

Mecanismos de resistencia a la permetrina en dos poblaciones de *Aedes aegypti* del occidente de Venezuela

Mechanisms of Permethrin resistance in two populations of Aedes aegypti in western Venezuela

Leslie Álvarez González^{1,2*}, Gustavo Ponce García² & Adriana Flores Suarez²

RESUMEN

Se determinó la resistencia a la permetrina en *Aedes aegypti* de los estados Trujillo y Zulia mediante bioensayos de botella. Los insectos derribados durante la hora de exposición fueron registrados y usados para calcular la Concentración Knock-down cincuenta (CK₅₀) y los muertos a las 24 horas para la Concentración Letal cincuenta (CL₅₀). La resistencia al derribo y post-recuperación fueron determinadas calculando del Factor de Resistencia FRCK₅₀ y FRCL₅₀, comparando los valores de CK₅₀ y CL₅₀ de las poblaciones de *Ae. aegypti* de campo con los de la cepa susceptible New Orleans obtenidos mediante análisis de regresión log-probit. Mecanismos metabólicos y no metabólicos asociados a la resistencia, fueron evaluados midiendo los niveles de las enzimas alfa-esterasas, beta-esterasas, oxidasas de función múltiple y glutatión-S-transferasas mediante la técnica de microplacas y determinando la frecuencia alélica I1016 por PCR alelo específico. Ambas poblaciones mostraron baja resistencia al derribo (FRCK₅₀ < 5) y moderada resistencia post-recuperación (FRCL₅₀ entre 5 y 10). Sobre-expresión de alfa-esterasas fue observada en la población Loma Linda la cual se correlacionó significativamente con la CL₅₀. En la población Pampanito la frecuencia del alelo I1016 fue de 0,1 y en Loma Linda de 0,17, observándose homocigotos mutantes solo en esta última población. Se evidencia la presencia de mecanismos metabólicos y no metabólicos asociados a la resistencia al derribo y post-recuperación a la permetrina en las poblaciones bajo estudio, lo cual debe ser considerado antes de la aplicación de piretroides para el control de *Ae. aegypti* en la zona de estudio.

Palabras clave: Culicidae, control químico, enzimas desintoxicantes, mutación *kdr*.

SUMMARY

Permethrin resistance was determined in *Aedes aegypti* populations from Trujillo and Zulia states using the bottle bioassay method. Insect knock-down rates during 1h of exposure were recorded and used to calculate the 50% knock-down concentration (KC₅₀) and the mortality after 24 h (LC₅₀). Knock-down and post-recovery resistance were determined by calculating the resistance factors, FRKC₅₀ and FRLC₅₀. This was done by comparing the KC₅₀ and LC₅₀ values (obtained by regression analysis log-probit) of the field populations with a susceptible New Orleans strain. Metabolic and non-metabolic mechanisms associated with resistance were assessed by measuring the levels of the following enzymes: alpha-esterases, beta-esterases, mixed function oxidases (MFOs) and glutathione-S-transferases (GSTs) using the microplate technique. We also determined the allelic frequency of I1016 by allele specific PCR. Both populations showed a low knock-down resistance (FRKC₅₀ < 5) and moderate post-recovery resistance (FRLC₅₀ between 5 and 10). Overexpression of alpha-esterases was observed in the Loma Linda population and was significantly correlated with the LC₅₀. The frequency of the I1016 allele was 0.1 for the Pampanito population and 0.17 for the Loma Linda population, and in the latter we also observed homozygous mutants. The existence of metabolic and non-metabolic mechanisms associated with knockdown resistance and post-recovery to permethrin in the populations studied was demonstrated. This should be taken into account before introducing these insecticides to control populations of *Ae. aegypti* in the region.

Key words: Culicidae, chemical control, detoxification enzymes, *kdr* mutation.

¹ Laboratorio de Bioquímica y Genética de Resistencia a Insecticidas. Instituto Experimental "J. W. Torrealba". Núcleo Universitario Rafael Rangel. Universidad de los Andes, Trujillo Venezuela. Sede Carmona. 3150.

² Laboratorio de Toxicología y Fisiología de Insectos. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. Facultad de Ciencias Biológicas. Av. Universidad s/n Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. México 66451.

*Autor de correspondencia: hleslieag@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Aedes aegypti (L.), principal vector de los flavivirus de la fiebre amarilla, dengue, fiebre hemorrágica por dengue (VFA y DENV) y zika (ZIKV), así como del alfavirus de la fiebre chikungunya (VC) ha desarrollado resistencia a los insecticidas en numerosos lugares del mundo (Brown, 1986). El desarrollo de este fenómeno en los mosquitos constituye el principal problema que afecta a las estrategias de control y se debe a la selección de genes de resistencia en las poblaciones de esta especie (WHO, 1981). En las últimas décadas, los insecticidas piretroides han jugado un papel importante en el control de adultos de *Ae. aegypti* a nivel mundial, a menudo en combinación con el insecticida organofosforado temefos para el control de estadios inmaduros, sin embargo, la evolución de la resistencia a estos y otros insecticidas en este vector ha comprometido la eficacia de los programas de control (Flores *et al.*, 2006, Thanispong *et al.*, 2008). Los principales mecanismos implicados en la resistencia a piretroides son el incremento de enzimas desintoxicantes tales como: carboxilesterasas, oxidasas de función múltiple P-450 (MFO) y glutatión-s-transferasas (GST) (Vaughan & Hemingway 1995, Rodríguez *et al.*, 1999, 2001, Kasai *et al.*, 2000, Prapanthadhara *et al.*, 2002, Hemingway *et al.*, 2004, Flores *et al.*, 2006) y mutaciones presentes en el gen para el canal de sodio dependiente de voltaje (Brenques *et al.*, 2003, Saavedra *et al.*, 2007, Yanola *et al.*, 2011). En Venezuela, investigaciones señalan resistencia de *Ae. aegypti* a los piretroides permetrina, ciflutrina, lambdacialotrina y deltametrina (Mazzarri & Georghiou, 1995, Molina *et al.*, 1995, Pérez, 2010, Álvarez *et al.*, 2008, 2013) lo cual refleja la intensa presión de selección ejercida, bien por la aplicación de estos químicos para el control de *Ae. aegypti*, o para el control de plagas agrícolas. Sobre-expresión de estererasas y MFO determinadas mediante el uso de sinergistas han sido reportados por Pérez (2010) en poblaciones de *Ae. aegypti* del estado Aragua resistentes a lambdacialotrina y deltametrina, del mismo modo, Álvarez *et al.* (2013), encuentran sobre-expresión de GST y MFO en poblaciones de los estados Trujillo y Lara resistentes a deltametrina. Mutaciones en el gen para el canal de sodio dependiente de voltaje asociadas a resistencia a piretroides, han sido observadas en *Ae. aegypti* de Venezuela. Saavedra *et al.*, (2007) refieren frecuencias para I1016 comprendidas entre 0,01 y 0,132 en poblaciones de los estados Anzoátegui, Lara, Bolívar y Apure. Recientes

investigaciones realizadas por Álvarez *et al.*, (2015) en poblaciones silvestres de *Ae. aegypti* de los estados Trujillo, Lara, Táchira y Guárico colectadas entre los años 2008-2012 demuestran la diseminación de la mutación V1016I con frecuencias del alelo I1016 comprendidas entre 0,01 y 0,37, así como la presencia de la mutación F1534C con frecuencias entre 0,35 y 1,0. Estos hallazgos acerca de los mecanismos metabólicos y no metabólicos responsables de la resistencia a piretroides en *Ae. aegypti* del territorio venezolano, exhortan al monitoreo de estas y otras poblaciones del país donde se observa emergencia de chikungunya y zika así como re-emergencia del dengue, lo anterior con la finalidad de ampliar la información necesaria para el manejo de la resistencia de este vector a los insecticidas usados para su control. Este estudio evalúa el nivel de resistencia de dos poblaciones de *Ae. aegypti* procedentes de los estados Trujillo y Zulia al piretroide permetrina, así como niveles de enzimas desintoxicantes y la mutación *kdr* V1016I.

METODOLOGÍA

Material Biológico

El presente estudio comprende 2 poblaciones de campo de *Ae. aegypti* procedentes de las localidades Pampanito (9°24'42"LN, 70°29'39"LO) en el estado Trujillo y Loma Linda (10°43'26"LN, 71°37'24"LO) en el estado Zulia, al occidente de Venezuela. Estadios inmaduros fueron colectados en el 2014 y transportados al Instituto Experimental "J. W. Torrealba" de la Universidad de los Andes, Venezuela para el establecimiento de las colonias y obtención de las generaciones parentales, las cuales fueron trasladadas a la Universidad Autónoma de Nuevo León, México donde fueron obtenidas las generaciones filiales F1, tal como se describe en (Álvarez *et al.*, 2013). Hembras de 1 a 3 días de emergidas y sin alimentación sanguínea fueron utilizadas para los bioensayos, pruebas bioquímicas y moleculares. La cepa de *Ae. aegypti* New Orleans (NO) mantenida durante varios años en el laboratorio sin exposición a insecticidas, fue usada como cepa de referencia susceptible.

Bioensayos

El insecticida evaluado permetrina 99% de pureza calidad reactivo (ChemService, West Chester, PA), se resuspendió en 1 mL de acetona para obtener

una solución stock con una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, a partir de la cual fueron preparadas diferentes diluciones con concentraciones que ocasionaron entre 2% y 98% de mortalidad. Los bioensayos se llevaron a cabo siguiendo la metodología de botellas tratadas propuestas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, 2002) en Atlanta, GA y (Brogdon&McAllister 1998), usando de 15 a 20 mosquitos por botella. Se evaluaron 5 a 6 concentraciones del insecticida mediante 4 réplicas (botella) por concentración y un grupo control o testigo cuya botella se trató solo con acetona. El tiempo de exposición fue de 1 h, tiempo durante el cual se hicieron observaciones cada 10 minutos para registrar los insectos derribados y evaluar el efecto Knock-down. Posteriormente, los insectos fueron trasladados a envases libres de insecticida y a las 24h se registró la mortalidad. Los bioensayos se realizaron en 3 oportunidades diferentes tanto en las poblaciones de campo y con la población de referencia NO. Las mortalidades fueron corregidas mediante la fórmula de Abbott (1925) cuando se registró mortalidad en el grupo control entre 5 y 20%. Los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis de regresión log-Probit (Finney, 1971), empleando el programa Probit (Raymond, 1985), para determinar la CK_{50} y CL_{50} e intervalos de confianza ($\alpha = 0,05$). Los factores de resistencia (FR) fueron calculados dividiendo los valores de CK_{50} de cada población entre los valores de CK_{50} de la cepa NO, así como los valores de CL_{50} y utilizados para categorizar la resistencia como: baja ($FR < 5$), moderada (FR entre 5 y 10) y alta ($FR > 5$) según Mazzarri&Georghiou (1995).

Enzimas

Cada mosquito se homogenizó en 2 mL de buffer fosfato pH 7,2 y 100 μL fueron transferidos a pozos individuales por triplicado por enzima. Alfa y beta esterasas, oxidasas de función múltiple y glutatión-S-transferasas (GST) fueron cuantificadas en 30 mosquitos de cada población de campo y de la cepa de referencia siguiendo la metodología descrita por Brogdon (1989) y CDC (1992). La absorbancia fue medida en un microlector de placas UVM-34 (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria) y promediada. La concentración de proteínas fue determinada según Brogdon (1984) y en caso de observarse variación en el tamaño de los mosquitos se realizó la dilución necesaria del homogenado. Se evaluaron los datos para cada ensayo bioquímico por

análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey a un nivel de significancia de $P > 0,05$, para comparar los promedios de absorbancia para cada enzima de las poblaciones estudiadas con el de la cepa de referencia. El umbral de resistencia correspondiente al valor de absorbancia máximo en la cepa NO, se comparó con los obtenidos en las poblaciones estudiadas. Se calculó el porcentaje de individuos que excedían el umbral (CDC, 2002) y se clasificó la enzima como un mecanismo no alterado (NA), alterado incipientemente (IA), o alterado (A), si $< 15\%$, $15-50\%$, o $> 50\%$ de los individuos excedían el umbral, respectivamente (Montella *et al.*, 2007). Análisis de regresión lineal fue realizado entre los valores de las CL_{50} y los niveles enzimáticos (promedio de valores de absorbancia). La correlación (r) fue determinada para conocer el grado de asociación entre ambas variables. Tres criterios fueron considerados para asociar algún mecanismo enzimático con la resistencia encontrada; valores promedio de absorbancia significativamente superiores con respecto a los mostrados por la cepa NO, más del 50% de los individuos excediendo el umbral de resistencia y alta correlación significativa entre los valores de CL_{50} y promedios de absorbancia para cada enzima.

Determinación de la frecuencia de la mutación V1016I

Extracción de ADN

El ADN se aisló de cada mosquito mediante la técnica de extracción sales modificada por Coen *et al.*, (1982). El ADN se pelletizó y antes de usarse se resuspendió en 200 μL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0). La cantidad y la calidad de cada ADN se determinó en un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc).

Amplificación de los alelos específicos PCR

Para la amplificación de los alelos V1016 e I1016 se realizó una sola reacción de PCR en tubo (Saavedra *et al.*, 2007). Se preparó un Máster mix con buffer 10x, agua destilada ultrapurificada, cloruro de magnesio 1,5 mM, dNTP's 25nM, 2 primers "alelo específicos" a 500 pM/ μL : V1016 (5'-[GCGGGCAGGGCGGGGGGGCGGGGCCACAAATTGTTTCCCACCCGCACCG]3') y I1016 (5'-[GCGGGCACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA]-3') y un primer anti sentido Ile1016r

(5'-[TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC]-3') y Taq polimerasa 5U/ μ L. En cada tubo de PCR se mezclaron por pipeteo 1,5 μ L de ADN y 23,5 μ L del Master Mix y se colocaron en un termociclador Biocycler BIORAD® programado a 4 ciclos: 1er ciclo: 95°C x 5 min, 2do Ciclo: 95°C x 1min, 60°C x 1min, 72°C x 1,15 min x 29, 3er Ciclo: 72°C x 10 min, 4°C 24 horas. Tres controles fueron incluidos cada vez que se realizó la PCR: un control homocigoto susceptible (V1016/V1016 cepa NO), un homocigoto resistente cepa IMU5 (I1016/I1016 población resistente Isla Mujeres, México) donada por la Dra. Karla Saavedra Rodríguez de Colorado State University, USA y un control negativo que correspondía a agua destilada ultrapurificada. Los productos de PCR, un marcador de peso molecular de 12 bandas (de 25bp a 500 pb HyperLadderTMV, Bionline) y el control negativo se revisaron en geles de agarosa al 3% con gel red. La electroforesis se corrió por 20 minutos a 100 voltios y se visualizó el gel para la genotipificación según Saavedra *et al.* (2007) mediante fragmentación de productos de PCR de alelos específicos del sistema V1016I. La frecuencia de cada mutación (p), fue calculada como la suma de dos veces el número de homocigotos resistentes y el número de heterocigotos, todo dividido entre $2n$, donde n es el tamaño de la muestra. El intervalo de confianza 95% alrededor de p , fue calculado como el intervalo Wald:

$$\tilde{p} \pm Z_{\alpha/2} \sqrt{\tilde{p}(1-\tilde{p}) / n}$$

el cual fue ajustado por adición de la mitad del cuadrado del valor crítico $Z(1,96)$, para el numerador y el cuadrado entero del valor crítico en el denominador antes calculando el intervalo (Agresti & Coull, 1998).

RESULTADOS

Para la población de *Ae. aegypti* Pampanito, la CK_{50} correspondió a 2,57 μ g/botella y la CL_{50} 2,60 μ g/botella, para Loma Linda la CK_{50} fue 2,90 μ g/botella y 2,54 μ g/botella la CL_{50} y para NO la CK_{50} fue de 0,67 μ g/botella y 0,46 μ g/botella la CL_{50} . Al determinar los $FRCK_{50}$ encontramos un valor de 3,8 para Pampanito y 4,3 para Loma Linda mostrando baja resistencia al derribo y valores de $FRCL_{50}$ en Pampanito de 5,7 y 5,5 en Loma Linda mostrando moderada resistencia post-recuperación (Tabla I). Con respecto a los mecanismos enzimáticos, sobre-expresión significativa de las alfa-esterasas y oxididasas fue observada en la población Pampanito con

porcentajes de individuos que excedían el umbral de resistencia inferiores a 15% quedando categorizadas como mecanismos enzimáticos NA según Montella *et al.*, (2007), al evaluar la correlación entre los valores de CL_{50} y los niveles enzimáticos (promedio de absorbancia) solo se encontró correlación significativa con las alfa-esterasas. En ninguno de los casos se cumplieron los tres criterios propuestos en este estudio, razón por la cual no se asocian estos mecanismos enzimáticos con la resistencia post-recuperación. En la población Loma Linda se observó incremento significativo de las alfa-esterasas, oxididasas y GST con porcentajes de individuos que excedían el umbral de resistencia superiores al 25%, quedando categorizados como mecanismos IA. Alta correlación significativa ($r= 0,998$; $p: \alpha 0,05$) entre la CL_{50} y los niveles de alfa-esterasas fue encontrada, asociando la participación de estas enzimas en la resistencia post-recuperación mostrada por esta población (Tabla II y Fig. 1). En la Tabla III se muestra el número de mosquitos para cada genotipo, la frecuencia del alelo I1016 e intervalo de confianza 95% alrededor de la frecuencia de las poblaciones naturales de *Ae. aegypti* de los estados Trujillo y Zulia para el 2014. El genotipo homocigoto silvestre V1016/V1016 fue el genotipo predominante, seguido por el genotipo heterocigoto V1016/I1016 presentes en ambas poblaciones. En contraste, el genotipo homocigoto mutante I1016/I1016 solo estuvo presente en la población Loma Linda (2/26). La frecuencia alélica I1016 en la población Loma Linda fue superior a la encontrada en Pampanito con valores de 0,17 y 0,10 respectivamente, en concordancia con los resultados obtenidos mediante bioensayos, ya que el mayor valor de $FRCK_{50}$ se obtuvo en la población Loma Linda. Todos los genotipos estuvieron en equilibrio para el locus 1016 según la Ley de Hardy-Weinberg con base en la prueba de χ^2 de Pearson, con valores calculados inferiores al valor tabulado (3,84).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados evidencian resistencia knock-down y post-recuperación a la permetrina a pesar de ser una molécula que no ha sido incorporada en los programas de control de *Ae. aegypti* en Venezuela, no obstante, la aplicación de insecticidas piretroides a nivel doméstico para el control de insectos voladores y en los programas de control de otras plagas de interés en salud pública pudiera

Tabla I. CK₅₀, CL₅₀ y factores de resistencia a la permetrina en *Ae. aegypti*, cepa susceptible New Orleans y dos poblaciones silvestres del occidente de Venezuela.

Cepas de <i>Aedes aegypti</i>	CK ₅₀ µg/mL	IC	b (+/- DE)	FRCK ₅₀	CL ₅₀ µg/mL	IC	b (+/- DE)	FRCL ₅₀
New Orleans	0,67	0,45-1,50	2,10 (0,31)	-	0,46	0,29-0,97	1,84 (0,27)	-
Pampanito	2,57	1,14-5,53	3,08 (0,45)	3,8	2,60	2,24-3,01	2,27 (0,41)	5,7
Loma Linda	2,90	1,99-5,60	4,90 (0,49)	4,3	2,54	2,07-3,13	4,45 (0,40)	5,5

CK₅₀ = Concentración Knock-down cincuenta.
 CL₅₀ = Concentración Letal cincuenta
 IC = Intervalos de Confianza 95%.
 DE = Desviación Estandar
 b = pendiente de la recta de regresión log-probit
 FR = Factor de Resistencia.

Tabla II. Promedio de absorbancia (+/- DE) de cuatro mecanismos enzimáticos en *Ae. aegypti*, cepa susceptible New Orleans y dos poblaciones silvestres del occidente de Venezuela.

Cepas de <i>Aedes aegypti</i>	Alfa-esterasas	Beta-esterasas	Oxidasas	GST
New Orleans	0,423 (+/-0,073)	0,655 (+/-0,096)	0,122 (+/-0,028)	0,035 (+/-0,009)
Pampanito	0,483 (+/-0,083)*	0,655 (+/-0,108)	0,151 (+/-0,033)*	0,041 (+/-0,021)
Loma Linda	0,498 (+/-0,055)*	0,625 (+/-0,071)	0,191 (+/-0,035)*	0,062 (+/-0,019)*

DE = Desviación Estandar.
 *promedio significativamente superior (p>0,05) al de la cepa NO.

Tabla III. Frecuencia alélica de I1016 en dos poblaciones silvestres de *Ae. aegypti* del occidente de Venezuela.

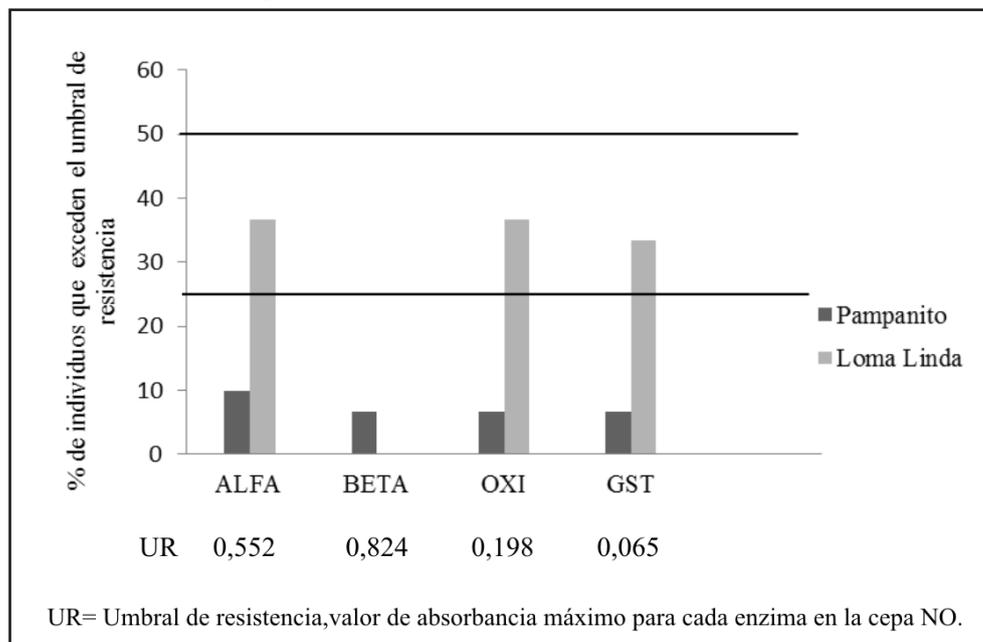
Cepas de <i>Aedes aegypti</i>	n	GG	GA	AA	Frecuencia de I1016	IC 95%	χ ² Hardy-Weinberg
Pampanito	26	21	5	0	0,10	(-0,02) - 0,13	0,294
Loma Linda	26	19	5	2	0,17	0,07 - 0,36	2,80

n = tamaño de la muestra.
 GG = homocigoto silvestre V1016/V1016
 GA = heterocigoto V1016/I1016
 AA = homocigoto mutante I1016/I1016
 IC = Intervalo de Confianza.

ser un factor determinante. Adicionalmente, existen reportes de *Ae. aegypti* resistentes a piretroides debido a resistencia cruzada con DDT (Hemingway *et al.* 1989, Brengues *et al.* 2003), ya que comparten el sitio blanco, el canal de sodio dependiente de voltaje, lo cual pudiera ser un factor adicional presente en nuestras poblaciones, debido a la presión de selección ejercida con la aplicación de DDT por varias décadas en Venezuela para el control de la malaria y otras enfermedades metaxénicas. El primer reporte de resistencia a la permetrina en Venezuela fue realizado por Mazzarri & Georghiou (1997) en poblaciones de *Ae. aegypti* procedentes de los estados Aragua y Falcón, no siendo afectada por los sinergistas DEF y butóxido de piperonilo (PBO), sugiriendo la

presencia de un mecanismo no enzimático asociado a la resistencia encontrada. *Ae. aegypti* de la población Pampanito (estado Trujillo), ha sido evaluado desde el 2006, particularmente en el 2008 mostró resistencia al piretroide deltametrina evolucionando en el 2010, con niveles sobre-expresados de GST en individuos supervivientes luego de ser expuestos a la CL₅₀ del piretroide y aumento de las frecuencias de los alelos mutantes I1016 y C1534 para el 2012 (Álvarez *et al.*, 2013; 2015). En el presente estudio encontramos resistencia knock-down y post-recuperación a la permetrina, por lo que esta población presenta resistencia cruzada a los piretroides permetrina y deltametrina, lo que limita el uso de estos químicos para el control de *Ae. aegypti* en la localidad. Similares

Fig. 1. Porcentaje de individuos de las Cepas de *Ae. aegypti* evaluadas que exceden el umbral de resistencia para cada enzima.



resultados han sido obtenidos por Molina *et al.*, (1995) en Venezuela, Harris *et al.*, (2010) en Islas Gran Caimán, Fonseca *et al.*, (2010) en Colombia y Flores *et al.*, (2013) en México. A pesar de mostrar niveles sobre-expresados de alfa-esterasas y oxidasas, estos mecanismos enzimáticos no fueron asociados con la resistencia encontrada, debido al bajo porcentaje de individuos que excedían el umbral de resistencia (< 15%) para ambas enzimas y ausencia de correlación entre los niveles de oxidasas y los valores de la CL_{50} , a diferencia de lo observado en la población Loma Linda resistente también a la permetrina, donde las alfa-esterasas se mostraron como un mecanismo incipientemente alterado (> entre 15% y 50%) correlacionándose significativamente con la CL_{50} , indicando la participación de estas enzimas en la resistencia desarrollada por esta población. El papel de las esterasas, oxidasas y GST en la resistencia a la permetrina es controversial, investigaciones realizadas por Mazzarri & Georghiou (1997), Prapanthadara *et al.* (2002) y Harris *et al.* (2010) afirman que no están involucradas en la resistencia a piretroides, en contraste, Flores *et al.* (2009), Azirun (2010), Fonseca *et al.* (2010), Somwang *et al.* (2011) y Kasai *et al.* (2014), demuestran el papel de enzimas como oxidasas P450 y esterasas en la resistencia a

permetrina. Con respecto al mecanismo de resistencia no metabólico mutación V1016I, este estudio evidenció el papel de esta mutación en la resistencia a la permetrina en *Ae. aegypti* de ambas poblaciones estudiadas, estando de acuerdo con diversos reportes que muestran que la resistencia a piretroides no se debe solo a la presencia de mutaciones en el gen del canal de sodio dependiente de voltaje sino también a mecanismos enzimáticos (Bregueset *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2005, 2006), tal como se presentó en la población Loma Linda. La mutación V1016I ha sido informada anteriormente en Venezuela en poblaciones silvestres de *Ae. aegypti* de varios estados, entre ellos el estado Trujillo, de donde es originaria la población Pampanito (Saavedra *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2015) y se ha diseminado a otros estados como el estado Zulia, sugiriendo ser el reflejo de la situación general del país. Cada año en Venezuela se continúan reportando casos de dengue, fiebre hemorrágica por dengue, chikungunya y la reciente arbovirosis zika. Particularmente para chikungunya, durante el año 2014 fueron reportados 37.274 casos probables con 2.486 confirmados para la semana epidemiológica 52 (OPS, 2014) los cuales descendieron progresivamente, reportándose para mayo de 2015 un total de 12.754 casos sospechosos

y confirmados, según la Sociedad Venezolana de Epidemiología; para zika, el gobierno anunció 5.221 casos sospechosos y 319 confirmados para febrero de 2016. El programa de control de *Ae. aegypti* durante los años 2014 y 2015 se basó en la eliminación de criaderos y la aplicación de los insecticidas químicos temefos granulado 1%, malatión 94%, fenitrotion CE 50% , pirimifosmetil 50% y deltametrina CE 2,5% en nebulizaciones de ultra bajo volumen, sin embargo, para la semana epidemiológica 41 del 2014, el Índice Aédico a Casas (IAC) a nivel nacional ascendió a 19,79, con respecto a la semana homóloga del 2013, resultando 2.136 casas positivas (MPPS, 2014) descendiendo en el 2015 a 17,54, lo cual se vio reflejado en el ascenso de casos de dengue, la ola epidémica de chikungunya registrada en el 2014 y la emergencia de zika en el país, a finales del año 2015. Debido a la necesidad de controlar *Ae. aegypti* en Venezuela, se han realizado investigaciones sobre la susceptibilidad y/o resistencia a los diferentes grupos de insecticidas químicos, así como los mecanismos de resistencia, las cuales se han limitado a poblaciones procedentes de pocos estados venezolanos (menos del 30%), trayendo como consecuencia la falta de información detallada acerca de la respuesta de este vector a los insecticidas usados en la actualidad. Lo anterior se traduce en un manejo general de la resistencia a nivel nacional que repercute en el éxito de los programas de control. Nuestro estudio comprendió poblaciones de *Ae. aegypti* de dos estados venezolanos, el primero Trujillo, el cual se ha monitoreado desde el año 2008 hasta la actualidad, reportándose resistencia a los insecticidas piretorides con participación de mecanismos metabólicos y no metabólicos, así como susceptibilidad a los organofosforados temefos y malatión usados para su control, el segundo Zulia, que a pesar de ser un estado referido durante los últimos cinco años como de alta casuística por dengue, no ha sido objeto de investigaciones acerca de la resistencia a insecticidas. La presente investigación viene a ser el primer reporte de resistencia a insecticidas piretroides en *Ae. aegypti* del estado Zulia, Venezuela, así como la determinación de enzimas desintoxicantes y mutaciones en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje. Recomendamos desarrollar investigaciones similares en otras localidades de este estado y otros estados del país con diferentes insecticidas con la finalidad de contar con información importante para el manejo de la resistencia. Adicionalmente, deben monitorearse continuamente las poblaciones de *Ae. aegypti* para

evitar la evolución de la resistencia y considerar los resultados obtenidos para garantizar el éxito del control del vector en las localidades estudiadas.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no hubo conflicto de intereses con persona o institución alguna en ninguna de las etapas de ejecución de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

La investigación fue financiada por la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México a través del proyecto Fortalecimiento del laboratorio de referencia para el estudio de la resistencia a insecticidas en artrópodos vectores de enfermedades, CONACYT INFR 2015-01 No. 251675 y la Universidad de los Andes, Venezuela a través del proyecto NURR C-571-13-03-B del CDCHTA, e Intercambio Científico.

REFERENCIAS

- Abbott W. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **8**: 265-267.
- Agresti A. & Coull B. A. (1998). Approximate is better than 'exact' for interval estimation of binomial proportions. *Am Stat.* **52**: 119-126.
- Álvarez L., Castillo C., Oviedo M. & Briceño F. (2008). Diferencias en la susceptibilidad a la deltametrina en poblaciones de *Aedes aegypti* de Trujillo, Venezuela. *Bol Mal Salud Amb.* **48**: 169-175.
- Álvarez L., Ponce G., Oviedo M., López B. & Flores A. (2013). Resistance to Malathion and Deltamethrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Western Venezuela. *J Med Entomol.* **50**: 1031-1039.
- Álvarez L., Ponce G., Saavedra-Rodríguez 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 Management Science.* **71**: 863-869.
- AzirunMohdSofian. (2010). Permethrin resistance in *Aedes aegypti* (Linnaeus) collected from Kuala

- Lumpur, Malaysia. *J. Asia-Pacific Entomol.* **13**: 175-182.
- Bregues C., Hawkes N. J., Chandre F., Mc Carroll 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. G. (1984). Mosquito protein microassay. I. Protein determinations from small portions of single- mosquito homogenates. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **79**: 457-459.
- Brogdon W. G. (1989). Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. *Parasitol. Today.* **5**: 56-60.
- Brogdon W.G. & Mc Allister J. C. (1998). Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J Am Mosq Control Assoc.* **14**: 159-164.
- Brown A. W. A. (1986). Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **2**: 123-140.
- CDC (2002). *Evaluating awebbased instruction.* (www.cdc.gov/ncidod/wbt/resistance/assay/microplate/index.htm). (Consultado: 2015, Agosto 18).
- Coen E., Strachan T. & Dover G. (1982). Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the melanogaster species subgroup of *Drosophila*. Department of Genetics, University of Cambridge. *J. Mol. Biol.* **158**: 17-35.
- El Universal (2016). Gobierno confirma que hay 319 casos de zika en el país. <http://www.eluniversal.com/vida/160212/gobierno-confirma-que-hay-319-casos-de-zika-en-el-país> (Consultado: 2016, Febrero).
- Finney D. (1971). *Probit analysis*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Flores A. E., Albeldaño W., Fernández S. I., Badii M. H., Loaiza H., Ponce G. G., *et al.* (2005). Elevated α -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, México. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **82**: 66-78.
- Flores A. E., Grajales J., Fernandez S. I., Ponce G. G., Becerra M., Lozano F. S., *et al.* (2006). Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern México. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **22**: 672-677.
- Flores A. E., Ponce G. G., Silva B., Gutiérrez S., Bobadilla C., López M. B., *et al.* (2013). Wide spread cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (L.) from Veracruz State México. *J. Econ. Entomol.* **106**: 959-969.
- Flores A. E., Reyes S. G., Fernandez S. I., Sanchez F. & Ponce G. (2009). Resistance to permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in Northern México. *Southwestern Entomologist.* **34**: 167-177.
- Fonseca-González Y., Quiñones M., Lenhart A. & Brogdon W. (2010). Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Management Science.* **67**: 430-437. DOI: 10.1002/ps.2081
- Harris A. F., Rajatileka S. & Ranson, H. (2010). Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg.* **83**: 277-284. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0623>
- Hemingway J., Boddington R. G. & Harris J. (1989). Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. *Bull Ent Res.* **79**: 123-30.
- Hemingway J., Hawkes N., McCarroll L. & Ranson H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**: 653-665.
- Kasai S., Weerashinghe I., Shono T. & Yamagawa M. (2000). Molecular clonig, nucleotide sequence and gene expression of a cytochrome P450 (CYP6F1) from the pyrethroid resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Insect Biochem Mol Biol.* **30**: 163-171.
- Kasai S., Komagata O., Itokawa K., Shono T., Ng L. C., Kobayashi M., & Tomita T. (2014). Mechanisms

- of Pyrethroid Resistance in the Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti*: Target Site Insensitivity, Penetration, and Metabolism. *PLoS Negl Trop Dis* **8**: e2948. doi: 10.1371/journal.pntd.0002948
- Mazzarri M. B. & Georghiou G. P. (1995). Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* (L) from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc.* **11**: 315-322.
- MPPS (2014). *Boletín Integral de Salud Ambiental. Semana Epidemiológica 41*. Dirección General de Salud Ambiental. www.iaes.edu.ve/descargas/boletin-dgsa/bidgsa2014.
- MPPS (2015). *Boletín Integral de Salud Ambiental. Semana epidemiológica 41*. Dirección General de Salud Ambiental. www.iaes.edu.ve/descargas/boletin-dgsa/bidgsa2015.
- Molina de Fernández D., Bisset J., Rodríguez M., González J., Salas O., Barazarte H., et al. (1995). Estudio de la susceptibilidad a insecticidas organofosforados y piretroides en cepas de *Aedes aegypti* (Linn.) de cinco estados de Venezuela. *Bol Dir Malarial San Amb.* **35**: 85-90.
- Montella I. R., Martins A. J., Fernández V. P., Pereira J. B., Braga I. A. & Valle D. (2007). Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg.* **77**: 467-477.
- OPS (2014). Número de casos reportados de fiebre chikungunya en las Américas. Oficina Sanitaria Panamericana. SE 41. www.paho.org.
- Pérez P. & Enrique E. (2010). *Resistencia cruzada a insecticidas piretroides en cepas de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) de municipios del estado Aragua*. www.bvs.gob.ve/jornadas.2010/03122010.
- Prapanthadara L., Promtet N., Koottathep S., Somboon P., Suwonkerd W., McCarroll L., et al. (2002). Mechanisms of DDT and permethrin resistance in *Aedes aegypti* from Chiang Mai, Thailand. *Dengue Bull.* **26**: 185-189.
- Raymond M. (1985). Presentation d' une programme d' analyse logprobit pour Microordinateur cahiers Orstrom. *Se' r Ent Me' d Parasitol.* **23**: 117-121.
- Rodríguez M., Bisset J., Mila L., Calvo E., Díaz C. & Soca L. (1999). Levels of insecticide resistance and its mechanisms in a strain of *Aedes aegypti* of Santiago de Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* **51**: 83-88.
- Rodríguez M., Bisset J., Fernández D., Lauzan L. & Soca A. (2001). Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. *J Med Entomol.* **38**: 623-628.
- Rodríguez M., McCall P. J., Donnelly M. J., Ranson H., Hemingway J. & Black W. C. (2007). A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* **16**: 785-798.
- Saavedra-Rodríguez K., Urdaneta-Marquez L., Rajatileka S., Moulton M., Flores A. E., Fernández-Salas I., et al. (2007). A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* **16**: 785-798.
- Somwang P., Yanola J., Suwan W., Walton C., Lumjuan M., Prapanthadara L., et al. (2011). Enzymes based resistant mechanism in pyrethroids resistant and susceptible *Aedes aegypti* strains from northern Thailand. *Parasitol Research.* **109**: 531-537.
- Thanispong K., Satfiantriphop S. & Chareonviriyaphap T. (2008). Insecticide resistance of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in Thailand. *J Pest Sci.* **33**: 351-356.
- Vaughan A. & Hemingway J. (1995). Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1)(A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J Biol Chem.* **270**: 17044-17049.
- Yanola J., Somboon P., Walton C., Nachaiwieng W., Somwang W. & Prapanthadara L. (2011). High-

throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Trop Med Int Hlth.* **16**: 501-509.

insecticides. World Health Organization. Geneva (WHO/VBC/81.80).

Recibido el 01/11/2015
Aceptado el 11/03/2016

WHO (1981). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to
