

Mecanismos asociados a la resistencia al derribo “kdr” a la deltametrina en *Aedes aegypti* del occidente de Venezuela

Mechanisms associated with knockdown resistance to deltamethrin in Aedes aegypti from western Venezuela

Leslie Álvarez González^{1,2*}, Gustavo Ponce García¹, Milagros Oviedo³, Arelis Briceño² & Adriana E. Flores Suarez¹

RESUMEN

Se determinaron los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados con la resistencia al derribo “kdr” a la deltametrina en poblaciones de *Aedes aegypti* de los estados Trujillo, Lara y Táchira. Las poblaciones fueron expuestas a CK_{50} previamente determinadas mediante bioensayos con botellas impregnadas siguiendo la metodología de Brogdon (1989) por 1h. Posteriormente los insectos fueron colocados en envases post-recuperación libres de insecticidas y separados en 4 fenotipos: los no derribados luego de 1h, los recuperados a las 4h, los supervivientes y los muertos a las 24 horas post-exposición. Todos los ejemplares fueron seccionados; con cabeza y tórax se determinaron los niveles de esterasas α y β , oxidasas de función múltiple, glutathion S transferasas y acetilcolinesterasa insensible y con el abdomen se extrajo ADN y se realizaron PCR para amplificar los alelos específicos Val1016 e Ile1016. Las enzimas desintoxicantes se incrementaron en la mayoría de las poblaciones entre las 4 y 24h posteriores a la exposición a la deltametrina sin encontrarse diferencia significativa con los niveles expresados en la cepa susceptible New Orleans (NO), excepto en la población de Ureña donde se encontró aumento significativo en las β -esterasas siendo superiores en el fenotipo superviviente con respecto al fenotipo muertos a las 24h. El genotipo silvestre V1016/V1016 prevaleció sobre el heterocigoto y homocigoto mutante en los cuatro fenotipos, en la mayoría de las poblaciones estudiadas, con excepción de la población Ureña donde el homocigoto mutante I1016/I1016 fue el genotipo predominante en los no derribados, lo cual se vio reflejado en la frecuencia alélica. Se asocia la mutación V1016I con la resistencia al derribo mostrada en las poblaciones evaluadas, destacando la importancia de la temprana detección de esta y otras mutaciones en el canal del sodio asociadas con resistencia a piretroides, lo cual debe ser considerado antes de incorporar el uso de deltametrina en el programa de control de *Ae. aegypti* en estas poblaciones.

Palabras clave: deltametrina, resistencia al derribo, mutación, canal de sodio, enzimas.

SUMMARY

The biochemical and molecular mechanisms associated with resistance to deltamethrin were determined in female *Aedes aegypti* taken from different mosquito populations captured in Trujillo, Lara and Tachira states. Individuals from each population were subjected to 1 h of exposure to deltamethrin using the CK_{50} previously determined by the bottle bioassay. The mosquitoes were then placed in containers free from insecticide and separated into 4 phenotypes: mosquitoes that were not knocked down after 1 h of exposure, those that recovered 4 h after exposure, those that were still alive 24 h after exposure and those that were dead at 24 h. Each of the mosquitoes in these groups was then dissected to separate the head-thorax, and abdomen. Biochemical tests were performed on the head-thorax to determine the presence of resistance-related enzymes including: α - and β -esterases, glutathione S-transferase and insensitive acetylcholinesterase. The abdomen was used for molecular tests to amplify the specific allele Val 1016 and Ile 1016. The quantities of detoxifying enzymes increased between 4 and 24 h after exposure to deltamethrin in mosquitoes from most of the populations tested although no significant differences between these and the susceptible New Orleans strain (NO) were found, except for mosquitoes from the Ureña population which showed a significant increase in β -esterase with higher values in the “survivors” phenotype compared to the “dead” phenotype at 24 h. The wild genotype V1016/V1016 prevailed over the heterozygous and homozygous mutants in the four phenotypes in the majority of the populations studied, with exception of the Ureña population where the resistant homozygote I1016/I1016 was the predominant genotype. The V1016I mutation was associated with the knockdown resistance observed in the evaluated populations emphasizing the importance of the early detection of this and other mutations in the sodium channel which have been linked with resistance to pyrethroids. These aspects should be considered before applying deltamethrin to control these *Ae. Aegypti* populations.

Key words: deltamethrin, knockdown resistance, mutation, sodium channel, enzymes.

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. Av. Universidad s/n Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. México 66451.

² 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.

³ Laboratorio de Biología de Lutzomyia. Instituto Experimental “J. W. Torrealba”. Núcleo Universitario Rafael Rangel. Universidad de los Andes, Trujillo Venezuela. Sede Carmona. 3150.

*Autor de correspondencia: hleslieag@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Los piretroides sintéticos permetrina, deltametrina, lambdaciolotrina, remestrina, sumitrina entre otros, han sido utilizados como adulticidas contra mosquitos, o aplicados a superficies como mosquiteros o pabellones, cortinas y otros artículos para la protección personal (Zaim *et al.*, 2000, Kroeger *et al.*, 2006) convirtiéndose en una importante herramienta para el control del dengue, pero rápidamente y en algunas ocasiones sin previa exposición a estos insecticidas, poblaciones de mosquitos han desarrollado resistencia

La Organización Mundial de la Salud (WHO) define la resistencia como “el desarrollo de una habilidad en una cepa de algún organismo para tolerar dosis de un tóxico que se comprueba como letal en la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie” (WHO, 1992). Es una característica genética heredable cuya frecuencia incrementa en la población como un resultado directo de la presión de selección con un insecticida.

Los principales mecanismos involucrados con la resistencia a insecticidas son la sobreexpresión de enzimas desintoxicantes y/o alteraciones en el sitio blanco donde ejerce su acción el insecticida. Las carboxilesterasas, las monoxidasas del citocromo P450 y las glutatión-s-transferasas (GST) son las enzimas comúnmente involucradas, cuya amplificación genética es inducida en los organismos por exposición a los insecticidas pudiendo generar resistencia a la mayoría ellos (Hemingway & Ranson, 2000). Por otro lado, mutaciones puntuales en el gen que codifica para el canal del sodio dependiente de voltaje han sido descritas y asociadas con la resistencia a DDT y piretroides en *Ae. aegypti* (Brenques *et al.*, 2003; Saavedra *et al.*, 2007; Yanola *et al.*, 2011). La presencia de estas mutaciones ocasionan un cambio de aminoácido que trae como consecuencia una reducción en la unión al insecticida sin pérdida de la función primaria del sitio blanco, denominándose este tipo de resistencia como resistencia al derribo, knockdown o kdr, la cual se evidencia debido a que los insectos no pierden la coordinación inmediatamente después de una exposición a piretroides y al DDT.

La resistencia knockdown disminuye la efectividad de todos los piretroides en diversos grados, dependiendo de si el insecticida contiene un

alcohol desciano-3-fenoxibencil (piretroide de Tipo I) o un alcohol α -ciano-3-fenoxibencil (tipo II). La presencia de este mecanismo en el campo afecta el uso de los piretroides para el control de mosquitos, por lo que, su detección temprana y caracterización son de vital importancia en el desarrollo de estrategias de manejo de la resistencia

Particularmente, en Venezuela, durante los últimos 15 años se han incorporado los piretroides para el control de adultos mediante aplicación espacial de gotas de ULV y conjuntamente con la reducción de criaderos y los programas de saneamiento ambiental con la participación de la comunidad integran las estrategias implementadas para el control y prevención del dengue.

Diversas investigaciones han demostrado que *Aedes aegypti* de Venezuela ha desarrollado resistencia a diferentes insecticidas, entre ellos piretroides (Mazarri & Georghiou, 1995, Bisett *et al.*, 2001, Álvarez *et al.*, 2008, 2013). Niveles sobre-expresados de esterasas determinados mediante pruebas bioquímicas y uso de sinergistas han sido reportados en *Ae. aegypti* de varios estados venezolanos involucrando este mecanismo enzimático como responsable de la resistencia al temefos, clorpirifos y pirimifos metil (Mazarri & Georghiou, 1995; Bisett *et al.*, 2001) así como oxidasas de función múltiple asociadas a la resistencia al malatión (Pérez & Molina, 2009). Adicionalmente, Saavedra *et al.* (2007) reportaron la presencia de la mutación V1016I asociada con la resistencia kdr a piretroides en poblaciones de 9 estados de Venezuela, poniendo de manifiesto la necesidad de monitorear otras poblaciones del país donde se observa re-emergencia del dengue.

El presente estudio analiza los mecanismos enzimáticos y la frecuencia de la mutación V1016I asociados a la resistencia kdr a la deltametrina en 4 poblaciones de *Ae. aegypti* de tres estados al occidente de Venezuela.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico

El presente estudio comprende 4 poblaciones de campo de *Ae. aegypti* procedentes de las localidades Pampanito (PTO 9°24'42"N, 70°29'39"W) y Tres

Esquinas (TE 9°25'48"N, 70°26'51"W) en el estado Trujillo, Lara (10°03'51"N, 69°29'20"W) en estado Lara y Ureña (7°54'57"N, 64°24'20"W) en el estado Táchira, al occidente de Venezuela (Fig. 1). Estadios inmaduros fueron obtenidos de cualquier criadero temporal de *Ae. aegypti* y transportadas al Instituto Experimental "J. W. Torrealba" de la Universidad de los Andes, Venezuela para el establecimiento de las colonias. Las hembras fueron alimentadas con (*Gallus gallus domesticus*) para la producción de huevos y obtener las generaciones parentales las cuales fueron trasladadas a la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, Nuevo León, México. Los huevos fueron colocados en contenedores de plástico con agua de clorada proporcionándoles una solución de proteína de hígado al 50% como fuente de alimento para los estadios larvales. Al llegar a pupa se colocaron en envases de 250 mL en jaulas (30 x 30 cm) hasta que emergieron los adultos. Los mosquitos machos fueron alimentados con solución azucarada al 10% y a las hembras con (*Rattus norvegicus*) para la producción de huevos, para la cual se colocaron envases con agua internamente revestidos con papel

filtro, correspondiendo a las generación filial F1. Todas las poblaciones se mantuvieron a temperatura de 25°C±2°C y 70%±2 de humedad relativa. Hembras de la generación F1 de 1 a 3 días de emergidas y sin alimentación sanguínea fueron utilizadas para las pruebas bioquímicas y moleculares. La cepa New Orleans (NO) mantenida durante varios años en el laboratorio sin exposición a insecticidas, fue usada como cepa de referencia susceptible.

Exposición a deltametrina

Lotes de 300 hembras de cada población de campo y de referencia de 1 a 3 días de emergidas y sin alimentación sanguínea fueron expuestas a la Concentración Letal cincuenta (CK₅₀) deltametrina durante 1h en botellas impregnadas (Brogdon & McAllister, 1998). Los valores de CK₅₀ correspondieron a 0,028 µg/botella en la cepa NO, 0,099 µg/botella en PTO, 0,125 µg/botella para TE, 0,216 µg/botella para Lara y 0,285 µg/botella para Ureña los cuales fueron determinados previamente por Álvarez *et al.* (2013). Posteriormente los

Fig. 1. Mapa de las áreas de estudio mostrando los sitios de muestreo y sus localidades, con respecto a la región occidental de Venezuela.



insectos fueron extraídos y colocados en envases libres de insecticidas separándolos según el fenotipo mostrado de acuerdo a las categorías establecidas en la presente investigación: no derribados luego de 1h (ND), recuperados luego de 4h (R), supervivientes a las 24h (S) y los muertos (M). Los ejemplares de cada fenotipo fueron colocados individualmente en tubos eppendorf, y almacenados a -70°C , los cuales posteriormente fueron seccionados, usando la cabeza y el tórax para las pruebas enzimáticas y el abdomen para las pruebas moleculares.

Pruebas Enzimáticas

Cabeza y tórax de cada mosquito fueron homogenizados en $100\ \mu\text{L}$ de buffer fosfato de potasio $0.01\ \text{M}$ pH 7.2 y suspendidos hasta $2000\ \mu\text{L}$ del mismo buffer. Alícuotas de $100\ \mu\text{L}$ fueron transferidas en pozos de placas de microtitulación. Treinta especímenes de cada grupo por población fueron analizadas por triplicado por placa. Las alfa y beta-esterasas, oxidasas de función múltiple (MFO) glutatión-S-transferasas (GST) y acetilcolinesterasa insensible (iAChE) fueron cuantificadas siguiendo la metodología descrita por Brogdon (1989) y el Centro de Control de Enfermedades CDC (1992) usando como referencia la cepa NO. Los valores de absorbancia fueron medidos con un espectrofotómetro ASYS UVM-34 (Austria) y promediados. La prueba de ANOVA ($\alpha = 0.05$) y la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) fueron aplicadas para el análisis de los valores de absorbancia para cada enzima determinada, tanto en las poblaciones de campo como en la cepa de referencia. Análisis de regresión lineal fueron realizados entre los valores de las CK_{50} y los niveles enzimáticos (promedio de valores de absorbancia), se determinó el valor R2 (coeficiente de determinación) para conocer la fuerza de la correlación.

Determinación de la frecuencia de la mutación V1016I

Extracción de ADN

El ADN se aisló del abdomen de cada mosquito mediante la técnica de extracción por sales (Black & DuTeau, 1997), se pelletizó y antes de usarse se resuspendió en $200\ \mu\text{L}$ de buffer TE ($10\ \text{mM}$ Tris-HCl, $1\ \text{mM}$ EDTA pH 8.0) y se determinó la cantidad y la calidad cada ADN en un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc).

Amplificación de los alelos específicos PCR

Para la amplificación de los alelos Val1016 e Ile1016 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 $1.5\ \text{mM}$, dNTP's $25\ \text{nM}$, 2 primers "alelo específicos" a $500\ \text{pM}/\mu\text{L}$: Val1016 (5'-[GCGGGCAGGGCGGGGGGGCGGGGC CACAAATTGTTTCCCACCCGCACCG]3) y Ile1016 (5'-[GCGGGCACAAATTGTTTCCCA CCCGACTGA]-3') y un primer anti sentido Ile1016r 5'-TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC y Taq polimerasa $5\ \text{U}/\mu\text{L}$. En cada tubo de PCR se mezclaron por pipeteo $1.5\ \mu\text{L}$ de ADN y $23.5\ \mu\text{L}$ 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 10min, 4°C x 4°C 24 horas. Tres controles fueron incluidos cada vez que se realizó la PCR: un control homocigoto susceptible (Val1016/Val1016 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 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 HyperLadder™V, Bioline) y el control negativo se revisaron en geles de agarosa al 3% con bromuro de ethidio. La electroforesis se corrió por 20 minutos a 100 voltios y se visualizó el gel para lo genotipificación según Saavedra *et al.*, (2007) mediante fragmentación de productos de PCR de alelos específicos del sistema V1016I. La frecuencia de cada mutación (\hat{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 \hat{p} , fue calculado como el intervalo Wald:

$$\hat{p} \pm z_{\alpha/2} \sqrt{\hat{p}(1-\hat{p})/n}$$

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

Enzimas

En la Tabla I se muestran los niveles de enzimas desintoxicantes alfa-esterasas, beta-esterasas, MFO, GST y iAChE en mosquitos que no fueron derribados luego de 1h de exposición, recuperados a las 4h y los supervivientes y muertos a las 24 horas. En las poblaciones Pampanito, Tres Esquinas y Ureña se observó incremento significativo en los niveles de alfa-esterasas entre 4h y 24h post-exposición, sin diferencia con los niveles obtenidos en la cepa susceptible NO. En contraste, en la población Lara no se observaron diferencias significativas entre los niveles enzimáticos en los diferentes horarios ni con los obtenidos en la cepa NO.

Con respecto a las beta-esterasas, en las poblaciones Pampanito, Lara y Ureña se observó incremento significativo en los supervivientes

a las de 24h post-exposición, siendo superiores significativamente a los obtenidos en la cepa susceptible NO; al comparar estos resultados con los observados en los muertos a las 24h se encontró que solo en la población Ureña los niveles en los supervivientes a las 24h fueron superiores significativamente. En la población Tres Esquinas, no hubo diferencia entre los niveles enzimáticos expresados en los diferentes horarios ni con los de la cepa NO. Niveles incrementados de MFO fueron encontrados en mosquitos supervivientes de las poblaciones Lara y Ureña los cuales fueron significativamente superiores a los obtenidos en los muertos; al compararlos con los obtenidos en los supervivientes de la cepa NO, no se encontró diferencia entre ellos.

En las poblaciones Pampanito y Ureña los niveles de GST se comportaron similarmente, aumentando entre 4h y 24h post-exposición sin diferencia con los niveles expresados en los muertos

Tabla I. Promedio y desviación estándar de los valores de absorbancias para enzimas, en 4 fenotipos de *Ae. aegypti* de Venezuela y en la cepa susceptible New Orleans luego ser expuestas a la CK₅₀ con deltametrina.

Población		α-esterasas (DS)	β-esterasas (DS)	MFO (DS)	GST (DS)	iAChE (DS)
NO	ND	0,775 (0,045)	0,732(0,054)	0,118(0,034)	-0,018 (0,087)	-0,025 (0,006)
	R	0,881 (0,676)	0,797 (0,094)	0,114(0,030)	-0,046(0,033)	0,010(0,006) ^a
	S	0,893 (0,043)	0,680 (0,060)	0,247 (0,100) ^b	-0,062 (0,057)	0,008 (0,005)
	M	0,929 (0,098)	0,618 (0,047)	0,155 (0,029)	0,043 (0,009) ^c	-0,004 (0,018)
PTO	ND	0,735 (0,044)	0,690 (0,064)	0,183 (0,059) ^d	0,041 (0,010) ^d	0,003 (0,006)
	R	0,726 (0,058)	0,660 (0,078)	0,171 (0,041)	-0,015 (0,035)	0,007 (0,189)
	S	0,896 (0,132) ^b	0,780 (0,079) ^{b,d}	0,182 (0,057)	0,042 (0,012) ^{b,d}	-0,017 (0,098)
	M	0,817 (0,058)	0,771 (0,088)	0,189 (0,053)	0,0361 (0,008)	0,008 (0,011)
TE	ND	0,473 (0,042)	0,749 (0,082)	0,134 (0,036)	0,035 (0,007) ^d	-0,022 (0,058)
	R	0,716 (0,074) ^a	0,694 (0,065)	0,151 (0,054)	0,037 (0,007) ^d	0,007 (0,011)
	S	0,885 (0,112) ^b	0,694 (0,053)	0,186 (0,080)	0,034 (0,013) ^d	-0,015 (0,029)
	M	0,760 (0,013)	0,755 (0,065)	0,128 (0,035)	0,029 (0,010)	0,007 (0,006)
Lara	ND	0,752 (0,066)	0,600 (0,056)	0,175 (0,057) ^d	0,034 (0,011) ^d	0,001 (0,013)
	R	0,762 (0,084)	0,748 (0,097) ^a	0,211 (0,061) ^d	0,037 (0,010) ^d	0,003 (0,013)
	S	0,719 (0,054)	0,819 (0,067) ^{b,d}	0,283 (0,120) ^b	0,038 (0,010) ^d	0,009 (0,008)
	M	0,747 (0,055)	0,835 (0,101)	0,195 (0,071)	0,029 (0,010)	0,003 (0,009)
Ureña	ND	0,874 (0,078) ^d	0,799 (0,074)	0,220 (0,036) ^d	0,046 (0,009) ^d	0,01 (0,005) ^d
	R	0,835 (0,100)	0,745 (0,069)	0,186 (0,044)	-0,016 (0,070)	0,003 (0,020)
	S	0,954 (0,120) ^b	1,021 (0,121) ^{b,d}	0,218 (0,061) ^b	0,038 (0,009) ^{b,d}	-0,05 (0,090)
	M	1,152 (0,187) ^{c,d}	0,755 (0,058) ^d	0,149 (0,038)	0,008 (0,047) ^d	0,011(0,006)

ND= no derribados luego de 1h, R= recuperados luego de 4 h, S= supervivientes luego de 24 h, M= muertos luego de 24 h.

a= promedio en mosquitos recuperados a las 4 h superior significativamente ($P<0.05$) al promedio en los no derribados a 1h.

b= promedio en mosquitos supervivientes a las 24 h superior significativamente ($P<0.05$) al promedio de los recuperados a las 4h.

c= promedio en mosquitos muertos a las 24 h superior significativamente ($P<0.05$) al promedio de los supervivientes a las 24 h.

d= promedio significativamente superior ($P<0.05$) con respecto a los mostrados en la cepa NO.

DS= Desviación estándar

pero superiores a los encontrados en los supervivientes de la cepa NO. En todas las poblaciones estudiadas no se encontraron diferencias entre los niveles de iAChE.

Los resultados obtenidos sugieren que las poblaciones estudiadas presentan un patrón de comportamiento similar en la expresión enzimática al ser sometidas a la CK_{50} -deltametrina, incrementándose o activándose entre 4h y 24h posteriores a la exposición con el insecticida. Al analizar el grado de asociación entre los niveles enzimáticos y las CK_{50} a las cuales fueron expuestas las poblaciones, no se encontró en ninguno de los casos correlación significativa (Tabla II), por lo que no se asoció la sobre-expresión enzimática con la resistencia al derribo.

Mutación V1016I

Los productos de PCR alelo-específico para el sistema V1016I fueron fragmentados por electroforesis en geles de agarosa al 3% disueltos en

Tabla II. Regresión lineal y R^2 entre los valores de CK_{50} y los niveles de enzimas (promedio de absorbancia) en hembras de 4 fenotipos de *Ae. aegypti* de Venezuela.

Enzima		R^2	Significancia
Alfa-esterasas	ND	0,006	0,901
	R	0,127	0,557
	S	0,006	0,676
	M	0,015	0,842
Beta-esterasas	ND	0,007	0,895
	R	0,007	0,896
	S	0,524	0,167
	M	0,697	0,079
MFO	ND	0,534	0,161
	R	0,743	0,060
	S	0,013	0,856
	M	0,007	0,897
GST	ND	0,732	0,065
	R	0,431	0,229
	S	0,683	0,085
	M	0,706	0,075
iAChE	ND	0,468	0,203
	R	0,431	0,229
	S	0,242	0,400
	M	0,529	0,164

ND= no derribados luego de 1h, R= recuperados luego de 4h.
S= supervivientes luego de 24 h, M= muertos luego de 24 h.
 R^2 = coeficiente de determinación.

buffer TBE 1X, detectando el alelo silvestre G/G (V1016/V1016) correspondiendo a una banda de 98 pb y el alelo mutante A/A (I1016/I1016) una banda de 78 pb tal como se muestra en Fig. 2. Ambas bandas se detectaron en los mosquitos heterocigotos V1016/I1016.

En los mosquitos no derribados luego de 1h en la mayoría de las poblaciones, exceptuando en la población Ureña, el genotipo predominante fue el homocigoto susceptible V1016/V1016 (más del 60%) seguido del genotipo heterocigoto V1016/I1016 (entre 20 y 30%). El homocigoto mutante I1016/I1016 fue el genotipo menos frecuente, el cual estuvo ausente en la población Pampanito, en baja proporción (3.3%) en las poblaciones Tres Esquinas y Lara y en alta proporción (53%) en Ureña.

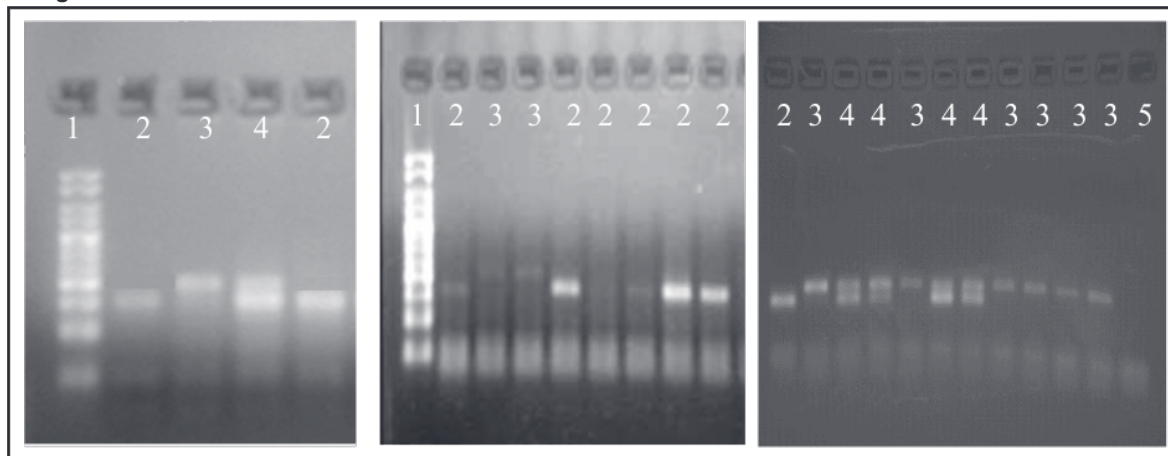
En el fenotipo R a las 4h se registró un comportamiento similar al observado en el fenotipo ND luego de 1h, predominando el genotipo homocigoto susceptible seguido por el genotipo heterocigoto y el genotipo homocigoto mutante, de igual manera en los fenotipos S y M a las 24h. Particularmente en la población Ureña se observó el mayor número de homocigotos mutantes en todos los fenotipos (Fig. 3).

La frecuencia del alelo I1016 en el fenotipo ND fue de 0,17 para Pampanito, 0,20 para Tres Esquinas, 0,18 para Lara y 0,65 para Ureña y 0,13; 0,18; 0,27 y 0,37 en las poblaciones Pampanito, Tres Esquinas, Lara y Ureña respectivamente en el fenotipo R a las 4h. En las poblaciones Pampanito y Ureña se encontraron iguales frecuencias alélicas en los fenotipos S y M (0,05 y 0,43 respectivamente), en Tres Esquinas la frecuencia fue de 0,0 para los supervivientes y 0,25 para los muertos, así como 0,13 y 0,27 en Lara (Tabla III).

DISCUSION

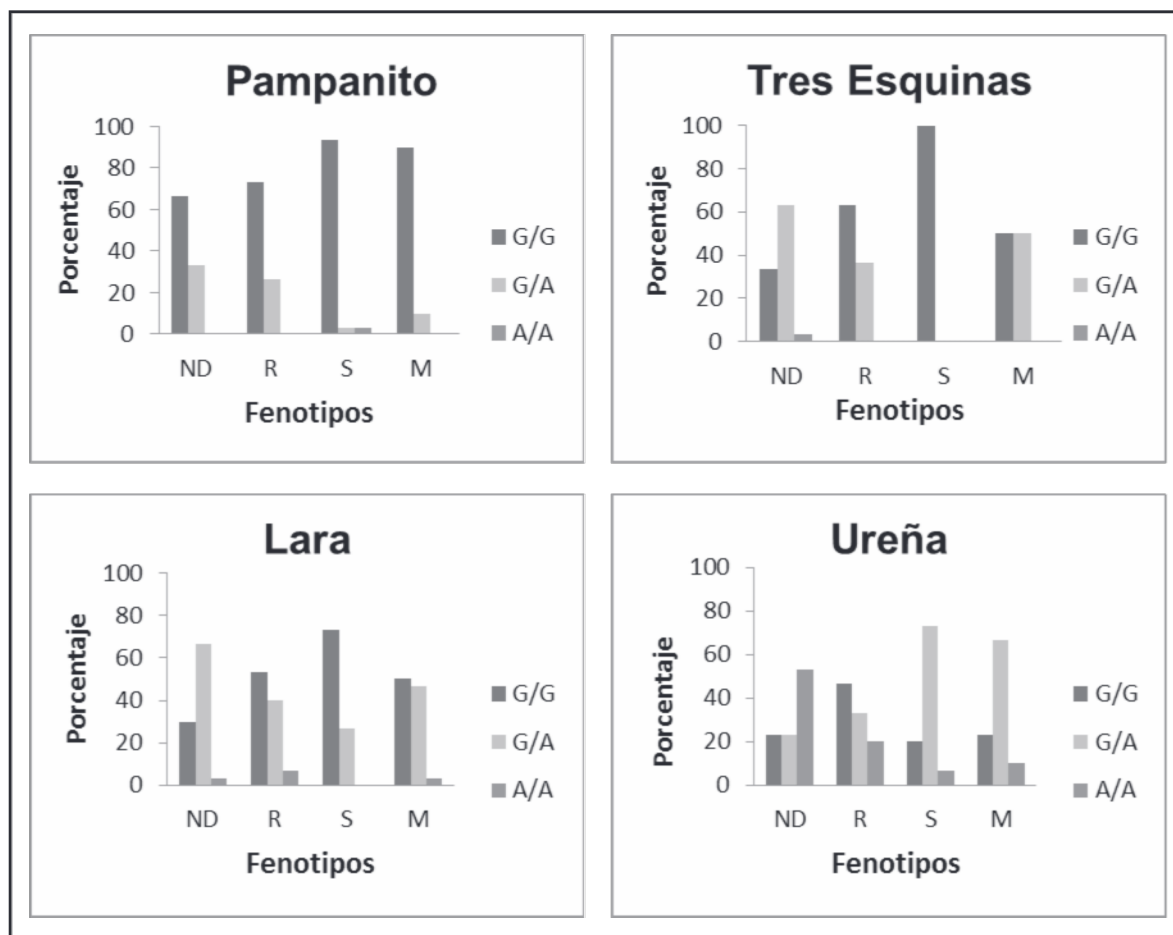
El sitio de acción del DDT y de los piretroides son los canales de sodio dependientes de voltaje a nivel axónico, ocasionando que estos se mantengan anormalmente abiertos, generando picos de actividad repetitiva en ausencia de estímulos y un retardo en el regreso al estado de reposo. Estos picos consisten en despolarizaciones sucesivas durante tiempos prolongados, y es la causa del fenotipo resistente conocido como "kdr" presentes en varias especies de

Fig. 2. Genotipos de la mutación V1016I en *Ae. aegypti* del occidente de Venezuela, mostrados en geles de agarosa al 3%.



1) Marcador de Peso Molecular de 25-500 pb; 2) Genotipo homocigoto mutante I1016/I11016 (IMU5); 3) Genotipo homocigoto silvestre V1016/V1106 (New Orleans); 4) Genotipo heterocigoto V1016/I1016; 5) Control negativo (Agua Ultrapurificada).

Fig. 3 Porcentaje de los genotipos del sistema Val1016Ile en *Aedes aegypti* de Venezuela sometidos a deltametrina.



ND= No derribados a 1 h, R=recuperados a las 4h, S= supervivientes a las 24h, M= muertos a las 24 h

Tabla III. Frecuencia del alelo Ile1016 e intervalo de Wald en diferentes fenotipos de *Ae. aegypti* luego de ser expuestos a las CK₅₀ de deltametrina.

Población		Frecuencia Ile1016	Intervalos de Wald
Pampanito	ND	0,17	0,07 - 0,34
	R	0,13	0,05 - 0,30
	S	0,05	0,001 - 0,21
	M	0,05	0,001 - 0,21
Tres Esquinas	ND	0,20	0,09 - 0,38
	R	0,18	0,08 - 0,36
	S	0,00	(-0,02) - 0,14
	M	0,25	0,13 - 0,43
Lara	ND	0,18	0,08 - 0,36
	R	0,27	0,14 - 0,45
	S	0,13	0,05 - 0,30
	M	0,27	0,15 - 0,45
Ureña	ND	0,65	0,47 - 0,79
	R	0,37	0,22 - 0,55
	S	0,43	0,27 - 0,61
	M	0,43	0,27 - 0,61

ND= no derribados luego de 1h, R= recuperados luego de 4 h, S= supervivientes luego de 24 h, M= muertos luego de 24 h.

insectos. La asociación entre la resistencia *kdr* y las modificaciones en el canal de sodio fue confirmada mediante estudios de unión de neurotoxinas (Bloomquist & Miller, 1986) y mediante estudio de mapeo genético.

En 1975, en Tailandia, fue reportada por primera vez la resistencia tipo *kdr* en *Ae. aegypti* a permetrina, debido a la presencia de un solo factor en el cromosoma III (Soderlund & Bloomquist, 1990). Posteriormente varias mutaciones en esta especie (G923V, L982T, I1011M, I1011V, V1016I, V1016G, D1794Y y F1534C) han sido identificadas en el gen del canal de sodio dependiente de voltaje que confieren resistencia a los piretroides (Bregues *et al.*, 2003; Saavedra *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2009; Yanola *et al.*, 2011).

En todas las poblaciones venezolanas evaluadas en este estudio fue detectada la mutación V1016I, concordando con lo reportado en 9 poblaciones naturales de *Ae. aegypti* procedentes de diferentes estados venezolanos en el 2007 por Saavedra *et al.* La mayor frecuencia del alelo mutante Ile1016 en el fenotipo no derribados, se presentó en la población Ureña, la cual mostro un valor del factor de resistencia “*kdr*” (FRCK₅₀) de 10.2 (Álvarez *et al.*, 2013) indicando alta resistencia

al derribo según Mazzarri & Georghiou (1995). En contraste, las poblaciones Pampanito, Tres Esquinas y Lara mostraron bajas frecuencias alélicas con valores de FRCK₅₀ inferiores a 10 indicando de baja a moderada resistencia al derribo a la deltametrina sugiriendo la existencia de asociación entre la expresión del fenotipo resistente (medido a través de bioensayos con exposición al insecticida) y el genotipo en el locus 1016.

El genotipo heterocigoto estuvo presente en una proporción importante tanto en los mosquitos no derribados como en los recuperados a las 4 horas, similarmente, Saavedra *et al.*, (2007) encontraron que la mitad de los mosquitos recuperados a las 4 horas fueron heterocigotos, sugiriendo que la detección de la resistencia tipo *kdr*, estaría mejor fundamentada si el registro se realiza a las 4 horas en vez de una hora post-exposición.

Con respecto a los mecanismos enzimáticos, los resultados obtenidos advierten que las poblaciones estudiadas presentan un patrón de comportamiento similar en la expresión enzimática al ser sometidas a la CK₅₀-deltametrina, incrementándose o activándose entre 4 h y 24h posteriores a la exposición con el insecticida. Solo en el fenotipo S de la población Ureña se encontraron niveles de beta-esterasas superiores significativamente con respecto al fenotipo muertos y al fenotipo supervivientes de la cepa NO. En este particular, al realizar análisis de correlación entre los niveles enzimáticos y las CK₅₀ deltametrina a las cuales fueron expuestas las poblaciones, no se encontró una correlación significativa, por lo que no se asoció los mecanismos enzimáticos con la resistencia al derribo.

Por otro lado, la supervivencia a las 24 h, además de ser producto de la mutación *kdr* pudiera estar intensificada debido a que tienen una maquinaria de enzimas adaptadas para metabolizar sangre, tal como lo refiere Saavedra *et al.*, (2007). Este autor menciona que las tripsinas y quimiotripsinas son las principales enzimas involucradas en la digestión de proteínas y que la sobre-expresión de los genes que codifican para ellas han sido reportados en cepas resistentes a insecticidas en *Drosophila melanogaster* y *Musca domestica* (Pedra *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 1998), así como, disminución en la regulación de tres genes que codifican para

estas enzimas en una cepa de *Anopheles stephensi* resistente a permetrina (Vontas *et al.*, 2007).

Finalmente, la detección de la resistencia kdr a piretroides debe ser un componente esencial de todos los programas para el control del dengue y otras enfermedades metaxénicas, ya que la presencia de mutaciones en el canal de sodio asociadas a este tipo de resistencia en poblaciones de campo limita el número y clases de insecticidas disponibles. La detección temprana bien de heterocigotos u homocigotos mutantes es de vital importancia en los programas de control y en el manejo de la resistencia a insecticidas.

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

Las colecciones de mosquitos Tres Esquinas y Pampanito fueron obtenidas mediante soporte del Subproyecto Dengue (2008000911-1) Misión Ciencia, Venezuela. La investigación fue financiada por el Fondo CONACYT Ciencia Básica 102120 y CONACYT PDCPN2013-01 Fondo I0002, México. Los autores agradecen a Intercambio Científico-ULA por su contribución en la publicación del artículo.

REFERENCIAS

Agresti A. & Coull B. A. (1998). Approximate is better than “exact” for interval estimation of binomial proportions. *Am. Statistician*. **52**: 119-126.

Ahmed S., Wilkins R. M. & Mantle D. (1998). Comparison of proteolytic enzyme activities in adults of insecticide resistant and susceptible strains of the housefly *Musca domestica* L. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**: 629-639.

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. Vector, control, pest management, resistance, repellents. **50**: 1031-1039.

Bisset J. A., Rodríguez M. M., Molina D., Díaz C. & Soca L. A. (2001). Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. *Rev. Cubana Med. Trop.* **5**: 37-43.

Black W. C. & DuTeau N. M. (1997). RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. En *Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual* (Crampton J. M., Beard C. B. & Louis C., eds), pp. 362-363. Chapman & Hall, London, U.K.

Bloomquist J. R. & Miller T. A. (1986). Sodium channel neurotoxin as probes of the knockdown resistance mechanism. *Neurotoxicology*. *String.* **7**: 217-23.

Bregues C., Hawkes N. J., 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. G. (1989). Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. *Parasitol. Today*. **5**: 56-60.

Brogdon W. G. & McAllister J. C. (1998). Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in bottles. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **14**: 159-164.

(CDC) Centers for Disease Control and Prevention. (2002). *Evaluating mosquitoes for insecticide resistance: a webbased instruction*. Documento en línea. (www.cdc.gov/ncidod/wbt/resistance/assay/microplate/index.htm) (Consultado: 2012, Agosto 15).

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 Biochemistry and Molecular Biology*. **39**: 272-278.
- Hemingway J. & Ranson H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* **45**: 371-391.
- Kroeger A., Manncheno M., Alarcón J. & Pesse K. (2006). Insecticide-impregnated bed nets for malaria control: varying experiences from Ecuador, Colombia, and Peru concerning acceptability and effectiveness. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**: 313-323.
- Mazzarri M. B. & Georghiou 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.
- Pedra J. H., McIntyre L. M., Scharf M. E. & Pittendrigh B. R. (2004). Genome-wide transcription profile of field and laboratory selected dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)-resistant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**: 7034-7039.
- Pérez E. E. & Molina D. (2009). Resistencia focal a insecticidas organosintéticos en *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) de diferentes municipios del estado Aragua, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 143-150.
- Saavedra K., Urdaneta L., Rajatileka S., Moulton M., Flores A. E., Fernández I., et al. (2007). Mutations in the voltage gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* **16**: 785-798.
- Soderlund D. & Bloomquist J. (1990). Molecular Mechanism of Insecticide Resistance. pp 58-96. En: *Pesticide Resistance in Arthropods*. Eds.: Roush R. T., Tabashnik B. E., Routledge Chapman & Hall Inc. Great Britain, U.K.
- Vontas J. G., David J. P., Nikou D., Hemingway J., Christophides G. K., Louis C. & Ranson H. (2007). Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensis* using cross-species microarray hybridization. *Insect Molecular Biology*. **16**: 315-332.
- WHO (1992). *Present status of pesticide resistance*. Tech. Rep. Ser. N° 818, WHO, Geneva, Switzerland. 2-17.
- Yanola J., Somboon P., Walton C., Nachaiwieng W., Somwang P. & 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. Health*. **16**: 501-509.
- Zaim M., Aitio A. & Nakashima N. (2000). Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Medical and Veterinary Entomology*. **14**: 1-5

Recibido el 24/02/2014
Aceptado el 23/06/2024