

Mecanismos de resistencia a insecticidas organosintéticos en una población de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) del estado Aragua

Luisa Elena Figueroa Acosta¹, María Marín Álvarez¹, Enrique Pérez Pinto² & Darjaniva Molina de Fernández³

Anopheles aquasalis del estado Aragua se encuentra en zonas de desarrollo agropecuario cercanas al Lago de Valencia y recibe presión de insecticidas en forma indirecta, la misma dirigida al control de plagas agrícolas. En esta especie, se determinó el nivel de resistencia al insecticida piretroide lambdacialotrina y al organofosforado pirimifosmetil. Los bioensayos se realizaron con el método de las botellas tratadas con insecticidas, a fin de determinar el umbral de resistencia el cual es definido como la sobrevivencia de los mosquitos a 60 minutos de exposición a una dosis específica de los productos evaluados. De tal manera que para lambdacialotrina 0,1 µg/mL se obtuvo un TL₅₀ de 140,7 minutos y para pirimifosmetil 0,1 µg/mL se obtuvo un TL₅₀ de 93,0 minutos. Se identificaron mecanismos de resistencia IN VIVO con los sinergistas Butóxido de Piperonilo (PB) y S, S, S, Tributilfosforotriotioato (DEF) e IN VITRO con el substrato beta naftil acetato. Las enzimas de multifunción oxidasa (MFO) y las esterasas confieren resistencia a estos grupos de insecticidas. Los resultados aquí obtenidos contribuirán al mejor conocimiento de la resistencia a insecticidas en esta especie de importancia médica.

Palabras claves: piretroides, organofosforados, sinergistas, oxidasas, esterasas.

INTRODUCCIÓN

El uso prolongado de insecticidas ha generado la aparición de resistencia en poblaciones de campo de vectores principales de malaria como *Anopheles darlingi* y *An. aquasalis* de los estados Sucre y Aragua (Molina *et al.*, 1997), del estado Monagas (Cortéz, 1999) y en otros vectores secundarios como *Anopheles albimanus* (Molina, 2000). Por lo que la resistencia es un factor que ha dificultado el control de la Malaria a través de la eliminación del vector (Molina *et al.*, 1997). Cuatro especies importantes, vectoras de Malaria en América, *An. albimanus*, *An.*

pseudopunctipennis, *An. darlingi* y *An. vestidipennis*, han demostrado resistencia a uno o más insecticidas, especialmente en áreas tratadas fuertemente con insecticidas (WHO, 1992). También ha sido reportada la resistencia de *An. darlingi* al DDT en Colombia (Suárez *et al.*, 1990).

La resistencia a insecticidas es un problema serio en el éxito de los programas de control de vectores, ya que se ha presentado en géneros de mosquitos de importancia médica. Fueron reportadas 520 especies de artrópodos resistentes a diferentes grupos de insecticidas (Georghiou, 1986). También la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1992) reportó 56 especies de *Anopheles* y 39 de Culicinos, además de triatominos y ácaros, con problemas de resistencia. El Comité de Acción de Resistencia a Insecticidas (IRAC, 2005), reportan 21 especies de *Aedes* y 63 especies de *Anopheles*, resistentes a uno o varios insecticidas.

En la actualidad los agentes de control químico han dado lugar a la selección genética de individuos con el necesario componente bioquímico o de comportamiento para nulificar

¹ Universidad de Carabobo, Escuela de Bioanálisis. Final avenida Ruíz Pineda, La Morita, Edo Aragua, Venezuela.

² Dirección General Sectorial de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria, urb. Andrés Bello, calle Pérez Bonalde, Maracay, Edo Aragua, Venezuela.

³ Instituto de Altos Estudios en Salud Pública "Dr. Arnoldo Gabaldón" Ministerio de Salud. Avenida Bermúdez Sur No 93, Maracay, Edo Aragua, Venezuela.

Autor de correspondencia: darja12@cantv.net

los efectos tóxicos de los mismos. Para algunas especies plagas, la acción de los insecticidas es baja o ninguna (Saume, 1992). El fenómeno de la resistencia a insecticidas se ha expandido e intensificado considerablemente, pasando a ser un serio obstáculo en el desarrollo e incremento de la producción agrícola y la reducción de tratamientos para el control de vectores de enfermedades de muchos países (Georghiou, 1986).

El fenómeno de la resistencia se origina por la presencia de algunos individuos dentro de una población natural de genes, que regulan algunos mecanismos que hacen que los mismos toleren dosis de insecticidas mayores (Georghiou, 1986). Las modificaciones de las enzimas juegan un papel importante. Así la dehidroclorinasa es el factor de mayor importancia en la resistencia al DDT. Las enzimas carboxilesterasas, fosforotriesterasas, acetilcolinesterasa, glutatión-S-transferasas están envueltas en la resistencia a organofosforados y las oxidasas de función mixta (MFO) en la resistencia a piretroides y DDT. Las esterasas confieren resistencia tanto a organofosforados como a piretroides (Georghiou & Pasteur, 1978; Brogdon & Mc Allister, 1998a).

En tal sentido, la presente investigación se enfocó hacia un estudio que actualiza y caracteriza la resistencia de *An. aquasalis* de Puerta Negra estado Aragua, a insecticidas organosintéticos. Dicha especie es la misma que transmite malaria en el oriente del país, trabajos realizados por algunos autores desde el punto de vista ecológico (Grillet *et al.*, 1998) y genético (Conn *et al.*, 1993; Moncada & Conn, 1992), así lo demuestran. Lo cual significa que la presencia del vector en el estado Aragua, representa un alto riesgo de transmisión de la enfermedad, ante los casos importados de malaria que se presentan, los cuales provienen en su mayoría de los estados Sucre, Bolívar y Apure, con una mayor incidencia en el municipio Girardot, el cual limita con el Lago de Valencia (S. Valero, comunicación personal).

Se pretende con la presente investigación, generar aportes en la implementación de programas dirigidos al manejo integrado del vector, en los que el elemento químico sea utilizado con precisión en el momento que sea necesario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

La población objeto de este estudio fue la fauna anofelina del lago de Valencia, el cual limita con la localidad de Puerta Negra (10° 06'N, 67° 36'O), municipio Zamora del estado Aragua. La muestra estuvo comprendida por mosquitos adultos de *An. aquasalis*, colectados entre las 18:00 y 20:00 horas, sobre cebo humano, con una frecuencia de dos veces por semana por un periodo de tres meses (Mayo-Julio, 2004). No se contó con una cepa patrón susceptible de la especie.

Insecticidas

Fueron evaluados el piretroide lambda-cialotrina (70% P/P) y el organofosforado pirimifosmetil (89.08% P/P), así como los sinergistas butóxido de piperonilo (PB 90% P/P, sinergista oxidasa) y S, S, S tributilfosforotrietoato (DEF 99% P/P, sinergista esterasa). Los insecticidas grado técnico sin valor comercial fueron suministrados por Insecticidas Internacionales Compañía Anónima (INICA).

Método de exposición

Las pruebas de resistencia a insecticidas y mecanismos "IN VIVO" se realizaron siguiendo el método de las botellas del CDC (Brogdon & Mc Allister, 1998b, Center for Diseases Control, Atlanta, USA). Para ello se utilizaron botellas de vidrio tipo Wheaton de 250 mL, las cuales fueron usadas como cámaras de prueba para detectar la resistencia a los insecticidas en mosquitos adultos.

Tratamiento de las botellas con insecticidas

A partir de soluciones madres de 100 µg/mL de cada uno de los insecticidas a evaluar, se prepararon soluciones a las concentraciones de 5; 1 y 0,1 µg/mL con acetona. Para los sinergistas las soluciones preparadas, fueron de 1 µg/mL para PB y 5 µg/mL para DEF. Las botellas y sus tapas fueron etiquetadas con la identificación del insecticida empleado, concentración y fecha del tratamiento. Cada una de las botellas a utilizar en los bioensayos fueron tratadas previamente con 1 mL de acetona, posteriormente se le añadió 1 mL de la solución de insecticida a las botellas, las cuales fueron cerradas de

tal manera que toda la superficie interna de la botella quedara expuesta a la solución. Una vez que la fase líquida fue uniformemente distribuida y la acetona se evaporó completamente, las botellas y las tapas fueron colocadas invertidas sobre papel absorbente durante 8 horas en un gabinete oscuro. Las botellas controles del experimento solo fueron tratadas con acetona (Santamaría *et al.*, 2003).

Bioensayos

Los bioensayos se realizaron en condiciones de laboratorio, a una temperatura de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y humedad relativa de $75\% \pm 5$. Se expusieron aproximadamente 10 mosquitos adultos (♀) por botella y se evaluaron cuatro réplicas por cada concentración de insecticida y dos réplicas como grupo control (Brogdon & Mc Allister, 1998b). De esta manera se determinó el efecto del insecticida en función del tiempo de exposición. Se registró el número de insectos muertos a intervalos regulares de cinco minutos hasta que se obtuvo un 100% de mortalidad. Con esta misma metodología se procedió para los bioensayos con los sinérgicos.

Pruebas bioquímicas

Los mosquitos sobrevivientes a los 60 minutos de exposición a insecticidas en los bioensayos, fueron seleccionados para determinar mecanismos de resistencia “IN VITRO” a través del método bioquímico, para detectar actividad enzimática de la esterasa elevada, la cual se hizo por microtitulación (Brogdon *et al.*, 1989).

Los mosquitos fueron macerados en cada pocillo de la placa de microtitulación para obtener un homogenato por cada mosquito en 100 μL de búfer de fosfato de potasio (0,01 M; pH 7,5). Se colocaron 50 μL de cada homogenato en pocillos individuales con 50 μL de beta-naftil acetato. La preparación se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente se le agregó una alícuota de 50 μL de Dianisidina, se incubó por dos minutos y luego se realizó la lectura correspondiente con el lector de Elisa, modelo Multiskan Plus manufacturado por Fisher Scientific. Las absorbancias se leyeron utilizando el filtro de 450 nm. Se dejaron 6 pocillos para los controles, 3 para control positivo y 3 para control negativo. Para control positivo se prepararon: 10 mg de beta-naftil acetato que se disolvieron en 2

mL de acetona y se añadieron 18 mL de búfer fosfato. Para el control negativo se empleó solamente búfer fosfato.

Análisis de los resultados

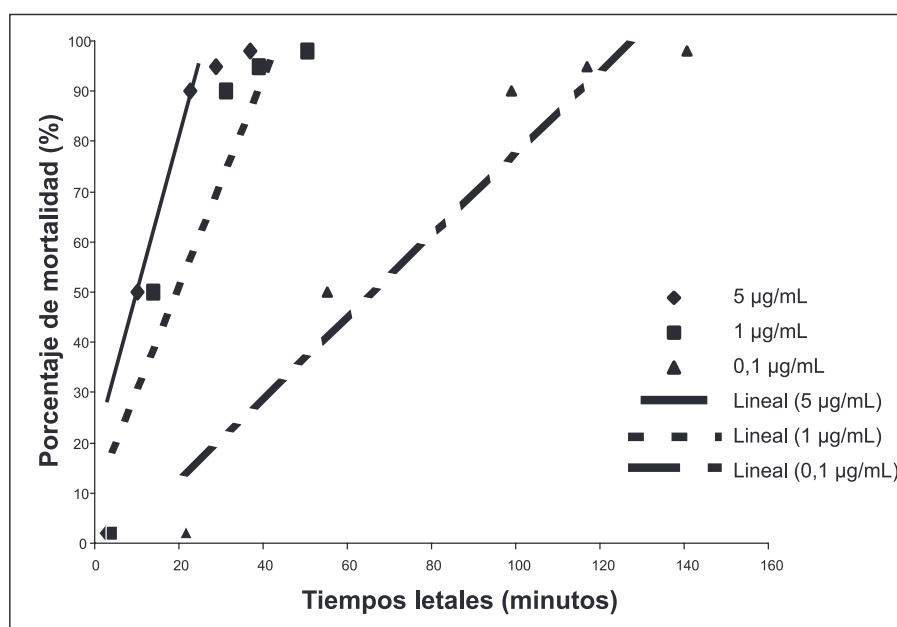
El análisis de los resultados obtenidos en los bioensayos con insecticidas, se realizó por el modelo estadístico de regresión y correlación lineal o simple, empleando el programa Probit (Raymond, 1985). Dicho análisis arrojó el porcentaje de mortalidad (2-98%) y los tiempos letales (minutos) para cada concentración de insecticida y/o sinérgico. Estos datos fueron graficados en el programa Excel. Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas de las esterasas elevadas, fueron analizados en función de los valores de absorbancias según el siguiente criterio: de 0 a 1,4 se consideraron homocigotos susceptibles (SS), de 1,4 a 2,0 heterocigotos resistentes (SR) y superiores a 2, homocigotos resistentes (RR). Para la determinación de la frecuencia génica se tomó en cuenta el número de individuos susceptibles, asumiendo que la población está en equilibrio genético (Peiris & Hemingway, 1990). Se determinó la frecuencia de genes resistentes según la fórmula de Hardy-Weinberg (Solomón *et al.*, 1996).

RESULTADOS

En la Tabla I, se presentan los resultados obtenidos para los insecticidas organosintéticos lambdacialotrina y pirimifosmetil, encontrándose que para las concentraciones 5 y 1 $\mu\text{g/mL}$ de lambdacialotrina se obtuvieron valores de TL_{98} inferiores al umbral de resistencia, mientras que se detectó resistencia con la concentración 0,1 $\mu\text{g/mL}$, ya que el valor de TL_{98} fue de 140,74 minutos. También, los resultados obtenidos con el insecticida pirimifosmetil evidencian que la cepa estudiada es resistente a este insecticida ya que los valores de TL_{98} fueron de 69,5 y 93,0 minutos, a las concentraciones de 1 y 0,1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; mientras que se obtuvo un valor de TL_{98} inferior al umbral de resistencia a la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$. Las tendencias de los datos tiempo-mortalidad construidas sobre la base de la determinación de los tiempos letales discriminativos para la población evaluada con ambos insecticidas, se presentan en las Fig. 1 y 2. A fin de confirmar la resistencia detectada en los bioensayos, se realizaron pruebas para la determinación del mecanismo de resistencia “IN VIVO”, evaluándose una muestra

Tabla I. Tiempos letales para insecticidas organosintéticos ($\mu\text{g/mL}$) en adultos de *Anopheles aquasalis* de Puerta Negra, estado Aragua; determinados a través de bioensayos con el método de botellas CDC, Atlanta, USA.

Insecticidas	Dosis $\mu\text{g/mL}$	N	TL ₅₀ (min)	IC	TL ₉₈ (min)	IC
Lambdacialotrina	5	111	10.2	8.6-11.8	37.1	7.4-64.1
	1	108	14.0	11.6-15.9	50.5	37.9-87.9
	0,1	117	55.3	51.1-59.3	140.7	123.2-169.3
Pirimifosmetil	5	69	24.1	22.1-26.0	44.9	39.5-54.8
	1	90	25.0	22.5-27.5	69.5	59.5-86.3
	0,1	84	33.2	29.9-36.7	93.0	74.8-131.7

Dosis= $\mu\text{g/mL}$; N=número de insectos evaluados; TL= Tiempo letal en minutos; IC= Intervalo de confianza a 95% (minutos).**Fig. 1. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad, en adultos de *Anopheles aquasalis* expuestos a botellas tratadas con tres concentraciones de Lambdacialotrina.**

de mosquitos colectados del campo, con una mezcla del insecticida lambdacialotrina con el sinergista PB, así como también una mezcla del insecticida pirimifosmetil con el sinergista DEF, pudiéndose notar que los valores de TL₅₀ y TL₉₈ disminuyeron, en relación con el efecto tóxico observado con el insecticida solo (Tabla II y III). Fueron determinados los factores de sinergismo (FS) (Vassena *et al.*, 2000), obteniéndose valores superiores a 1 (FS= 3,1 y 1,9 respectivamente).

El efecto sinérgico se puede apreciar mejor en las Fig. 3 y 4, donde las líneas que representan a los insecticidas solos, están a la derecha y las

que representan mezclas de los insecticidas con los sinergistas, se observan desplazados a la izquierda. Se determinó que está operando la multifunción oxidasa (MFO) como mecanismo de detoxificación para el insecticida lambdacialotrina.

DISCUSIÓN

Por medio de bioensayos en botellas tratadas con insecticidas, en las que fueron expuestos adultos de *An. aquasalis* de la localidad Puerta Negra, Aragua, se demostraron niveles significativos de resistencia al piretroide lambdacialotrina y al organofosforado

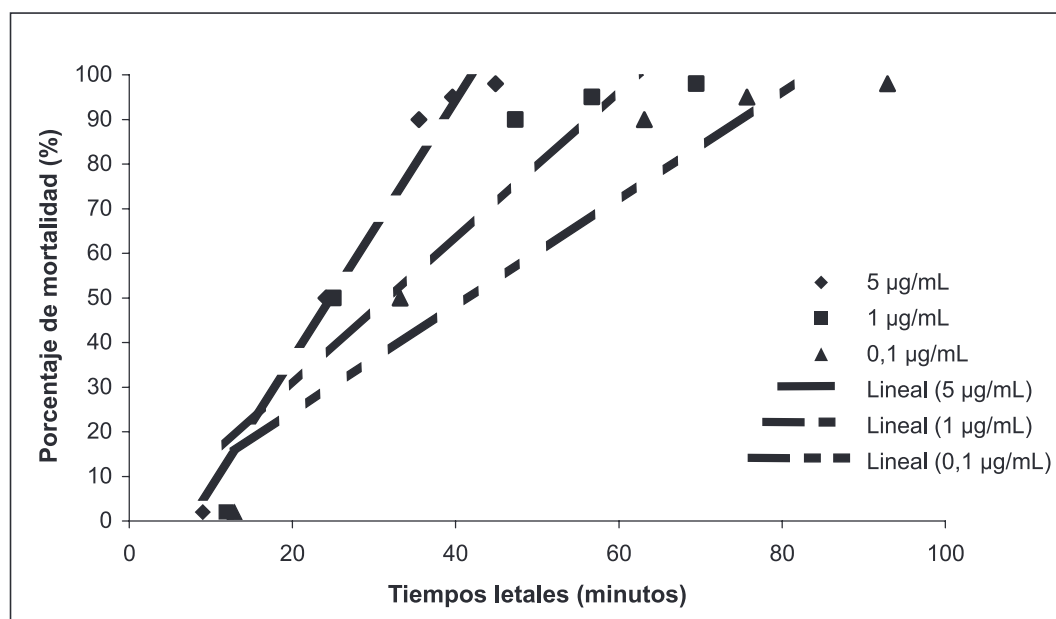


Fig. 2. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad, en adultos de *Anopheles aquasalis* expuestos a botellas tratadas con tres concentraciones de Pirimifosmetil.

pirimifosmetil, usados en la localidad experimental para el control de plagas agrícolas. En relación con la resistencia encontrada a lambdacialotrina, los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los señalados por Molina *et al.* (1997), en los que se reportó resistencia de *An. aquasalis* de la localidad de Caño Rico del estado Aragua (cercana a la localidad experimental, Puerta Negra) a algunos insecticidas piretroides, entre los que se menciona lambdacialotrina. No obstante, en mosquitos de la misma especie de Río de Agua y Putucual del estado Sucre, se reportó susceptibilidad a este insecticida. Esto pudiera explicarse porque las poblaciones de *An. aquasalis* de Aragua comparten ecosistemas agrícolas y la lambdacialotrina es un insecticida muy utilizado en agricultura por lo que se infiere que la especie

recibe presión en forma indirecta ya que la misma es dirigida a plagas agrícolas. La resistencia detectada, en la presente investigación para el organofosforado pirimifosmetil, muestra que la población de *An. aquasalis* se ha seleccionado para este insecticida, ya que los resultados de Molina *et al.* (1997), reportaron como susceptible a *An. aquasalis* de Aragua y de Sucre a insecticidas organofosforados, entre los que se incluye el pirimifosmetil, sin embargo, este insecticida fue el que presentó el mayor valor de Tiempo letal 50 (50,61 minutos) en relación con los insecticidas malation, fenitrothion y fention, cuyos valores de TL₅₀ oscilaron entre 6,7 y 10,2 minutos; lo cual evidencia que ya se estaba desarrollando resistencia incipiente a este insecticida. La resistencia de *An. aquasalis* de Puerta Negra, a pirimifosmetil podría

Tabla II. Respuesta de adultos de *Anopheles aquasalis* de Puerta Negra estado Aragua, al insecticida Lambdacialotrina solo, y mezclado con el sinergista PB, aplicando el método de botellas del CDC, Atlanta, USA.

Insecticidas	Dosis µg/mL	N	TL ₅₀ (min)	IC	TL ₉₈ (min)	IC
Lambdacialotrina	0,1	117	55.3	51.1-59.3	140.7	123.2-169.3
Lambdacialotrina + PB	0,1 + 1	87	18.0	16.2-20.2	41.3	32.7-65.0
Factor de sinergismo (FS)	3.1					

Dosis=µg/mL; N=número de insectos evaluados; TL= Tiempo letal en minutos; IC= Intervalo de confianza a 95% (minutos); FS= TL₅₀ Insecticida/ TL₅₀ Insecticida+PB.

Tabla III. Respuesta de adultos de *Anopheles aquasalis* de Puerta Negra estado Aragua, al insecticida Pirimifosmetil solo, y mezclado con el sinergista DEF, aplicando el método de botellas del CDC, Atlanta, USA.

Insecticidas	Dosis	N	TL ₅₀	IC 4	TL ₉₈ 5	IC
Pirimifosmetil	0,1	84	33.2	29.9-36.7	93.0	74.8-131.7
Pirimifosmetil + DEF	0,1 + 5	117	17.8	16.3-19.5	36.6	30.6-49.2
Factor de sinergismo* (FS)	1.9					

Dosis= µg/mL, N= Número de insectos evaluados, TL₅₀= Tiempo letal 50 (minutos), IC= Intervalo de confianza a 95% (minutos), TL₉₈= Tiempo letal 98 (minutos), *FS= TL₅₀ Insecticida/ TL₅₀ Insecticida+DEF.

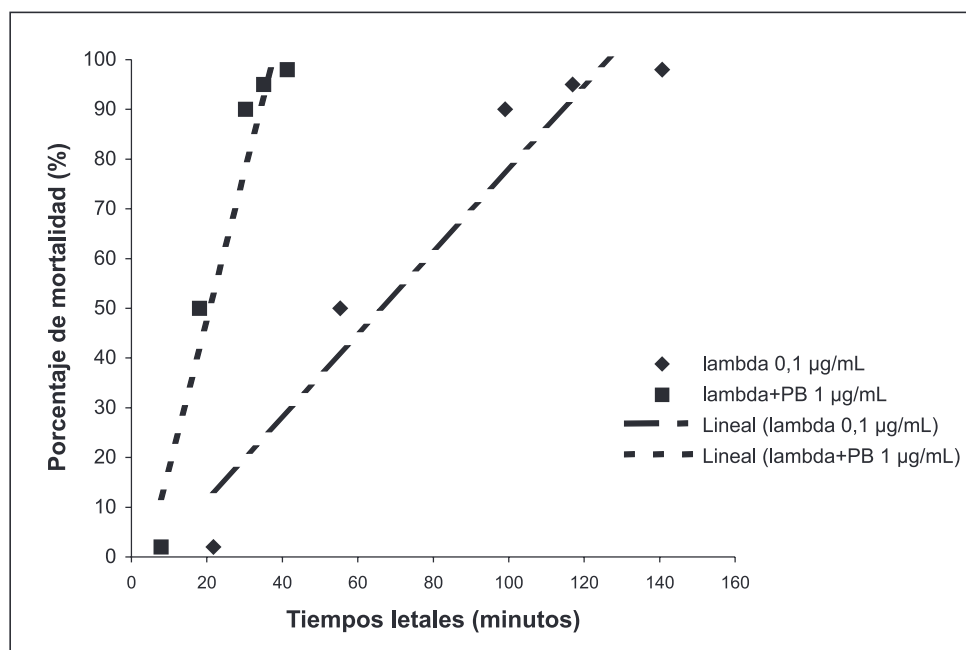


Fig. 3. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad, en adultos de *Anopheles aquasalis* expuestos a botellas tratadas con el insecticida Lambdacialotrina y con mezcla Lambdacialotrina + PB 1.

también obedecer a la exposición de estos insectos a la acción de insecticidas utilizados en labores agrícolas, por cuanto la zona es de fuerte explotación agropecuaria y ese insecticida no ha sido nunca usado por organismos de salud para el control de la especie. Los resultados obtenidos concuerdan con reportes de Georghiou (1982), quien señala que la resistencia múltiple a insecticidas organoclorados, organofosforados y carbamatos en *Anopheles albimanus* de la zona costera del Pacífico de Centro América, se debe a la implicación de los insecticidas utilizados en el control de las plagas agrícolas demostrada por evidencias como la aparición de resistencia en los mosquitos antes de la aplicación de compuestos químicos para el control de los insectos vectores.

También estudios realizados sobre la distribución de la resistencia a los organofosforados y carbamatos en zonas rurales de Guatemala con *An. albimanus*, señalaron que la resistencia a estos insecticidas se había presentado por el uso intensivo de insecticidas agrícolas (Brogdon *et al.*, 1989).

En relación con los mecanismos de resistencia identificados, la resistencia a lambdacialotrina en *An. aquasalis* de Puerta Negra fue fuertemente reducida por la acción sinergista del butóxido de piperonilo, sugiriendo que las enzimas de multi función oxidasas (MFO) están involucradas en la resistencia a piretroides. (Wilkinson, 1983; Oppernorth, 1985; Ffrench-Constant *et al.*, 1998).

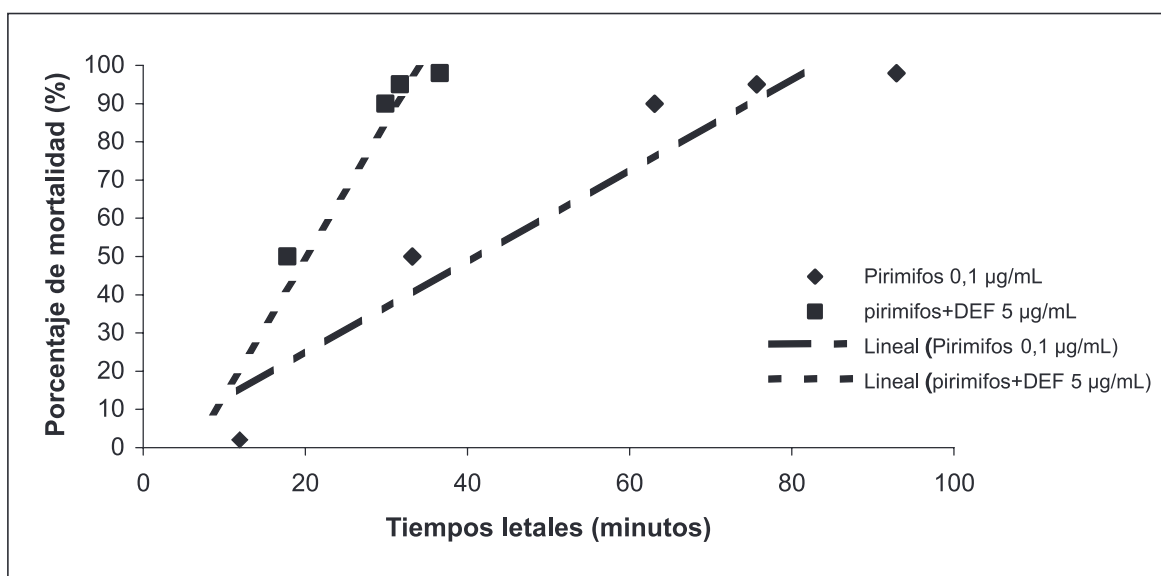


Fig. 4. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad, en adultos de *Anopheles aquasalis* expuestos a botellas tratadas con el insecticida Pirimifosmetil y con la mezcla Pirimifosmetil 0.1 µg/mL + DEF 5 ug/mL.

También fue identificado el mecanismo de esterasas elevadas IN VIVO e IN VITRO en insectos resistentes al Pirimifosmetil, encontrándose concordancia con lo reportado por Brogdon *et al.* (1989), con *An. albimanus* de Guatemala, sobre la resistencia a los organofosforados y carbamatos, identificaron el mecanismo de resistencia de esterasas elevadas, operando en las poblaciones.

No obstante, Ocampo *et al.* (2000) trabajando con poblaciones larvales de *An. pseudopuntipennis* de áreas agrícolas del Valle del Río Cauca de Colombia, encontraron que aunque los mosquitos resultaron susceptibles a los insecticidas malation, permetrina y propoxur, las pruebas bioquímicas revelaron un incremento en el nivel de enzimas en algunos individuos que previamente estuvieron expuestos a insecticidas agrícolas, por lo que la presencia de individuos menos susceptibles valida la hipótesis de que esas áreas han tenido una historia de uso fuerte de insecticidas y no excluye la presencia de poblaciones menos susceptibles en el pasado. Esto es también posible que previo a la exposición a DDT, aplicado por agencias públicas tuvo un efecto selectivo, produciendo un aumento en MFO, el cual puede afectar también la susceptibilidad a insecticidas piretroides. También Quiñonez *et al.* (2003) señalan los altos niveles de alfa y beta esterasas encontrados en poblaciones de *Anopheles darlingi*

de Antioquia, Colombia, los cuales no se asocian con la susceptibilidad observada en los bioensayos con insecticidas. En el presente trabajo, hubo correspondencia entre la resistencia encontrada en los bioensayos y el hallazgo de esterasas elevadas y MFO como los mecanismos de resistencia identificados.

La importancia de la información obtenida radica en que se establecieron dosis referenciales, para lambdacialotrina y pirimifosmetil, lo cual facilita monitorear la resistencia a insecticidas en *An. aquasalis* a escala focal. Además se están implementando metodologías estandarizadas a través de ensayos bioquímicos, que permiten establecer líneas base no existentes en esta especie para esta localidad y a su vez se ha revelado la presencia de mecanismos de resistencia.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Centro de Investigaciones de Enfermedades Endémicas y Saneamiento Ambiental y Personal del laboratorio entomológico de malaria del IAESP-Ministerio de Salud. La investigación recibió apoyo del proyecto FONACIT N° 2000001898 y el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad de Carabobo, recibió apoyo logístico del Instituto de Altos Estudios en

Salud Pública "Dr. Arnoldo Gabaldón" (IAESP- Ministerio de Salud).

Mechanisms of resistance to organosynthetic insecticides in a population of *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) from Aragua State

SUMMARY

Anopheles aquasalis from Aragua State is found in zones of developed agriculture and fishing near Valencia Lake and receives indirect pressure from the insecticides which are directed against agricultural pests. The level of resistance to the insecticides lambda cyhalothrin and pirimiphosmethyl was determined. Bioassays were carried out using the bottle method in which mosquitoes are exposed to glass bottles treated with insecticides, estimating as a threshold of resistance the survival of mosquitoes after 60-min exposure to a specific dose of the products evaluated. Mosquitoes turned out to be resistant to the pyrethroid lambda cyhalothrin at 0.1 µg/mL with TL₉₈ at 140.7 min and to the organophosphate primiphosmethyl 0.1 µg mL with TL₉₈ at 93.0 min. Resistance mechanisms were detected IN VIVO using the synergists piperonyl butoxide (PBO) and S, S, S, Trisbutylphosphotristioate and in IN VITRO using the substrate betanaphthylacetate. Multifunctional oxidases (MFO) and esterases are suggested as cause of resistance in these groups of insects. The values of the slope were between 3.7 and 7.6 which means that the population response was stable and homogenous. The results obtained contribute to a better knowledge of the insecticide resistance of this medically important species.

Key words: pyrethroids, organophosphates, synergists, oxidases, esterases.

REFERENCIAS

Brogdon W., Beach R., Stewart J. & Castanaza L. (1989). Análisis por ensayo de microplaca de la distribución de la resistencia de *Anopheles albimanus* a organofosforados y carbamatos en Guatemala. *PAHO Bull.* **106**: 139-152.

Brogdon W. & Mc Allister J. (1998a). Insecticide resistance and vector control. *Synopses.* **4**: 605-613.

Brogdon W. & Mc Allister J. (1998b). Simplification of adult mosquito bioassays through use of time mortality determinations in glass bottles. *JAMCA* **14**: 159-154.

Conn J., Cockburn F. & Mitchell E. (1993). Population differentiation of the malaria vector *An. aquasalis* using mitochondrial DNA. *J. Hered.* **84**: 248-253.

Cortéz G. Lilia. (1999). *Evaluación de la resistencia a insecticidas y sus mecanismos en Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis Curry, 1932 (Diptera: Culicidae) del Municipio Bolívar del estado Monagas, Venezuela.* Tesis para optar a Licenciatura en Biología. Escuela de Ciencias, Departamento de Biología. Universidad de Oriente.

Ffrench-Constant R. H., Pittendricgh B., Vaughan A. & Anthony N. (1998). Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes?. *Phil. Trans. Roy. Soc. London.* **(B) 353**: 1685-1693.

Georghiou G. P. (1982). In: *Resistance to insecticides used in public health and agriculture.* Proc. Int. Workshop. 22-28 February. Colombo. Sri Lanka: Nat. Sci. Council. Sri Lanka.

Georghiou G. P. (1986). In: *Pest Resistance: Strategies and tactics for management.* National Academy Press. Washington, D.C. 14-43.

Georghiou G. P. & Pasteur N. (1978). Electrophoretic esterase patterns in insecticide-resistant and susceptible mosquitoes. *J. Econ. Ent.* **71**: 201-205.

Grillet M. E., Montañez H. & Berti J. (1998). Estudio biosistemático y ecológico de *An. aquasalis* y sus implicaciones para el control de la malaria en el Estado Sucre: II-Ecología de sus criaderos. *Bol. Dir. Mal. y San. Amb.* **38**: 38-46.

IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) (2005). *Insecticide resistance management.* En: <http://www.irac-online.org> (Consulta: Noviembre 17, 2005).

- Molina de Fernández D. (2000). *Ecología y Comportamiento de Anopheles albimanus de Aragua frente a insecticidas químicos*. Tesis doctoral Postgrado en Entomología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.
- Molina de Fernández D., Saume F., Bisset J., Hidalgo O., Anaya W., González J., Salas O. & Barazarte H. (1997). Establecimiento de la línea de susceptibilidad de la fase adulta de *Anopheles* Spp. a insecticidas químicos. *Bol. Dir. Mal. y San. Amb.* **37**: 55-69.
- Moncada A. & Conn J. (1992). Apolytene chromosome study of four populations of *Anopheles aquasalis* from Venezuela. *Genome*. **35**: 327-331
- 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. *JAMCA*. **16**: 331-338.
- Oppenoorth F. J. (1985). *Biochemistry and genetics of insecticide resistance, comprehensive insect physiology, Biochemistry and pharmacology* 12, Ed by Kerkut GA and Gilbert LI, Pergamon press, Oxford, pp 731-774.
- Peiris H. & Hemingway J. (1990). Mechanisms of insecticide resistance in a temephos-selected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) strain from Sri Lanka. *Bull. Ent. Res.* **80**: 453- 457.
- Quiñones M., Rojas W., Amud M., Calle D., Ruíz F. & Rúa G. (2003). Evaluación de la susceptibilidad de *Anopheles darlingi* a Lambda cihalotrina (ICON) en una zona de alta transmisión malárica en el Departamento de Antioquia (Colombia). *Rev. Lat. San. Amb. ICOSAN*. **2**: 6- 11.
- Raymond M. (1985). Présentation d'un programme d'analyse log-probit pour microordinateur. *Série Entomol Médical Parasitol*. **23**: 117- 121.
- Saume, F. (1992). *Introducción a la química y toxicología de insecticidas*. Aragua, Venezuela, Industria Gráfica Integral. 184-206.
- Santamaría E., Munstermann L. & Ferro C. (2003). Aproximación al método CDC para determinar susceptibilidad a insecticidas en vectores de leishmaniasis. *Biomédica*. **23**: 115-121.
- Solomon E., Berg L., Martín D. & Villee C. (1996) *Biología de Villee*. Tercera edición en español. Edit. Interamericana Mc Graw-Hill. Mexico.
- Suárez M., Quiñonez M., Palacios J. & Carrillo A. (1990). First record of DDT resistance in *Anopheles darlingi*. *JAMCA*. **6**: 72-74.
- Vassena C., Picollo M. & Zerba E. (2000). Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med. Vet. Entomol*. **14**: 51- 55.
- WHO (1992). *Vectors resistance to pesticides*. Fifteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Technical reports series. **818**: 17-24.
- Wilkinson, C. F. (1983). Role of mixed function oxidases in insecticide resistance *Pest Resistance to pesticides* (Ed. by G. Georgiou & T. Saito).

Recibido 29/10/2005
Aprobado 24/03/2006