

## Caracterización de la resistencia a insecticidas DDT y Lambdacialotrina asociados a la mutación Kdr V1016I en algunas cepas de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (Diptera: Culicidae) de Venezuela

### *Characterization of the resistance to DDT and Lambdacialotrine insecticides associated with the mutation Kdr V1016I in some strains of Aedes aegypti (Linnaeus 1762) (Diptera: Culicidae) from Venezuela*

Danny Bastidas Beltrán<sup>1\*</sup>, Darjaniva Molina de Fernández<sup>1</sup> & Elizabeth Ferrer<sup>2</sup>

#### RESUMEN

*Aedes aegypti* es el vector principal de los arbovirus dengue, fiebre amarilla, chikunguña y Zika, las estrategias para el control vectorial incluyen el uso de insecticidas, durante las epidemias. Sin embargo, esta herramienta química ha traído como consecuencia poblaciones resistentes a insecticidas, siendo una amenaza para la salud pública. Por lo antes expuesto y considerando el aumento en el registro de casos de estas enfermedades, se propuso caracterizar la resistencia a dos insecticidas en *A. aegypti* de siete municipios del estado Aragua: Girardot, Mario Briceño Iragorry, Francisco Linares Alcántara, Libertador, José Félix Ribas, Santiago Mariño y Zamora. Se aplicó el método de botellas del CDC, para detectar resistencia a insecticidas comparando con la cepa susceptible Rockefeller. Se determinaron mecanismos bioquímicos (enzimas) y moleculares donde se amplificaron los alelos V1016 e I1016 por Reacción en Cadena de la Polimerasa alelo específico (AS-PCR), para detectar la mutación génica Kdr. Todas las cepas presentaron resistencia al DDT y susceptibilidad a lambdacialotrina. La resistencia al DDT sugiere la participación de GST y en menor medida las oxidasas. La mutación génica Kdr V1016I se detectó en todas las poblaciones. El genotipo homocigoto susceptible V1016/V1016 prevaleció con 86,9 % sobre el heterocigoto V1016/I1016 (12,5%) y el resistente (mutante) I1016/I1016 (0,6%) se detectó solamente en Girardot con una frecuencia alélica I1016 de 0,18. Los resultados obtenidos representan un aporte valioso para la implementación de medidas de control químico, en *A. aegypti* del estado Aragua, endémico para arbovirosis en los últimos años.

**Palabras clave:** Resistencia molecular, susceptibilidad, dengue, oxidasas, piretroides.

#### SUMMARY

*Aedes aegypti* is the main vector of arboviruses dengue, yellow fever, chikungunya and Zika, strategies for vector control include the use of insecticides during epidemics. However, this chemical tool has resulted in populations resistant to insecticides, being a threat to public health. Due to the above and considering the increase in the registry of cases of these diseases, it was proposed to characterize the resistance to two insecticides in *A. aegypti* of seven municipalities: Girardot, Mario Briceño Iragorry, Francisco Linares Alcántara, Libertador, José Félix Ribas, Santiago Mariño and Zamora of Aragua state. The CDC bottle method was applied for detecting resistance to insecticides, comparing with the Rockefeller susceptible strain. Biochemical (enzymatic) and molecular mechanisms were determined where the alleles V1016 and I1016 were amplified by Allele specific Polymerase Chain Reaction (AS-PCR) to detect the Kdr gene mutation. All strains showed resistance to DDT and susceptibility to lambdacyhalothrin. Resistance to DDT suggest the participation of GST, and to a lesser extent oxidases. The Kdr gene mutation V1016I was detected in all populations. The homozygous susceptible genotype V1016 / V1016 prevailed with 86.9% over the heterozygote V1016 / I1016 (12.5%) and the resistant (mutant) I1016 / I1016 (0.6%) was detected only in Girardot with an allelic frequency I1016 of 0.18. The results obtained represent a valuable contribution for the implementation of chemical control measures, in *A. aegypti* from Aragua state, endemic for arbovirosis in recent years.

**Keywords:** Resistance, molecular, susceptibility, dengue, oxidases, pyrethroids

<sup>1</sup> Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon" Ministerio del Poder Popular para la Salud, Maracay estado Aragua, Venezuela

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones en Ciencias Biomédicas (BIOMED) Universidad de Carabobo. Maracay estado Aragua, Venezuela

\*Autor de Correspondencia: bastidasdanny.94@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

*Aedes aegypti* es el vector principal de los arbovirus dengue (DEN), fiebre amarilla (VFA) chicunguña (CHIKV) y Zika (ZIKV) (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2016; Organización Panamericana de la Salud, OPS, 2013). En las últimas décadas ha aumentado enormemente la incidencia de dengue en el mundo. Según una estimación reciente, se producen 390 millones de infecciones por dengue cada año (OMS, 2016). Para el año 2016, en América, en la semana epidemiológica N° 39 se reportaron 2.048.182 casos de dengue y 3.658 casos de dengue grave con 839 defunciones (OPS/OMS, 2016). En Venezuela, desde la primera epidemia en 1989 -1990, se han reportado cientos de miles de casos hasta la fecha. De hecho, en el quinquenio 2011-2015 se reportaron más de 245 mil casos [Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) 2011, 2012, 2013, 2014 y 2015].

Ante el carácter endémico del dengue en nuestro país, las estrategias de control vectorial de *A. aegypti* siguen el enfoque del manejo integrado, a través de la combinación de medidas de saneamiento ambiental educación sanitaria y la participación social como estrategias fundamentales. Con el fin de eliminar los criaderos y garantizar la sostenibilidad de las medidas de control con su adopción por las comunidades y los sistemas de salud. Así mismo el uso de insecticidas, solo se considera durante las epidemias (SAS & OPS/OMS, 1997; Rodríguez, 2002).

La erradicación de este vector de Centro y sur América se logró con gran éxito a partir de 1945, después de la introducción del organoclorado DDT, pero su uso extensivo determinó los primeros casos de resistencia a este insecticida en *A. aegypti*; *A. taeniorhynchus*, *A. sollicitans* (Busvine & Coker, 1958; Brown, 1986).

Actualmente el uso del DDT en Venezuela está prohibido, las principales clases de insecticidas utilizados para el control vectorial son organofosforados (SAS, OPS, OMS, 1997). Los insecticidas piretroides (deltametrina, lambdacialotrina), son aplicados en forma puntual, mientras que en otros lugares del mundo los piretroides están siendo usados ampliamente sobre todo en casos de emergencia (Gratz, 1991; Zaim et al., 2000; MPPS, 2009; Cáceres et al., 2013; Manjarres & Olivero, 2013).

Sin embargo, el uso de la herramienta química en el control de *A. aegypti*, ha traído como consecuencia la selección de poblaciones del vector resistentes a insecticidas, a través de mecanismos de resistencia, metabólicos basado en la sobreexpresión de enzimas detoxificantes como: esterasas, oxidasas de función múltiple (enzimas P450), glutatión S-transferasas (GST), enzimas comúnmente involucradas cuya amplificación genética es inducida en los organismos por exposición a los insecticidas pudiendo generar resistencia a la mayoría de ellos. El otro mecanismo son alteraciones en el sitio blanco en el cual hay una disminución en la sensibilidad o modificación de éste (Hemingway & Ranson, 2000).

Existen evidencias de resistencia a los insecticidas DDT y piretroides en *A. aegypti*, Cáceres et al. (2013), en un estudio realizado en Panamá, siguiendo la metodología de la OMS para larvas y adultos, hallaron resistencia moderada a deltametrina solamente en larvas pertenecientes a la localidad de Chitre lo cual no sucedió con los adultos.

Por otro lado Ardila-Roldán et al. (2013), realizaron un estudio en Casanare, Colombia, en poblaciones naturales de *A. aegypti* de tres localidades endémicas para el dengue, en las que se evaluaron seis cepas, usando la técnica de OMS para larvas y las botellas del CDC para adultos. Ellos encontraron resistencia en todas las poblaciones al DDT, lambdacialotrina y permetrina, dos presentaron sensibilidad a deltametrina y cinco a ciflutrina. Se registró sensibilidad al temefos, malation y fenitrotion. No se presentó incremento de las esterasas ( $\beta$ ), pero sí de las enzimas P450 en dos poblaciones.

Santacoloma et al. (2010), evaluaron la susceptibilidad a insecticidas deltametrina, lambdacialotrina y al DDT, e identificaron mecanismos bioquímicos de resistencia en 13 poblaciones de *A. aegypti* de Colombia. Utilizaron las metodologías de la OMS y las botellas CDC para adultos. Las encontraron resistencia al DDT, lambdacialotrina pero no a la deltametrina. Evidenciaron incremento de esterasas no específicas en 7 de 11 poblaciones y una población con oxidasas de función múltiple elevada. Se descartó resistencia cruzada de tipo fisiológico entre el DDT y lambdacialotrina en las poblaciones de *A. aegypti* evaluadas, asociándose la resistencia con el incremento de la esterasas no específicas.

En Venezuela los estudios de resistencia a insecticidas en *A. aegypti* son escasos o de muy vieja data, Quarterman & Schoof (1958) reportaron resistencia al DDT en Caracas. Estudios hechos por Mouchet (1967) documentaron resistencia a este insecticida en poblaciones de *A. aegypti* de los estados Carabobo, Falcón, Sucre, Nueva Esparta y Caracas. Los estudios más recientes fueron los de Pérez en el 2005 (datos no publicados) en los cuales encontró altos niveles resistencia al DDT, en seis municipios del estado Aragua. Molina de Fernández *et al.*, 1995 determinaron los niveles de susceptibilidad o resistencia a organofosforados y piretroides en cinco estados de Venezuela, encontraron altos niveles de resistencia a deltametrina y resistencia incipiente a lambdacialotrina. Así mismo en Coro, estado Falcón Bastidas *et al.*, 2015 reportaron susceptibilidad al insecticida lambdacialotrina.

Por otro lado, el Kdr (por sus siglas en inglés "Knock down resistance") es un fenómeno que ocurre una vez que el mosquito presenta la mutación en la secuencia de aminoácidos en los canales de sodio dependientes de voltaje de la membrana celular nerviosa lo cual lleva a la reducción en la sensibilidad de los canales donde se enlazan el DDT y los piretroides (Bisset, 2002; IRAC, 2006). Existen varias mutaciones no sinónimas que ocurren en esta proteína que ocasiona que los insectos mantengan la coordinación inmediatamente después de una exposición de insecticidas piretroides y DDT (Bregues *et al.*, 2003).

La mutación génica Kdr ha sido observada en *Anopheles gambiae*, *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* y *A. aegypti* (Martínez *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2006). La caracterización de secuencias en cepas de *Anopheles gambiae* y *Culex quinquefasciatus* resistentes a piretroides, ha mostrado que la mutación más común es la sustitución de una leucina por fenilalanina en el segmento 6 del dominio II del canal de sodio dependiente de voltaje, sin embargo Bregues *et al.* (2003) no encontraron esta mutación en *A. aegypti* pero describió varias mutaciones tipo Kdr y Saavedra *et al.* (2007) reportaron mutaciones adicionales en la misma posición I1011M, I1011V, V1016G y V1016I. Álvarez *et al.* (2014), detectó la mutación V1016I en todas las poblaciones venezolanas evaluadas.

En Venezuela la mutación génica Kdr (V1016I) se estudió por primera vez en el año 2007

por Saavedra *et al.*, de todas las cepas estudiadas de América Latina, nueve correspondieron a poblaciones naturales de *A. aegypti* procedentes de los estados venezolanos: Sucre, Anzoátegui Lara, Portuguesa, Zulia, Táchira Miranda Bolívar y Apure, la mutación V1016I fue detectada en Anzoátegui, Lara, Bolívar y Apure; aunque el genotipo mutante estuvo ausente en todas las poblaciones.

Álvarez *et al.*, 2015 evaluaron la frecuencia no solo de la mutación V1016I, sino también de la mutación F1534C en el gen del canal de sodio dependiente de voltaje, en cinco poblaciones de *A. aegypti* de Venezuela durante los años 2008, 2010 y 2012, encontraron una variación de las frecuencias alélicas I1016 de 0,01 a 0,37 y para C1534 entre 0,35 a 1. Los resultados mostraron que las frecuencias C1534 son más altas que las I1016 en las poblaciones naturales de *A. aegypti* en Venezuela.

Siendo Venezuela un país endémico para arbovirosis transmitidas por *A. aegypti*, el estado Aragua no se aleja de esta realidad, a pesar de no contar con datos oficiales de los casos de DEN, CHIKV y ZIKV en este estado, se presume un aumento en el registro de casos de estas enfermedades en la mayoría de los municipios de esta entidad.

Tomando en cuenta lo antes expuesto, además de la problemática de la aparición de resistencia a insecticidas en este vector, lo cual es una amenaza para la salud pública, el presente estudio se propuso como objetivo caracterizar la resistencia a insecticidas organoclorado: DDT y piretroide: lambdacialotrina en *A. aegypti* del estado Aragua, a través de métodos biológicos, bioquímicos y moleculares para detectar la presencia de la mutación kdr V1016I. A fin de ofrecer información valiosa, que fortalecerá el uso de la herramienta química en el contexto de un programa de manejo integrado del vector.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cepas de Aedes aegypti*

La muestra estuvo comprendida por cepas de mosquitos de *A. aegypti*, fueron colectados a partir de material inmaduro en el estado Aragua, Venezuela en los municipios: Girardot, Mario Briceño Iragorry, Francisco Linares Alcántara, Libertador, José Félix Ribas, Santiago Mariño y Zamora (Tabla I). Dichas localidades

presentaron alta densidad humana y casuística de dengue. Se realizaron las colectas durante los años 2012-2013, de fases inmaduras (larvas y pupas) en el peridomicilio de viviendas; en recipientes en los que el agua se conservó por periodos superiores a una semana, sin ser renovada, como: tanques sin tapa, pipotes, latas, botellas cauchos desechados y otros semejantes ubicados en los solares de las viviendas. Para la colecta se utilizaron los métodos sugeridos por la Organización Mundial de la Salud, utilizando cucharones, goteros y succionadores (OMS, 1993). El material de campo fue trasladado al Laboratorio de Biología de Vectores y Reservorios del Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA) IAE “Dr. Arnoldo Gabaldon” para el establecimiento de las colonias, hasta la obtención de adultos bajo condiciones de cría estandarizadas. La cepa susceptible de comparación fue la Rockefeller, suministrada por el Centro de Control de enfermedades (CDC), San Juan de Puerto Rico.

#### *Insecticidas evaluados*

Fueron evaluados los insecticidas: organoclorado: DDT (98%) y el piretroide lambdacialotrina (70%), en presentación grado técnico, usando como diluyente acetona, los mismos fueron suministrados por Insecticidas Internacionales Compañía Anónima (INICA), Cagua, estado Aragua, Venezuela.

#### *Pruebas biológicas*

Se realizaron siguiendo el método de las botellas tratadas con insecticidas, del CDC (Brogdon & McAllister, 1998a). Los mosquitos adultos *A. aegypti* fueron expuestos a botellas de vidrio tipo

Wheaton de 250 mL, tratadas con soluciones cetónicas de insecticidas, en el Laboratorio de Evaluación de Insecticidas del CEEESA, IAE “Dr. Arnoldo Gabaldon” siguiendo metodología estandarizada por Figueroa *et al.* (2006). Las concentraciones evaluadas correspondieron a las dosis diagnósticas, obtenidos en la cepa Rockefeller en el laboratorio (datos no publicados) para DDT (200 µg/mL en 45 minutos) y lambdacialotrina (6,25 µg/mL en 30 minutos).

Los bioensayos se realizaron a temperaturas aproximadas de 25 °C ± 2 y humedad relativa de 55% ± 5. Fueron expuestos aproximadamente 15 ± 2 mosquitos adultos hembras de tres días de edad de las generaciones F1 y F3, (sin ingesta de sangre) alimentados exclusivamente con solución azucarada al 10%. Los bioensayos para cada insecticida se realizaron por triplicado, en cada uno se evaluaron cuatro réplicas por cada concentración de insecticida y dos réplicas como grupo control (testigo), el cual solo se trató la botella con acetona. La mortalidad se registró cada 15 min hasta el tiempo en el que se logró el 100% de mortalidad. De esta manera se determinó el efecto del insecticida en función del tiempo de exposición.

Una vez obtenidos los datos, se relacionaron las variables tiempo-mortalidad para los insectos evaluados. Para ello, se graficaron los registros de porcentajes de mortalidad en el eje de las ordenadas (Y) y el tiempo en el eje de las abscisas (X), haciendo uso de Microsoft® Excel® 2003. Dicho análisis se muestra la tasa de mortalidad de cada cepa a cada insecticida. Estas fueron graficadas en el mismo plano junto con la línea de

**Tabla I. Localidades seleccionadas para el estudio y su ubicación georeferencial.**

Municipios	Población	Latitud	Longitud
Girardot	La Pedrera	10,2926	-67,56119
	Caña de Azúcar	10,27153	-67,62081
Mario Briceño Iragorry	El limón	10,3005	-67,63011
	El Paseo	10,28896	-67,61908
Francisco Linares Alcántara	Coropo	10,20411	-67,53934
	Santa Inés	10,21176	-67,53956
Libertador	La Orquídea	10,16262	-67,55575
José Félix Ribas	La Ceiba	10,20961	-67,34575
Santiago Mariño	Ciudad Bendita	10,22468	-67,53305
Zamora	San Francisco de Asís	10,07554	-67,55178

base de susceptibilidad del respectivo insecticida; correspondiente a la dosis diagnóstica y límite umbral de resistencia. Si la mortalidad fue menor al 90% la población es resistente, si la mortalidad fue igual o superior al 98% población es susceptible y si la mortalidad está entre 90-97% la población pudiera estar desarrollando resistencia (verificación) (WHO, 2016). Mortalidades entre 5 y 20% en el grupo control (testigo), tratado solo con acetona, fue corregida aplicando la fórmula de Abbott (1925).

#### Pruebas bioquímicas

Para determinar los mecanismos bioquímicos, se realizaron pruebas "in vitro" involucrados en los sistemas de detoxificación en la resistencia metabólica a insecticidas (Brogdon *et al.*, 1989; Figueroa *et al.*, 2006).

Se escogieron 96 mosquitos que luego se trituraron individualmente en 50 µL de una solución tampón de fosfato de sodio (0,05 M; pH 7,5) y diluido a 0,5 mL del mismo tampón. Se tomaron alícuotas de 50 µL de cada muestra y se colocaron en placas para microtitulación de 96 pocillos. Se evaluaron dos enzimas diferentes que confieren resistencia a insecticidas; oxidasas y Glutathion-S-transferasa (GST) (Brogdon *et al.*, 1989; Ocampo *et al.*, 2000).

El substrato utilizado en el ensayo de oxidasa fue peróxido de hidrógeno al 3% y una solución de 3, 3',5, 5'-Tetrametil Benzidina (TMBZ) (0,002 M). Para la evaluación de GST se empleó glutatión reducido (1,8 mM) y 1-chloro-2,4'-dinitrobenzene (CDNB). La absorbancia fue medida en un lector de ELISA (Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas), Multiskan Plus de Fisher Scientific, empleando un filtro de 620 nm para las oxidasas y un filtro de 405 nm para la GST. A los datos obtenidos se les aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ) y comparaciones múltiples Dunnett's ( $P < 0,05$ ) a través del programa STATISTIX versión 8.0 (Sokal *et al.*, 1979; Analytical Software, 2003).

#### Detección de la mutación génica *Kdr V1016I*

##### Extracción de ADN

El ADN se aisló de cada mosquito mediante la técnica de precipitación salina modificada por

Coen *et al.* (1982) (Black & DuTeau; 1997). Una vez extraído el ADN se resuspendió en 100 µL de tampón TE pH 8; (Tris HCl 10 mM pH 8; EDTA 0,1 mM pH 8). Se determinó la cantidad y calidad del ADN mediante el índice de absorbancia 260/280 (Hoisington *et al.*, 1994; Luque & Herráez, 2005; Sambrook & Russell 2001;). La integridad del ADN de cada mosquito se evaluó mediante una electroforesis en tampón Tris Borato EDTA (TBE) (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,089 M y EDTA 0,002 M) en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Finalmente, se observaron y fotodocumentaron las bandas, en un equipo computarizado Gel Doc 1000 BIO-RAD mediante el programa MultiAnalyst versión 1,1 (1996-1997).

##### Amplificación de los alelos V1016 e I1016

Se realizó una sola reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tubo (Saavedra *et al.*, 2007). Para ello se preparó una mezcla que contiene: tampón de reacción Colorless Gotaq®, Flexi (Promega) (Tris HCl 50 mM pH 8,5; NaCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; desoxirribonucleotido trifosfato (dNTP's) 0,2 mM; 1 pmol de cada cebador V1016 directo, (5'-GCGGGCAGGGCGGCGGGGGC GGCCACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG-3'. I1016 directo (5'- GCGGGCACAA TTGTTTCCCACCCGCACTGA-3' y I1016 reverso (5'-TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC-3' y Taq ADN polimerasa Gotaq®, Flexi (Promega) 1U, colocando 150 ng de ADN extraído y agua nanopura (16-18 MΩ-cm) para alcanzar un volumen final de 50 µL. Los tubos en la mezcla de reacción de ADN se colocaron en un termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler con la siguiente programación: desnaturalización inicial 95°C por 5 min; seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, hibridación a 60°C por 1 min, extensión a 72°C por 2 min y extensión final a 72°C por 10 min.

Cada PCR contó con un control susceptible: homocigoto (V1016/V1016); control resistente: homocigoto (I1016/I1016) los cuales fueron donados al laboratorio de Biología Molecular del (CEEESA) por la Dra. Karla Saavedra Rodríguez de la Universidad de Colorado (USA) y un control negativo que correspondía a agua nanopura (16-18 MΩ-cm). Los productos de PCR fueron cargados en geles de agarosa al 4% con tampón de carga (xilencianol 0,02%; azul de bromofenol al 0,02% en glicerol al 50%). Se

utilizó como marcador una escalera de tamaño molecular de 25 pb (Promega) con sus respectivos controles. Se utilizó un tampón de electroforesis TBE (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,089 M y EDTA 0,002 M) y un voltaje de 100 V por 30 min. Se reveló con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y se visualizó en un equipo computarizado Gel Doc 1000 BIO-RAD mediante el programa MultiAnalyst versión 1,1 (1996-1997) para determinar los genotipos homocigotos susceptibles (V1016/V1016), de 98 pb; heterocigoto (V1016/I1016), de dos productos (98 pb y 78 pb) y homocigotos resistentes (I1016/I1016), de 78 pb (Saavedra *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2014). Las frecuencias de los alelos I1016 fueron estimadas junto con los intervalos de confianza a 95%. El Coeficiente endogámico de Wright FIS (Wright, 1921) fue utilizado para evaluar el equilibrio Hardy-Weinberg entre los genotipos (Rodríguez *et al.*, 2009).

## RESULTADOS

### *Pruebas Biológicas*

En la Fig. 1, se presentan los resultados al evaluar el insecticida organoclorado DDT a una concentración de 200 µg/ml. Las cepas de campo evaluadas: Girardot, Mario Briceño Iragorry, Francisco Linares Alcántara, Libertador, José Félix Ribas, Santiago Mariño y Zamora superaron el umbral de mortalidad de los 45 min, alcanzando un 100% de mortalidad a los 240, 180, 105, 240, 180, 240 y 300 min respectivamente, con porcentajes de mortalidades para este umbral inferiores al 80%; Girardot (57,8%), Mario Briceño Iragorry (54,2%), Francisco Linares Alcántara, (34,5%), Libertador (5,4%), José Félix Ribas (60%), Santiago Mariño (13,8%) y Zamora (2,8%), mostrando resistencia al DDT en todas las cepas de campo evaluadas.

Al evaluar el insecticida piretroide lambda-cialotrina a una concentración de 6,25 µg/ml, todas las cepas de campo evaluadas presentaron el 100% de mortalidad a los 30 min, categorizándose como susceptible a lambda-cialotrina. La cepa Girardot presentó el porcentaje de mortalidad más bajo en el tiempo de umbral (0 - 15 min) en relación a las otras cepas (Fig. 2).

### *Pruebas bioquímicas*

En la Tabla II se muestran los promedios y desviaciones estándar de las absorbancias de

las enzimas oxidasas y GST determinadas en las cepas de *A. aegypti* de campo y cepa susceptible Rockefeller. Se observaron niveles de oxidasas en las cepas Libertador y José Félix Ribas superiores estadísticamente ( $P < 0,05$ ) a los registrados en la cepa susceptible Rockefeller. Similarmente las GST se mostraron elevadas en las cepas Girardot, Mario Briceño Iragorry, Francisco Linares Alcántara, José Félix Ribas y Santiago Mariño con respecto a la cepa susceptible Rockefeller. Esta sobre expresión enzimática sugiere su participación en la resistencia mostrada al DDT.

### *Detección de la mutación génica Kdr V1016I*

En los 336 mosquitos analizados el genotipo predominante fue el homocigoto susceptible (V1016/V1016) con 86,9 %, seguido del heterocigoto (V1016/I1016) con 12,5%, y el menos frecuente el genotipo homocigoto resistente (mutante) (I1016/I1016) el cual estuvo ausente en seis de las siete localidades estudiadas; encontrándose solamente en la localidad de Girardot representando un 0,6% de todas las localidades analizadas. En la Fig. 3 se muestra un ejemplo del patrón electroforético obtenido en 24 mosquitos de la cepa de campo Girardot.

La frecuencia alélica para el alelo mutante (I1016) (Tabla III) el cual fue variable, presentando 0,03 en las localidades: José Félix Ribas, Santiago Mariño, y Zamora a 0,08 en Francisco Linares Alcántara, 0,06 en Mario Briceño Iragorry y Libertador hasta 0,18 en Girardot. Los valores de FIS fueron menores a cero, en seis localidades indicando exceso de heterocigotos en: Mario Briceño Iragorry, Francisco Linares Alcántara, Libertador, José Félix Ribas, Santiago Mariño y Zamora, por otro lado se obtuvo un único valor de FIS mayor a cero (exceso de homocigotos) en Girardot. Los genotipos en todas las cepas evaluadas, están en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $P \geq 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

La resistencia al DDT fue detectada, en todas las poblaciones evaluadas, esto pudiera explicarse por la intensa presión de selección registrada en el pasado, ya que, desde su introducción en Venezuela en 1945 para el control de la malaria este organoclorado

Fig. 1. Curvas tiempo-mortalidad en adultos de *A. aegypti* cepa susceptible (Rockefeller) y siete cepas de campo, expuestas al insecticida organoclorado DDT a una concentración de 200 µg/ml por botella.

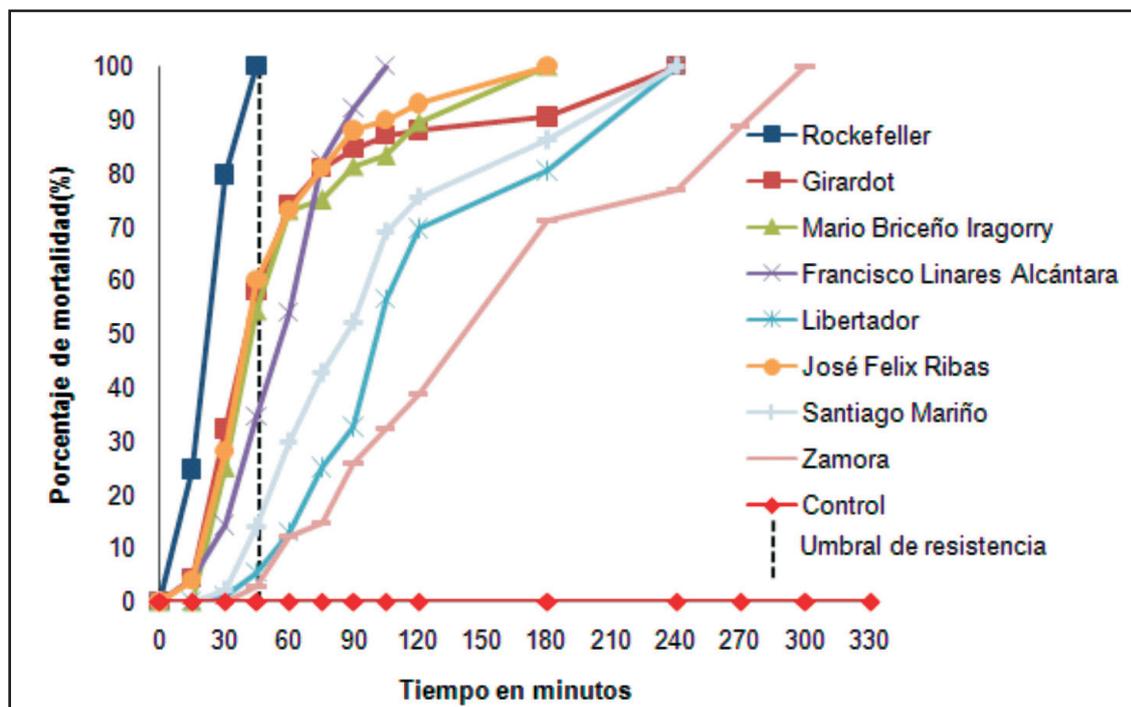


Tabla II. Promedio y desviación estándar de los valores de absorbancia para enzimas: oxidasas y GST de *A. aegypti* cepa susceptible (Rockefeller) y siete cepas de campo.

Cepas	Enzimas	
	Oxidasas	GST
Rockefeller	0,192 +/- 0,059 <sup>DS</sup>	0,084 +/- 0,015 <sup>DS</sup>
Girardot	0,163 +/- 0,046 <sup>DS</sup>	0,117 +/- 0,014 <sup>DS</sup>
Mario Briceño Iragorry	0,153 +/- 0,028 <sup>DS</sup>	0,096 +/- 0,009 <sup>DS</sup>
Francisco Linares Alcántara	0,205 +/- 0,049 <sup>DS</sup>	0,104 +/- 0,023 <sup>DS</sup>
Libertador	0,389 +/- 0,298 <sup>DS</sup>	0,096 +/- 0,010 <sup>DS</sup>
José Félix Ribas	0,246 +/- 0,070 <sup>DS</sup>	0,100 +/- 0,03 <sup>DS</sup>
Santiago Mariño	0,199 +/- 0,083 <sup>DS</sup>	0,097 +/- 0,013 <sup>DS</sup>
Zamora	0,190 +/- 0,160 <sup>DS</sup>	0,084 +/- 0,028 <sup>DS</sup>

■ Promedio significativamente superior ( $P < 0,05$ ) con la cepa susceptible Rockefeller  
 DS: desviación estándar

Fig. 2. Curvas tiempo-mortalidad en adultos de *A. aegypti* cepa susceptible (Rockefeller) y siete cepas de campo, expuestos al insecticida piretroide lambdacialotrina a una concentración de 6,25µg/ml por botella.

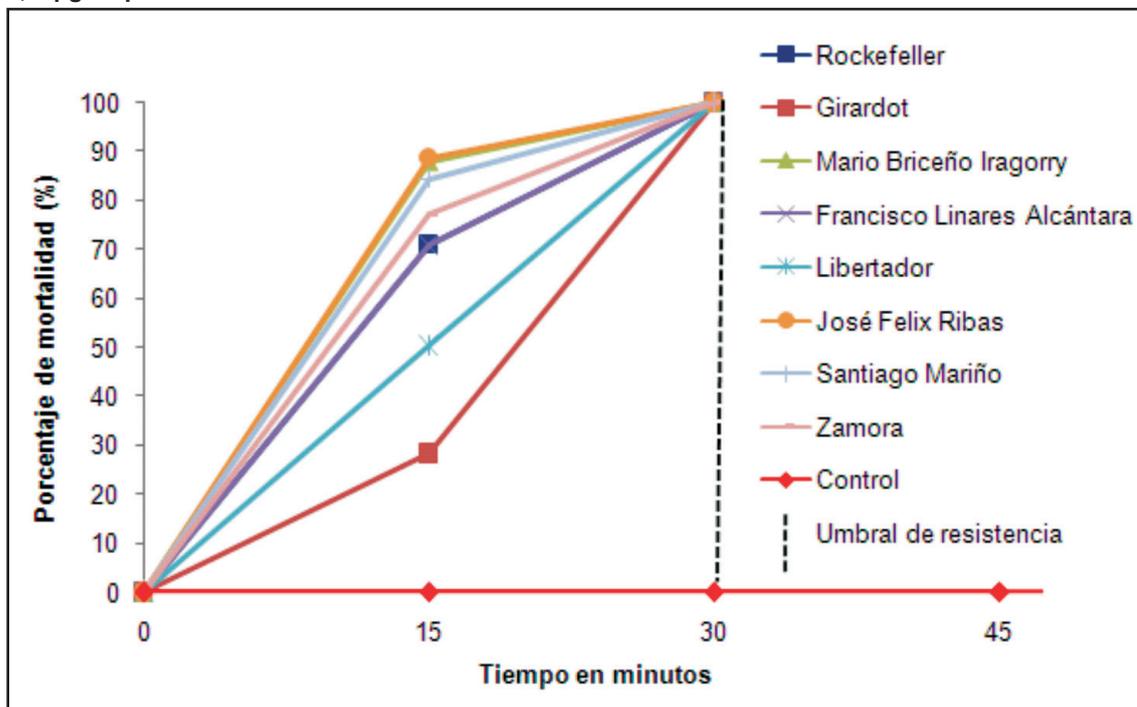
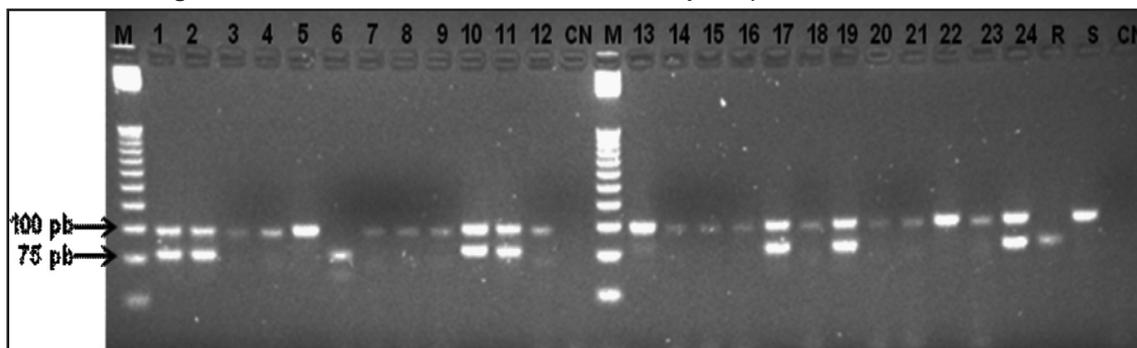


Fig. 3. Electroforesis en gel de agarosa al 4% de productos de PCR alelo específica para el sistema V1016I. (Los genotipos homocigotos susceptibles (V1016/V1016) aparecen en las líneas: 3, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22 y 23; homocigoto resistente (I1016/I1016) en la línea 6; heterocigotos (V1016/I1016) en las líneas: 1, 2, 10, 11, 17, 19 y 24. Líneas: M: escalera de tamaño molecular de 25pb, CN: control negativo, R: control resistente S: control susceptible).



fue utilizado por más de 40 años ejerciendo presión de selección en diferentes organismos blanco o no (Saume 1992 y Mazzarri 1995). En diferentes países se han reportado poblaciones de *A. aegypti* resistentes al DDT, así tenemos en África y Asia (Kamgang *et al.*, 2011 y Dharshini *et al.*, 2011), en Colombia (Maestre *et al.*, 2010), en las islas Caimán (Harris *et al.*, 2010),

en Cuba, Jamaica, Panamá Costa Rica, Nicaragua, Perú y Venezuela (Rodríguez, 2008).

Específicamente en Venezuela, Pérez en el 2005, encontró altos niveles de resistencia al DDT, en seis municipios del estado Aragua. A pesar de que en Venezuela se dejó de usar el DDT, fuentes informales

**Tabla III. Genotipos y frecuencias alélicas de la mutación Kdr V1016I de *A. aegypti* en siete cepas de campo.**

Cepas	N	I1016/I1016	V1016/I1016	V1016/V1016	Frecuencia I1016	p-Valor	FIS
Girardot	48	2	13	33	0,18	0,6240	0,070
Mario Briceño Iragorry	48	0	6	42	0,06	0,6441	- 0,067
Francisco Linares Alcántara	48	0	8	40	0,08	0,5288	- 0,091
Libertador	48	0	6	42	0,06	0,6442	- 0,067
José Félix Ribas	48	0	3	45	0,03	0,8232	- 0,032
Santiago Mariño	48	0	3	45	0,03	0,8232	- 0,032
Zamora	48	0	3	45	0,03	0,8232	- 0,067

N: Número de muestra. homocigoto resistente (mutante) I1016/I1016; heterocigoto V1016/I1016; homocigoto susceptible V1016/V1016.

señalan su contrabando y su uso agrícola ilegal (Gil, 2006). La elevada persistencia y estabilidad ambiental del DDT, continúan ejerciendo presión en las poblaciones de mosquitos o bien, la resistencia pudiera ser debido a la presencia de características intrínsecas de la especie que favorecen la expresión de genes de resistencia (Fonseca & Quiñones 2005., Vargas *et al.*, 2006).

En relación al insecticida piretroide lambda-cialotrina, todas las cepas evaluadas presentaron susceptibilidad al referido compuesto. Estos resultados concuerdan con los reportados por Chuaycharoensuk *et al.* (2011) en un estudio realizado en toda Tailandia, en una cepa de el Salvador, Bisset *et al.* (2009), en Colombia Maestre *et al.* (2010) y Santacoloma *et al.* (2010), en Panamá, Cáceres *et al.* (2013), así mismo, en Coro, Venezuela, se reportó susceptibilidad a este insecticida (Bastidas *et al.*, 2015).

Los insecticidas piretroides han incrementado su uso en el último decenio a nivel mundial (Moreno *et al.*, 2012) diversos estudios han reportado el carácter resistente o susceptible de acuerdo a su uso. Tal es el caso de la susceptibilidad, categoría de verificación a deltametrina y cipermetrina o la resistencia moderada a deltametrina (Álvarez *et al.*, 2013). Igualmente, se ha reportado a cipermetrina por Pereira da-Cunha *et al.* (2005); Vargas *et al.* (2006), encontraron resistencia y susceptibilidad a deltametrina; Bisset *et al.* (2009), reportaron resis-

tencia a piretroides: lambda-cialotrina, permetrina y deltametrina (Harris *et al.*, 2010).

La susceptibilidad o resistencia, encontrada a los insecticidas piretroides es diversa y va a depender de su uso tanto para fines agrícolas o en los programas de control de vectores en cada país. La ausencia de resistencia a lambda-cialotrina encontrada en el presente estudio puede deberse al poco uso de este insecticida en salud pública, en los programas de control de vectores, ya que está básicamente dirigido a los insecticidas organofosforados; debido a que los piretroides se usan principalmente en el ámbito agrícola, en uso doméstico como principal ingrediente activo en algunos de los insecticidas aerosoles, espirales o aplicados a superficies como mosquiteros (Kolaczinski & Curtis 2004; SAS & OPS/OMS, 1997).

Estudios moleculares han involucrado varias mutaciones en el gen del canal de sodio dependiente de voltaje y algunas han sido identificadas en *A. aegypti*, (G923V, L982T, I1011M, I1011V, V1016I, V1016G, D1794Y y F1534C) y han sido asociadas con la resistencia a piretroides en esta especie. (Bregues *et al.*, 2003; Saavedra *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2009; y Yanola *et al.*, 2011).

La mutación génica Kdr V1016I se detectó en todas las poblaciones evaluadas en este estudio. El genotipo homocigoto resistente (mutante) (I1016/

I1016) estuvo presente solamente en Girardot con una frecuencia del alelo I1016 baja en una proporción de (0,6%) para todas las cepas analizadas. A pesar de encontrar esta baja proporción de la mutación V1016I, otros investigadores en distintos lugares de América han encontrado esta mutación con diversas frecuencias alélicas I1016. Marcombe *et al.* (2009), a través de secuenciación del gen del canal de sodio dependiente de voltaje detectaron la presencia de la mutación Kdr V1016I con una alta frecuencia alélica (0,71) de una cepa de la comunidad de Vaucelin colectada en la Isla de Martinique. Harris *et al.* (2010), en las islas Caimán evidenció la mutación Kdr V1016I con alta frecuencia alélica (0,79). En México, Ponce *et al.* (2009), de un total de 81 cepas de campo en el cual se analizaron 3951 mosquitos de *A. aegypti* para la mutación Kdr V1016I entre los años 1996 - 2009, observaron un dramático incremento en las frecuencias alélicas para el alelo I1016 de 0,00 a 0,88; lo cual se relacionó con el uso intensivo de permetrina en los programas de control.

En Venezuela se evidenció por primera vez esta mutación en el año 2007 por Saavedra *et al.* (2007), de todas las cepas estudiadas de América Latina, nueve correspondieron a poblaciones naturales de *A. aegypti* procedentes de los estados venezolanos: Sucre, Anzoátegui Lara, Portuguesa, Zulia, Táchira Miranda Bolívar y Apure, la mutación V1016I fue detectada en Anzoátegui, Lara, Bolívar y Apure con valores de frecuencias alélicas de 0,014; 0,010; 0,018 y 0,018 respectivamente; aunque el genotipo mutante estuvo ausente en todas las poblaciones. Estudios más recientes en el país realizados por Álvarez *et al.* (2014), en los estados Trujillo, Lara y Táchira en los cuales se investigó la presencia de esta mutación en *A. aegypti* con resistencia al derribo a la deltametrina, encontraron que el genotipo predominante fue el homocigoto susceptible (>60%) seguido del heterocigoto (20-30%) y el menos frecuente el homocigoto mutante que estuvo presente en alta proporción en Ureña (53%) con una frecuencia alélica I1016 de 0,65. Un estudio más actual realizado por los mismos autores Álvarez *et al.* (2015) evaluaron la frecuencia no solo de la mutación V1016I, sino también de la mutación F1534C en el gen del canal de sodio dependiente de voltaje, en cinco poblaciones de *A. aegypti* de Venezuela durante los años 2008, 2010 y 2012, encontraron una variación de las frecuencias alélicas I1016 de 0,01 a 0,37 y para C1534 entre 0,35 a 1.

La presencia del genotipo homocigoto mutante I1016/I1016, en la cepa Girardot, se complementa con el hecho que la misma presentó, (en las pruebas biológicas en los primeros quince minutos de exposición, previo al umbral), el menor porcentaje de sobrevivencia, por lo que pudiera esperarse que esos dos individuos que presentaron el carácter mutante pudieran encontrarse en ese grupo. La baja presión de selección ejercida con insecticidas piretroides no ha seleccionado individuos resistentes para la lambdacialotrina; sin embargo, resulta de importancia que el genotipo heterocigoto V1016/I1016 estuvo presente en todas las poblaciones evaluadas representando 12,5 %. Se debe considerar entonces el hecho; que la unión de dos alelos I1016 provenientes de ambos padres podría originar un genotipo mutante (I1016/I1016) en el tiempo, debido a que la resistencia es un fenómeno hereditario transmitido de generación en generación siendo un requisito indispensable la disponibilidad de individuos resistentes y susceptibles (Saume, 1992).

Afortunadamente el fenotipo Kdr es semi o totalmente recesivo (Paton *et al.*, 2000) lo cual con la aplicación de buenas estrategias para el control de vectores, permitirá vigilar y controlar la aparición de poblaciones resistentes a piretroides disminuyendo así las posibilidades de uso, de este grupo de insecticidas.

Estudios realizados por Brengues *et al.* (2003), en los que obtuvieron una secuencia parcial de la región que codifica al segmento hidrofóbico 6 del dominio II de el gen del canal de sodio dependiente de voltaje de diez mosquitos de trece cepas de *A. aegypti*. Analizaron los exones 19 al 21 que codifican los aminoácidos 908 - 1036 (Número de acceso al GenBank AF534112). Encontraron que algunas de las mutaciones descritas, se asociaban a diferentes niveles de sensibilidad para la inhibición de permetrina y lambdacialotrina. Igualmente estudios neurofisiológicos en *Culex quinquefasciatus* de Arabia Saudita, indicaron que la insensibilidad del nervio como consecuencia de la mutación Kdr en estas especies, a diferencia de las moscas domésticas, pudieron no conferir resistencia a todos los piretroides (Amin & Hemingway, 1989). Estudios de sensibilidad realizados por Hu *et al.* (2011), en los canales de sodio dependientes de voltaje de cucarachas, sensibles a piretroides en los cuales se introdujo un cambio de una fenilalanina (F) por una cisteína (C) para la mutación F1515C en el segmento

6 del dominio III, por medio de mutagénesis, y fueron expresados en oocitos de *Xenopus*; encontraron que esta mutación reduce drásticamente la sensibilidad de los canales a tres piteroides tipo I (permetrina, NRDC 157, bioresmetrin) pero no a tres tipo II (cipermetrina, deltametrina, cialotrina). Por otro lado, otro estudio realizado en Tailandia en el cual se desarrolló una herramienta rápida para la detección de la mutación F1534C en el segmento 6 del dominio III, en cepas de *A. aegypti* resistentes a permetrina, siendo el alelo 1534C recesivo, encontraron que no todos los mosquitos con el genotipo homocigoto mutante sobrevivieron a la exposición a permetrina (Yanola *et al.*, 2011). En Brasil, Pereira *et al.* (2011), encontraron que el alelo mutante I1016, fue observado en individuos susceptibles y resistentes para el insecticida cipermetrina, por lo que la resistencia no mostró ninguna asociación con el alelo mutante y la resistencia o susceptibilidad observada, a diferencia de la fuerte asociación entre la mutación I1011M y la resistencia encontrada en una de las poblaciones estudiadas. Lo antes expuesto, parece indicar que los mosquitos con las mutaciones V1016I kdr pudieran no tener la misma sensibilidad al piretroide cipermetrina ya que no se detectó asociación entre los mosquitos resistentes y la presencia del alelo I1016.

La detección de los mecanismos de resistencia es fundamental y da una orientación de la vía por la cual se puede estar presentando el fenómeno de la resistencia a los insecticidas, permitiendo una adecuada selección de los insecticidas en los programas de control de vectores (Fonseca & Quiñones 2005).

Bregues *et al.* (2003) encontraron resistencia cruzada entre DDT y piretroides en *A. aegypti* debido a la mutación Kdr. Sin embargo, los resultados en el presente estudio permitieron descartar resistencia cruzada para DDT y *lambdialotrina*, asociado a la mutación Kdr V1016I, ya que el genotipo mutante se detectó en una sola cepa de campo con una frecuencia baja de (0,18) y ninguna de las cepas mostró resistencia al piretroide *lambdialotrina* pero si se encontró resistencia generalizada al DDT. Los niveles elevados de GST hallados en *A. aegypti* de todas las cepas resistentes a DDT, podrían indicar que el mecanismo responsable de la resistencia a esta molécula está mediado principalmente por incremento en la actividad de enzimas GST (Hemingway *et al.*, 2004) y en menor medida por oxididasas en las cepas Libertador y José Felix Ribas. El comportamiento de

la cepa Zamora fue distinto ya que a pesar de presentar uno de los más altos niveles de resistencia al DDT, no presentó valores elevados de GST y oxididasas, esta resistencia pudiera estar asociada con incrementos de enzimas citocromos P540, lo cual concuerda con lo reportado por Ardila-Roldán *et al.* (2013), en que las enzimas citocromos P450 jugaron un papel importante en la resistencia encontrada al DDT en todas las poblaciones evaluadas en el departamento de Casanare, Colombia. Como se ha documentado, las enzimas citocromos P450 son una familia de hemoproteínas que se han asociado con la resistencia para casi todas las clases de insecticidas, principalmente piretroides (Berge *et al.*, 1998) organoclorados y reguladores de crecimiento (Brogdon & McAllister, 1998b), ya que son responsables del metabolismo oxidativo de una amplia variedad de componentes exógenos (Scott & Wen 2001). A pesar de esto, la resistencia al DDT pudiera estar principalmente vinculada con la sobreexpresión de GST, lo cual concuerda con distintos autores (Grant & Hammock, 1992; Lumjuan *et al.*, 2005; Santacoloma *et al.*, 2010; Maestre *et al.*, 2010; Fonseca *et al.*, 2011; Marcombe *et al.*, 2014). También se ha asociado la GST con la resistencia a organofosforados y recientemente a piretroides (Kostaropoulos *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2009). O bien sea por la presencia de la mutación F1534C la cual se ha asociado igualmente con la resistencia al DDT en cepas de *A. aegypti* pero no se realizó en el presente estudio (Álvarez *et al.*, 2015).

En general la resistencia a insecticidas es un rasgo multifactorial que puede ser afectado por el medio ambiente (disponibilidad y sitios de reproducción), operatividad (frecuencia de aplicación de insecticidas, la cantidad, periodo de exposición) y genética (genes metabólicos y de alteración del sitio de destino) (Fonseca & Quiñones 2005). Por lo que se concluye que es necesario el establecimiento de estrategias de monitoreo de la resistencia a insecticidas, en forma sistemática, como aporte a medidas de control integrado, a fin de disminuir la presión en las áreas donde la resistencia ya ha sido detectada, a fin de asegurar el uso de insecticidas de una manera adecuada.

#### *Conflicto de intereses*

Los autores manifiestan que en la ejecución y publicación de los resultados de estos estudios no hubo intereses financieros o de cualquier otra índole.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon" (IAE), por facilitar la ejecución a través de la participación de talento humano con alta experticia en el estudio de vectores. Al BIOMED por el apoyo para lograr los objetivos planteados en biología molecular. Al personal del Centro de Estudio de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA) adscrito al IAE, especialmente al personal de Entomología y Laboratorio de Biología de Vectores y Reservorios. Este trabajo fue financiado por el IAE, Ministerio del Poder Popular para la Salud y el Ministerio del Poder Popular Para Ciencia, Tecnología e Innovación, a través del Sub-Proyecto N° 2008000911-1 Nuevas Alternativas Tecnológicas para la Prevención y el Control del Dengue con la Participación Ciudadana. Componente. Resistencia a Insecticidas.

## REFERENCIAS

- Abbott W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**: 265-267.
- Álvarez L., Ponce G., Oviedo M., López B. & Flores A. (2013). Resistance to malation and deltamethrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from western Venezuela, *J. Med. Entomol.* **50**: 1031-1039.
- Álvarez L., Ponce G., Oviedo M., Briceño A. & Flores A. (2014). Mecanismos asociados a la resistencia al derribo "Kdr" a la deltametrina en *Aedes aegypti* del occidente de Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **54**: 58-67.
- Álvarez L., Ponce G., Saavedra K., López B. & Flores A. (2015). Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest Manag. Sci.* **71**: 863-869.
- Amin A. M. & Hemingway J. (1989). Preliminary investigation of the mechanisms of DDT and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera:culicidae) from Saudi Arabia. *Bull Entomol Res.* **79**: 361-366.
- Analytical Software. (2003). *Statistix 8 User's Manual*. Analytical Software, Tallahassee, Florida, USA.
- Ardila-Roldán S. Santacoloma L & Brochero, H. (2013). Estado de la sensibilidad a los insecticidas naturales de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Casanare, Colombia. *Biomédica.* **33**: 446-458.
- Bastidas D., Figueroa L., Pérez E. & Molina de Fernández D. (2015). Estado de la resistencia a insecticidas organosintéticos de *Aedes aegypti* de Coro, estado Falcón, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **50**: 173-183.
- Berge J., Feyereisen R. & Amichot M. (1998). Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* Serie B. **353**: 1701-1705.
- Bisset J. (2002). Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Rev. Cubana Med. Trop.* **54**: 202-219.
- Bisset J., Rodríguez M., San Martín J., Romero J. & Montoya R. (2009). Evaluación de la Resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* del Salvador. *Rev. Panam. Salud Publica.* **26**: 229-234.
- Black W. & DuTeau N. (1997). *RAPD-PCR and SSCP analysis for insect populations genetic studies*. pp. 361-373. En: *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors: a Methods Manual* J Crampton. C Beard. C Louis. (Eds.) Chapman and Hall: Cambridge.
- Bregues C., Hawkes N., Chandre F., McCarroll L., Duchon S., Guillet P., et al. (2003). Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med. Vet. Entomol.* **17**: 87-94.
- Brogdon W. Beach R. Stewart J. & Castanaza L. (1989). Análisis por ensayo de microplacas de la distribución de la resistencia de *Anopheles albimanus* a organofosforados y carbamatos en Guatemala. *Bol. San. Panam.* **106**: 139-147.
- Brogdon W. & McAllister J. (1998a). Simplification of adult mosquito bioassays through use of time

- mortality determinations in glass bottles. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **14**: 159-154.
- Brogdon W. & McAllister H. (1998b). Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infect. Dis.* **4**: 605-613.
- Brown A. (1986). Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **2**: 123-140.
- Busvine J. & Coker W. (1958). Resistance Patterns in DDT- Resistant *Aedes aegypti*. *Bull. World Health Organ.* **18**: 651-656.
- Cáceres L., Rovira J., García A., Torres R. & De la Cruz M. (2013). Determinación de la sensibilidad a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en poblaciones de *Aedes aegypti* Linneaus, 1762 (Diptera: Culicidae) de Panamá. *Biomédica.* **33**: 70-81.
- Chang Ch., Shen W., Wang T., Lin Y., Hsu E. & Dai S. (2009). A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* **39**: 272-278.
- Chuaycharoensuk T., Juntarajumnong W., Boonyauan W., Bangs M., Akwatanakul. P., Thammapalo S., et al. (2011). Frequency of pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *A. albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J Vector Ecol.* **36**: 204-212.
- Coen E. S., Strachan T. & Dover. G. (1982). Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the melanogaster species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* **158**: 17-35.
- Dharshini S., Vinobaba M., Jude P., Karunaratne P. & Surendran S. (2011). Prevalence and insecticide susceptibility of dengue vectors in the district of Batticaloa in Eastern Sri Lanka. *Trop Med Health.* **39**: 47-52.
- Figueroa L., Marín M., Pérez E. & Molina de Fernández D. (2006). Mecanismos de resistencia a insecticidas organosintéticos en una población de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) del estado Aragua. *Bol. Mal. Salud Amb.* **46**: 39-47.
- Fonseca I., Quiñones M., Lenhart L. & Brogdon W. (2011). Insecticide resistance status *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Manag Sci.* **67**: 430-437.
- Fonseca I. & Quiñones M. (2005). Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos detección y vigilancia en salud pública. *Rev. Colomb. Entomol.* **31**: 107-115.
- Gil M. (2006). *Informe ciudadano de la situación de los contaminantes orgánicos persistentes en Venezuela*. Fundación Aguaclara. Documento en línea en línea. <http://www.aguaclara.org/pdf/proipep-20060827.pdf>. (Consulta: 2016 agosto 22).
- Grant D. & Hammock B. (1992). Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. *Mol. Gen. Genet.* **234**: 169-176.
- Gratz, N. (1991). Emergency Control of *Aedes aegypti* as a disease vector in urban areas *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **2**: 383-393.
- Harris A., Rajatileka S. & Ranson H. (2010). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**: 277-284.
- Hemingway J., Hawkes N. J., McCarroll I. & Ranson H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* **34**: 653-665.
- Hemingway J. & Ranson H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* **45**: 371-391.
- Hoisington D., Khairallah M. & González de León D. (1994). *Laboratorio Protocols: CIMMYT*. Applied Molecular genetics Laboratory (2da ed.). México, DF: CIMMYT.
- Hu Z., Du Y., Nomura Y. & Dong K. (2011). A sodium channel mutation identified in *Aedes aegypti* selectively reduces cockroach sodium channel sensitivity to type I, but not type II pyrethroids. *Insect Biochem Mol Biol.* **41**: 9-13.
- IRAC, Insecticide Resistance Action Committee. (2006). *Prevention and management of insecticide*

- resistance in vector and pests of public health importance.* [Folleto] USA: Autor.
- Kamgang B., Marcombe S., Chandre F., Nchoutpouen E., Nwane P., Etang J., Corbel V. & Paupy C. (2011). Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central África. *Parasites & Vectors* **4**: 79-86.
- Kolaczinski J. H. & Curtis C. F. (2004). Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a review of the debate. *Food Chem. Toxicol.* **42**: 697-706.
- Kostaropoulos I., Papadopoulos A., Metaxakis A., Boukouvala E. & Papadopoulos M. (2001). Glutathione S-transferase in the defense against pyrethroid in insect. *Insect Mol Biol.* **31**: 313-319.
- Lumjuan N., McCarroll L., Prapanthadara L., Hemingway J. & Ranson H. (2005). Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confer DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* **35**: 861-871.
- Luque J. & Herráez A. (2005). *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética.* Conceptos, técnicas y aplicaciones en Ciencias de la Salud. Harcourt S.A. Madrid, España:
- Maestre R., Rey G., De las Salas J., Vergara C., Santacoloma L., Goenaga S. & Carrasquilla M. (2010). Estado de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* a insecticidas Atlántico (Colombia). *Rev. Colomb. Entomol.* **36**: 242-248.
- Manjarres A. & Olivero J. (2013). Control Químico de *Aedes aegypti*: Una perspectiva histórica. *Rev. Costarric. Salud Pública.* **22**: 68-75
- Marcombe S., Poupardin R., Darriet F., Reynaud S., Bonnet J., Strode C., et al. (2009). Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics.* **10**: 1-14.
- Marcombe S., Farajollahi A., Healy S., Clark G. & Fonseca D. (2014). Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and mechanisms involved. *PloS One.* **9**: 1-10.
- Martínez D., Chandre F., Williamson M. S., Darriet F., Bergue J. B., Devonshire A. L., et al. (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (Kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* **7**: 179-184.
- Martins A., Moura R., Birgitt G., Peixoto A. & Valle D. (2009). Voltage-Gated Sodium Channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **81**: 108-115.
- Mazzarri M. (1995). Revisión del estado actual de la resistencia de *Aedes aegypti* a insecticidas utilizados en salud pública. *Bol. Dir. Malarial. San. Amb.* **35**. 91-95.
- Molina D., Bastidas D. & Figueroa L. (2013). Malation vs. *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) de diferentes regiones de Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **53**: 44-55.
- Moreno E., Aldana M., Silveira M., Rodríguez G., Valenzuela A. & Meza M. (2012). Análisis de piretroides en suelo y agua de zonas agrícolas y urbanas de los valles del Yaquí y Mayo. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **28**: 303-310
- Mouchet J. (1967). La resistencia aux insecticides chez *Aedes aegypti* et les especes voisines. *Bull. WHO.* **36**: 569-577.
- MPPS (14 de Diciembre de 2009). Dirección general de Salud Ambiental. Dirección de Control de Vectores, Reservorios y Faunas Nocivas.
- MPPS (25 al 31 de Diciembre de 2011). Boletín Epidemiológico, Semana Epidemiológica N°52 Documento en línea: [http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com\\_content&view=article&id=941](http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=941) (Consulta: 2016 Agosto 20).
- MPPS (23 al 29 de Diciembre de 2012). Boletín Epidemiológico, Semana Epidemiológica N°52 Documento en línea: [http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com\\_content&view=article&id=941](http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=941) (Consulta: 2016 Agosto 20).

- MPPS (22 al 28 de Diciembre de 2013). Boletín Epidemiológico, Semana Epidemiológica N°52 Documento en línea: [http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com\\_content&view=article&id=941](http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=941) (Consulta: 2016 Agosto 20).
- MPPS (26 de Octubre al 1 de Noviembre de 2014). Boletín Epidemiológico, Semana Epidemiológica N° 44. Documento en línea: [http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com\\_content&view=article&id=941](http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=941) (Consulta: Agosto 20, 2016).
- MPPS (28 de Junio al 4 de Julio de 2015). Boletín Epidemiológico, Semana Epidemiológica N° 26. Documento en línea: [http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com\\_content&view=article&id=941](http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=941) (Consulta: 2016 Agosto 20).
- Ocampo C., Brogdon W., Orrego C., Toro G. & Montoya-Lerma J. (2000). Insecticide susceptibility in *Anopheles pseudopunctipennis* from Colombia: Comparison between bioassays and biochemical assays. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **16**: 331-338.
- OMS. (1993). *Técnicas entomológicas de campo para la lucha antipalúdica*. Parte I. Guía del alumno. Ginebra.
- OMS (2016). *Dengue y dengue grave. Nota descriptiva agosto 2016*. Documento en línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/> (Consulta: 2016, Octubre 18).
- OPS/OMS, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud, (2016). (Octubre 14 de 2016). *Dengue: Datos estadísticos y epidemiología Número de casos reportados de dengue y dengue grave en las Américas, por país (SE 39)*. Documento en línea: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=readall&cid=3274&Itemid=40734&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=3274&Itemid=40734&lang=es) (Consulta: 2016, Octubre 18)
- OPS (2013). *Epidemiological alert. Chikungunya, fever, 9*. Documento en línea: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_) (Consulta: 2016, Octubre 18).
- Paton M., Karunaratne S., Giakoumaki E., Roberts N. & Hemingway J. (2000). Quantitative analysis of gene amplification in insecticide resistant *Culex* mosquitoes. *Biochem J.* **346**: 17-24.
- Pereira da-Cunha M., Pereira J., Brogdon W., Moya G. & Valle D. (2005). Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **100**: 441-444.
- Pereira E., Santos M., De Araujo A., Gomes E., Da Silva U., Nogueira L., et al. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasit Vectors.* **4**: 1-12.
- Pérez E. (2005). *Resistencia a insecticidas en cepas de Aedes aegypti (díptera: culicidae) de distintos municipios del estado Aragua*. Trabajo de grado de Maestría, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.
- Ponce G., Flores A., Fernández I., Saavedra K., Reyes S., Lozano S., et al. (2009). Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. *PLoS.* **3**: 1-10.
- Quarterman K. & Schoof H. (1958). The status of insecticide resistance in arthropods of public health importance in 1956. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **7**: 74-83.
- Rodríguez M., Bisset J., Fernández D. & Pérez O. (2004). Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. *Rev. Cubana Med. Trop.* **56**: 54-60.
- Rodríguez R. (2002). Estrategias para el control de dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Rev. Cubana Med. Trop.* **54**: 189-201.
- Rodríguez S., Gaunt T. & Day I. (2009). Hardy-Weinberg equilibrium testing of Biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am. J. Epidemiol.* **169**: 505-514.
- Rodríguez M. (2008). *Estudio de la resistencia a insecticidas en Aedes aegypti (Díptera:*

- culicidae*). Tesis doctoral Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. La Habana, Cuba.
- Saavedra K., Urdaneta L., Rajatileka S., Moulton M., Flores A., Fernández I., et al. (2007). A mutation in the voltaje-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* **16**: 785-798.
- Sambrook J. & Russell D. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3ra edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Santacoloma L., Chaves B. & Brochero H. (2010). Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. *Rev. Panam. Salud Publica.* **27**: 66-73.
- SAS & OPS/OMS (1997). *Normas técnicas y operativas para la prevención del dengue y el control del Aedes aegypti en Venezuela (Normas técnicas)*, Caracas: Autor.
- Saume F. (1992). *Introducción a la química y toxicología de insecticidas.: Integral*. Maracay, Venezuela.
- Scott J. & Wen Z. (2001). Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Manag Sci.* **57**: 958-967.
- Sokal F., Robert R., Rohlf F. & James (1979). *Biometría: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. H. Blumes Rosario. Madrid, España.
- Vargas F., Córdova O. & Alvarado A. (2006). Determinación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Lutzomyia peruensis* procedentes del norte peruano. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica.* **23**: 259-264.
- WHO (2016). *Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vector Mosquitoes*. Second Edition. Geneva.
- Wright S. (1921). Systems of mating. II. The effects of inbreeding on the genetic composition of population. *Genetics.* **6**: 124-143.
- Xu Q., Wang H., Zhang L. & Liu N. (2006). Kdr allelic variation in pyrethroid resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* (S.) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**: 774-780.
- Yanola J., Somboon P., Walton C., Nachaiwieng W., Somwang P. & Prapanthadara L. (2011). High throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltaje-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Trop. Med. Int. Health.* **16**: 501-509.
- Zaim M., Aitio A. & Nakashima N. (2000). Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med. Vet. Entomol.* **14**: 1-5.

Recibido el 18/02/2017  
Aceptado el 29/12/2018