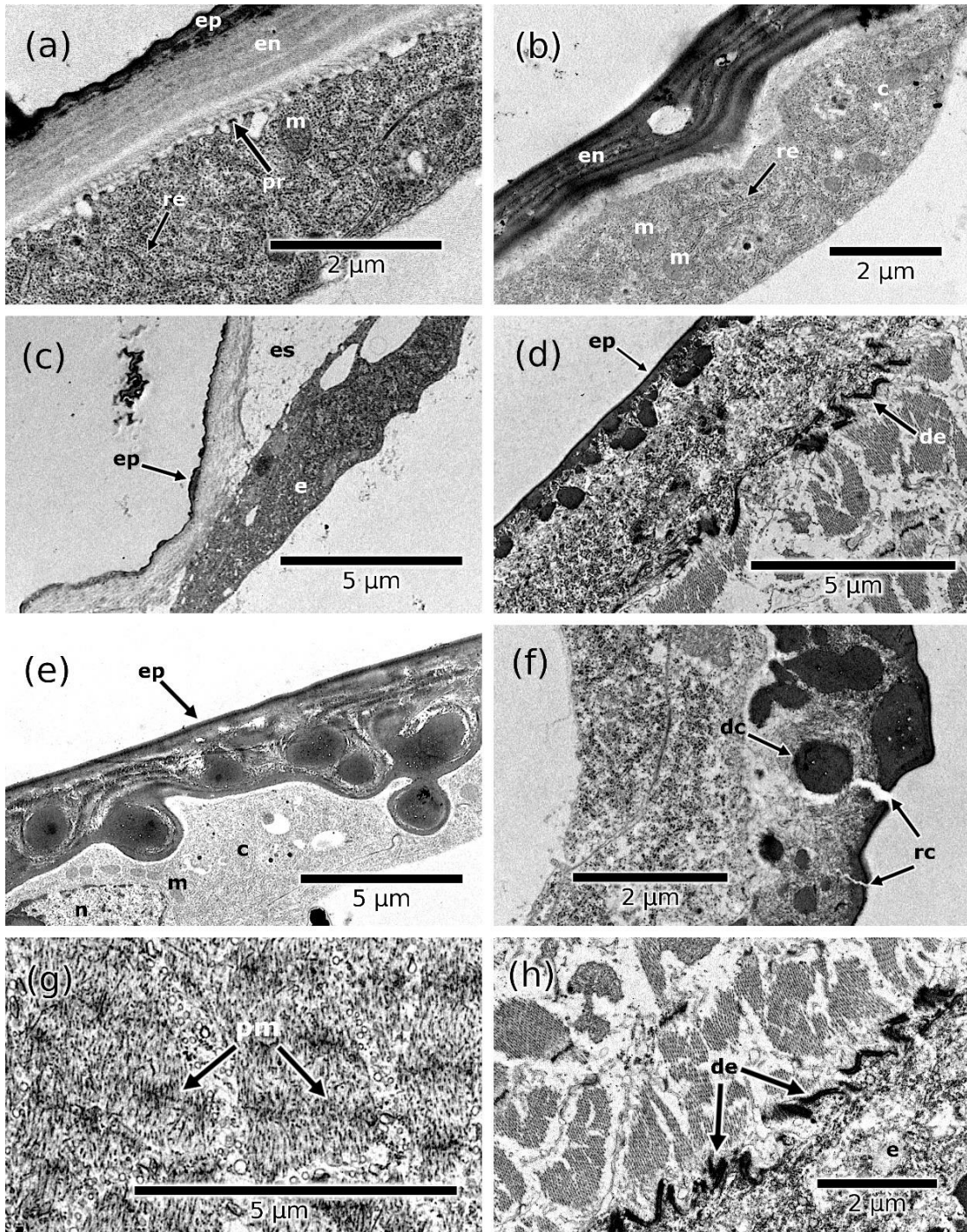


Figura 11. Electromicrografías de cutícula, epidermis y músculo de larvas de tercer ínstar de *Aedes aegypti* del grupo testigo (a y g) y tratadas a concentraciones de 0.25 ppm (c), 0.4 ppm (b y e) y 0.6 ppm (d, f y h) de DFB. c: citoplasma, dc: desprendimientos cuticulares, de: desmosomas, e: epidermis, en: endocutícula, ep: epicutícula, es: espacio subcuticular, m: mitocondria, n: núcleo, pm: patrones de músculo estriado, pr: puntos de refuerzo, rc: ruptura de la cutícula, re: retículo

## 6. DISCUSIÓN

En diversos estudios se ha reportado la susceptibilidad de *Ae. aegypti* a inhibidores de la síntesis de quitina, mediante la aplicación de concentraciones puntuales, sin la definición previa de una ventana biológica, como es el caso de Junqueira Da Silva y Mendes (2007), que emplearon concentraciones entre 5 y 300 ppb y obtuvieron una CL50 de 5.19 ppb y CL95 de 12.24.

Existen referencias a la concentración inhibitoria (CI) del DFB por su efecto en la emergencia de los adultos, sobre todo en trabajos en los que la mortalidad causada en larvas ha sido baja, por ejemplo, la obtenida de 10% y 38% por Al-Azab *et al.* (2013), con concentraciones entre 0.0004 y 0.008 ppm y mortalidad más baja, de 2% a 20%, con las mismas concentraciones por Al-Azab y Shaalan (2018), mientras que Kamal y Khater (2010) observaron una mayor mortalidad de 24% con 0.003 ppm.

Las larvas de tercer instar de *Ae. aegypti* fueron susceptibles a concentraciones de DFB con valores de la CL50 y CL90 cercanos a los obtenidos por Aziz (2017), quien obtuvo valores de 0.178 y 0.301 ppm, respectivamente, para las concentraciones mencionadas, aunque con rangos de mortalidad debajo de 20%, que en el caso de Costa y Tadei (2011) fueron de 64.2% y 97.5% con concentraciones de 0.009 y 0.01 ppm, cercanas a las del autor antes mencionado, pero menores a las de este estudio, en el que la mayor mortalidad fue de 82 a 100% a concentraciones de 0.4 a 1.0 ppm.

Las observaciones realizadas demostraron que las diferentes concentraciones de DFB afectaron aspectos de comportamiento en las larvas de *Ae. aegypti*. Se coincide con Alves Borges *et al.* (2012) y Azis (2017) que observaron lentitud de movimientos de las larvas de tercero y cuarto instar posterior al tratamiento, aunque los primeros autores también notaron temblores y convulsiones, seguidas de parálisis. Costa y Tadei (2012) indican que las larvas de *Anopheles darlingi* presentaron un alargamiento de la región cervical, que impidió que los músculos sostuvieran el peso de la región cefálica y la mantuvieran en posición vertical, como en el caso del tórax y abdomen, a pesar de lo cual los movimientos de las partes bucales no se alteraron y las larvas



continuaron alimentándose de manera normal, efectos que no fueron observados en esta ocasión.

Las larvas de *Ae. aegypti* sufrieron alteraciones morfológicas a diferentes niveles. Con microscopía de luz se observaron anomalías externas con mayor frecuencia, similares a las reportadas por Alves-Borges *et al.* (2004), quienes describen que las larvas tratadas con 1.0 ppm de DFB mostraban una superficie corporal destruida, de apariencia delgada y de bajo desarrollo con segmentos corporales indefinidos y oscuros, mientras que a 0.1 ppm las alteraciones eran menores, con segmentos corporales visibles, aunque más delgadas y de menor tamaño que las del grupo control. Costa y Tadei (2012) refieren que larvas de *A. darlingi* morían al inicio de la muda porque la cutícula vieja de la cabeza obstruía el nuevo integumento, o por la extravasación de tejidos de la zona torácica en las que lograban liberarse de ella. En las larvas que completaron la apólis, los dos últimos segmentos abdominales permanecían adheridos a la cutícula vieja, por lo que presentaron movimientos natatorios lentos, sin poder liberarse de ella y posteriormente morían, características observadas en este trabajo, con excepción de la salida de tejidos.

En este estudio únicamente se realizaron observaciones hechas con larvas de tercer instar, pero diversos autores han descrito alteraciones en los siguientes estadios de desarrollo de *Ae. aegypti*. Junqueira da Silva y Mendes (2007) y Kamal y Kather (2010), observaron que en la etapa intermedia larva-pupa, las larvas permanecían unidas a la cutícula anterior y las pupas retenían la cutícula larvaria en una porción del abdomen. El último autor también observó que los adultos emergían de forma incompleta o mantenían los tarsos unidos al pupario, mientras que Aziz (2017) menciona que los adultos emergieron, pero volaron por debajo del nivel normal, o se mantenían en descanso por periodos largos sobre la superficie del agua.

Con MEB se describieron con detalle las alteraciones ocasionadas por DFB, como la ruptura de la cápsula cefálica, también descrita por Alves Borges *et al.* (2012), aunque se difiere en cuanto al incremento en el número de setas delgadas y alargadas que se enrollaron en los surcos intersegmentales, las que ocasionaron

constricciones en cada región e impidieron el proceso de la muda, lo que daba un aspecto “momificado” a las larvas, ocasionado por la superposición de varias cutículas, relacionado con el aumento en número, tamaño y enrollamiento de las setas.

Las observaciones en MET de los cortes ultrafinos consistieron en identificar las principales alteraciones de la cutícula que en parte son consistentes con Alves Borges *et al.* (2012), en cuanto a la presencia de puntos de refuerzo en larvas del grupo testigo y la formación del espacio subcuticular en larvas tratadas, pero no se observó que durante el proceso de muda las larvas testigo formaran un espacio exuvial para la síntesis de la nueva cutícula, que las células epidermales estuvieran en mitosis y que liberaran fluido de muda todavía inactivo. En las larvas tratadas, al inicio del proceso de muda los autores refieren la formación de los espacios subcuticular y exuvial, pero sin la nueva epicutícula, mientras que al final del proceso notaron que la vieja epicutícula y la exocutícula estaban separadas por un espacio exuvial, con la nueva procutícula indiferenciada y poco esclerosada y que en algunos casos se formó una nueva epicutícula cercana a la cutícula antigua, con la célula epidérmica alterada, vacuolizada y estructuras en forma de escamas.

Con el novalurón aplicado a larvas de cuarto instar de *Ae. aegypti*, Farnesi *et al.* (2012), observaron alteraciones del cuerpo graso, glándulas salivales, troncos traqueales, ciegos gástricos, ganglio torácico, intestino medio y matriz peritrófica, ausencia de tejido conectivo y desorganización de los discos imaginales de alas y patas. Mediante microscopía de contraste diferencial de interferencia, los autores observaron una cutícula translúcida, discontinua y en algunas zonas con forma de cuerda que podía llegar a desprenderse de la epidermis, la cual se adelgazó o se encontraba degenerada.

Entre los efectos de los inhibidores de la síntesis de quitina se han citado las mudas abortivas y la incapacidad de los huevos para eclosionar y con menos frecuencia la interrupción de la formación de la membrana peritrófica, que tiene una función importante como barrera contra la infección en el intestino medio por microorganismos (Merzendorfer, 2013). En este caso, además de los daños por

ruptura en diferentes áreas del integumento y por lo tanto la incapacidad para completar la muda, se observó alteración en la conformación de los músculos, la epidermis, la cutícula y los puntos de unión entre ellos. Chapman (2013) menciona que los músculos esqueléticos se fijan a la epidermis mediante uniones celulares que se sujetan a los microtúbulos, que a su vez se unen a la cutícula por hemidesmosomas. Nation (2016) apunta que los hemidesmosomas unen la membrana basal a las células epidermales.

El daño en las papilas anales interfiere con el proceso de absorción. En las larvas de mosquitos el epitelio forma estas estructuras externas, cubiertas por una cutícula delgada a través de la cual hay absorción de agua y sales y que contienen numerosas mitocondrias, lo que indica gran actividad de las células. En *Aedes* absorben cloro, sodio y potasio del agua y así mantienen la composición iónica normal de la hemolinfa. El tamaño total de estas papilas varía inversamente con la concentración iónica del agua circundante en algunas especies (Copeland, 1964., Wigglesworth, 1974., Chapman, 2013., Klowden, 2013). Los daños en el sifón respiratorio, aunados a la incapacidad de las larvas para salir a la superficie, significan alteraciones de otro sistema vital. El sifón respiratorio permite a las larvas de mosquitos alimentarse a baja profundidad mientras respiran de manera simultánea en la superficie (Klowden, 2013).

## **7. CONCLUSIONES**

El diflubenzurón actúa en larvas de *Ae. aegypti* en concentraciones extremadamente bajas, suficientes para alterar su comportamiento y morfología, con la posible afectación de diversos sistemas fisiológicos y por lo tanto de su desarrollo. Su empleo para el control de esta especie puede ser de utilidad en cuerpos de agua en los que no haya presencia de otros artrópodos. Su inocuidad para vertebrados lo ubica como un producto con posibilidades de ser utilizado.

## 8. LITERATURA CITADA

- Aguilera, L., Marquetti, M., y Navarro, A. (2001). Actividad biológica del diflubenzuron sobre *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 53, 48-52.
- Al-Azab, A. M., Al-ghamdi, K. M., Shaheen, M. A., and Zaituon, A. A. (2013). The biological effects of sumilarv and flubex on dengue fever vector *Aedes aegypti* in Jeddah Governorate, Saudi Arabia. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 10, 235-240. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/1115>
- Al-Azab, A. M., and Shaalan, E. A. (2018). Efficacy of spinosad and flubex against dengue fever vector *Aedes aegypti* in Jeddah Governorate, Saudi Arabia. *Veterinary Research*, 3, 15-21.
- Alves Borges, R., Cavasin, G. M., Garcia da Silva, I., Arruda, W., Fernandes de Oliveira, E. S., Garcia da Silva, H. H., y Martins, F. (2004). Mortalidade e alterações morfológicas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista de Patología Tropical*, 33, 91-104.
- Alves Borges, R., Arruda, W., Fernandes de Oliveira, E. S., Cavasin, G. M., Garcia da Silva, H. H., y Garcia da Silva, I. (2012). Mecanismos da ação larvicida do diflubenzuron sobre *Aedes aegypti* evidenciados pelas alterações ultraestruturais. *Revista de Patología Tropical*, 41, 222-232.
- American Mosquito Control Association. (2018). Mosquito-borne diseases. Disponible en: <https://www.mosquito.org/page/diseases> (consultado: 23 Octubre 2018).
- Argueta, A. L., Valle, J., y Marina, C. F. (2011). Efectos ovicida y larvicida del spinosad en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 37, 269-272.
- Aziz, A. T. (2017). Insecticidal activity of three insect growth regulators towards the dengue and Zika virus vector *Aedes aegypti* in Saudi Arabia. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5, 961-966.
- Becker, N., Petrić, D., Zgomba, M., Boase, C., Dahl, C., Madon, M., and Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and Their Control* (pp. 25). Alemania: Springer.



- Belinato, T. A., Martins, A. J., Pereira Lima J. B., and Valle, D. (2013). Effect of triflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* under laboratory conditions. *Parasites & Vectors*, 6, 83. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-83>
- Beserra, E. B., de Freitas, E. M., de Souza, J. T., Fernandes, C. R. M., y Santos K. D. (2009). Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em aguas com diferentes características. *Iheringia, Série Zoológica*, 99, 281-285. <http://dx.doi.org/10.1590/S0073-47212009000300008>
- Carpenter, S. J. and LaCasse, W. J. (1974) Mosquitoes of North America (North of Mexico) (pp. 138-147). USA: University of California Press.
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. (2016). *Monitoreo de resistencia a insecticidas (adulticidas) utilizados en el programa nacional de control de vectores en México* (pp. 14). México: Secretaría de Salud.
- Chapman, R. F. (2013). *The insects: structure and function* (pp. 242, 550). United Kingdom: Cambridge University Press.
- Chico Aldama, P., Hidalgo García, F. J., y Ochoa Esquivel, R. S. (2001). Ciclo de vida del *Aedes aegypti* y manifestaciones clínicas del dengue. *Acta Pediátrica de México*, 22(2): 114-117.
- Copeland, E. (1964). A mitochondrial pump in the cells of the anal papillae of mosquito larvae. *The Journal of Cell Biology*, 23, 253-263.
- Costa, F. M., and Tadei, W. P. (2011). Laboratory toxicity evaluation of Diflubenzuron, a chitin-synthesis inhibitor, against *Anopheles darlingi* (Diptera, Culicidae). *Journal of Reserch in Biology*, 6, 444-450.
- Costa, F. M., and Tadei, W. P. (2012). Morphological alterations caused by Diflubenzuron in *Anopheles darlingi* root (Diptera, Culicidae). *Journal of Reserch in Biology*, 3, 215-221.
- Darvas, B. (1997). Insect Development and Reproduction Disrupters. En: *Soft Scale Insects-Their Biology, Natural Enemies and Control* (7B), Ben-Dov, Y., y Hodgson, C.J. (Eds.). Elsevier Science B.V.: Amsterdam, The Netherlands. pp. 166.

- Eisler, R. (1992). Diflubenzuron hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. Biological Report 4, U.S. Fish and Wildlife Service, Patuxent Wildlife Research Center. Laurel, Maryland, USA.
- Evans, H. C., Elliot, S. L., and Barreto, L. W. (2018). Entomopathogenic fungi and their potential for the management of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Americas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113, 206-214.
- Faccioli, V. (2011). Los mosquitos. Revista Electrónica Institucional del Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino".
- Farnesi, L. C., Brito, J. M., Linss, J. G., Pelajo-Machado, M., Valle, D., and Rezende, G. L. (2012) Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: Effects of the chitin synthesis inhibitor novaluron. *PLoS ONE*, 7, e30363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030363>
- Finney, D. J. (1971) *Probit Analysis*. 3rd Edition, Cambridge University Press, London.
- Fulton, M. H., Key, P. B., and Delorenzo, M. E. (2013). Insecticide toxicity in fish. *Fish Physiology*, 33, 309-368. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398254-4.00006-6>
- Grafton-Cardwell, E., Godfrey, L., Chaney, W., and Bentley, W. (2005). Various novel insecticides are less toxic to humans, more specific to key pests. *California. Agriculture*, 59(1): 29-34.
- Grosscurt, A. C., and Jongsma, B. (1987) Mode of action and insecticidal properties of diflubenzuron. En: Wright J. E., y Retnakaran, A. (Eds.). *Chitin and benzoylphenyl ureas*, Dr. W Junk Publishers: Dordrecht, The Netherlands. pp 76.
- Gutiérrez-Ramírez, A., Robles-Bermúdez, A., Santillán-Ortega, C., Ortiz-Catón, M., y Cambero-Campos, O. (2013). Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el estado de Nayarit, México. *Revista Bio Ciencias*, 2, 102-112.
- Jahan, N., Razaq, J., and Jan, A. (2011). Laboratory evaluation of chitin synthesis inhibitors (diflubenzuron and buprofezin) against *Aedes aegypti* larvae from Lahore, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 43, 1079-1084.

- Junqueira da Silva, J., and Mendes, J. (2007). Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlândia, State of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40, 612-616. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822007000600002>
- Kamal, H., and Khater, E. (2010). The biological effects of the insect growth regulators; pyriproxyfen and diflubenzuron on the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 40, 565 – 574.
- Klein-Koch, C. (1977). Acción de reguladores del crecimiento e inhibidores del desarrollo de insectos y ácaros. *Revista Peruana de Entomología*, 20, 13-17.
- Klowden, M. J. (2013). *Physiological systems in insects* (pp. 428, 462). New York: Academic Press.
- Martínez, A. F. (1999). Inhibidores de síntesis de quitina: Control de poblaciones de mosquitos con productos biorracionales. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 58, 232-237.
- Merzendorfer, H. (2013). Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. *Insect Science*, 20, 121-138. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01535.x>
- Morales-Ramos, J. A., Rojas, M. G., and Sittertz-Bhatkar, H. (2006). Effects of diflubenzuron on the peritrophic matrix and fat body of formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) workers. *Sociobiology*, 47, 667-676.
- Mulla M., Darwazeh, H. A., Kennedy, B., and Dawson, D. M. (1986). Evaluation of new insect growth regulator against mosquitoes with notes on nontarget organisms. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2(3): 314-320.
- Nation, J. L. (2016). *Insect physiology and biochemistry* (pp.104). New York: CRC Press. Taylor & Francis Group.
- Nelson, M. (1986). *Aedes aegypti: Biología y Ecología*. Organización Panamericana de la Salud, Washington D. C.
- Rozendaal, J. A. (1997). *Vector control: methods for use by individuals and communities* (pp.15-16). Switzerland: World Health Organization.

- SAS Institute. (2012). The SAS system for Windows. Release 6.2.9200. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Suman, D. D., Wang, Y., Bilgrami, A. L., and Gaugler, R. (2013). Ovicidal activity of three insect growth regulators against *Aedes* and *Culex* mosquitoes. *Acta Tropica*, 128, 103-109. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.025>
- Tail, G., Kara, F. Z., Doumandji-Mitiche, B., and Porcheron, P. (2015). The effects of diflubenzuron on the cuticle and on hemolymphatic ecdysteroids of fifth instar nymphs of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Orthoptera Research*, 24, 77-81. <https://doi.org/10.1665/034.024.0206>.
- Tilak, R., Verma, A. K., and Wankhade, U. B. (2010). Effectiveness of diflubenzuron in the control of houseflies. *Journal of Vector Borne Diseases*, 47, 97-102.
- Tiwari, S., Clayson, P. J., Kuhns, E. H., and Stelinski, L. L. (2012). Effects of buprofezin and diflubenzuron on various developmental stages of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Pest Management Science*, 68, 1405-1412. <https://doi.org/10.1002/ps.3323>
- Tunaz, H., and Uygun, N. (2004). Insect Growth Regulators for Insect Pest Control. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28, 377-387.
- Wigglesworth, V. B. (1974). *Insect Physiology* (pp. 75-76). New York: Springer-Science+Business Media, B. V. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3202-0>
- World Health Organization. (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. (pp. 8-14). Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. (2006). *Report of the ninth WHOPES working group meeting: WHO/HQ, Geneva, 5-9 December 2005: review of: Dimilin GR and DT, Vectobac DT, Aqua K-Othrine, Aqua Reslin Super* (pp. 4, 36). Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. (2018). Mosquito control: can it stop Zika at source? Disponible en: <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/articles/mosquito-control/en/> (consultado: 18 Octubre 2018).