

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE SUB-
POBLACIONES SILVESTRES DE *Aedes aegypti* (L) DE
VENEZUELA SOMETIDAS A PRESIÓN CON
INSECTICIDAS DE USO COMÚN**

Por

LESLIE COROMOTO ALVAREZ GONZALEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

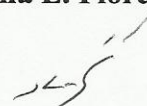
Diciembre, 2012

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE
SUB-POBLACIONES SILVESTRES DE *Aedes aegypti*(L)
DE VENEZUELA SOMETIDAS A PRESIÓN CON
INSECTICIDAS DE USO COMÚN**

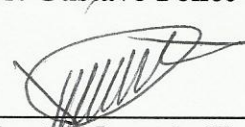
Comité de Tesis



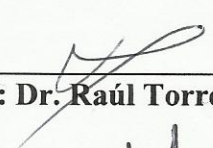
Directora: Dra. Adriana E. Flores Suárez



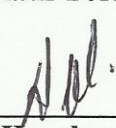
Secretario: Dr. Gustavo Ponce García



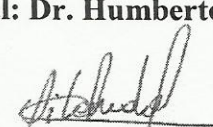
Vocal: Dr. Roberto Mercado Hernández



Vocal: Dr. Raúl Torres Zapata



Vocal: Dr. Humberto Quiroz



Director Externo: Dra. Milagros J. Oviedo. A.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por siempre hacer su voluntad en mí y permitirme alcanzar una de mis metas.

A mi familia por estar siempre a mi lado brindándome su apoyo incondicional, lejos o cerca siempre a mi lado.

A la Universidad de los Andes, Venezuela por haberme brindado su apoyo económico y permitirme realizar los estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Ciencia Básica, proyecto 102120 por el financiamiento económico brindado para la realización de este trabajo de tesis.

Al Consejo nacional de Ciencia y Tecnología México por su apoyo con la beca 351734.

Al proyecto Misión Ciencia- Subproyecto Dengue por el financiamiento para la colecta del material biológico.

A la Dra. Adriana Flores, mis sinceros agradecimientos su apoyo fue fundamental tanto en lo institucional como en lo personal.

A todos los Maestros de aquí y Profesores de allá por sus oportunos consejos y valiosa amistad.

A mis amigos venezolanos, mexicanos y todas aquellas personas que de una u otra manera me acompañaron en momentos felices y no tan felices ocupan un lugar invaluable en mi corazón.

DEDICATORIA

A mi hijo Juan José regalo divino que Dios me dio, lejos de ser un obstáculo eres y siempre serás la fuente de inspiración y el motor de mi vida....Te amo bebe.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	8
2. Avance progresivo del dengue en América Latina.....	11
3. Situación epidemiológica del dengue en Venezuela.....	13
4. Estructura química del temefos.....	15
5. Estructura química del malatión.....	17
6. Estructura química de la deltametrina.....	20
7 Estructura del canal de sodio dependiente de voltaje.....	35
8. Occidente de Venezuela. Área de Estudio.....	42
9. Colecta de estadios inmaduros de <i>Ae. aegypti</i>	43
10. Establecimiento de colonias de <i>Ae. aegypti</i>	45
11. Bioensayos con larvas de <i>Ae. aegypti</i>	47
12. Preparación de botellas para bioensayos.....	49
13. Bioensayos de botella con adultos de <i>Ae. aegypti</i>	50
14. Disección de mosquitos.....	52
15. Esquema de determinación de enzimas detoxificativas.....	54
16. Extracción, purificación y cuantificación de ADN.....	57
17. Amplificación de los alelos específicos para la mutación <i>Ile1,016</i>	58
18. Fragmentación de los productos amplificados por PCR.....	59
19. Niveles enzimáticos en larvas de <i>Ae. aegypti</i> luego de ser expuestos al temefos.....	66
20. Niveles enzimáticos en <i>Aedes aegypti</i> de Venezuela luego de ser expuestos al malatión durante los años 2008 y 2010.....	73
21. Clasificación de los mecanismos enzimáticos basada en el porcentaje de especímenes supervivientes que exceden el Umbral de Resistencia.....	73
22. Tiempo Knockdown cincuenta (TK ₅₀) en <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela con deltametrina durante los años 2008 y 2010.....	78

23. Tiempo Letal cincuenta (TL ₅₀) en <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela con deltametrina durante los años 2008 y 2010.....	80
24. Niveles enzimáticos en <i>Aedes aegypti</i> de Venezuela luego de ser expuestos a la CL ₅₀ -deltametrina durante los años 2008 y 2010.....	82
25. Clasificación de los mecanismos enzimáticos basada en el porcentaje de especímenes supervivientes que exceden el Umbral de Resistencia.....	83
26. Niveles enzimáticos en <i>Aedes aegypti</i> de Venezuela luego de ser expuestos a la DK ₅₀ -deltametrina durante los años 2008 y 2010.....	86
27. Geles de agarosa al 3% mostrando los genotipos de la mutación <i>Ile1,016</i> en <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela.....	88

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Insecticidas evaluados.....	37
2. Concentración Letal cincuenta y Factor de Resistencia en cuatro sub-poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela con el larvicida temefos.....	64
3. Tiempos Letales cincuenta en <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela con el larvicida temefos.....	65
4. Promedio y Desviación standard de las absorbancias para cada enzima en larvas de <i>Ae. aegypti</i> expuestas a la CL ₅₀ .temefos.....	67
5. Porcentaje de especímenes de las sub-poblaciones de campo que rebasan el umbral de resistencia determinado en la cepa New Orleans.....	67
6. Regresión Lineal y R ² entre los valores de CL ₅₀ .temefos y los niveles promedios de enzimas (promedio de absorbancia) en hembras de <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela 2008 y 2010.....	68
7. Valores de CL ₅₀ y FR en <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela con malatión durante los años 2008 y 2010.....	69
8. Valores de TL ₅₀ en <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela con malatión durante los años 2008 y 2010.....	71
9. Promedio y Desviación standard de las absorbancias para cada enzima en <i>Ae. aegypti</i> expuestas al malatión durante los años 2008 y 2010.....	72
10. Dosis Knockdown cincuenta y Factores de Resistencia al derribo en <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela con deltametrina en los años 2008 y 2010.....	74
11. Concentración Letal cincuenta y Factor de Resistencia en <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela con deltametrina durante los años 2008 y 2010.....	76
12. Valores de TK ₅₀ obtenidos en <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela a la dosis más cercana a los valores de DK ₅₀ con deltametrina.....	77
13. Valores de TL ₅₀ obtenidos en <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela a la dosis más cercana a los valores de CL ₅₀ con deltametrina.....	79
14. Promedio y Desviación standard de las absorbancias para cada enzima en <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela expuestas a la CL ₅₀ con deltametrina.....	81

15. Regresión Lineal y R^2 entre los valores de CL_{50} y los niveles de enzimas (promedio de absorbancia) en hembras de <i>Ae. aegypti</i> supervivientes luego de ser expuestas a la deltametrina.....	83
16. Promedio y Desviación standard de las absorbancias para cada enzima en <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela expuestas a la DK_{50} con deltametrina.....	85
17. Regresión Lineal y R^2 entre los valores de DK_{50} -deltametrina y los niveles de enzimas (promedio de absorbancia) en hembras de <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela.....	89
18. Genotipos y frecuencia del alelo <i>Ile1,016</i> en <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela.....	90
19. Frecuencia del alelo <i>Ile1,016</i> , intervalos de confianza 95% y coeficientes de endogamia en sub-poblaciones naturales de <i>Ae. aegypti</i> de Venezuela.....	91

RESUMEN

Se analizó la resistencia a los insecticidas temefos, malatión y deltametrina en 4 sub-poblaciones de *Aedes aegypti* de Venezuela durante los años 2008 y 2010 siguiendo el protocolo de la OMS (1981) y la metodología de botellas impregnadas Brogdon y McAllister (1998), así como los mecanismos de resistencia enzimáticos y mutación *kdr*. Las sub-poblaciones Pampanito (PTO), Tres Esquinas (TE), Lara y Ureña evaluadas en este estudio mostraron baja resistencia al temefos ($FR_{CL50} < 5$) en ambos periodos de investigación con niveles sobre-expresados de β -esterasas en la sub-población Lara 2008 y TE para el 2010, así como MFO para PTO 2008, los cuales no fueron asociados con la baja resistencia encontrada debido a que no cumplieron los tres criterios propuestos en este estudio para asociar las enzimas detoxificativas con la resistencia. Todas las sub-poblaciones mostraron baja resistencia al organofosforado malatión en el 2008 y 2010 con valores de $FR_{CL50} < 5$ y sobre-expresión de alfa-esterasas cuyo papel en el metabolismo del organofosforado no se pudo dilucidar en el presente estudio. Con respecto a la deltametrina se observó baja resistencia al derribo en la sub-población PTO con un FR_{DK50} de 4.9 y moderada resistencia en las sub-poblaciones TE, Lara y Ureña con valores de FR_{DK50} entre 5 y 10 para el 2008. Para el 2010 los valores de DK_{50} aumentaron significativamente en todas las sub-poblaciones, pero solo la sub-población Ureña mostró alta resistencia al derribo, asociando dicha resistencia con la presencia de la mutación *Ile1,016* en el canal de sodio cuyas frecuencias oscilaron entre 0.01 y 0.37. Resistencia moderada post-recuperación a la deltametrina durante el año 2008 fue observada en la mayoría de las sub-poblaciones, la cual evolucionó para el 2010 registrándose valores de FR_{CL50} de 9.3 en PTO y en el resto de las sub-poblaciones valores >10 , correspondiendo a una alta resistencia post-recuperación al piretroide la cual no se asoció a los niveles sobre-expresados de GST y MFO. Los resultados obtenidos evidencian que la resistencia es dinámica en el tiempo y el espacio, por lo que deben realizarse evaluaciones periódicas que incluyan bioensayos de susceptibilidad y determinación de mecanismos asociados a la resistencia a insecticidas para obtener una información completa acerca de la susceptibilidad de la población blanco al químico que se desee aplicar, elaborar estrategias para el manejo de la resistencia e identificar el momento oportuno para rotar los insecticidas con el objetivo de conservar la susceptibilidad de dicha sub-población.

ABSTRACT

We analyzed the resistance to insecticides temephos, malathion and deltamethrin in 4 sub-populations of *Aedes aegypti* in Venezuela during 2008 and 2010 following the WHO protocol (1981) and the methodology Brogdon and McAllister (1998) impregnated bottles, well as enzymatic resistance mechanisms and *kdr* mutation. Sub-populations Pampanito (PTO), Tres Esquinas (TE), Lara and Ureña were evaluated in this study showed low resistance to temephos ($FR_{CL50} < 5$) in both periods of research with over-expressed levels of β -esterases in the sub-population Lara and TE for 2008 and 2010 and MFO in PTO 2008, which were not associated with low resistance encountered because they did not meet the three criteria proposed in this study to enzymes associated with resistance. All sub-populations showed low resistance to malathion in 2008 and 2010 with FR_{CL50} values < 5 and over-expression of alpha-esterases whose role in the metabolism of organophosphorus could not figure out in this study. Low knockdown resistance to deltamethrin was observed in the sub-population PTO (FR_{DK50} 4.9) and moderate resistance in the subpopulations TE, Lara and Ureña with values FR_{DK50} between 5 and 10 for 2008. The values DK_{50} for 2010 were significantly increased in all sub-populations, but only Ureña sub-population showed high knockdown resistance, associating this resistance with the presence of the mutation *Ile1, 016* in the sodium channel whose frequencies ranged 0.01 and 0.37. Post-recovery moderate resistance to deltamethrin in 2008 was observed in most of the sub-populations, which evolved in 2010 recorded 9.3 FR_{CL50} values in PTO and the rest of the sub-populations values > 10 , corresponding to a high resistance to pyrethroid post-recovery which was not associated with over-expressed levels of GST and MFO. The results show that the resistance is dynamic in time and space, so it should be periodic evaluations of bioassays including determining susceptibility and resistance mechanisms associated with insecticide to get complete information about the susceptibility of the population white to implement desired chemical, develop strategies for resistance management and identify the right time to rotate insecticides in order to preserve the susceptibility of this sub-population.

1. INTRODUCCION

El control del *Aedes aegypti* (L.) principal vector de dengue clásico y hemorrágico en Venezuela y otros países del mundo, ha sido la única opción para la prevención y disminución de la transmisión de la enfermedad. La reducción de criaderos y los programas de saneamiento ambiental con la participación de la comunidad, son estrategias que se han venido implementado en los últimos años, las cuales por si solas no son suficientes, por lo que el uso de insecticidas químicos dentro y alrededor de los hogares sigue siendo la principal herramienta.

Desde 1970 en Venezuela y otros países de América Latina, han sido utilizados los organofosforados temefos y malatión, aplicados en recipientes de agua doméstica y para el tratamiento residual intradomiciliario o rociado espacial para reducir las densidades de *Ae. aegypti* (Georghiou *et al.*, 1987; Grazt, 1991), siendo exitosos de manera temporal por falta de periodicidad y sustentabilidad, en la mayoría de los casos.

Adicionalmente, el uso masivo y extensivo de insecticidas tanto en salud pública como en la agricultura, ha ejercido presión de selección, generando el desarrollo de resistencia a diferentes insecticidas en *Ae. aegypti* y otros culícidos, (WHO, 1986) lo que constituye el principal problema operacional para los programas de control.

La resistencia a insecticidas puede deberse principalmente al incremento en la actividad metabólica y/o alteraciones en el sitio blanco. Tres familias de enzimas están mayormente involucradas en la resistencia metabólica: las carboxylesterasas, las monoxidasas del citocromo P450 y las glutatión-s-transferasas (GST) cuya amplificación genética es inducida en los organismos por exposición a los insecticidas pudiendo generar resistencia a la mayoría ellos (Hemingway and Ranson, 2000). Por otro lado, mutaciones puntuales en el gen que codifica para el canal del sodio 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), donde el aminoácido resultante ocasiona una reducción en la unión al insecticida sin pérdida de la función primaria del sitio blanco.

En Venezuela los estudios de monitoreo de resistencia a insecticidas han revelado que *Ae. aegypti* ha desarrollado resistencia a diferentes insecticidas. 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 and Georghiou, 1995; Bisset *et al.*, 2001. Adicionalmente, Saavedra *et al.* (2007) reportaron la presencia de la mutación *Ile* 1016 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 el nivel de resistencia a temefos, malatión y deltametrina en 4 sub-poblaciones de *Ae. aegypti* de Venezuela en dos períodos 2008 y 2010 así como la mecanismos enzimáticos y frecuencia de la mutación *kdr*.

2. HIPOTESIS

El uso de insecticidas químicos por más de 40 años en Venezuela, ya sea para el control de enfermedades metaxénicas o bien para el control de plagas agrícolas ha ejercido presión de selección en sub-poblaciones de *Aedes aegypti* induciendo y/o seleccionando resistencia a través de mecanismos enzimáticos y/o moleculares.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la susceptibilidad y mecanismos de resistencia a temefos, malatión y deltametrina en 4 sub-poblaciones de *Aedes aegypti* de Venezuela durante los años 2008 y 2010.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

3.2.1 Determinar la Concentración Letal cincuenta (CL_{50}) y Tiempo Letal cincuenta (TL_{50}) para temefos durante los años 2008 y 2010 en las 4 sub-poblaciones de *Ae. aegypti*.

3.2.2 Determinar la CL_{50} y TL_{50} para malatión en *Ae. aegypti* cepa susceptible New Orleans y en las sub-poblaciones de los estados Trujillo, Lara y Táchira durante los años 2008 y 2010.

3.2.3 Determinar las CL_{50} , Dosis Knockdown₅₀ (DK_{50}), TL_{50} y Tiempo Knockdown₅₀ (TK_{50}) para deltametrina durante los años 2008 y 2010 en las 4 sub-poblaciones de *Ae. aegypti*.

3.2.4 Determinar el nivel de resistencia al temefos (FR_{CL50}) durante 2008 y 2010 en las 4 sub-poblaciones bajo estudio.

3.2.5 Determinar el nivel de resistencia al malatión (FR_{CL50}) durante los años 2008 y 2010 en las 4 sub-poblaciones bajo estudio.

3.2.6 Determinar el nivel de resistencia al derribo (knockdown) FR_{DK50} y post-recuperación FR_{CL50} en las sub-poblaciones evaluadas a la deltametrina durante el 2008 y 2010 por comparación con la cepa susceptible New Orleans.

3.2.7 Caracterizar mecanismos enzimáticos de resistencia asociados a temefos, malatión y deltametrina en las 4 sub-poblaciones de *Ae. aegypti* durante los años 2008 y 2010 y establecer la magnitud de la resistencia por comparación con la cepa susceptible New Orleans.

3.2.8 Determinar la frecuencia de la mutación *Ile1,016* que confiere resistencia a piretroides en las 4 sub-poblaciones de *Ae. aegypti* durante los años 2008 y 2010.

4. ANTECEDENTES

4.1 *Aedes aegypti*: Aspectos biológicos. Importancia como vector y control.

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) es un mosquito perteneciente al orden Díptera, familia Culicidae y subfamilia Culicinae, cuyo origen se ubica biogeográficamente en la Región Etiópica (África), donde se encuentran la mayor cantidad de especies del Subgénero *Stegomyia* (Theobald, 1901) al cual este culícido pertenece. Allí en la actualidad este mosquito es una especie silvestre, habitando libre del contacto con el hombre. Se encuentra entre las latitudes 35°N y 35°S, aproximadamente en la isoterma de verano de 10°C, estando limitada su distribución por la altitud; no encontrándose normalmente por encima de los 1000 m.s.n.m, aunque ha sido reportado en Colombia y en la India a más de 2000 m.s.n.m (WHO,1997).

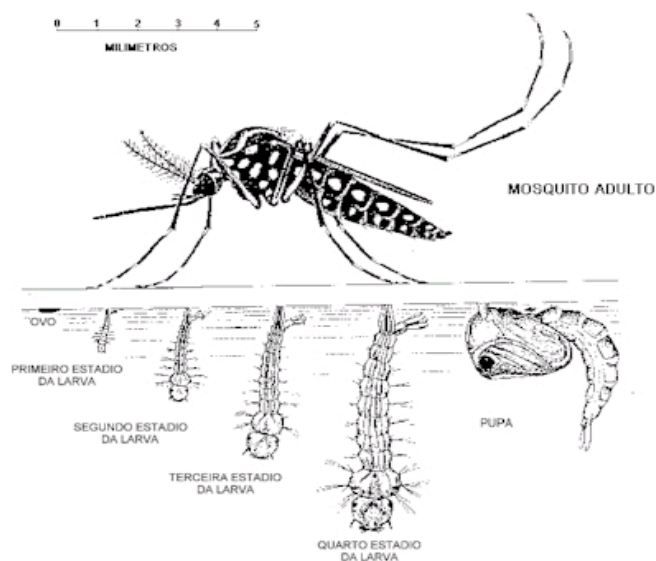
Ae. aegypti es un insecto holometábolo con dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: una fase acuática con tres formas evolutivas diferentes: (huevo, larva y pupa) y la fase aérea o de adulto o imago. Una vez que la hembra ingiere sangre y realiza el proceso de ovogénesis los huevos son depositados individualmente en sustratos húmedos preferentemente recipientes artificiales domiciliarios y peri domiciliarios. Los huevos son de color negro, ovoides y con una longitud no mayor a 1 mm. En condiciones óptimas la eclosión ocurre en un par de días, sin embargo pueden mantener su viabilidad hasta por un año dependiendo de la fuente de reservas y las condiciones ambientales (Gordon, 1988), siendo la etapa de huevo la más resistente del biociclo de *Ae. aegypti*.

La fase larvaria comprenden cuatro grados evolutivos denominados I,II, III y IV los cuales se desarrollan en ambientes acuáticos, donde la principal fuente de alimento consiste en micro biota filtrada por la partes bucales de la larva. Morfológicamente las larvas tiene una cabeza pequeña y redondeada con antenas cortas y poco visibles, el tórax es reducido y más abultado que el abdomen y presentan dos prominentes espinas laterales y una hilera recta de 7 a 12 escamas del peine, en el octavo segmento abdominal. Presentan movimientos ondulantes y permanecen en posición vertical en la superficie del agua. La duración de este periodo larvario va a depender factores como:

temperatura del agua, disponibilidad de alimento y densidad larvaria, variando entre 5 y 14 días. Una vez alcanzada la última fase larval ocurre una segunda metamorfosis para dar origen a la fase de pupa las cuales son pequeñas y presentan en su cefalotórax dos tubos respiratorios cortos y gruesos. Las pupas no se alimentan y generalmente se encuentran respirando en la superficie del agua, para lo cual quedan inmóviles. El tiempo que demoran las pupas en su evolución hasta la salida del adulto es corto, depende fundamentalmente de la temperatura del agua, generalmente es de dos a tres días. La etapa adulta consiste en un insecto volador pequeño de color negro con líneas de escamas plateadas en el mesonotum, formando un diseño similar a una lira, manchas pleurales de escamas blancas plateadas, antenas filiformes con escamas plateadas en el tórax y cerdas pos-espíriculares. Patas oscuras con fémures y tibias revestidas de escamas claras en las superficies posteriores medianas, artículos tarsales con nítida anillación clara en las extremidades basales, más desarrollada y visible en los tarsos posteriores. Abdomen con franjas basales y manchas baso laterales a partir del segundo tergito. En esta fase hay dimorfismo sexual y diferencias en sus hábitos alimenticios; los machos son fitófagos con una proboscis larga adaptada para succionar jugos de plantas y otras fuentes de azúcar mientras que las hembras son de hábitos hematofágicos, poseen una proboscis larga adaptada para succionar sangre a través de la piel (Fig. 1).

Luego de la ingesta sanguínea las hembras con armonía gonadotrófica o desarmonía gonadotrófica, entran en un periodo de reposo y las ovariolas comienzan el proceso de ovogénesis mediado por hormonas, este proceso tiene una duración

Figura 1. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*



entre 3 a 4 días y culmina en la ovoposición de 50 a 120 huevos aproximadamente.

Ae. aegypti por sus hábitos hematofágicos es capaz de ingerir, incubar y transmitir diferentes patógenos luego de una alimentación sanguínea infectada, su implicación como transmisor del virus de la fiebre amarilla data desde 1900 de fiebre amarilla y desde 1903 en la transmisión del virus dengue (Philip and Rozenboom, 1973).

Por lo general, la transmisión del arbovirus requiere de que un mosquito adquiera el virus a partir de una ingesta sanguínea, se replique en el intestino medio, atraviese esta primera barrera para llegar al hemocele donde nuevamente se replica, posteriormente se disperse a otros órganos secundarios incluyendo las glándulas salivales y por medio de las secreciones salivares se transmita durante la subsiguiente picadura (Hardy *et al.*, 1983; Woodring *et al.*, 1996). El éxito de este proceso requiere que el virus supere numerosas barreras morfológicas (ej., las membranas basales) y fisiológicas (ej., factores de modulación de virus) y se disemine dentro del mosquito (Hardy *et al.*, 1983; Hardy, 1988; Woodring *et al.*, 1996; Ader *et al.*, 2004). Ha sido demostrado que *Ae. aegypti* de diferentes orígenes geográficos presentan variaciones con respecto a la susceptibilidad a la infección oral por el virus dengue y, por lo tanto, en la habilidad para transmitir la infección (Bennett *et al.*, 2002; Lourenço *et al.*, 2002; Vazeille *et al.*, 1999). Las poblaciones de *Ae. aegypti* de Venezuela varían en la susceptibilidad a infectarse con el virus DEN-1, Pernalet *et al.*, 2009 demostraron que la población de *Ae. aegypti* procedente del estado Bolívar mostro mayor susceptibilidad a la infección que las procedentes de los estados Trujillo, Falcón y Aragua.

Actualmente *Ae. aegypti* es considerado el principal vector del virus dengue a nivel mundial, debido a su amplia distribución geográfica, su alto grado de susceptibilidad a infectarse con el virus, así como estrecha relación con el hombre. Este mosquito es netamente antropofílico y su hábito de tomar más de una ingesta sanguínea durante su ciclo gonadotrófico incrementa su capacidad vectorial (Platt *et al.*, 1997). La transmisión del dengue ocurre en forma particular durante los meses del año con mayor precipitación pluvial y altas temperaturas, lo que propicia condiciones necesarias para el desarrollo larval en los hábitats donde se almacena agua (Gubler and Trent, 1994).

El aumento en la actividad de epidemias por dengue, el desarrollo de hiperendemicidad y la emergencia de epidemias por dengue hemorrágico, han sido generados por diversos factores, entre ellos, cambios demográficos y sociales, reducción de recursos para prevención y control de enfermedades metaxénicas, así como cambios en las estrategias de salud pública (Gubler, 1998a).

El control del *Ae. aegypti*, ha sido la única opción para la prevención y disminución de la transmisión de la enfermedad. La reducción de criaderos y los programas de saneamiento ambiental con la participación de la comunidad, son estrategias que se han venido implementado en los últimos años, las cuales por si solas no han sido suficientes, por lo que el uso de insecticidas químicos dentro y alrededor de los hogares sigue siendo la principal herramienta.

En las décadas de los 50s y 60s, varias campañas para la erradicación de vectores fueron implementadas a nivel mundial, entre estas, la erradicación de *Ae. aegypti*. Desafortunadamente, todos estos programas han carecido de sustentabilidad, y una vez que el mosquito y la enfermedad fueron controlados, los recursos son desviados a otros programas trayendo como consecuencia que las poblaciones de *Ae. aegypti* re-infestaron e invadieran nuevas regiones.

Actualmente las campañas de control de *Ae. aegypti* consisten en la eliminación de criaderos de estadios larvales y en casos de brotes de dengue, la aplicación espacial del insecticidas organofosforado malatión o piretroides sintéticos en nubes de gotas de ultrabajo-volumen (ULV). Usualmente, la eliminación de pequeños utensilios que tienden a acumular agua en los patios de las casas, así como el tratamiento de contenedores de agua de consumo con el larvicida temefos (Abate®) son realizadas durante las campañas de prevención. Particularmente, en Venezuela, durante los últimos 15 años, los principales insecticidas utilizados para el control el *Ae. aegypti* han sido el larvicida organofosforado temefos (Abate®) en gránulos a razón de 1 ppm y el adulticida deltametrina para control densidades de adultos en nubes de gotas de ULV.

4.2 Situación epidemiológica del dengue en Venezuela

Anualmente un estimado de 100 millones de personas se infecta con Fiebre por

dengue (FD) y, aproximadamente, 500.000 con Fiebre hemorrágica por dengue (FHD) en el mundo entero (Gubler, 1996; Vazeille *et al.*, 1999).

La situación del dengue en América Latina y el Caribe se ha agravado considerablemente durante los últimos 20 años (Fig. 2), incrementando abruptamente la incidencia de la FD y del FHD a partir de 1995, representando un serio problema de salud pública (OPS, 2007). Esta expansión está asociada a la circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus (Gubler, 1997), a la introducción de nuevas variantes genéticas de mayor patogenicidad (Rico-Hesse *et al.*, 1997) y al aumento de la abundancia y extensión geográfica de *Ae. aegypti*, vector principal del dengue (Gubler and Clark, 1995).

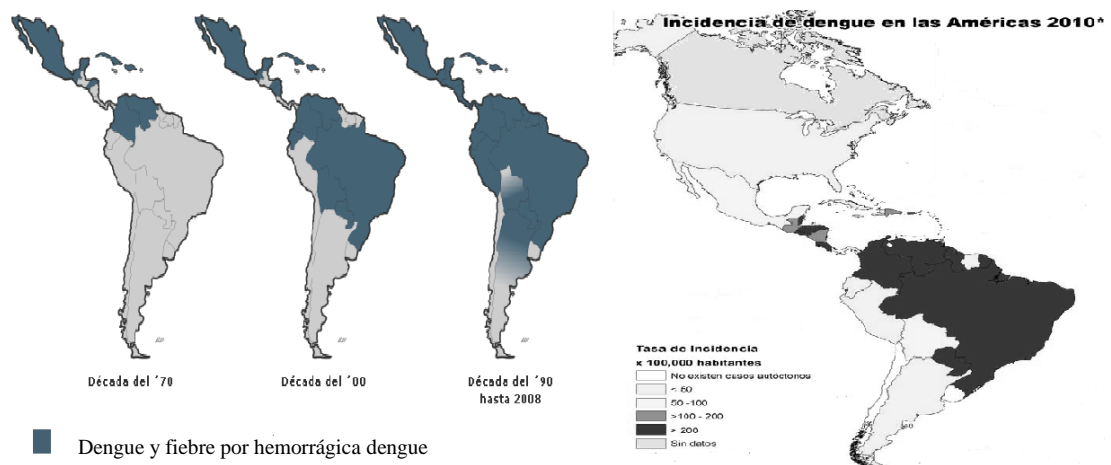


Figura 2. Avance progresivo del dengue en América Latina.

En Venezuela, el dengue es endémico desde hace 60 años, a partir de la epidemia registrada durante 1941-1946 (Pinherio and Corber, 1997). Sin embargo, la reemergencia de la enfermedad y la emergencia de la FHD y el Síndrome de Choque por Dengue (SCD) se registra a partir de 1989 (OPS, 1990) y, lamentablemente, el número de individuos en riesgo de ser infectados se ha incrementado con el crecimiento urbano descontrolado, la circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus y la dispersión del mosquito *Ae. aegypti* a lo largo de nuestra geografía. En este país, el sector salud ha manifestado una seria crisis en los últimos años, debido a limitaciones administrativas y técnicas, que se han traducido en un incremento marcado en la casuística. Por otra parte, el control de *Ae. aegypti* se hace difícil no sólo por la limitación de recursos, sino también por la gran extensión y heterogeneidad en las zonas urbanas y por la deficiencia

en el suministro de servicios públicos como los de recolección de desechos sólidos, suministro de agua potable y atención médica (Barrera *et al.*, 2000). En Venezuela, así como en otras regiones del mundo, el acelerado crecimiento de los centros urbanos sin planificación, la falta de servicios sanitarios adecuados, el intercambio de individuos entre áreas geográficas diferentes que posibilitan el intercambio del virus, la falta de programas de prevención y la crisis administrativa constituyen retos para cualquier iniciativa destinada a controlar el dengue.

Para el año 2008, Venezuela exhibió una tasa de incidencia de 172 por 100.000 habitantes siendo la más elevada, en la sub-región de los países Andinos. Un total de 48.048 casos de dengue fueron reportados en su mayoría procedentes de los estados Aragua, Zulia, Mérida, Lara y Monagas.

El Boletín Epidemiológico del Ministerio del Poder Popular para la Salud para semana epidemiológica 52 registró un total de 64.721 casos de dengue para el 2009 en Venezuela, que representó un 37% de incremento con respecto al 2008 y para la semana epidemiológica 43 del 2010 106.724 casos con 7 estados en epidemia (Zulia, Miranda, Mérida, Táchira Lara, Distrito Capital y Aragua) siendo este el mayor número de casos de dengue reportado en este país.

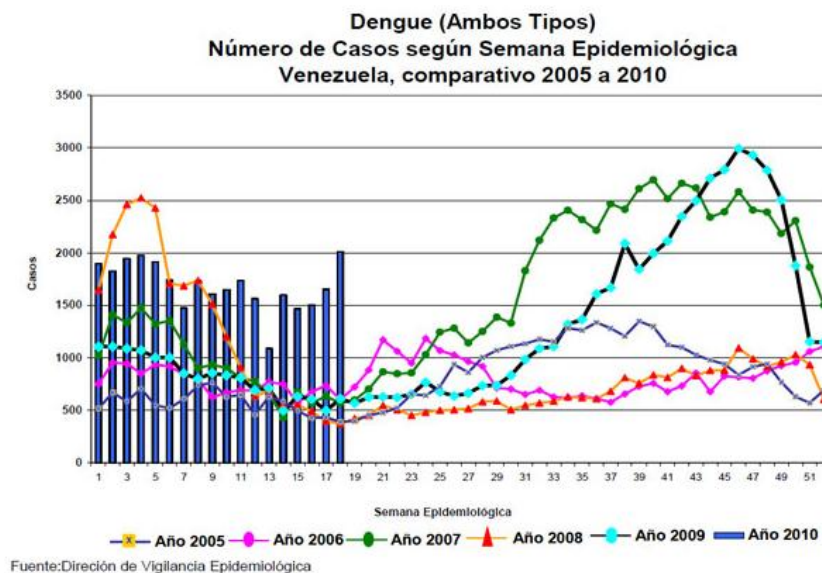


Figura 3. Situación epidemiológica del dengue en Venezuela.

En la Figura 3 podemos observar el número de casos anuales reportados para Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por dengue en Venezuela durante los años

2005-2010 (2005-2009 de la 1 semana epidemiológica hasta la 52 y 2010 desde la semana 1 hasta la semana 18).

4.3 Insecticidas

Los primeros insecticidas consistieron en sustancias inorgánicas, tales como: sulfuro (1000 A.C), arsénico (900 D.C), arsenato de plomo, cloruro de mercurio, ácido bórico y algunos jabones, que usualmente se usaban en grandes cantidades principalmente para el control marginal de plagas.

Posteriormente se utilizó un segundo grupo de insecticidas denominados insecticidas botánicos: la nicotina, rotenona y piretrinas los cuales poseían mayor complejidad, mayor potencial y más selectividad, pero su disponibilidad limitada, alto costo y fotosensibilidad evitó que tuvieran mayor impacto en plagas, siendo las piretrinas el insecticida botánico más usado en los últimos dos siglos.

En el siglo XX, para 1930 se descubrieron los insecticidas orgánicos sintéticos y se optimizaron los sistemas de síntesis, identificación, búsqueda y metodología para probar su actividad biológica. En 1939, Müller descubre el primer insecticida sintético, el DDT, perteneciente al grupo de los clorados y se desencadena un rápido aumento en el número de insecticidas organoclorados descubiertos, los cuales presentaron una serie de inconvenientes como bioacumulación y alta persistencia en el medio ambiente. Posteriormente para 1945 se descubrió otro grupo de insecticidas los organofosforados los cuales por su poder insecticida, menor bioacumulación y persistencia en el medio ambiente reemplazan a los clorados. A la par aparece otro grupo de insecticidas, los carbamatos, con gran selectividad y una década después se sintetizan los piretroides (Casida and Quistad, 1998).

Estos cuatro grupos de insecticidas aun constituyen el 90% del mercado en salud pública junto otros insecticidas como los insecticidas bacterianos *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) y reguladores de crecimiento.

4.3.1 Insecticidas Organofosforados

Los organofosforados son todos aquellos insecticidas químicamente constituidos por ésteres de ácido fosfórico. Son más tóxicos para los vertebrados que los

organoclorados y no son persistentes en el ambiente, ya que los enlaces éster son muy susceptibles a la descomposición biótica y abiótica. Estos insecticidas ejercen su acción tóxica a nivel del sistema nervioso inhibiendo la enzima acetilcolinesterasas, dando como resultado la acumulación de acetilcolina (ACh), lo cual interfiere con la transmisión neuromuscular provocando una sobreexcitación de los músculos voluntarios y finalmente la parálisis.

Dentro de este grupo se encuentran los insecticidas usados en salud pública, tales como: malatión, fenitrotión, clorpirifos, fentión, temefos, entre otros (Casida and Quistad, 1998).

4.3.1.1 Temefos. Generalidades

Temefos comúnmente conocido como ABATE® es el insecticida que ha tenido mayor uso en las Américas, particularmente en salud pública para el control larval de *Ae. aegypti*.

El nombre científico del temefos es 0,0,0,0'-tetrametil-0,0'-tio-di-p-fenileno, fórmula empírica $C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$ y Peso molecular: 466.48. Se presenta en cristales blancos o incoloros. Tiene tres presentaciones: líquido al 50%, cápsulas de liberación lenta al 5% y granos de arena al 1%.

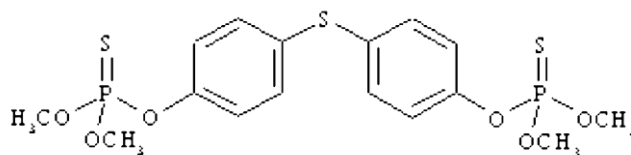


Figura 4. Estructura química del temefos.

Es un insecticida no sistémico que actúa por contacto e ingestión, interfiriendo en la transmisión de los impulsos nerviosos por inhibición de la colinesterasa. Está clasificado como ligeramente peligroso con una dosis letal aguda en conejos de 1.300 mg/kg. Los seres humanos pueden absorber el temefos por inhalación, ingestión, por la piel y por los ojos.

Una característica de este insecticida es la baja solubilidad en agua razón, por la cual puede ser aplicado sin riesgos de toxicidad en humanos, sin necesidad de mediciones estrictas del volumen de los recipientes tratados, por lo que es recomendado para aplicarse en aguas de consumo humano por la Organización Mundial de la Salud.

La dosis de aplicación generalmente es 1 parte por millón cada seis semanas o 2 partes por millón si la re-aplicación se hace posterior a las seis semanas. La aplicación del temefos se efectúa en recipientes positivos a larvas como una medida preventiva básica con periodicidad bimestral y en situaciones de emergencia o brotes, previo a estudios entomológicos evaluados con criterios operativos de control.

4.3.1.2 Malatión. Generalidades

El malatión fue el organofosforado alifático más utilizado luego de su introducción en 1950, tanto en la agricultura (vegetales, frutales y forrajeros) y en salud pública, controla una amplia gama de insectos masticadores y chupadores en frutales, hortalizas y ornamentales, así como insectos de interés médico. En la actualidad, en algunos países como Venezuela aún es utilizado para el control de *Ae. aegypti*. El nombre científico de este insecticida es dietil (dimetoxitiofosforil) succinato o S-1.2-bis (etoxicar-bonil) etil 0,0-dimetil fosforoditioato, fórmula empírica $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ y Peso molecular 330.36. Se presenta como líquido incoloro en estado puro o líquido color café oscuro a amarillo, con olor desagradable parecido al zorrillo. Tiene tres presentaciones concentrado emulsionable, polvo mojable y solución concentrada.

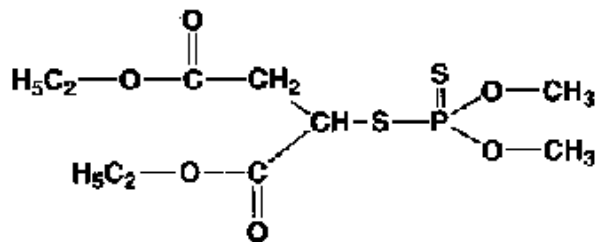


Figura 5. Estructura química del malatión.

El malatión es un insecticida neurotóxico no sistémico de amplio espectro, actúa por contacto, ingestión e inhalación y que afecta al sistema nervioso central (inhibe la enzima acetilcolinesterasa). Está clasificado como moderadamente peligroso para los mamíferos con una dosis letal aguda en ratas de 1.260 mg/kg vía oral. Los seres humanos pueden absorber el malatión por inhalación, ingestión o a través de la piel. Las intoxicaciones agudas se manifiestan en súbitos accesos de transpiración, abundante secreción de saliva, diarrea, bronquitis, infarto al miocardio y coma. La muerte

sobreviene por paro respiratorio. Dada su alta y aguda toxicidad para el ser humano y para los organismos acuáticos, es necesario tomar precauciones especiales cuando se aplica. Se debe prestar especial atención a los residuos contenidos en las sustancias alimenticias.

Este insecticida es ligeramente persistente en el ambiente (1 semana), su afinidad por el suelo varía de muy baja a moderada y puede constituir un riesgo de contaminación para las aguas subterráneas en sitios donde las condiciones no favorezcan su degradación. Tanto en agua como en suelo la degradación ocurre por una combinación de procesos biológicos y reacciones no biológicas mediadas por el agua (hidrólisis).

4.3.2 Insecticidas Piretroides

Son compuestos sintéticos derivados de alcaloide “Piretro” presente en las flores de las plantas *Chrysanthemum cinerariifolium* y *Chrysanthemum coccineum*. Los compuestos biológicamente activos son el resultado de la combinación de dos ácidos (pirétrico y crisantémico) y tres alcoholes (piretrolona, jasmolona y cinerolona). En comparación con los organofosforados y carbamatos sus propiedades toxicológicas y ambientales son más favorables. Todos son lipofílicos y casi insolubles en agua. Estas moléculas han sido objeto de múltiples modificaciones químicas, en busca de mejorar su acción tóxica y estabilidad en el medio ambiente por lo que han sido clasificadas en cuatro categorías o generaciones.

La primera generación con un solo piretroide, la aletrina, la cual se diferencia de la cinerina I porque contiene un lado en la cadena más estable y más persistente que el piretro. Es efectivo contra moscas y mosquitos, pero menos efectivo contra cucarachas y otros insectos.

La segunda generación incluye: a) tetrametrina, (1965) que poseía mayor fuerza de derribo que la aletrina y fácilmente sinergizada, b) la resmetrina (1967) aproximadamente 20 veces más efectiva que el piretro en cuanto al derribo en mosca casera y no sinergizada por ningún sinergista, c) la bioresmetrina (1967) 50 veces más efectiva contra moscas caseras susceptibles a insecticidas y tampoco sinergizada, d) la bioaletrina (1969) más potente que la aletrina y fácilmente sinergizada, pero menos efectiva que la resmetrina y e) la fenotrina (1973). La resmetrina fue el insecticida de

segunda generación más utilizado en forma de aerosoles para el control de insectos voladores y rastreros en interiores de casas.

La tercera generación incluye fenvalerato y permetrina, los cuales aparecieron en 1972 y 1973, respectivamente, fueron los primeros piretroides agrícolas debido a fotoestabilidad y residualidad sobre las hojas de los cultivos.

La cuarta generación comenzó en 1975 cuando se introdujo átomos de fluor a la molécula confiriéndole una actividad especial, dando origen a una nueva generación de piretroides usados en salud pública como ciflutrina y cialotrina. A partir de estos se aislaron isómeros activos como la lambdacyalotrina y beta-ciflutrina. La última generación de piretroides fue introducida a partir del hecho que la unión éster no era indispensable para la acción insecticida, surgiendo así el flufenprox, silaflufen y etofenprox.

En general, los piretroides interfieren con las funciones del sistema nervioso y actúan sobre el axón a nivel central y periférico mediante interacción con los canales de sodio y/o desplazando al ácido kainico de sus uniones específicas en los mamíferos y en los insectos. A semejanza de las piretrinas, bloquean los impulsos nerviosos en el nivel de su transmisión final.

Los efectos de estos compuestos pueden ser de 4 tipos: 1) sobre-excitación nerviosa sin contracciones musculares, 2) afección en los nervios motores que causan contracciones musculares, 3) contracciones musculares de larga duración y 4) obstrucción total del impulso nervioso.

Los signos típicos de intoxicación por los piretroides Tipo I incluyen hiperexcitabilidad y convulsiones, mientras que los piretroides Tipo II causan principalmente ataxia y descoordinación. En insectos los efectos de los piretroides, especialmente los del Tipo I, pueden desarrollarse en 1 a 2 minutos después del tratamiento y pueden resultar en la caída, es decir, en la pérdida de la postura normal y de la locomoción.

4.3.2.1 Deltametrina

La deltametrina es uno de los piretroides sintéticos más usados en todo el mundo. Mientras que para los mamíferos, este insecticida es clasificado como seguro, es muy

tóxico para la vida acuática, particularmente los peces, y por tanto debe ser utilizado con extrema precaución alrededor de zonas de agua.

El nombre científico de la deltametrina es (S)- α -ciano-3-phenoxy-benzyl (1R, 3R)-3-(2,2 - dichlorovinyl)-2,2- dimethylcyclopropanecarboxylate, fórmula empírica $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ y Peso molecular: 505.21. Se presenta como líquido fluido de color ligeramente amarillo a marrón pajizo. Tiene una presentación: concentrado emulsionable.

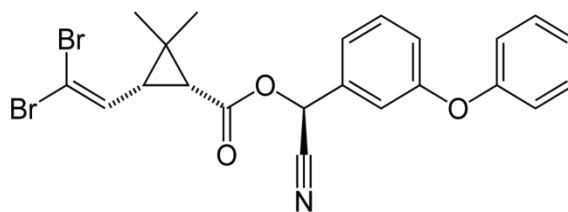


Figura 6. Estructura química de la deltametrina.

La deltametrina es un piretroide tipo II que afecta los canales de sodio (Na^+) en la membrana nerviosa provocando una intensa actividad repetitiva (bloqueo de la transmisión del influjo nervioso) y en consecuencia la muerte. Tiene acción de contacto e ingestión y también inhibe la alimentación.

Está clasificado como moderadamente peligroso con una dosis letal en rata por encima de 2000 mg/kg vía oral o dérmica. En los seres humanos el mayor riesgo se produce por ingestión y debido a su baja volatilidad, la inhalación del principio activo es difícil. En la piel puede provocar irritación pasajera. El envenenamiento por deltametrina puede provocar fuertes dolores abdominales, convulsiones, vómito y pérdida de conocimiento. La inhalación por aerosoles provoca vértigo, cefalea y tos.

La deltametrina juega un papel muy importante en el control de la malaria siendo usada en la fabricación de mosquiteros con insecticida de larga duración. Se aplica para el control de diferentes insectos vectores, entre ellos: *Anopheles gambiae* y *Aedes aegypti*, es el piretroide más utilizado solo o conjuntamente con otros insecticidas o como alternativa a alguno de ellos (permetrina, cipermetrina, malatión y fentiión).

La forma de aplicación de la deltametrina y otros piretroides utilizados en el control el dengue, es mediante aerosoles espaciales de gota de ultrabajo volumen (ULV).

Para que esta aplicación sea efectiva, las gotas de deltametrina deben estar en contacto con los mosquitos en vuelo o en sitio de reposo, desafortunadamente, esta medida ha demostrado ser inefectiva en muchos casos (Gubler, 1989; WHO, 2002).

En los últimos años se ha generado gran interés en nuevas formas de aplicación residual de piretroides, principalmente deltametrina, en cortinas, paredes, mosquiteros y otras superficies de reposo del mosquito *Ae. aegypti* (Karcha *et al.*,1995; Kroeger *et al.*, 2006).

4.4 Resistencia a los Insecticidas

La resistencia a insecticidas fue definida por la FAO (1979) como la capacidad desarrollada por una población de insectos a ser afectada por la aplicación de insecticidas. Técnicamente se define como la habilidad complementaria y hereditaria propia de un individuo o conjunto de ellos, que los capacita fisiológicamente y etimológicamente, para bloquear la acción tóxica de un insecticida por medio de mecanismos metabólicos y no metabólicos, y en consecuencia sobrevivir a la exposición de dosis que para otros sería letal. Es una característica genética heredable, cuya frecuencia aumenta en una población como el resultado de la presión de selección ejercida por un insecticida, por lo tanto, una población de vectores desarrolla resistencia debido a que el insecticida elimina progresivamente la mayoría de individuos susceptibles mientras permite la sobrevivencia y reproducción de aquellos que poseen algún mecanismo que evite su efecto tóxico.

La variación genotípica y fenotípica que afecta a la resistencia se presenta en algunos individuos de la población como resultado de una mutación o duplicación genética modificando algún aspecto fisiológico, morfológico o de comportamiento en el fenotipo normal, permitiendo que los individuos con dichas variaciones genéticas tengan mayor probabilidad de sobrevivir al efecto tóxico del insecticida que los individuos carentes de ellas, por lo tanto la frecuencia del gen aumentará en las sucesivas generaciones con el paso del tiempo.

Históricamente a nivel mundial, en los programas de control de diversas enfermedades metaxénicas tales como: Malaria, Enfermedad de Chagas, Leishmaniasis, Fiebre Amarilla y Dengue entre otras, han sido incluidos los insecticidas químicos como

una herramienta importante y exitosa. Así tenemos que durante más de 30 años fueron empleados los Organoclorados, obteniéndose resultados impresionantes a nivel mundial, especialmente con el DDT, pero su uso masivo y propiedades organolépticas trajo como consecuencia el desarrollo de resistencia en diferentes vectores, ocasionando la rotación a otro grupo de químicos, los organofosforados, y los carbamatos. Actualmente otras moléculas con actividad insecticida, los piretroides sintéticos, son los más utilizados bien aplicados en superficies, en forma de niebla o en material como cortinas o mosquiteros logrando además del control una prevención de la enfermedad (Mulla, 1994).

La resistencia a insecticidas ha sido objeto de múltiples estudios a nivel mundial, no solo por ser ejemplo de adaptabilidad de los insectos, sino porque es el principal motivo que favorece la transmisión de muchas enfermedades y por ende debido al fracaso de los programas de control.

Los insectos del orden Díptera, especialmente los de importancia médica (*Culex*, *Aedes* y *Anopheles*), representan el grupo en donde se ha reportado el mayor número de casos de resistencia, reflejando la enorme presión de selección que se ha ejercido con los insecticidas a nivel mundial, especialmente sobre mosquitos, además de que estos cuentan con las características requeridas para el rápido desarrollo de la resistencia como: ciclos de vida corto y alta fecundidad.

El DDT fue introducido para el control de mosquitos, entre ellos *Ae. aegypti*, en 1945 y para 1947 se registró el primer caso de resistencia a este organoclorado en *Aedes taeniorhynchus* y *Ae. sollicitans* (Brown, 1986). Para 1972 *Ae. aegypti* había sido erradicado de 19 países (Gubler, 1989), sin embargo, en el mismo año, la resistencia al DDT fue reconocida como un problema serio y la campaña terminó antes que la meta de erradicación fuera alcanzada (Brown and Pal, 1971).

Los problemas de resistencia han continuado a pesar del uso de nuevos grupos de insecticidas y alrededor de cien especies de mosquitos han generado resistencia a uno o más insecticidas (Hemingway and Ranson, 2000).

En el control de la malaria y dengue se han incluido algunos organoclorados (hexacloruro de benceno, DDT), organofosforados (metil-paratión, temefos, malatión y

clorpirifos), carbamatos (propoxur y carbosulfan) y piretroides (resmetrina, permetrina fenotrina) (Ayesa *et al.*, 2006).

La resistencia al malatión está presente en las principales especies vectoras del género *Anopheles* (Hemingway and Ranson, 2000), *Culex* (Hemingway and Karunaratne, 1998) y en *Aedes aegypti* (Georghiou *et al.*, 1987; Vaughan and ffrench-Constant, 1998; Rawlins, 1998). Los organofosforados y carbamatos tienen el mismo modo de acción y una vez que una población de insectos es resistente alguno de los dos insecticidas, es muy probable que ocurra un fenómeno de resistencia cruzada (Villani and Hemingway, 1987).

La resistencia a varios grupos de piretroides se ha dispersado en culícidos y anofelinos (Chandre *et al.*, 1998,1999). La resistencia cruzada entre piretroides y DDT en *Anopheles gambiae* ha generado una gran preocupación, ya que los piretroides son el único grupo disponible para la implementación de la estrategia más eficaz para controlar la malaria como lo es la impregnación de pabellones. En *Ae. aegypti* se ha registrado resistencia a piretroides, ya sea debido a la resistencia cruzada con DDT (Hemingway *et al.*, 1989; Brengues *et al.*, 2003), o bien, mediante mecanismos metabólicos relacionados con la resistencia a organofosforados y carbamatos (Rodríguez *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2003).

4.4.1 Detección de Resistencia. Bioensayos

La resistencia a insecticidas puede ser investigada, mediante la utilización de pruebas de susceptibilidad a insecticidas, conocidas como bioensayos, caracterización molecular de los genes y los productos bioquímicos que confieren resistencia; el rol de estos productos en las reacciones detoxificativas e incluso el estudio de las fuerzas ecológicas y evolutivas que afectan la dinámica de estos genes en la población.

El bioensayo es considerado como cualquier método por medio del cual, alguna propiedad de alguna sustancia o material, es medida en términos de la respuesta biológica que produce.

Los bioensayos dosis-respuesta a insecticidas, se basan en exponer grupos de insectos a un rango de dosis de insecticidas produciendo un rango de mortalidades en la muestra tratada. Al graficar los datos de las dosis vs las mortalidades se obtiene una

curva sigmoide, la cual es transformada en una recta, al expresar la dosis en logaritmo y la mortalidad en unidades probit.

La gráfica dosis-respuesta permite establecer la dosis requerida para matar a un porcentaje dado de individuos tratados. Generalmente las poblaciones son caracterizadas por la dosis o concentración letal que mata el 50% (DL₅₀ o CL₅₀) o 95% (DL₉₅ o CL₉₅) de los individuos tratados. La pendiente de la línea de respuesta obtenida mediante el programa Probit (Finney, 1971) es una medida de la variabilidad genética de la población, una recta con una pendiente alta indicará la presencia de una población homogénea, es decir, que poseen los mismos genes de resistencia y está en las mismas proporciones en los individuos, por el contrario pendientes bajas indicaran heterogeneidad en la población.

Los niveles de resistencia de distintas poblaciones pueden ser comparados usando esta metodología mediante el cálculo de la proporción de la resistencia (RR: resistance ratio, FR: Fracción de Resistencia o PR: Proporción de Resistencia) que corresponde a la diferencia de la susceptibilidad entre una población de campo y la cepa de referencia susceptible; la cual se calcula mediante la relación CL₅₀ de la población de campo/ CL₅₀ de la cepa susceptible, también puede calcularse con otros valores como: CL₉₀, CL₉₅, DK₅₀, TL₅₀, etc.

Existen varias cepas susceptibles de mosquitos mantenidas en el laboratorio sin exposición a insecticidas las cuales son utilizadas como cepas de referencia en los bioensayos dosis-respuestas, pruebas bioquímicas y moleculares para detección de mecanismos asociados a resistencia a insecticidas. Para *Ae. aegypti* las cepas susceptibles más utilizadas son la Rockefeller y la cepa New Orleans.

Otra finalidad de los bioensayos, se refiere a la detección de mecanismos enzimáticos asociados a la resistencia, a través de la utilización de sinergistas, sustancias que bloquean enzimas que ocasionan resistencia permitiendo que el insecticida actúe libremente, lo cual se ve reflejado en los valores de susceptibilidad en los insectos resistentes (Lagunes and Villanueva, 1994).

4.5 Mecanismos de Resistencia a Insecticidas

La resistencia surge a causa de cambios genéticos que modifican los pasos toxicocinéticos o toxicodinámicos de la interacción insecto-insecticida, (Brown and Abedi, 1960): a) por disminución en la penetración cuticular, b) aumento del metabolismo de los insecticidas, c) disminución de la afinidad del sitio de acción d) aumento en la excreción o e) cambios en el comportamiento. De estos los difundidos, mejor estudiados y que suelen producir altos grados de resistencia, son el aumento del metabolismo y la disminución de la afinidad en el sitio blanco.

4.5.1 Resistencia Metabólica

El metabolismo de las sustancias extrañas al organismo se sucede en dos fases: un metabolismo primario y otro secundario.

El metabolismo primario involucra procesos hidrolíticos, oxidativos y otros procesos enzimáticos para obtener productos finales polares o sea, solubles en agua que puedan fácilmente ser excretados a través de orina y heces, mientras que el metabolismo secundario involucra la reacciones de los compuestos anteriores con agentes de conjugación endógenos para dar origen a compuestos conjugados solubles en agua (Saume, 1992).

La resistencia metabólica es el resultado del incremento en la expresión de genes codificadores de enzimas que metabolizan a los principales xenobióticos. Tres familias de enzimas están mayormente involucradas en la resistencia a los cuatro grupos de insecticidas, sin embargo su rol exacto aun no ha sido determinado. Las carboxylesterasas, las monoxidasas del citocromo P450 y las glutatión-s-transferasas (GST) cuya amplificación genética es inducida en los organismos por exposición a los insecticidas pueden generar resistencia a la mayoría ellos (Hemingway and Ranson, 2000). Estas enzimas catalizan un gran rango de reacciones de detoxificación y constituyen la primera línea de defensa enzimática contra los xenobióticos, son responsables de retirar muchos productos de desecho del metabolismo, juegan roles esenciales en las rutas biosintéticas y están involucradas en la comunicación química (Scott, 1995). Particularmente las esterasas están asociadas con la resistencia a organofosforados, carbamatos y en menor proporción a piretroides; las monoxigenasas en el metabolismo de piretroides y en la activación o detoxificación de organofosforados

y en menor proporción de metil-carbamatos; y las glutatión-s-transferasas cuyo principal rol es el metabolismo del DDT a productos menos tóxicos y un rol secundario en la resistencia a organofosforados.

4.5.1.1 Carboxyl-Esterasas

Las carboxyl-esterasas son enzimas que adicionan una molécula de agua a los grupos carboxiéster, fosforoéster y carboxilamida. Casi todos los piretroides, fosforados y carbamatos son sustratos potenciales de esta enzimas, pues contienen al menos uno de estos grupos. Se estima que en casi 90% de los casos de resistencia a insecticidas organofosforados y carbamatos hay niveles elevados de estas enzimas (Hemingway and Ranson, 2000) y en menor proporción a piretroides.

El papel de las estererasas como mecanismo de resistencia puede ser inferido mediante: 1) detección de niveles elevados de productos de la hidrólisis de insecticidas en estudios de metabolismo en insectos resistentes, 2) sinergismo de la toxicidad del insecticida en insectos resistentes mediante el uso de inhibidores de estererasas no tóxicos (TPP: 0,0,0-trifenil fosfato, DEF: S,S,S-tributil fosforotritioato, IBP:0,0-bis(1-metil)s-fenilmetil fosforotioato) y 3) detección de altos niveles de actividad de estererasas generales usando sustratos simples y ensayos espectrofotométricos de homogenizados o tejidos de insectos (Brogdon, 1989), o bien por electroforesis y tinción de geles (Hemingway and Karunaratne, 1998).

La sobreproducción de estererasas es una respuesta evolutiva contra la presión de selección por insecticidas organofosforados y carbamatos, su presencia se ha documentado en numerosas especies de artrópodos, incluyendo mosquitos, garrapatas, áfidos y cucarachas.

El papel de las estererasas en la detoxificación de los piretroides ha sido poco estudiado, existen varios reportes de la actividad intensificada de las estererasas en poblaciones de mosquitos resistentes, entre estas *Anopheles gambiae*, *Anopheles albimanus* y *Culex quinquefasciatus* y *Ae. aegypti* (Rodríguez *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2003), sin embargo, los genes involucrados aun son desconocidos. Algunos estudios han demostrado que las estererasas tienen baja actividad catalítica sobre algunos piretroides, sugiriendo que los elevados niveles de estererasas presentes en cepas resistentes a

piretroides, podría deberse a pre-selección con organofosforados (Rodríguez *et al.*, 2002).

La principal causa de la excesiva síntesis de esterasas en insectos resistentes, se debe a la amplificación de genes dentro el genoma, transcripción sobre-regulada o expresión genética alterada.

4.5.1.2 Monooxidasas del Citocromo-P450

El citocromo P450 es una enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas que se encuentran en la mayoría de los organismos: bacterias, archaea y eucariotas. La gran diversidad de monooxidasas se debe a la existencia de múltiples isoformas de P450, varios patrones de expresión y un amplio espectro de sustratos (Scott, 1995).

Las proteínas del citocromo P450 usan un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas. Por lo general forman parte de cadenas de transferencia de electrones con multicomponentes, denominadas sistemas contenedoras de P450. La reacción más común catalizada por el citocromo P450 es una reacción monooxigenasa, es decir, la inserción de un átomo de oxígeno molecular (O_2) en un sustrato orgánico (RH) a la vez que el otro átomo de oxígeno es reducido a agua. Para que se complete la reacción se requieren electrones, que son provistos por la coenzima NADPH.

Las monooxidasas P450 tienen un amplio rango de sustratos, pero en general, estas enzimas metabolizan sustratos lipofílicos para producir moléculas con mayor solubilidad en agua, o bien con grupos funcionales que permiten las reacciones de conjugación, promoviendo la excreción (Berge *et al.*, 1998).

Las monooxidasas P450 están envueltas en el metabolismo de todos los insecticidas, permitiendo la detoxificación a través de la hidroxilación alifática del DDT, deshidroxilación aromática del carbaryl y propoxur, y la epoxidación de ciclodienos o la activación de organofosforados mediante reacciones de oxidación.

La elevada actividad de las monooxidasas ha sido asociada con la resistencia a piretroides en *An. stephensi*, *An. subpictus*, *An. gambie* y *Cx. quinquefasciatus* (Brogdon *et al.*, 1999, Vulule *et al.*, 1999).

Este mecanismo de resistencia metabólica puede identificarse a través de bioensayos *in vivo* con insecticidas y PBO (butóxido de piperonilo), el cual es un inhibidor de monooxidasas del citocromo P450. La reducción en la magnitud de la resistencia observada representara un indicio de la presencia de este mecanismo de resistencia. Estudios bioquímicos *in vitro* comparando niveles de estas enzimas en cepas susceptibles y resistentes actualmente son llevados cabo en microplacas para evidenciar sobreexpresión de monooxidasas p450, los cuales han sido standarizados para diferentes especies de mosquitos vectores (Brogdon and McAllister, 1998a).

En la mayoría de los casos donde se ha asociado la actividad elevada de las monooxidasas P450 con la resistencia a insecticidas se ha identificado el rol de los genes *Cyp* pertenecientes a la familia *Cyp6*. En *An. gambiae* y *Cx. quinquefasciatus* se han identificado la sobre-expresión de uno o varios genes pertenecientes a esta familia a asociados con la resistencia a piretorides (Nikou *et al.*, 2003; Gong *et al.*, 2005), así como los pertenecientes a la familia CYP4, CYP12 y CYP9 en otras especies de insectos.

4.5.1.3 Glutación-S-transferasas

La glutatión S-transferasas (GST) es una familia de enzimas que catalizan la conjugación del glutatión endógeno a una variedad de compuestos electrofílicos, protegiendo las macromoléculas biológicas como las proteínas y los ácidos nucleicos de las consecuencias tóxicas de una reacción covalente con el insecticida. Estas enzimas han sido implicadas en la detoxificación y biotransformación de muchos xenobióticos. La conjugación incrementa la solubilidad del compuesto electrofílico (insecticidas), facilitando la excreción de la molécula del organismo.

De los tipos de GSTs (microsomales y citosólicas), solo las enzimas citosólicas han sido implicadas en el metabolismo de los insecticidas. Este tipo de enzimas han sido encontradas tanto en plantas como animales, es una proteína dimérica, cada una compuesta de 2 subunidades las cuales pueden ser homodímeros o heterodímeros. Pueden ser clasificadas además, de acuerdo con su estructura y especificidad de sustrato. Esta enzima es inducible por algunos compuestos químicos, tanto en mamíferos como en insectos.

La GST de insectos ha sido clasificada como clase *theta*. Se ha propuesto a esta clase como precursora de las clases α , μ y π , basados en la distribución aparente de esta en un rango diverso de organismos que incluyen bacterias, levaduras, plantas e insectos (Wilce *et al.*, 1995). Varios estudios han correlacionado la resistencia a insecticidas con niveles incrementados de actividad GST y la producción de diferentes isoformas (Kuss *et al.*, 1994, Ranson *et al.*, 2002). Las diferentes actividades catalíticas de GST y el número de enzima individual presente en las cepas de insectos susceptibles y resistentes han demostrado ser el factor responsable de la resistencia a varios insecticidas.

El principal rol de las GSTs en la resistencia a insecticidas en mosquitos, es el meabolismo del DDT a productos no tóxicos (DDE), aunque también tienen un rol secundario en la resistencia a organofosforados. La resistencia al DDT basada en GSTs es muy común en varias especies de anofelinos, reflejando el fuerte uso de este insecticida para el control de la malaria durante varias décadas.

En *Ae. aegypti* al menos dos grupos de GSTs se encuentran en altos niveles en insectos resistentes al DDT (Lumjuan *et al.*, 2005), mientras que en *An. gambiae* un gran número de GSTs se encuentran elevadas y algunas de ellas pertenecen a la clase delta (Ranson *et al.*, 1997).

Recientemente se ha secuenciado el genoma de *Ae. aegypti* revelando la presencia de 235 genes que codifican para enzimas detoxificativas de la familia de las monooxidasas del citocromo P450, glutatión transferasas y carboxyl/colinesterasa (Stode *et al.*, 2008). Estos investigadores construyeron una matriz que contiene sondas de oligonucleótidos únicas para estos genes y compararon el nivel de expresión cepas resistentes y susceptibles a insecticidas. Varios genes candidatos se identificaron perteneciendo la mayoría a dos familias de genes, la CYP9 P450s y las GSTs épsilon.

4.5.2 Resistencia por insensibilidad en el sitio blanco

Los sitios de acción de los insecticidas son el blanco específico donde interactúan siendo el sistema nervioso uno de los puntos más susceptibles de los animales, principalmente porque sufre con facilidad daños irreversibles.

Mutaciones puntuales no silentes en los genes es la causa más común de la resistencia en el sitio blanco. Para se produzca la selección de las mutaciones, el

aminoácido resultante debe reducir la unión del insecticida al sitio de acción sin causar pérdida de la función primaria.

4.5.2.1 Acetilcolinesterasa Insensible

El sitio de acción de los organofosforados y carbamatos es la enzima acetilcolinesterasa, inhibiendo su actividad. La AchE está ubicada en la membrana post-sináptica del nervio y tiene como función hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina. La AchE de los insectos tiene una especificidad de sustrato intermedio entre la AchE de los vertebrados y la butiril-colinesterasa.

La forma molecular predominante en insectos es un dímero globular anfifílico que se une a la membrana mediante una ancla glicofílica. Alteraciones en la AchE en insectos resistentes a organofosforados y carbamatos resulta en una reducción o inhibición en la sensibilidad de la enzima por estos insecticidas.

La intensidad de esta enzima ha demostrado ser un importante mecanismo de resistencia en especies plagas y se han identificado al menos 5 sitios mutados en el sitio de acción de la AchE.

En *Cx. pipiens* se han identificado al menos dos genes *Ace* con esa actividad. Hasta la fecha la única acetilcolinesterasa clonada en *Cx. pipiens* es la *Ace2*, la cual no está involucrada en la resistencia a insecticidas y está ligada al sexo, por el contrario, el gen *Ace1* es autonómico y confiere resistencia a insecticidas (Malcolm *et al.*, 1998).

El análisis detallado de los perfiles de inhibición de la AchE de *Ae. aegypti* sugiere que existe un solo locus AchE en esta especie, por lo tanto la resistencia basada en alteraciones de la acetil-colinesterasa podría estar ligada al sexo.

Cinco mutaciones puntuales asociadas con la resistencia a organofosforados y carbamatos han sido identificadas en el gen de la acetilcolinesterasa en *Drosophila melanogaster* (Mutero *et al.*, 1994) y estudios dirigidos por mutagénesis del AchE ligado al sexo de *Ae. aegypti* han demostrado que estas mutaciones también confieren resistencia en mosquitos (Vaughan *et al.*, 1997).

4.5.2.2 Receptores GABA

El receptor GABA en los insectos es un canal de iones de cloro heteromultimérico, con función de inhibir la neurotransmisión en el sistema nervioso central los insectos y en uniones neuromusculares.

Los receptores GABA pertenecen a una superfamilia de receptores de neurotransmisores que incluyen a los receptores nicotínicos de la acetilcolina. Estos receptores están formados por oligomerización de cinco subunidades alrededor del canal central de iones de sodio. Cinco subunidades distintas han sido clonadas a partir de vertebrados. En la actualidad solo tres subunidades han sido clonadas en *D. melanogaster*, pero estas no entran en la clasificación de subunidades GABA de los vertebrados (French-Constant *et al.*, 1993).

El receptor GABA de los insectos está implicado como un sitio de acción para los piretroides, ivermectinas y ciclodienos. Algunos estudios demuestran que los insectos resistentes a ciclodienos son resistentes a los insecticidas picrotoxina y fenilpirazole y que el efecto de la ivermectina en neuronas cultivadas puede revertirse con el pretratamiento con picrotoxina, sugiriendo que estos insecticidas interactúan con el inoforo de cloro asociado con el receptor GABA de insectos.

La resistencia a Dieldrin fue reportada en 1950, pero la participación de los receptores GABA en este tipo de resistencia fue elucidada hasta 1990.

Se ha encontrado que una substitución de alanina a serina en el dominio que envuelve al canal del receptor GABA, confiere resistencia a ciclodienos tales como dieldrin. La mutación fue identificada por primera vez en *D. melanogaster*, y desde entonces sea encontrado en un amplio rango de insectos resistentes al dieldrin, incluyendo *Ae. aegypti* (French-Constant *et al.*, 1994). La única variación en insectos resistentes es que el residuo substituido cambia a glicina en vez de serina. A pesar de que los ciclodienos fueron suspendidos en la agricultura y en salud pública, los alelos resistentes pueden ser encontrados en relativamente altas frecuencias de poblaciones de insectos en campo.

4.5.2.3 Canal de Sodio dependiente de Voltaje

El canal de sodio dependiente de voltaje es el sitio de acción del DDT y los piretroides. En los insectos es una proteína transmembranal que contiene alrededor de

2108 aminoácidos plegados en cuatro dominios homólogos e hidrofóbicos (dominio I, II, III, IV), separados por uniones hidrofílicas. Cada dominio se compone de seis segmentos transmembranales (S1-S6) (Fig. 7).

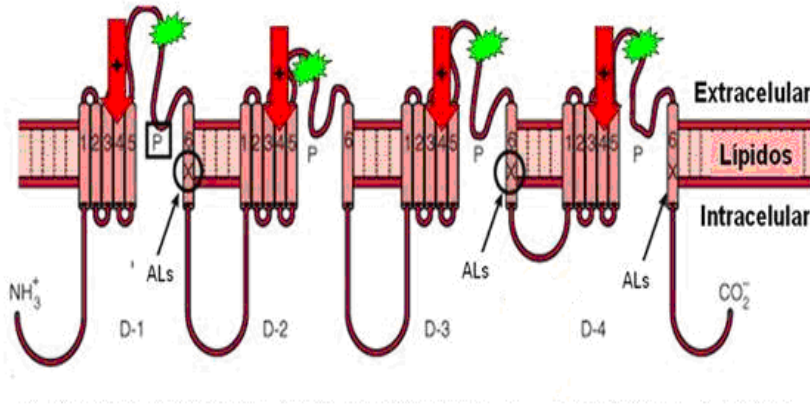


Figura 7 Estructura del canal de sodio dependiente de voltaje

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. Dichos picos consisten en despolarizaciones sucesivas durante tiempos prolongados, y es la causa del fenotipo resistente conocido como “*Kdr*” presentes en varias especies de insectos.

Diversas especies de insectos resistentes al DDT y piretroides presentan alteraciones en el gen del canal de sodio. La asociación entre la resistencia *kdr* con modificaciones en el canal de sodio fue confirmada mediante estudios de unión de neurotoxinas (Bloomquist and Miller, 1986) y mediante estudio de mapeo genético. La mayoría de la investigaciones sobre éste mecanismo de resistencia han sido realizadas en el sistema *Musca domestica* desde 1950, y en los últimos años se identificó una sola mutación en el dominio II segmento transmembranal 6 (DIIS6), asociada con la resistencia tipo *kdr* la cual fue mapeada en el cromosoma 3 y fue documentada la sensibilidad reducida del sistema nervioso en los insectos con *kdr* para piretroides.

La característica *kdr* confiere resistencia para ambos efectos, parálisis rápida y acción letal de todos los piretroides conocidos, piretrinas y DDT, sin disminuir la eficacia de otras clases de insecticidas.

La mutación consistió en un cambio de nucleótidos de adenina por timina en el residuo *Leucina*1014, que ocasiona un cambio de aminoácidos de leucina (*Leu*) a fenilalanina (*Phe*). Posteriormente, la misma mutación fue identificada en varias especies de mosquitos, tales como *An. gambiae*, *An. stephensi*, *An. sacharovi* y *Culex pipiens* (Martínez-Torres *et al.*, 1998,1999, Enayati *et al.*, 2003, Luleyap *et al.*, 2002)

Una segunda característica, designada resistencia *super-kdr*, confiere mucha más resistencia hacia DDT y algunos piretroides (especialmente a deltameterina). Estas características fueron observada mediante mapeo del cromosoma 3 (Williamson *et al.*, 1993).

Otras mutaciones en el segmento DIIS6 han sido identificadas. Una nueva mutación que consiste en un cambio de Timina por Adenina en el residuo *Leu*1014 de *An. gambiae* y *Cx pipiens* (Ranson *et al.*, 2000b, Luleyap *et al.*, 2002) confiere una sustitución a Serina confiriendo más resistencia al DDT que a piretroides.

Adicionalmente en algunos insectos dípteros con el fenotipo “*super kdr*”, además de contener la mutación *Leu*1014*Phe*, presentaron una segunda mutación *Met*918*Thr* que ocurre en el puente de unión de los segmentos transmembranales 4 y 5, el dominio II (Williamson *et al.*, 1996, Guerrero *et al.*, 1997), la cual intensifica el fenotipo *kdr* en cepas de moscas resistentes.

La mutación Leucina a Fenilalanina en anofelinos puede detectarse mediante pruebas diagnóstico-moleculares basadas en PCR, discriminando entre individuos homocigotos susceptibles, homocigotos resistentes y heterocigotos (Martínez-Torres *et al.*,1998, Lynd *et al.*,2005). Debido a que la resistencia *kdr* es semi-recesiva o completamente recesiva, la capacidad de identificar organismos heterocigotos es de suma importancia para la detección temprana y manejo de la resistencia en campo. Actualmente existe una tendencia a investigar la resistencia a piretroides mediante PCR en regiones donde otras mutaciones *kdr* han sido encontradas, sin embargo, cambios en otras regiones podrían estar asociadas a la resistencia.

4.5.2.4 Resistencia “*kdr*” en *Ae. aegypti*

La resistencia *kdr* (Knockdown resistance) o resistencia al derribo, es un término genérico que se refiere a uno de los dos principales tipos de resistencia a piretroides y

DDT, la cual se evidencia porque los insectos no pierden la coordinación inmediatamente después de una exposición a piretroides.

En 1975, en Tailandia, fue reportada por primera vez la resistencia tipo *kdr* en *Ae. aegypti*, posterior a la falla en una campaña de control utilizando bioresmetrina. Los estudios genéticos de una cepa seleccionada de esta población, demostró la presencia de un solo factor de resistencia a piretroides (Rpy) presente en el cromosoma III, el cual fue incompletamente dominante en herencia (Soderlund and Bloomquist, 1990).

Este tipo de resistencia a piretroides ha sido reportado en diversas poblaciones de *Ae. aegypti*. Siete mutaciones han sido identificadas en el dominio II, segmento transmembranal S6 del canal de sodio en cepas de *Ae. aegypti* resistentes a permetrina (Bregues *et al.*, 2003). Una de las mutaciones ocurre en la primera posición del codón Isoleucina en el residuo 1,011 (*Iso1,011*), donde un cambio de Adenina a Guanina (A→G) ocasiona la substitución del aminoácido de Isoleucina por Metionina (*Met*), esta mutación fue encontrada en cepas resistentes a piretroides de Sud-América. Posteriormente, fue descrita una segunda mutación asociado a la resistencia *kdr* en *Ae. aegypti* resistentes a DDT y piretroides procedentes de Tailandia. Esta mutación ocurre en el codón 1,016 (*Val1,016*), donde una substitución de nucleótidos de Timina a Guanina (T→G) en la segunda posición del codón, ocasionaba un cambio de aminoácido de Valina (silvestre) a Glicina. (Bregues *et al.*, 2003; Prapanthadara *et al.*, 2002). Más recientemente Saavedra *et al.*, 2008 en 30 cepas de *Ae. aegypti* de América Latina, encuentran dos nuevas mutaciones en los codones 1,011 y 1,016. Una transición A→G en la primera posición del codón 1011 codifica un cambio a Valina (*Val1,011*) y una transición G→A en la primera posición del codón 1016 codifica una sustitución a Isoleucina (*Iso1,016*).

Para 2010, en *Ae. aegypti* de Tailandia resistentes a permetrina fue reportada una nueva mutación en el codón 1552 en el dominio IIIS6 en que ocasiona un cambio de Fenilalanina a Cisteína (*Cys1,552*) (Yanola *et al.*, 2011).

4.6 Estudios de susceptibilidad de *Ae. aegypti* en Venezuela

En Venezuela los estudios de monitoreo de resistencia a insecticidas han revelado que esta especie ha desarrollado resistencia a diferentes líneas de insecticidas. Desde

1958 la resistencia al DDT fue reportada (Quaterman and Schoof, 1958), posteriormente Mouchet (1967) refiere resistencia al dieldrin/BHC y Georghiou *et al.* (1987) a organofosforados y carbamatos. Mazzarri y Georghiou (1995), y Pérez *et al.*, (2002) detectaron poblaciones de *Aedes aegypti* de los estados Aragua y Falcón resistentes a organofosforados, carbamatos, y piretroides aun cuando estos últimos han sido recientemente introducidos en los programas de control. En el 2008 Alvarez *et al.*, encontraron en 7 de 9 poblaciones procedentes del estado Trujillo porcentajes de mortalidad entre 89 y 97% a la deltametrina, lo cual sugiere según la OMS resistencia al químico.

Con respecto a los mecanismos de resistencia, Mazzarri y Georghiou (1995) determinaron aumento de esterasas en *Aedes aegypti* de Aragua y Miranda resistente al temefos, posteriormente Bisset *et al.*, (2001) encuentran resistencia al temefos en *Aedes aegypti* procedentes de Apure, resistencia en las cepas Táchira, Miranda y Aragua al clorpirifos y en todas las cepas resistencia al pirimifos metil, demostrando por medio de estudios con sinergistas y pruebas bioquímicas que la resistencia detectada al temefos y clorpirifos estuvo mediada por la alta actividad de esterasas.

Adicionalmente, Saavedra *et al.*, (2007) reportaron la presencia de la mutación *Ile1016* 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.

5. MATERIAL Y METODO

5.1 Área de Estudio

Venezuela geopolíticamente está estructurada en 23 estados, el Distrito Capital y 74 islas en el mar Caribe que constituyen las Dependencias Federales, distribuidos en nueve regiones:

Región Capital: Distrito Capital y estados Vargas y Miranda.

Región Central: estados Aragua, Carabobo y Cojedes.

Región Insular: estado Nueva Esparta y Dependencias Federales.

Región Nororiental: estados Anzoátegui, Monagas y Sucre.

Región Guayana: estados Bolívar, Amazonas y Delta Amacuro.

Región Centro Occidental: estados Falcón, Lara, Portuguesa y Yaracuy.

Región Zuliana: estado Zulia.

Región de los Andes: estados Barinas, Mérida, Táchira, Trujillo y municipio de Páez del estado Apure.

Región de Los Llanos: estados Guárico y Apure.

Los estados están conformados por municipios autónomos que constituyen la unidad primigenia de la administración política territorial.

El presente estudio comprende sub-poblaciones de *Ae. aegypti* procedentes de las localidades Pampanito y Tres Esquinas en el estado Trujillo, Lara en estado Lara y Ureña en el estado Táchira, al occidente de Venezuela (Fig. 8).

Pampanito: Se encuentra ubicado en el municipio Pampanito en el Estado Trujillo, en las coordenadas a 9°24'42" lat., 70°29'39" long. El municipio Pampanito se ubica en el centro del estado Trujillo, cerca de ciudades y poblaciones importantes como: Trujillo, Valera y Pampán a una altura entre 614 m.s.n.m. Su clima es del tipo tropical de montaña y tropical de altura con una temperatura variable que oscila entre 20°C y 30°C y una precipitación pluvial anual de 1200 mm. La principal actividad económica es la agricultura.



Figura 8 Occidente de Venezuela. Área de estudio.

Tres Esquinas: Se localiza en las coordenadas $9^{\circ}25'48''$ lat., $70^{\circ}26'51''$ long. en el municipio Trujillo del estado Trujillo a 430 m.s.n.m. Su clima es del tipo tropical de montaña y tropical de altura con una temperatura entre 17°C y 24°C y una precipitación anual de 936 mm. La principal actividad económica es la agricultura (caficultura) y la ganadería (cría de ganado vacuno y porcino).

Lara: Se encuentra ubicada a $10^{\circ}03'51''$ lat., $69^{\circ}29'20''$ long. en la región centro-occidental de Venezuela en el estado Lara cuya capital es Barquisimeto. El clima es de tipo Tropical seco, con temperatura media entre 18°C y 28°C . Se encuentra a una altura de 614 m.s.n.m. y registra una precipitación pluvial anual de 650 mm. En esta ciudad destacan las actividades netamente urbanas vinculadas a la industria, el comercio y los servicios.

Ureña: Esta localidad se encuentra ubicada a $7^{\circ}54'57''$ lat., $64^{\circ}24'20''$ long. en el estado Táchira región de los andes a 802 m.s.n.m. El clima es tropical de montaña y tropical de altura con una temperatura promedio de 26.6°C . La principal actividad económica es la agricultura y floricultura.

5.2 Material biológico

Recolecta y establecimiento de las colonias

El muestreo se realizó dirigido para la recolecta de fases larvianas del mosquito en criaderos temporales donde se conoce el vector se reproduce (agua limpia almacenada o estancada) durante los años 2008 y 2010. El material colectado fue transportado en bolsas whirl-pak dentro de termos al Insectario “Pablo Anduze” del Ins. Experimental “J. W. Torrealba” de la Universidad de los Andes, Venezuela para el establecimiento de las colonias (Fig. 9).



Figura 9. Recolecta de estadios inmaduros de *Ae. aegypti*.

Las larvas fueron distribuidas en charolas de plástico 35x35 cm identificadas con el nombre de cada localidad conteniendo agua dechlorada. Periódicamente las larvas fueron alimentadas con alimento balanceado para peces finamente molido y una vez que alcanzaron al estadio de pupa se transfirieron a envases plásticos con agua colocándolas dentro jaulas de cría de 30 x 30 cm para la emergencia de los adultos. Los mosquitos machos se alimentaron con agua azucarada al 10% (fuente de carbohidratos) en algodones impregnados y las hembras con *Gallus gallus domesticus* para la producción de huevos. Dentro de las jaulas se colocaron envases de plástico con agua y tiras de papel de filtro como sustrato para la oviposición, las cuales se dejaron de 2 a 3 días para que los huevos embrionaran. Posteriormente se extrajeron las papeletas, se dejaron secar sobre charolas, se almacenaron en sobres de papel debidamente identificados, correspondiendo a las generaciones parenterales. Posteriormente fueron trasladadas al Laboratorio de Fisiología y Toxicología de la Facultad de Biología Unidad B de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Las papeletas de cada una de las sub-poblaciones estudiadas se colocaron en charolas que contenían agua dechlorada para la eclosión de los huevos y una vez

visualizadas las larvas fueron alimentadas periódicamente con una solución de hígado en polvo al 50% en base de agua. Se continuó el ciclo de desarrollo de la manera antes descrita con la diferencia que las hembras fueron alimentadas sobre (*Rattus norvegicus*) para la producción de huevos. Seguidamente se colocaron envases con agua internamente revestidos con papel filtro, para obtener la generación filial 1 de cada sub-población de campo con las que se llevaron a cabo la totalidad de este estudio (Fig. 10).

Todas las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* se mantuvieron a temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $70\% \pm 2$ de humedad relativa.



Eclosión de Huevos



Alimentación de larvas con proteína de hígado al 50%



Pupas



Jaulas para oviposición



Secado de papeletas con huevos



Sub-poblaciones de adultos

Figura 10. Establecimientos de colonias de *Ae. aegypti*.

5.3 Bioensayos de susceptibilidad

Para determinar la susceptibilidad de las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* al larvicida temefos se realizaron bioensayos siguiendo la metodología de la WHO (1981) y para los insecticidas malatión y deltametrina la metodología de “Botella impregnada” que se lleva en el CDC (Brogdon and McAllister, 1998b), utilizando diferentes dosis de los insecticidas evaluados.

5.3.1 Preparación de soluciones stock

Los insecticidas evaluados en este estudio fueron temefos, malatión y deltametrina (Chem Service, Inc.), ingrediente activo (i.a) (Tabla1).

Tabla1. Insecticidas evaluados.

<i>Nombre común</i>	<i>Nombre químico</i>	<i>Concentración</i>	<i>Pureza</i>
Temefos	0,0,0,0'-tetrametil-0,0-tio-di-p-fenileno	100mg	97.5%
Malatión	(dimetoxitiofosforiltio) succinato o S-1.2-bis (etoxicarbonil) etil 0,0-dimetil fosforoditioato	500 mg	98.4%
Deltametrina	(RS)-alfa-ciano-fenoxibencil-(1RS,3RS; 1SR, 3SR) 3- (2,2-diclorovinil) -2.2-Dimetilciclopropanocarboxilato	100 mg	99.5%

El insecticida temefos se resuspendió con 1 ml de etanol y los insecticidas malatión y deltametrina con 1 ml de acetona obteniendo las soluciones stock con concentraciones finales de 100 µg/µl, 500 µg/µl y 100 µg/µl respectivamente. A partir de estas soluciones se realizaron diluciones en tubos eppendorf de 2ml siguiendo la formula $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ con la finalidad de obtener concentraciones que ocasionaran entre 2% y 98% de mortalidad en los especímenes evaluados. Estas soluciones fueron etiquetadas, resguardadas de la luz con papel aluminio y almacenadas en refrigeración.

5.3.2 Bioensayos en larvas

Los bioensayos fueron llevados a cabo siguiendo el protocolo de la WHO (1981). Veinte larvas de III estadio tardío fueron colocadas en envases de plástico que contenían de 99 ml de agua destilada y se les adicionó 1 ml de la solución de insecticida. Cinco o más concentraciones del larvicida temefos fueron evaluadas por triplicado en las subpoblaciones estudiadas y en la cepa susceptible New Orleans. Se incluyó un testigo o control por triplicado al cual se le añadió 1 ml de etanol.

Durante las dos primeras horas de exposición fueron realizadas lecturas cada 15 minutos y posteriormente a las 2, 4 y 24 horas cuando se registró la mortalidad. El criterio de mortalidad usado fue inmovilidad de las larvas o movimiento no ascendente y reducción en el tamaño (Fig. 11).

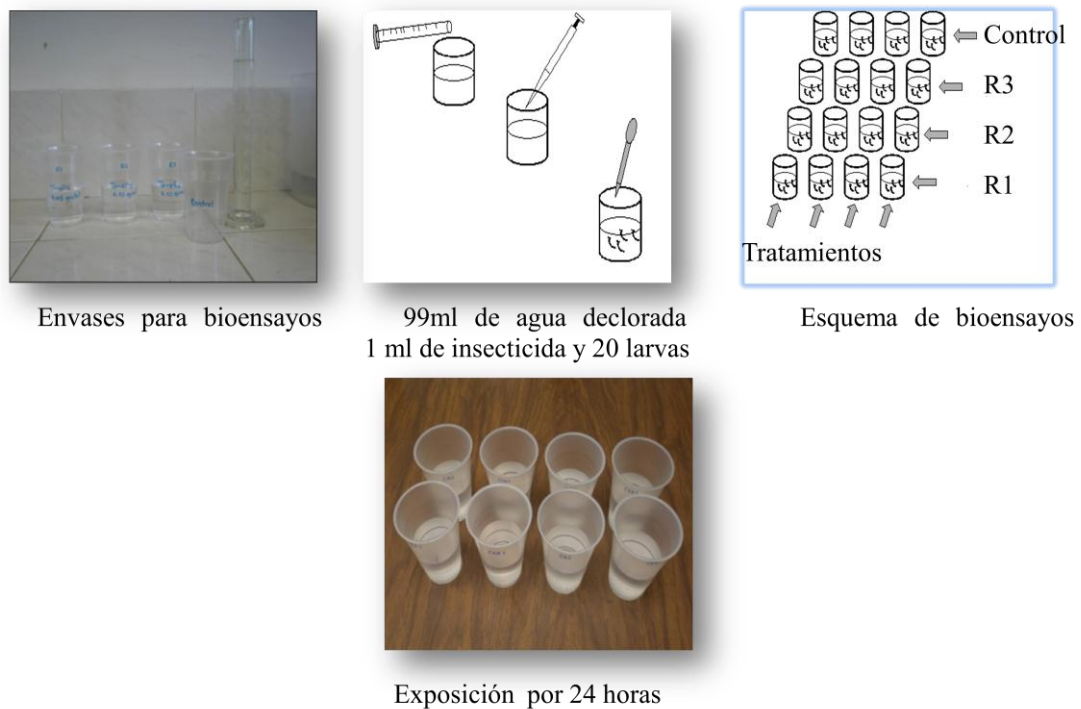


Figura 11. Bioensayos con larvas de *Ae. aegypti*

5.3.3 Bioensayos en adultos

Los bioensayos se llevaron a cabo siguiendo la metodología de botellas impregnadas propuestas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta, USA (Brogdon and McAllister, 1998b).

5.3.3.1 Preparación de Botellas

Se utilizaron botellas de vidrio Wheaton de boca angosta (3 cm) y 250 ml de capacidad, con tapón de rosca, limpias y secas. A cada botella debidamente identificada se le agregó 1 ml de acetona e inmediatamente después el volumen de la solución stock adecuado para obtener la concentración deseada en $\mu\text{g}/\text{botella}$ ($\mu\text{g}/\text{bot}$), se tapó, se agitó la mezcla suavemente y se rotó la botella en varias direcciones con la finalidad de que toda la superficie de la botella incluyendo la tapa quedara completamente impregnada con la solución. Posteriormente se retiró la tapa, se continuó rotando hasta que se observó poco líquido y se dejó evaporar el solvente restante durante 24 h a temperatura ambiente en oscuridad (Fig. 12).



Figura 12. Preparación de botellas para bioensayos

5.3.3.2 Bioensayos

Cada bioensayo constó de 5 o 6 concentraciones con 4 replicas para cada insecticida y 1 como control o testigo tratada solo con acetona. Se utilizaron hembras de la generación F_1 . De 15 a 20 hembras sin ingesta sanguínea de 1 a 3 días de emergidas

fueron colocadas con un aspirador bucal en cada botella. Para el insecticida malatión el tiempo de exposición fue de 2 horas. Con el insecticida deltametrina los insectos fueron expuestos por 1 h durante la cual se hicieron observaciones cada 10 minutos para registrar los insectos caídos o derribados. El criterio para determinar el estado de derribe se basó en: 1) el mosquito se encuentre con el dorso en el fondo de la botella, 2) sea incapaz de volar, 3) tenga movimientos aberrantes y sea incapaz de mantenerse erguido. Posteriormente los insectos fueron trasladados a envases libres de insecticida y luego de 1, 2 y 4 h se registraron los recuperados, así como los muertos a las 24 h. Un mosquito muerto fue aquel que no presentó movimiento después de un tiempo de 24 horas. Esta metodología se siguió con todas las sub-poblaciones de campo y con la de referencia (Fig. 13).

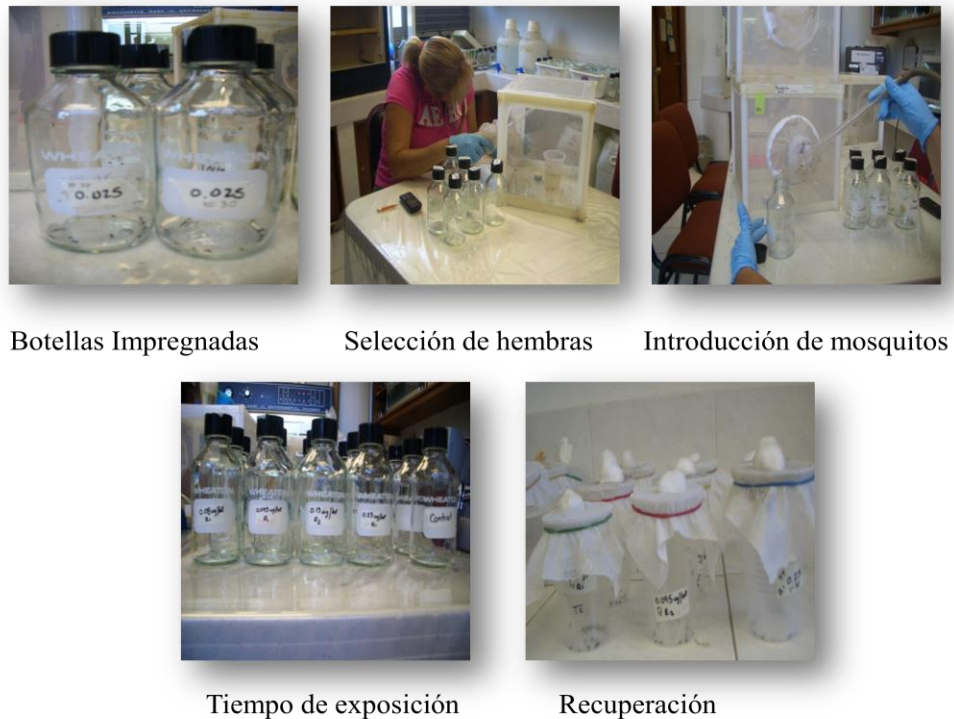


Figura 13. Bioensayos de botellas con adultos de *Ae. aegypti*

5.4 Detección de Mecanismos de Resistencia Metabólica

5.4.1 Exposición de los insectos a los insecticidas bajo estudio

Previo a la determinación de las enzimas α y β -esterasas, Oxidasas de función múltiple (MFO), Glutación-S-Tranferasas (GST) y Acetilcolinesterasas Insensible (iAChE) las sub-poblaciones de campo y la cepa susceptible NO fueron expuestas a los insecticidas evaluados.

5.4.1.1 Exposición de larvas

Aproximadamente 100 larvas de cada sub-población fueron expuestas durante 24 horas a los respectivas CL_{50} obtenidos previamente con el larvicida temefos. Luego de 24 horas fueron separadas las larvas supervivientes de las muertas y almacenadas individualmente en viales a $-70^{\circ}C$.

5.4.1.1 Exposición de larvas

Aproximadamente 100 larvas de cada sub-población fueron expuestas durante 24 horas a los respectivas CL_{50} obtenidos previamente con el larvicida temefos. Luego de 24 horas fueron separadas las larvas supervivientes de las muertas y almacenadas individualmente en viales a $-70^{\circ}C$.

5.4.1.2 Exposición de Adultos

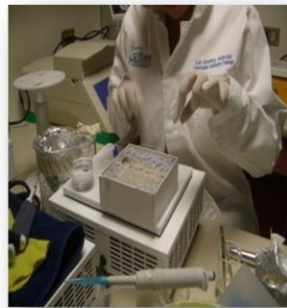
Insecticida Malatión

Lotes de 100 hembras de cada sub-población sin ingesta sanguínea y de 1 a 3 días de emergidas fueron expuestas a botellas impregnadas con la CL_{99} de malatión determinada en la cepa New Orleans durante el tiempo que ocasionó el 50% de de los muertos y se almacenaron individualmente a $-70^{\circ}C$.

Insecticida Deltametrina

Dos grupos fueron expuestos a la deltametrina para la cuantificación de enzimas detoxificativas. El primer grupo comprendió aproximadamente 100 hembras de cada sub-población sin ingesta sanguínea y 1 a 3 días de emergidas, las cuales fueron sometidos a la respectiva CL_{50} durante el tiempo que ocasionó el 50 % de mortalidad, el cual correspondió al momento cuando el 50% de los insectos expuestos estaban derribados o muertos dentro de la botella. Posteriormente fueron separados los supervivientes de los muertos y almacenados individualmente a $-70^{\circ}C$. Finalmente un

total de 30 hembras supervivientes y 30 muertas fueron usadas para la cuantificación de enzimas detoxificativas. El segundo grupo correspondió a 200 -300 hembras por subpoblación bajo las condiciones de alimentación y edad anteriormente descritas, las cuales fueron expuestas a botellas impregnadas con la respectiva DK_{50} por 1h y posteriormente retiradas y colocadas en envases libres de insecticidas. Los mosquitos que fueron capaces de mantener una posición erguida o de volar luego de 1 hora fueron aspirados e individualizados en tubos eppendorf y almacenados a $-70^{\circ}C$. El resto de los insectos derribados fueron mantenidos en condiciones de temperatura y humedad anteriormente mencionadas. A las 4 h los insectos que se recuperaron fueron extraídos y almacenados, así como los supervivientes y muertos a las 24 h. Estos mosquitos fueron seccionados, la cabeza y el tórax fueron utilizados para la realización de pruebas enzimáticas y el abdomen guardado a $-70^{\circ}C$ para la posterior extracción de DNA y genotipificación (Fig. 14).



Plancha fría para disección



Material para disección



Disección del mosquito



Abdomen, cabeza y tórax

Figura 14. Disección de mosquitos

5.4.2 Preparación de homogenatos

Cada larva o mosquito fue homogenizado en 100 μ l de buffer fosfato de potasio 0.01 M pH 7.2 y suspendido hasta 2 ml del mismo buffer. Alícuotas de 100 μ l fueron transferidas en pozos de placas de microtitulación por triplicado. Las alfa y beta-esterasas, MFO, GST y iAChE fueron cuantificadas siguiendo la metodología descrita Brogdon and McAllister (1998a) usando como referencia la cepa NO. Las absorbancias fueron medidas con un espectrofotómetro ASYS UVM-34 (Austria) y promediadas.

5.4.3 Determinación de niveles enzimáticos

5.4.3.1 Determinación de Alfa y Beta-esterasas

Se mezclaron 100 μ l de alfa o beta naftilacetato (disuelto en acetona y buffer fosfato) con 100 μ l de homogenato de cada insectos en cada pozo de las microplacas y se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente se adicionó 100 μ l de dianisidina tetrazotizada, se incubó durante 4 minutos y se realizaron las lecturas usando un filtro de 540 nm. Alfa o beta naftil fueron utilizados como controles positivos.

5.4.3.2 Determinación de MFO

Se mezclaron 100 μ l de homogenato con 200 μ l 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina dihidroclorada (disuelta en metanol y buffer acetato 0.25 M pH 5) en cada pozo de microplacas y se añadió 25 μ l de peróxido de hidrógeno a 3%. Se incubó por 10 minutos y se leyó con un filtro de 620nm. Se utilizó Citocromo C (de corazón bovino) como control positivo.

5.4.3.3 Determinación de GST

Se mezclaron 100 μ l de homogenato con 100 μ l de glutatión reducido y 100 μ l 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (cDNB) en cada pozo de microplaca y se realizaron lecturas a una longitud de onda de 340 nm inmediatamente y luego de 10 minutos. La lectura inicial T0 se restó a la lectura realizada a los 10 min (T10).

5.4.3.4 Determinación de iAChE

Se mezclaron 100 μ l de homogenato de cada insecto con 100 μ l de acetilcolina yodada (ACTH)-propoxur en cada pozo de microplacas y 100 μ l de ácido ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB). Posteriormente se realizaron las lecturas a 414 nm

inmediatamente (T0) y luego de 20 min de incubación a temperatura ambiente (T20). Se restaron los T0 a los T20.

5.5 Frecuencia de la mutación *Ile1,016*

Se determinaron las frecuencias alélicas de la mutación *Ile1,016* en hembras de *Ae. aegypti* de las sub-poblaciones Pampanito, Tres Esquinas, Lara y Ureña en condiciones naturales durante 2008 y 2010. Adicionalmente, se determinó la frecuencia alélica en los cuatro grupos fenotípicos (no derribados luego de 1h, recuperados a las 4 h y supervivientes y muertos a las 24h) de las sub-poblaciones luego de ser expuestos a la DK_{50} y se estableció la asociación entre el genotipo y el fenotipo.

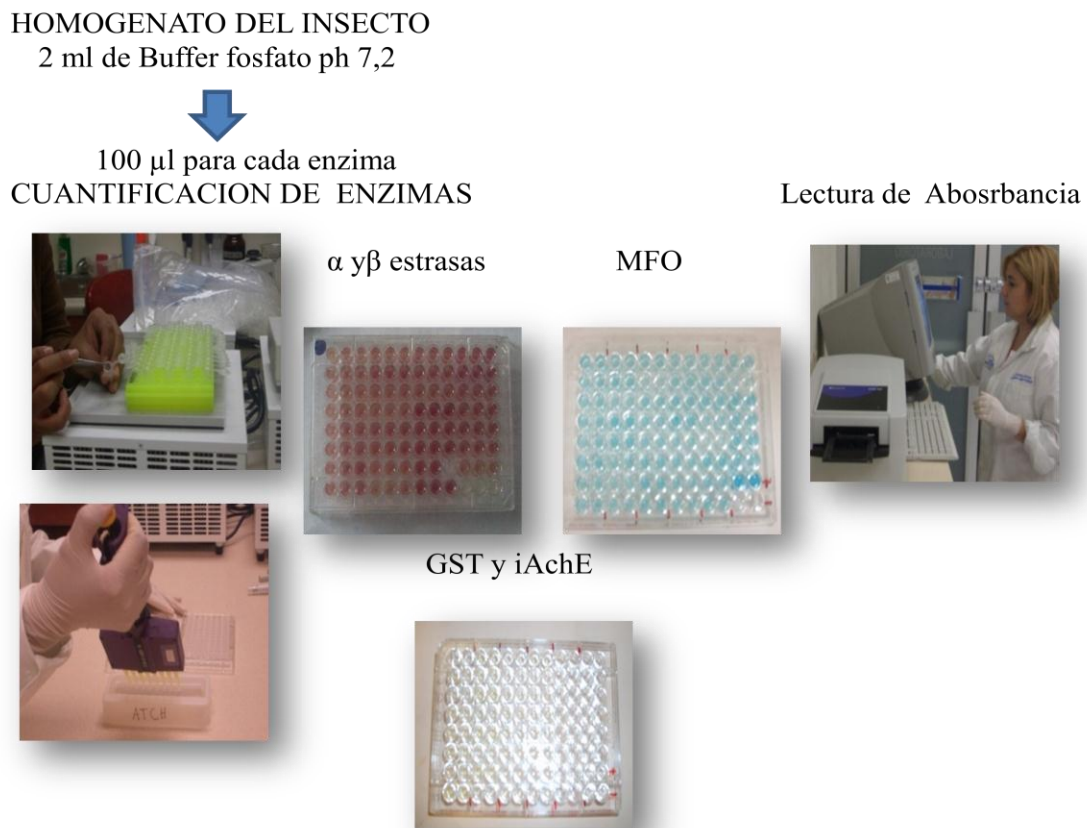


Figura 15. Esquema de determinación de enzimas detoxificativas

5.5.1 Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído de cada mosquito (abdomen o insecto completo) siguiendo la técnica de extracción de sales (Black and Munstermann,1996). Los mosquitos fueron macerados individualmente en 100 µl de buffer de homogenización (0.1M NaCL, 0.2M sacarosa, 0.1 Tris-HCL pH 9.1, 0.005M EDTA y 0.5% dodecilsulfato de sodio-SDS) utilizando pistilos Kontex en tubos eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente se mezclaron, se centrifugaron por 2 minutos a 14.000 y se incubaron a 65°C por 30 minutos. Después de este periodo se adicionaron 15 µl de acetato de potasio, se mezclaron, se colocaron a -20°C por al menos 30 min para precipitar el SDS y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min. Los sobrenadantes fueron transferidos individualmente a nuevos tubos eppendorf estériles de 1.5 ml, se adicionaron 200 µl de etanol al 100% y se incubaron 10 min a temperatura ambiente para precipitar los ácidos nucleicos. El ADN fue centrifugado durante 15 min a 14.000 rpm y removido el etanol cuidadosamente. Posteriormente 200 µl de etanol al 70% fueron agregados al pellet formado, se centrifugaron a 14.000 rpm por 5 min para remover el exceso de sales, y se desechó el sobrenadante cuidadosamente para no perder el pellet. Un segundo lavado fue realizado añadiendo 200 µl de etanol al 100%, se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min y se extrajo todo el alcohol. El pellet de ADN se secó usando un Speed-Vac y luego se resuspendió en 50 µl de buffer TE (0.05M Tris-HCL, 0.05 EDTA, pH 8). La concentración y la calidad cada ADN extraído fue medida con un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc). Todos los ADN extraídos fueron almacenados a -70 °C (Fig. 16).

5.5.2 Amplificación de los alelos específicos PCR.

Para la amplificación de los alelos *Val1,016* e *Ile1,016* 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: *Val1,016* (5'-[GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCACAAATTGTTTCCCACCCGCACCG] 3) y *Ile1,016* (5'-[GCGGGCACAAAT TGTTTCCCACCCGCACTGA]-3') y un primer anti sentido *Ile1,016r* 5'- TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC y Taq polimerasa 5U/µl. En cada tubo de PCR se colocó 1.5 µl de ADN y se le agregó 23.5 µl del Master

Mix, se mezclaron por pipeteo 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 29x, 3er Ciclo: 72°C x 10min, 4to Ciclo x 4°C 24 horas (Fig.17). A la par de los ADN de los mosquitos de las sub-poblaciones bajo estudio, se llevaron tres controles cada vez que se realizó la PCR, los cuales comprendieron: un control homocigoto susceptible (*Val1,016/Val1,016* cepa NO), un homocigoto resistente cepa IMU5 (*Ile1,016/Ile1,016* población resistente Isla Mujeres, México) gentilmente donada por la Dra. Karla Saavedra y un control negativo que correspondía a agua destilada ultrapurificada.

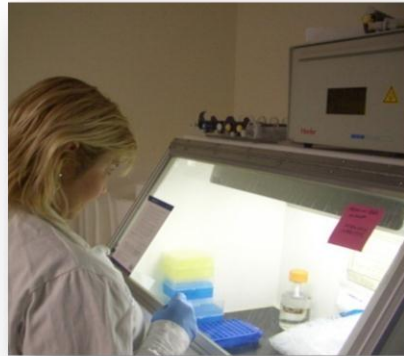


Figura 16. Extracción, purificación y cuantificación de ADN.

5.5.3 Identificación de genotipos en *Ae. aegypti*

La identificación de genotipos se realizó según Saavedra *et al.*, (2007) mediante fragmentación de productos de PCR de alelos específicos del sistema *Val1,016Ile*. Para ello los productos de PCR, un marcador de peso molecular de 12 bandas (de 25bp a 500

pb HyperLadder™V, Biotin) y el control negativo se revisaron en geles de agarosa al 3% disueltos en TBE a los cuales se les añadieron 3 µl de bromuro de etidio. Para cargar las muestras en el gel se mezclaron 3 µl de buffer de carga (azul de bromophenol disuelto en TBE 1X y glicerol) y 6 µl de los productos de PCR y luego se colocaron en los pozos del gel. La electroforesis se corrió por 20 minutos a 100 voltios y se visualizó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta para lo genotipificación (Fig.18).



Campana con LUV



Termociclador

Figura 17. Amplificación de los alelos específicos para la mutación *Ile1,016*.



Productos de PCR



Electroforesis



Visualización de genotipos

Figura 18. Fragmentación de los productos amplificados por PCR.

5.6 Análisis de resultados

5.6.1 Dosis, tiempo- mortalidad

Las mortalidades obtenidas en los bioensayos con temefos y malatión tanto en las sub-poblaciones bajo estudio como en la cepa de referencia NO, fueron analizadas por

medio log-probit software (Raymond, 1985), basado en Finney (1971) para determinar la concentración letal media (CL_{50}) y tiempo letal medio (TL_{50}).

Las Dosis knockdown DK_{50} o de derribo fueron determinadas con los insectos caídos durante la hora de exposición a la deltametrina, así como el Tiempo Knockdown cincuenta (TK_{50}) y las CL_{50} y TL_{50} con estos valores y con los obtenidos luego 1h, 2h, 4h de exposición y 24 h posteriores a la exposición de los mosquitos.

Los intervalos de confianza fueron calculados con una $\alpha = 0.05$ y se determinó la diferencia significativa entre los valores en base al traslape de los mismos. Las mortalidades fueron corregidas mediante la fórmula de Abbott (1925) cuando se observó mortalidad en el grupo control.

Los Factores de Resistencia (FR_{50}) fueron calculados dividiendo los valores de las CL_{50} o TL_{50} de las sub-poblaciones bajo estudio entre los obtenidos en la cepa susceptible New Orleans. Con el insecticida deltametrina también se calcularon los Factores de Resistencia al derribo (FR_{DK50}), dividiendo DK_{50} de la sub-población bajo estudio entre los obtenidos en la cepa de referencia New Orleans.

Se utilizó el criterio propuesto por Mazzarri y Georghiou (1995) para clasificar la resistencia como: alta resistencia cuando el valor de $FR > 10$, moderada resistencia entre 5 y 10 y baja resistencia cuando el $FR < 5$.

5.6.2 Análisis de Enzimas detoxificativas

Obtenidos los datos de absorbancias para cada enzima, se creó una base de datos en Excel y se calculó el promedio de los valores de absorbancia por insecto. Posteriormente fue llevada a cabo la prueba de ANOVA ($\alpha = 0.05$) y la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para determinar diferencias significativas entre los niveles enzimáticos en las larvas supervivientes y muertas luego de ser expuestas al temefos en las sub-poblaciones estudiadas con respecto a la cepa de referencia, así como en las hembras supervivientes y muertas luego de ser expuestas a los insecticidas malatión y deltametrina.

El umbral de resistencia correspondió a la máxima absorbancia de la enzima en los especímenes supervivientes de la cepa NO el cual fue comparado con los supervivientes de las sub-poblaciones estudiadas y usado para clasificar los mecanismos enzimáticos como no alterado (NA), incipientemente alterado, o alterado si menos del

15% de los especímenes exceden el umbral, entre 15 y 50% o cuando más del 50% excede este umbral, respectivamente (Montella *et al.*, 2007).

Análisis de regresión lineal fueron realizados entre los valores de las CL_{50} y los niveles enzimáticos (promedio de absorbancia) de las hembras supervivientes, así como entre los valores de DK_{50} y los niveles enzimáticos. La prueba de R^2 fue llevada a cabo para conocer el grado de asociación entre ambas variables.

Finalmente tres criterios fueron considerados para determinar si un mecanismo enzimático estuvo involucrado con la resistencia encontrada: 1) más del 50% de los especímenes supervivientes de la sub-población estudiada excedieran el umbral de resistencia, 2) el valor promedio de la absorbancia de la enzima sea superior en los especímenes supervivientes que en los muertos dentro de una sub-población y a su vez superior a los supervivientes de la cepa NO ($p < 0.05$); y 3) que exista alta correlación significativa entre los valores de CL_{50} y los niveles enzimáticos.

5.6.3 Cálculo de frecuencias de la mutación "kdr" *Ile1,016*

Las frecuencias genotípicas (f) fueron calculadas dividiendo el número de mosquitos con el genotipo a calcular entre el total de mosquitos analizados:

- 1.- Frecuencia del genotipo homocigoto susceptible *Val1,016/Val1,016* (f_{GG})
 $(f_{GG}) = \text{Número de mosquitos} / \text{Número de mosquitos analizados}$
- 2.- Frecuencia del genotipo homocigoto resistente *Ile1,016/Ile1,016* (f_{AA})
 $(f_{AA}) = \text{Número de mosquitos} / \text{Número de mosquitos analizados}$
- 3.- Frecuencia del genotipo heterocigoto *Val1,016/Ile1,016* (f_{GA})
 $(f_{GA}) = \text{Número de heterocigotos} / \text{Número de mosquitos analizados}$

Las frecuencias alélicas se calcularon sumando la frecuencia genotípica de los heterocigotos entre dos más la frecuencia de los homocigotos:

- 1.- $p = f_{GG} + (f_{GA}/2)$ Frecuencia alélica de *Val1,016*
- 2.- $q = f_{AA} + (f_{GA}/2)$ Frecuencia alélica de *Ile1,016*

La comprobación del Equilibrio Hardy-Weinberg se suele llevar a cabo utilizando la prueba de χ^2

$\chi^2 = \sum (O-E)^2/E$ donde: O son los genotipos observados y E los genotipos esperados, los cuales se calcularon según fórmula de Hedrick (2011):

Homocigotos *Val1,016/Val1,016* esperados GG esp= $p^2(n)$

Homocigotos *Ile1,016/Ile1,016* esperados AA esp= $q^2(n)$

Heterocigotos *Val1,016/Ile1,016* esperados G/A esp= $2pq(n)$

Si el valor de χ^2 calculado es $< \chi^2$ tabulado (1 d.f) =3.84 y una $P < 0.05$ aceptamos la H_0 : la sub-población bajo estudio se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg.

El Coeficiente endogámico de Wright's F_{IS} (1921) fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$FIS = 1 - (Hobs/Hexp)$$

donde: Hobs es el número de heterocigotos observados y Hexp esperados, es igual a $= 2\tilde{p}(1 - \tilde{p})$ donde \tilde{p} es la frecuencia del alelo mutante.

El intervalo de confianza 95% alrededor de \tilde{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 y Coull, 1998).

6. RESULTADOS

6.1 Susceptibilidad al Temefos

6.1.1 Concentración Letal Cincuenta y Factor de Resistencia.

Los valores de CL_{50} , intervalos de confianza, pendiente de la recta y Factor de Resistencia (FRs) para las sub-poblaciones estudiadas se muestran en la Tabla 2. En esta se puede observar que los valores de CL_{50} oscilaron entre 0.0085 $\mu\text{g/ml}$ y 0.0376 $\mu\text{g/ml}$ durante los años 2008-2010. La sub-población TE 2010 mostró una mayor susceptibilidad al larvicida con una CL_{50} de 0.0085 $\mu\text{g/ml}$, inferior ($p < 0.05$) a las encontradas en las sub-poblaciones PTO 2008 (0.013 $\mu\text{g/ml}$) y 2010 (0.0137 $\mu\text{g/ml}$), Lara 2008 (0.0134 $\mu\text{g/ml}$) y Ureña 2010 (0.0139 $\mu\text{g/ml}$) cuyos valores no mostraron diferencia entre ellos, en base al traslape de los intervalos de confianza. En contraste, el máximo valor de CL_{50} se registró en la sub-población de Lara para el 2010 (0.0376 $\mu\text{g/ml}$), el cual se incrementó 2.6 veces mostrando una menor susceptibilidad al larvicida.

Al comparar los valores de las CL_{50} determinados en las sub-poblaciones bajo estudio con los obtenidos en la cepa susceptibles NO obtuvimos valores en los $FR_{CL_{50}}$ inferiores a 5 en ambos períodos de investigación, indicando susceptibilidad de las sub-poblaciones bajo estudio al larvicida, lo cual evidenció la alta efectividad que aún presenta éste insecticida para el control larval de *Ae. aegypti*, quedando sujetas a una continua vigilancia, con la finalidad de identificar el momento oportuno para realizar cambios en los programas de control y conservar en las sub-poblaciones la susceptibilidad encontrada.

6.1.2 Tiempo Letal Cincuenta y Factor de Resistencia.

Para el 2008 se obtuvieron valores para el Tiempo Letal cincuenta de 8 h 41 min y 19 h 18 min en las sub-poblaciones PTO y Lara respectivamente, las cuales mostraron ser significativamente diferentes en base al traslape de los límites de confianza. La concentración a la cual fue calculado este valor correspondió a 0.014 $\mu\text{g/ml}$ para la sub-población PTO y 0.0134 $\mu\text{g/ml}$ para Lara y 0.0083 $\mu\text{g/ml}$ para la cepa NO. Al calcular

los FR_{CL50} , se encontraron valores de 0.7 y 1.6, ambos inferiores a 5, concordando con los resultados obtenidos mediante comparación de la concentración letal cincuenta (FR_{CL50}), indicando susceptibilidad de las sub-poblaciones bajo estudio al larvicida temefos para el 2008.

Tabla 2. Concentración Letal cincuenta y Factor de Resistencia en cuatro sub-poblaciones de *Ae. aegypti* de Venezuela con el larvicida temefos.

Sub-Población	Año de Recolecta	CL_{50} μg/ml	LC	² b (+ DS)	¹ FR_{CL50}
NO		0.0083	(0.0075-0.0091)	2.83 (0.32)	
PTO	2008	0.0130	(0.0123-0.0138)	4.50 (0.47)	1.57
	2010	0.0137	(0.0125-0.0149)	3.83 (0.40)	1.65
TE	2010	0.0085	(0.008-0.0089)	4.62 (0.54)	1.02
Lara	2008	0.0134	(0.0126-0.0143)	5.39 (0.72)	1.61
	2010	0.0376	(0.0331-0.0428)	2.07 (0.21)	4.53
Ureña	2010	0.0139	(0.0125-0.0154)	2.8 (0.28)	1.65

¹ FR_{CL50} , Factor de resistencia: CL_{50} población de campo/ CL_{50} cepa New Orleans.

²Pendiente de la línea de regresión Probit-log, desviación standard (\pm DS) entre paréntesis.

Los valores de TL_{50} en el 2010 estuvieron en un rango de 12h 53 min a 18h 52 min, cuyo máximo valor correspondió a la sub-población Lara, sin embargo no hubo diferencia significativa entre ellos y los encontrados en la cepa NO ya que los límites de confianza se traslapan. La concentración a la cual fueron determinados los TL_{50} correspondieron a 0.0137 μg/ml para PTO, 0.0085 μg/ml para TE, 0.0375 μg/ml para Lara y 0.0139 μg/ml para Ureña. Los valores de los FR_{TL50} fueron calculados solo en las sub-poblaciones PTO, TE y Ureña debido a la similitud en los valores de las CL_{50} con respecto a la cepa NO, encontrando valores inferiores a 5 evidenciando la susceptibilidad de las sub-poblaciones en este período de investigación (Tabla 3).

6.1.3 Mecanismo de Resistencia Enzimática

De los cinco sistemas enzimáticos evaluados en el 2008 y 2010, solo se encontraron niveles sobre expresados de β-esterasas en las larvas supervivientes de las sub-poblaciones Lara 2008 y TE 2010 (Fig. 19) con 96.7% y 93.3% de especímenes

rebasando el umbral de resistencia determinado en la cepa NO respectivamente, categorizándose como un mecanismo alterado (A) según Montella *et al.* (2007); así como MFO en la larvas supervivientes de la sub-población PTO 2008 con 26.7% de especímenes que rebasan el umbral, categorizándose como un mecanismo incipientemente alterado (Tabla 4 y 5).

Tabla 3. Tiempo Letal Cincuenta en *Ae. aegypti* de Venezuela con el larvicida temefos

Población	¹ (TL ₅₀) Horas-minutos	LC	² b (\pm DS)	FR_{TL50}
NO	12h 22 min	9h 21 min- 16h 12 min	1.2 (0.15)	
PTO 2008	8h 41 min	7h 32min- 11h 38 min	1.1 (0.14)	0.7
Lara 2008	19h 18 min	16h 12 min- 23h 0 min	2.76 (0.43)	1.6
PTO 2010	12 h 53min	9h 20min- 18h 13 min	0.82 (0.13)	1.0
TE 2010	12h 47 min	9h 38 min- 16h 32min	0.95 (0.13)	1.0
Lara 2010	18h 52 min	13h 32min- 26h 11 min	1.09 (0.16)	----
Ureña 2010	13 h 12 min	10h 30 min- 17h 13 min	0.98 (0.14)	1.1

¹Tiempo Letal cincuenta

²Pendiente de la línea de regresión Probit-log, desviación estándar (\pm DS) entre paréntesis.

³FR_{TL50}, Factor de resistencia: TL₅₀ población de campo/ TL₅₀ cepa New Orleans.

La Tabla 6 muestra los coeficientes de determinación entre los niveles enzimáticos y las concentraciones a las cuales se sometieron las sub-poblaciones, no encontrándose correlación significativa entre los valores de CL₅₀ y la sobreexpresión de β -esterasas en la sub-población Lara 2008 y TE para el 2010 ($p < 0.05$). De igual manera no se encontró correlación significativa entre los niveles sobre-expresados de MFO en la sub-población Pampanito 2008 y la CL₅₀, por lo que en ninguno de los casos se cumplen los tres criterios propuestos en este estudio para asociar un mecanismo enzimático con la resistencia a insecticida, coincidiendo con los resultados generados a través de los bioensayos en ambos períodos de investigación.

Tabla 4. Promedio y Desviación standard de las absorbancias para cada enzima en larvas *Ae. aegypti* expuestas a la CL₅₀ temefos.

<i>Sub-Población</i>		<i>α-esterasas</i> (DS)	<i>β-esterasas</i> (DS)	<i>MFO</i> (DS)	<i>GST</i> (DS)	<i>iAChE</i> (DS)
NO	S	0.593(0.032)	0.497 (0.019)	0.103 (0.057)	0.029 (0.006)	0.004 (0.007)
	M	0.624(0.073)	0.502(0.042)	0.131(0.033)	-0.0033(0.033)	-0.037(0.046)
PTO 2008	S	0.552 (0.075)	0.510 (0.042)	0.187* (0.093)	0.002 (0.032)	0.0061(0.0044)
	M	0.555 (0.067)	0.652 (0.035)	0.081 (0.028)	-0.0004 (0.028)	0.004 (0.0034)
Lara 2008	S	0.535 (0.028)	0.624* (0.035)	0.099 (0.037)	0.030 (0.006)	-0.018 (0.035)
	M	0.536 (0.031)	0.497 (0.029)	0.113 (0.054)	0.084 (0.061)	-0.0003 (0.0104)
PTO 2010	S	0.524 (0.029)	0.690 (0.094)	0.059 (0.007)	0.005 (0.031)	-0.104 (0.07)
	M	0.619 (0.078)	0.654 (0.058)	0.111 (0.070)	0.004 (0.038)	-0.056 (0.049)
TE 2010	S	0.577 (0.033)	0.695* (0.089)	0.127 (0.021)	0.001 (0.042)	-0.00002 (0.012)
	M	0.614 (0.042)	0.547 (0.032)	0.118 (0.016)	0.027 (0.006)	0.003 (0.002)
Lara 2010	S	0.485 (0.025)	0.595 (0.035)	0.118 (0.045)	0.015 (0.027)	-0.019 (0.035)
	M	0.364 (0.012)	0.590 (0.024)	0.071 (0.007)	0.004 (0.044)	0.001 (0.015)
Ureña 2010	S	0.556 (0.027)	0.598 (0.073)	0.192 (0.064)	0.006 (0.037)	0.030 (0.058)
	M	0.672 (0.097)	0.642 (0.089)	0.169 (0.026)	0.0044 (0.027)	-0.0076 (0.014)

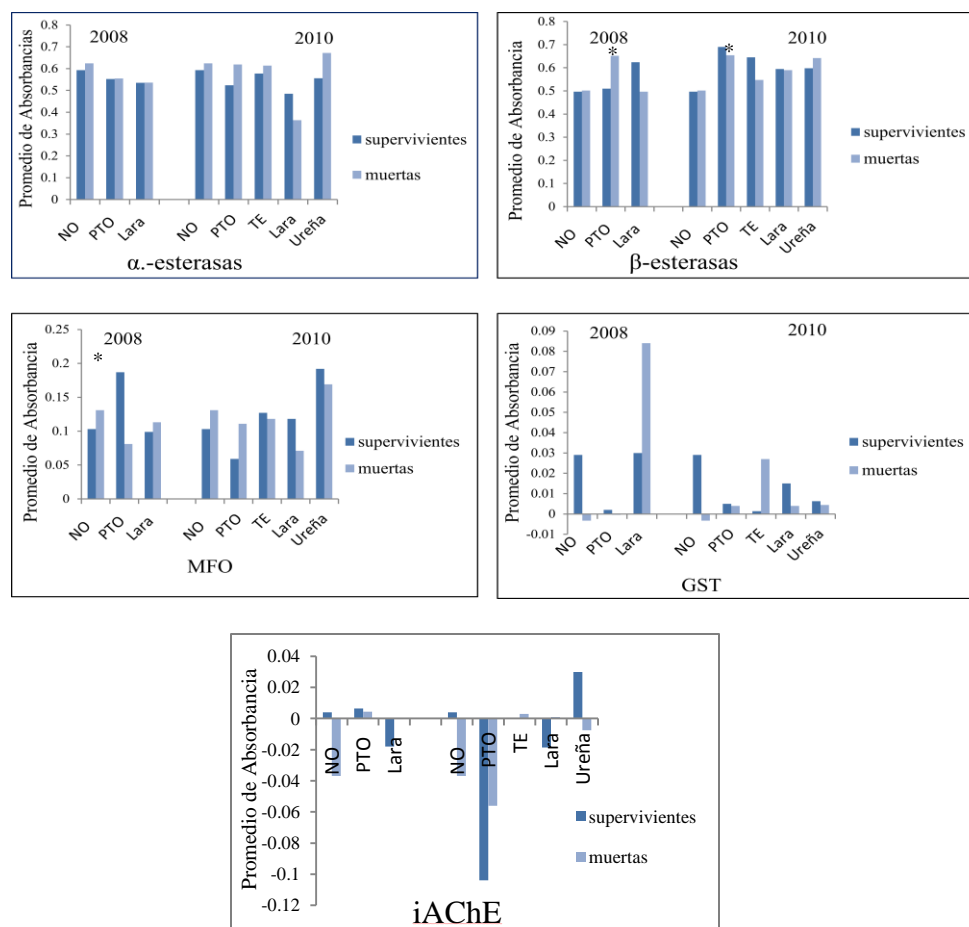
S:supervivientes luego de ser expuestos a la CL₅₀ de temefos M: muertos luego de ser expuestos.
DS: Desviación standard. * promedio significativamente superior (P<0.05) en larvas supervivientes comparada con las muertas en la misma sub-población y superiores a las supervivientes de la cepa NO.

Tabla 5. Porcentaje de especímenes de las sub-poblaciones de campo que rebasan el Umbral de Resistencia determinado en la cepa New Orleans.

Sub-población	Año de Recoleta	α-esterasas (0.637)¹	β-esterasas (0.520)	MFO (0.235)	GST (0.044)	iAChE (0.017)
PTO	2008	3.3%	26.7%	26.7%	0%	0%
Lara	2008	0%	96.7%	0%	0%	6.7%
PTO	2010	0%	96.7%	0%	0%	0%
TE	2010	0%	93.3%	0%	0%	0%
Lara	2010	0%	86.7%	0%	3.3%	0%
Ureña	2010	0%	73.3%	33.3%	0%	46.6%

¹Máximo valor de Absorbancia en la cepa New Orleans (Umbral de Resistencia).

Sombreado= Sin sombra: No Alterada, Gris claro: Incipientemente alterada, Gris oscuro: Alterada.



* promedio significativamente superior ($P < 0.05$) en larvas supervivientes comparadas con las muertas en la misma sub-población y superiores a las supervivientes de la cepa NO.

Fig. 19 Niveles enzimáticos en larvas de *Ae. aegypti* expuestas al temefos.

Tabla 6. Regresión Lineal y R^2 entre los valores de CL_{50} -temefos y los niveles promedios de enzimas (absorbancia) en hembras de *Ae. aegypti* de Venezuela 2008 y 2010.

Enzima	R^2	Significancia	R^2	Significancia
	2008		2010	
Alfaesterasas	0.953	0.139	0.804	0.039
Betaesterasas	0.403	0.562	0.004	0.917
MFO	0.161	0.737	0	0.987
GST	0.167	0.732	0.004	0.919
iAChE	0.243	0.672	0.008	0.886

6.2 Susceptibilidad al Malatión

6.2.1 Concentración letal cincuenta y Factor de Resistencia

Los valores de las CL_{50} con el organofosforado malatión oscilaron entre 1.18 $\mu\text{g}/\text{bot}$ y 3.49 $\mu\text{g}/\text{bot}$ para el año 2008, encontrándose mayor susceptibilidad en la sub-población TE ($\alpha=0.05$) con una CL_{50} de 1.18 $\mu\text{g}/\text{bot}$ con respecto a las demás sub-poblaciones, sin diferencia significativa con la cepa susceptible NO, debido al traslape de los intervalos de confianza. En orden de susceptibilidad la sub-población PTO fue <Ureña<Lara aunque no hubo diferencia significativa entre ellas. Al comparar estos valores de CL_{50} determinados en las sub-poblaciones de campo con los obtenidos en la cepa NO obtuvimos valores de $FR_{CL_{50}}$ de 1.3, 0.7, 2.2 y 1.9 para las sub-poblaciones PTO, TE, Lara y Ureña respectivamente, los cuales fueron inferiores a 5 por lo que las sub-poblaciones fueron categorizadas para el 2008 como susceptibles al organofosforado.

Para el 2010 los valores de las CL_{50} estuvieron comprendidos entre 2.31 $\mu\text{g}/\text{bot}$ y 3.07 $\mu\text{g}/\text{bot}$, observándose aumento significativo en todas las sub-poblaciones estudiadas con respecto a NO. Particularmente la sub-población TE experimentó un aumento significativo en la CL_{50} (2.75 $\mu\text{g}/\text{bot}$) y la sub-población de Lara disminución (2.31 $\mu\text{g}/\text{bot}$), en contraste, las poblaciones PTO y Ureña no experimentaron cambios significativos durante este periodo. Al evaluar los valores de $FR_{CL_{50}}$ se encontró que todas las sub-poblaciones para el 2010 se mantienen susceptibles al malatión con valores inferiores a 5 (Tabla 7).

6.2.2 Tiempo Letal Cincuenta

El tiempo letal medio para malatión fue calculado para cada una de las sub-poblaciones estudiadas a la concentración más cercana a la CL_{50} .

Para el 2008 obtuvimos valores de Tiempos Letales cincuenta comprendidos entre 15h 42 min y 25h 01 min en las sub-poblaciones estudiadas, los cuales no mostraron ser diferentes entre ellos ni con los obtenidos en la cepa NO basándonos en el traslape en los límites de confianza, a pesar de que fueron calculados a diferentes concentraciones: 3.0 $\mu\text{g}/\text{bot}$ para la cepa susceptible NO; 2.0 $\mu\text{g}/\text{bot}$ para la sub-población PTO; 3.0 $\mu\text{g}/\text{bot}$ para TE; 3.5 $\mu\text{g}/\text{bot}$ para Lara y 3.0 $\mu\text{g}/\text{bot}$ para Ureña. Se compararon los valores

obtenidos en la cepa NO y los de las sub-poblaciones TE y Ureña calculados a la misma concentración (3.0 µg/bot) y obteniéndose valores de FR_{TL50} inferiores a 5, concordando con los resultados obtenidos mediante comparación de la concentración letal cincuenta (FR_{CL50}), indicando baja resistencia de estas sub-poblaciones al organofosforado malatión para el 2008.

El valor de TL_{50} en el 2010 en las sub-poblaciones de campo estuvieron en un rango de 13h 27 min a 36h 52 min, cuyo máximo valor correspondió a la sub-población de Ureña, sin embargo no hubo diferencia significativa entre ellos incluyendo a la cepa NO ya que los límites de confianza se traslapan, siendo similar el comportamiento al observado durante el 2008. La concentración a la cual fueron calculados estos valores correspondieron a: 2.5 µg/bot para la cepa NO; 3.5 µg/bot para la sub-población PTO; 2.8 µg/bot para TE; 3.0 µg/bot para Lara y Ureña. En este período no se establecieron comparaciones entre los resultados obtenidos ya todas las sub-poblaciones fueron sometidas a diferentes concentraciones y no sería equitativa dicha comparación (Tabla 8).

Tabla 7. Valores de CL_{50} y FR en *Ae. aegypti* de Venezuela con malatión durante los años 2008 y 2010.

Sub-Población	Año de Recolecta	CL_{50} µg/bot	LC	Pendiente (DS)	FR_{CL50}
NO	2008	1.6	1.21-2.12	0.82 (0.10)	
	2010	1.45	1.34-1.57	2.62 (0.26)	
PTO	2008	2.15	1.58-2.95	0.77 (0.11)	1.3
	2010	3.00	2.79-3.24	3.27 (0.74)	2.1
TE	2008	1.18	0.90-1.54	0.85 (0.12)	0.7
	2010	2.75	2.47-3.06	2.85 (0.29)	1.9
Lara	2008	3.49	2.95-4.09	1.53 (0.18)	2.2
	2010	2.31	2.08-2.59	2.19 (0.21)	1.6
Ureña	2008	3.05	2.44-3.81	1.18 (0.17)	1.9
	2010	3.07	2.85-3.35	2.99 (0.36)	2.1

CL_{50} : Concentración Letal cincuenta, LC: Límites de Confianza.

Pendiente de la línea de regresión Probit-log, desviación standard (\pm DS) entre paréntesis.

FR_{CL50} , Factor de resistencia: CL_{50} sub-población de campo/ CL_{50} cepa New Orleans.

Tabla 8 Valores de TL50 en *Ae. aegypti* de Venezuela con el organofosforado malatión durante los años 2008-2010.

Sub-Población	¹ (TL ₅₀) Horas-minutos	LC	² b (<u>±</u> DS)	
NO	2008	20h28min	11h08min- 35h43min	0.75 (0.14)
	2010	11h16min	07h27min-22h00min	0.32 (0.10)
PTO	2008	24h50min	21h01min- 28h38min	2.7 (0.37)
	2010	13h27min	08h01min- 21h01min	0.56 (0.10)
TE	2008	15h42min	07h33 min- 23h36min	0.71 (0.16)
	2010	22h28min	13h16min- 26h19min	0.88 (0.16)
Lara	2008	27h 55min	20h02 min- 37h20min	1.43 (0.17)
	2010	15h44 min	12h45min- 19h24 min	1.91 (0.21)
Ureña	2008	25h01min	20h02min- 30h43min	2.24 (0.29)
	2010	36h52min	16h58 min- 80h03 min	0.77 (0.16)

¹Tiempo Letal cincuenta, LC: Límites de Confianza.

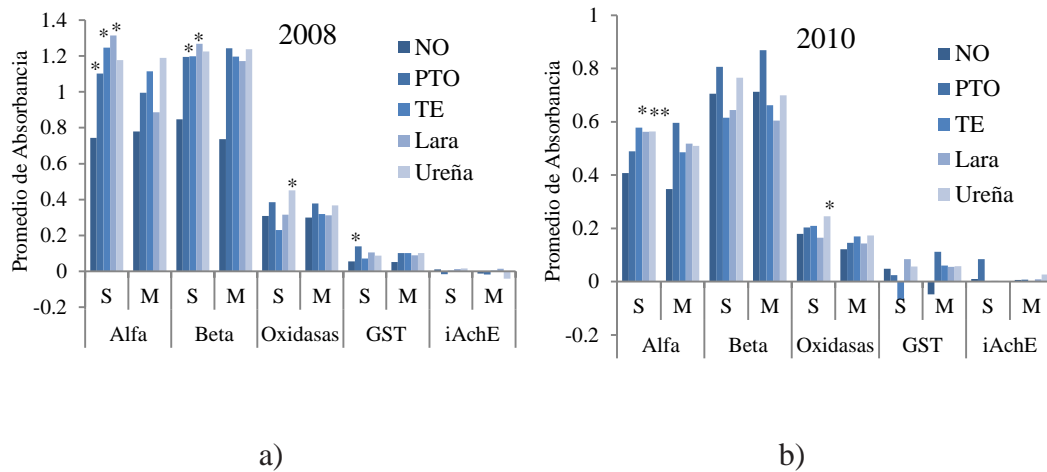
²Pendiente de la línea de regresión Probit-log, desviación estándar (±DS) entre paréntesis.

6.2.3 Mecanismos de Resistencia Enzimática

En la Tabla 9a se muestran los promedios de absorbancia y desviación standard para cada enzima en las sub-poblaciones expuestas al malatión en el 2008. Niveles sobre-expresados de α -esterasas fueron observados en los especímenes supervivientes de las sub-poblaciones PTO, TE y Lara luego de ser expuestos a la CL₉₉ determinada en la cepa NO (30.7 μ g/bot), los cuales fueron significativamente superiores ($p < 0.05$) a los registrados en los muertos de cada sub-población y en los supervivientes de la cepa NO (Fig. 20a). Al evaluar el porcentaje de supervivientes de cada sub-población que excedieron el umbral de resistencia, encontramos que el 100% de ellos excedieron el máximo valor de absorbancia registrado en la cepa NO (0.797), quedando categorizado como un mecanismo alterado. Igualmente, se observaron niveles sobre-expresados de β -esterasas en las poblaciones PTO y Lara, con 100% de supervivientes excediendo el umbral de resistencia (0.966) categorizándose como un mecanismo alterado.

Las MFO se mostraron como un mecanismo incipientemente alterado en la sub-población de Ureña con un 33.3% de los supervivientes excediendo el umbral de resistencia (0.491). Niveles de GST significativamente superiores fueron observados en la sub-población de PTO, categorizándose como un mecanismo alterado con 93.3% de

insectos excediendo el umbral de resistencia (0.118) (Fig. 21). Para el 2010, encontramos sobre-expresión de α -esterasas en las sub-poblaciones TE, Lara y Ureña con más del 80% de los supervivientes excediendo el umbral de resistencia (0.494), así como, MFO en la sub-población Ureña con un 6.7% de supervivientes excediendo el umbral de resistencia (Tabla 9b y Fig 20b).



* promedio significativamente superior ($P < 0.05$) en especímenes supervivientes comparados con los muertos en la misma sub-población y superiores a los supervivientes de la cepa NO.

Figura 20. Niveles enzimáticos en *Aedes aegypti* de Venezuela expuestos al malatión durante los años 2008 y 2010.

Tabla 9. Promedio y Desviación standard de las absorbancias para cada enzima en *Ae. aegypti* expuestas al malatión durante los años 2008-2010.

a) 2008

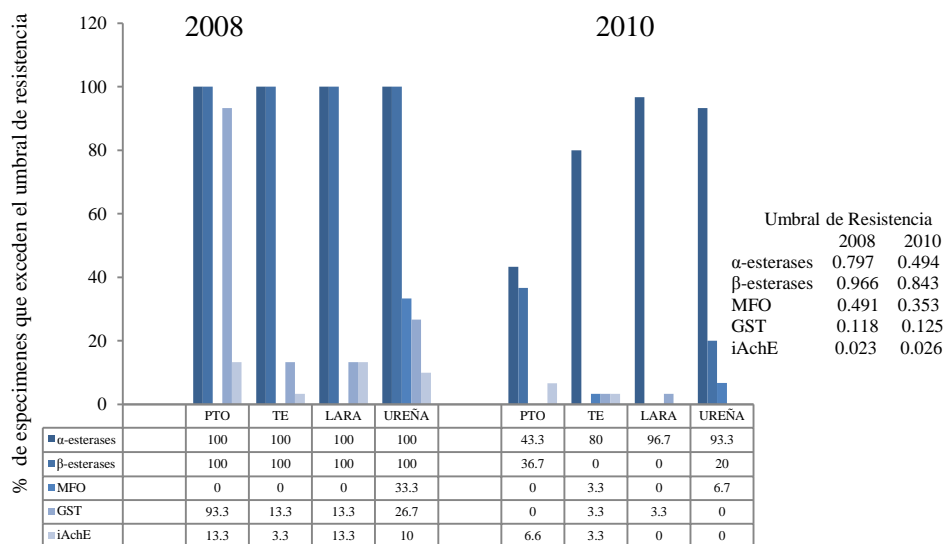
<i>Sub-Población</i>	<i>α-esterasas</i>	<i>β-esterasas</i>	<i>MFO</i>	<i>GST</i>	<i>iAChE</i>
NO S	0.744 (0.033)	0.847 (0.054)	0.308 (0.069)	0.056 (0.018)	0.010 (0.005)
M	0.780 (0.084)	0.737 (0.049)	0.300 (0.072)	0.052 (0.013)	-0.013 (0.030)
PTO S	*1.103 (0.061)	*1.195 (0.025)	0.385 (0.042)	*0.140 (0.025)	-0.016 (0.038)
M	0.969 (0.100)	1.244 (0.027)	0.379 (0.081)	0.101 (0.017)	-0.018 (0.066)
TE S	*1.246 (0.067)	1.198 (0.025)	0.230 (0.045)	0.071 (0.038)	0.003 (0.012)
M	1.115 (0.058)	1.196 (0.034)	0.320 (0.076)	0.102 (0.031)	0.003 (0.026)
Lara S	*1.314 (0.038)	*1.268 (0.091)	0.315 (0.038)	0.106 (0.010)	0.012 (0.012)
M	0.886 (0.048)	1.172 (0.023)	0.313 (0.061)	0.089 (0.031)	0.014 (0.009)
Ureña S	1.178 (0.069)	1.225 (0.022)	*0.451 (0.09)	0.088 (0.049)	0.017 (0.010)
M	1.189 (0.064)	1.238 (0.036)	0.367 (0.088)	0.101 (0.055)	-0.042 (0.063)

b) 2010

Sub-Población		α -esterasas	β -esterasas	MFO	GST	iAChE
NO	S	0.408 (0.043)	0.705 (0.074)	0.179 (0.072)	0.048 (0.018)	0.011 (0.006)
	M	0.348 (0.028)	0.713 (0.080)	0.122 (0.034)	-0.047 (0.067)	0.006 (0.006)
PTO	S	0.489 (0.035)	0.807 (0.073)	0.204 (0.308)	0.024 (0.072)	0.084 (0.002)
	M	0.596 (0.074)	0.869 (0.092)	0.146 (0.022)	0.112 (0.020)	0.008 (0.009)
TE	S	*0.578 (0.088)	0.615 (0.097)	0.209 (0.062)	-0.068 (0.097)	0.0005 (0.020)
	M	0.486 (0.029)	0.662 (0.114)	0.170 (0.059)	0.061 (0.010)	0.0009 (0.035)
Lara	S	*0.562 (0.044)	0.644 (0.076)	0.165 (0.037)	0.084 (0.026)	0.0032 (0.007)
	M	0.518 (0.036)	0.605 (0.087)	0.143 (0.031)	0.056 (0.013)	0.0089 (0.010)
Ureña	S	*0.564 (0.047)	0.766 (0.095)	*0.246 (0.06)	0.057 (0.042)	0.0009 (0.0087)
	M	0.510 (0.047)	0.699 (0.076)	0.173 (0.041)	0.058 (0.018)	0.0270 (0.0071)

S:supervivientes luego de ser expuestos a la CL₅₀ de Malatión, M: muertos luego de ser expuestos.

* promedio significativamente superior (P<0.05) en especímenes supervivientes comparados con los muertos en la misma sub-población y superiores a los supervivientes de la cepa NO.



Alterado: mas 50%, Incipientemente alterado: entre 25 y 50%, No alterado menos >25%

Figura 21. Clasificación de los mecanismos enzimáticos basada en el porcentaje de especímenes supervivientes que exceden el Umbral de Resistencia.

6.3.1 Dosis Knockdown cincuenta (DK₅₀) y Factor de Resistencia al derribo.

En las sub-poblaciones estudiadas, los valores de las DK₅₀ calculados en base a los insectos caídos durante la hora de exposición a la deltametrina oscilaron entre 0.079

$\mu\text{g}/\text{bot}$ y $0.115 \mu\text{g}/\text{bot}$ para el año 2008, observando el mayor valor en la sub-población Tres Esquinas seguido por el correspondiente valor para las sub-poblaciones Ureña, Lara y Pampanito los cuales no fueron diferentes entre ellos debido al traslape de los límites de confianza, pero sí con los obtenidos en la cepa susceptible, New Orleans.

Al calcular los valores de los FR_{DK50} por comparación con la cepa New Orleans obtuvimos valores de 4.9 para la sub-población Pampanito mostrando baja resistencia al derribo y valores entre 5 y 10 en las sub-poblaciones Tres Esquinas, Lara y Ureña mostrando moderada resistencia al derribo.

Para el año 2010 se registró aumento significativo en los valores de la DK_{50} para las sub-poblaciones Lara ($0.216 \mu\text{g}/\text{bot}$) y Ureña ($0.285 \mu\text{g}/\text{bot}$) con valores para los FR_{DK50} de 7.7 y 10.2 respectivamente, mostrando moderada resistencia al derribo en la sub-población Lara y alta resistencia al derribo en la sub-población Ureña. En contraste, las sub-poblaciones Pampanito y Tres Esquinas no experimentaron cambios significativos para el 2010, con valores de FR_{DK50} inferiores a 5 (Tabla 10).

Tabla. 10 Dosis Knockdown cincuenta y Factor de Resistencia al derribo en *Ae. aegypti* de Venezuela con deltametrina durante los años 2008 y 2010.

Sub-Población	Año de Recoleta	DK_{50} $\mu\text{g}/\text{bot}$	LC	Pendiente (DS)	FR_{DK50}
NO	2008	0.016	0.012-0.022	1.15 (0.12)	
	2010	0.028	0.021-0.034	1.42 (0.17)	
PTO	2008	0.079	0.071-0.087	2.77 (0.38)	4.9
	2010	0.099	0.086-0.114	2.05 (0.25)	3.5
TE	2008	0.115	0.105-0.127	3.06 (0.34)	7.2
	2010	0.125	0.107-0.147	1.81 (0.19)	4.5
Lara	2008	0.083	0.077-0.090	4.33 (0.61)	5.2
	2010	0.216	0.193-0.243	2.03 (0.25)	7.7
Ureña	2008	0.110	0.068-0.176	1.33 (0.35)	6.9
	2010	0.285	0.249-0.326	1.63 (0.18)	10.2

DK_{50} : Dosis Knockdown cincuenta LC: Límites de Confianza.

FR_{DK50} : Factor de Resistencia.

6.3.2 Concentración Letal cincuenta y Factor de Resistencia

Los valores de las CL_{50} para deltametrina en las sub-poblaciones evaluadas estuvieron comprendidos entre 0.031 $\mu\text{g}/\text{bot}$ y 0.072 $\mu\text{g}/\text{bot}$ para el año 2008, observándose el menor valor en la sub-población Ureña, el cual fue diferente significativamente a los valores del resto de las sub-poblaciones. Al determinar los $FR_{CL_{50}}$ se obtuvieron valores de 6.6, 9.0 y 9.0 para las sub-poblaciones Pampanito, Tres Esquinas y Lara mostrando moderada resistencia al piretroide, en contraste, la sub-población de Ureña mostró baja resistencia ($FR_{CL_{50}}$ 3.9). Todos los valores de DK_{50} en las sub-poblaciones estudiadas fueron significativamente superiores a los obtenidos en la cepa NO. Para el 2010 los valores de la CL_{50} se incrementaron significativamente ($p < 0.05$) en todas las sub-poblaciones, oscilando entre 0.140 $\mu\text{g}/\text{bot}$ y 0.294 $\mu\text{g}/\text{bot}$ mostrando la sub-población Pampanito moderada resistencia ($FR_{CL_{50}}$ 9.3) y las sub-poblaciones Tres Esquinas, Lara y Ureña alta resistencia a la deltametrina ($FR_{CL_{50}} > 10$). El valor de la CL_{50} en la sub-población de Ureña aumentó 9 veces para el año 2010 mostrando la rápida evolución de la resistencia post-recuperación a la deltametrina en esta sub-población, en comparación con las restantes sub-poblaciones (Tabla 11).

Tabla 11. Concentración Letal cincuenta y Factor de Resistencia en *Ae. aegypti* de Venezuela con deltametrina durante los años 2008 y 2010.

Sub-Población	Año de Recolecta	CL_{50} $\mu\text{g}/\text{bot}$	LC	Pendiente (DS)	$FR_{CL_{50}}$
NO	2008	0.008	0.006-0.013	1.27 (0.14)	
	2010	0.015	0.013-0.021	1.02 (0.13)	
PTO	2008	0.053	0.048-0.059	3.09 (0.39)	6.6
	2010	0.140	0.125-0.147	2.67 (0.31)	9.3
TE	2008	0.052	0.059-0.088	1.3 (0.19)	9.0
	2010	0.203	0.179-0.273	1.79 (0.23)	13.5
Lara	2008	0.072	0.066-0.079	2.9 (0.45)	9.0
	2010	0.279	0.245-0.317	1.87 (0.24)	18.6
Ureña	2008	0.031	0.022-0.045	0.73 (0.13)	3.9
	2010	0.294	0.255-0.339	1.53 (0.18)	19.6

CL_{50} : Concentración Letal cincuenta, LC: Límites de Confianza

$FR_{CL_{50}}$: Factor de Resistencia

Al comparar los valores de DK_{50} y CL_{50} se puede observar que los valores de las DK_{50} para las sub-poblaciones Pampanito, Tres Esquinas y Ureña en el 2008 fueron superiores a los valores de CL_{50} , debido a bajos porcentajes de recuperación a los 60 minutos de exposición (0%, 0.56%, 0% respectivamente) indicando mayor eficiencia de la deltametrina a las 24 horas, por el contrario, para el 2010 los valores de CL_{50} fueron superiores a los valores de las DK_{50} en las sub-poblaciones Pampanito, Tres Esquinas y Lara cuyos porcentajes de recuperación fueron 9.7%, 12.8%, 9.3% respectivamente, necesiéndose mayor cantidad de deltametrina para matar a los insectos caídos. En la sub-población Ureña no se encontró diferencia entre ambos valores.

6.3.3 Tiempo Knockdown cincuenta (TK_{50})

En la Tabla 12 se muestran los valores de TK_{50} obtenidos con deltametrina en las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* de tres estados venezolanos para el 2008 y 2010. Los valores de TK_{50} estuvieron comprendidos entre los 45 y 53 minutos en las sub-poblaciones Pampanito, Lara y Ureña en el 2008 y la cepa susceptible NO, los cuales fueron calculados a la concentración de 0.08 $\mu\text{g}/\text{bot}$ en Pampanito y Lara, 0.07 $\mu\text{g}/\text{bot}$ para Ureña y 0.025 $\mu\text{g}/\text{bot}$ en la cepa NO y no mostraron diferencia entre ellos, según el traslape de los límites de confianza. En la sub-población de Tres Esquinas obtuvimos un menor valor (33 minutos) diferente a los encontrados en el resto de las sub-poblaciones utilizando para su determinación una mayor concentración (0.2 $\mu\text{g}/\text{bot}$). Para el 2010 observamos que los valores de TK_{50} estuvieron comprendidos entre 37 y 53 minutos a la dosis de 0.15 $\mu\text{g}/\text{bot}$ para la población Pampanito, 0.2 $\mu\text{g}/\text{bot}$ para Tres Esquinas, 0.25 $\mu\text{g}/\text{bot}$ para Lara y 0.4 $\mu\text{g}/\text{bot}$ en Ureña, encontrándose el menor valor en las sub-poblaciones Pampanito y Ureña las no fueron diferentes entre ellas, pero si con las sub-poblaciones Tres Esquinas y Lara. Igualmente a lo observado para el 2008 el valor de TK_{50} para la cepa NO fue similar al resto de las sub-poblaciones evaluadas con la diferencia que la concentración utilizada para su determinación fue más baja (0.05 $\mu\text{g}/\text{bot}$).

Al comparar los valores de TK_{50} de cada sub-población en ambos períodos de investigación podemos observar diferentes patrones de comportamiento. En las sub-poblaciones Pampanito y Ureña los valores de TK_{50} fueron superiores para el 2008 con

respecto a los obtenidos en el 2010 usando para su determinación menores concentraciones en el 2008 que en el 2010, lo cual es congruente, a menor concentración mayor es el tiempo necesario para derribar a los insectos. En la sub-población Tres Esquinas el valor de TK₅₀ fue menor en el 2008 aunque fueron utilizadas las mismas concentraciones en ambos años y en la sub-población de Lara no se encontró diferencia significativa entre estos parámetros en ambos periodos de evaluación aunque en el 2008 la concentración usada fue inferior (Fig. 22).

Tabla 12 Valores de TK₅₀ obtenidos en *Ae. aegypti* de Venezuela a la concentración más cercana a los valores de DK₅₀ con deltametrina.

Sub-Población		¹ (TK ₅₀) Horas:minutos	² LC	³ b (±DS)
NO	2008	0:51	0:45-0:57	2.1 (0.28)
	2010	0:45	0:38-0:47	2.8 (0.16)
PTO	2008	0:50	0:45-0:55	2.8 (0.38)
	2010	0:37	0:33-0:40	2.9 (0.35)
TE	2008	0:33	0:31-0:36	3.1 (0.28)
	2010	0:48	0:44-0:53	1.7 (0.20)
Lara	2008	0:53	0:47-0:60	2.8 (0.44)
	2010	0:53	0:48-0:59	2.3 (0.24)
Ureña	2008	0:45	0:42-0:48	3.4 (0.39)
	2010	0:36	0:33-0:41	1.72 (0.24)

¹Tiempo Knockdown cincuenta, ² Límites de Confianza. ³b: pendiente de recta de regresión.

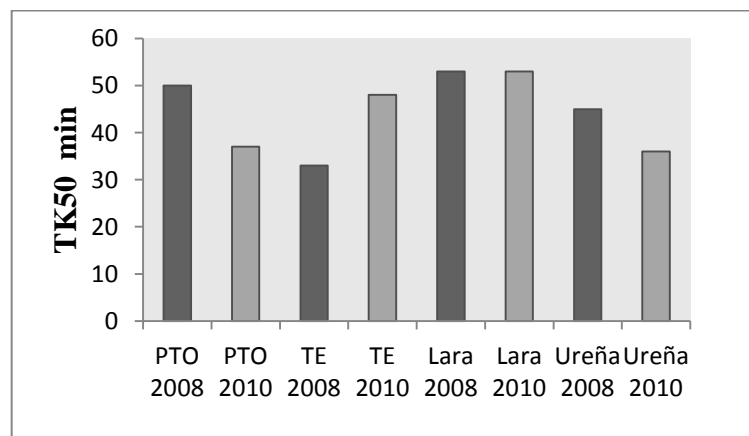


Figura 22. Tiempos Knockdown cincuenta (TK₅₀) en *Ae. aegypti* de Venezuela con deltametrina durante los años 2008 y 2010.

6.3.4 Tiempo Letal cincuenta (TL₅₀)

Los valores de TL₅₀ para el 2008 estuvieron comprendidos entre 3 horas 40 minutos y 8h 41 min en las sub-poblaciones Pampanito, Tres Esquinas y Ureña los cuales no mostraron ser diferentes entre sí ya que los límites de confianza se traslapan. Estos valores fueron determinados a la concentración de 0.065 µg/bot para Pampanito, 0.08 para Tres Esquinas y 0.05 para Ureña. En contraste, en la sub-población Lara se obtuvo el menor Tiempo Letal cincuenta (1h 37 minutos) a una concentración de 0.08 µg/bot el cual no fue diferente al obtenido en la cepa susceptible NO teniendo en consideración que esta concentración fue 10 veces mayor que la utilizada con la cepa NO (0.008 µg/bot).

Para el 2010 las sub-poblaciones Pampanito, Tres Esquinas y Lara no mostraron diferencias entre ellas en los valores de TL₅₀ oscilando entre 1h 06min y 1hora 27 minutos, los cuales fueron calculados a la concentración 0.15 µg/bot, 0.25 µg/bot y 0.3 µg/bot respectivamente. En la cepa New Orleans obtuvimos un valor de TL₅₀ de 3 h 02 minutos a la concentración 0.025 µg/bot, 6 veces más baja que la menor concentración utilizada para determinar las TL₅₀ en las sub-poblaciones de campo. El mayor valor para el TL₅₀ se obtuvo en la sub-población Ureña y correspondió a 21h 16 minutos a una concentración de 0.2 µg/bot, necesitándose mayor tiempo de exposición para lograr matar a los insectos de esta sub-población si se compara con el tiempo necesitado para matar a los insectos de las restantes sub-poblaciones donde se utilizaron concentraciones muy similares (Tabla 13).

Al comparar los valores de TL₅₀ de cada sub-población en ambos períodos de investigación se observó que en las sub-poblaciones Pampanito y Tres Esquinas los valores de TL₅₀ fueron superiores para el 2008 con respecto al 2010 usando para su determinación concentraciones inferiores en el 2008, en contraste, en la sub-población Ureña encontramos que el valor de TL₅₀ fue menor en el 2008 a una concentración 4 veces más baja que la utilizada para el 2010. En la sub-población Lara no se encontró diferencia significativa en ambos periodos aunque la concentración utilizada en el 2008 fue inferior a la del 2010 (Fig. 23).

Tabla 13 Valores de TL₅₀ obtenidos en *Ae. aegypti* de Venezuela a la concentración más cercana a los valores de CL₅₀ con deltametrina.

Sub-Población		¹ (TL ₅₀) Horas:minutos	LC	² b (±DS)
NO	2008	1:53	1:17-2:12	1.0 (0.08)
	2010	3:02	2:03-4:09	1.4 (0.16)
PTO	2008	3:40	2:39-5:02	0.7 (0.09)
	2010	1:27	1:05-1:58	0.5 (0.06)
TE	2008	5:15	4:07-6:59	0.8 (0.07)
	2010	1:27	1:12-1:41	0.9 (0.02)
Lara	2008	1:37	1:17-2:00	0.9 (0.09)
	2010	1:06	0:46-1:34	0.5 (0.07)
Ureña	2008	8:41	5:58-12:45	0.7 (0.05)
	2010	21:16	11:53-23:35	0.6 (0.07)

¹Tiempo Letal cincuenta, ²b: pendiente de la recta de regresión. LC: Límites de Confianza.

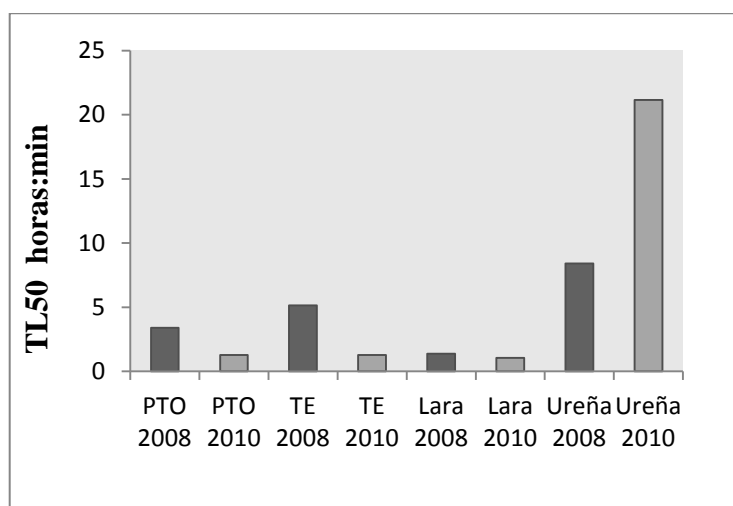


Fig. 23 Tiempos Letales cincuenta (TL₅₀) en *Ae. aegypti* de Venezuela con deltametrina durante los años 2008 y 2010.

6.3.5 Mecanismos de Resistencia Enzimática

6.3.5.1 Enzimas seleccionadas con CL₅₀

En la Tabla 14a y Figura 24a se muestran los promedios y desviación standard de los cinco sistemas enzimáticos evaluados: α -esterasas, β -esterasas, MFO, GST y iAChE para el 2008, así como el porcentaje de especímenes supervivientes que exceden el

umbral de resistencia determinado en la cepa New Orleans. Luego de exponer las sub-poblaciones a los respectivos valores de CL₅₀ con deltametrina, se encontraron niveles de GST superiores en hembras supervivientes de la sub-población Lara con respecto a las muertas y a la vez superiores a los niveles encontrados en las hembras supervivientes de la cepa New Orleans con un 86.7% de estos especímenes excediendo el umbral de resistencia siendo categorizado como un mecanismo enzimático alterado (A) según Montella et al., (2007) (Fig. 25). Niveles sobre-expresados de iAChE fueron registrados en hembras supervivientes de la sub-población Ureña con un 3.3% de los especímenes rebasando el umbral de resistencia quedando categorizado como un mecanismo no alterado (NA).

Para el 2010, sobre-expresión de MFO se registró en los supervivientes de la sub-población Tres Esquinas con 23.3% de los especímenes excediendo el umbral de resistencia (mecanismo incipientemente alterado). En las sub-poblaciones Pampanito y Tres Esquinas se observaron niveles sobre-expresados de GST con 100% de sobrevivientes excediendo el umbral (mecanismo alterado) y así como, iAChE en las sub-poblaciones Pampanito, Lara y Ureña con 0%, 50% y 3.3% respectivamente (Tabla 14b y Fig. 24b).

Tabla 14. Promedio y Desviación standard de las absorbancias para cada enzima en *Ae. aegypti* de Venezuela expuestas a la CL₅₀ con deltametrina.

a) 2008

Sub-Población		α -esterasas	β -esterasas	MFO	GST	iAChE
NO	S	0.766 (0.086)	0.948 (0.090)	0.433 (0.084)	0.051 (0.009)	-0.036 (0.043)
	M	0.775 (0.054)	0.987 (0.092)	0.334 (0.059)	0.020 (0.051)	0.004 (0.002)
PTO	S	0.661 (0.025)	0.895 (0.092)	0.242 (0.046)	0.095 (0.022)	-0.104 (0.037)
	M	0.779 (0.035)	0.763 (0.096)	0.226 (0.047)	0.092 (0.021)	0.018 (0.016)
TE	S	0.806 (0.046)	0.814 (0.101)	0.191 (0.045)	0.064 (0.014)	0.011 (0.008)
	M	0.683 (0.057)	0.736 (0.055)	0.205 (0.040)	0.062 (0.015)	0.004 (0.002)
Lara	S	0.743 (0.056)	1.029 (0.082)	0.285 (0.052)	*0.098 (0.021)	0.012 (0.006)
	M	0.821 (0.110)	1.132 (0.119)	0.273 (0.054)	0.0005 (0.038)	-0.001 (0.006)
Ureña	S	0.778 (0.098)	0.955 (0.091)	0.325 (0.082)	0.008 (0.021)	*0.001 (0.006)
	M	0.794 (0.135)	0.941 (0.105)	0.277 (0.091)	0.050 (0.036)	-0.043 (0.069)

b) 2010

Sub-Población		α -esterasas	β -esterasas	MFO	GST	iAChE
NO	S	0.674 (0.502)	1.100 (0.984)	0.192 (0.053)	-0.039 (0.061)	-0.116 (0.078)
	M	0.809 (0.045)	0.981 (0.118)	0.233 (0.063)	-0.004 (0.038)	0.011 (0.008)
PTO	S	0.693(0.114)	0.791 (0.139)	0.209 (0.090)	*0.378 (0.087)	*0.009 (0.009)
	M	0.720 (0.060)	0.802 (0.099)	0.189 (0.076)	-0.014 (0.036)	-0.018 (0.044)
TE	S	0.755 (0.101)	0.858 (0.132)	*0.325 (0.095)	*0.631 (0.077)	0.006 (0.022)
	M	0.917 (0.106)	0.924 (0.111)	0.253 (0.104)	0.039 (0.014)	-0.030 (0.066)
Lara	S	0.636 (0.087)	0.925 (0.169)	0.175 (0.062)	0.023 (0.021)	*0.036 (0.054)
	M	0.657 (0.055)	0.911 (0.066)	0.289 (0.088)	0.019 (0.197)	-0.106 (0.071)
Ureña	S	0.555 (0.045)	0.939 (0.051)	0.123 (0.025)	0.030 (0.007)	*0.010 (0.012)
	M	0.769 (0.064)	0.905 (0.702)	0.134 (0.095)	0.024 (0.013)	-0.170 (0.057)

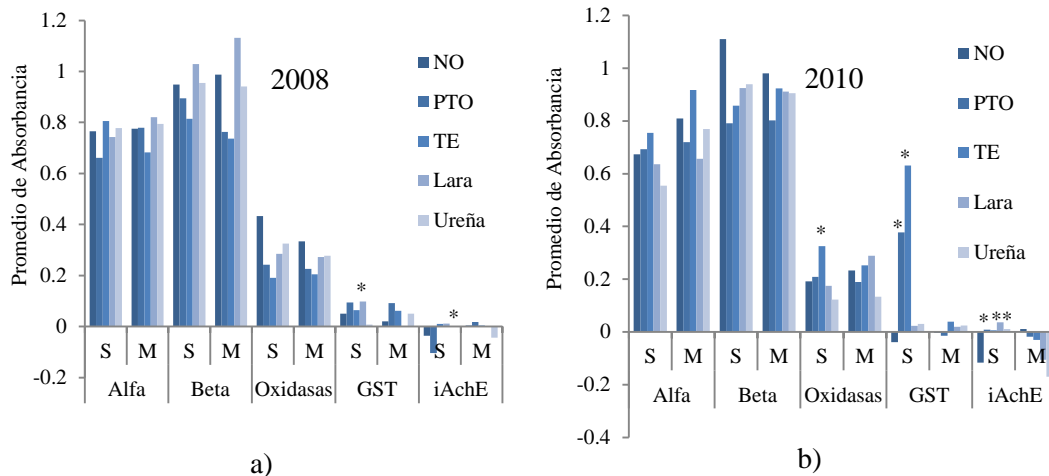
S:supervivientes, M: muertos luego de ser expuestos a la CL₅₀ de deltametrina.

* promedio significativamente superior (P<0.05) en especímenes supervivientes comparados con los muertos en la misma sub-población y superiores a los supervivientes de la cepa NO.

Tabla 15. Regresión Lineal y R² entre los valores de CL₅₀ y los niveles de enzimas (promedio de absorbancia) en hembras de *Ae. aegypti* supervivientes luego de ser expuestas a la deltametrina.

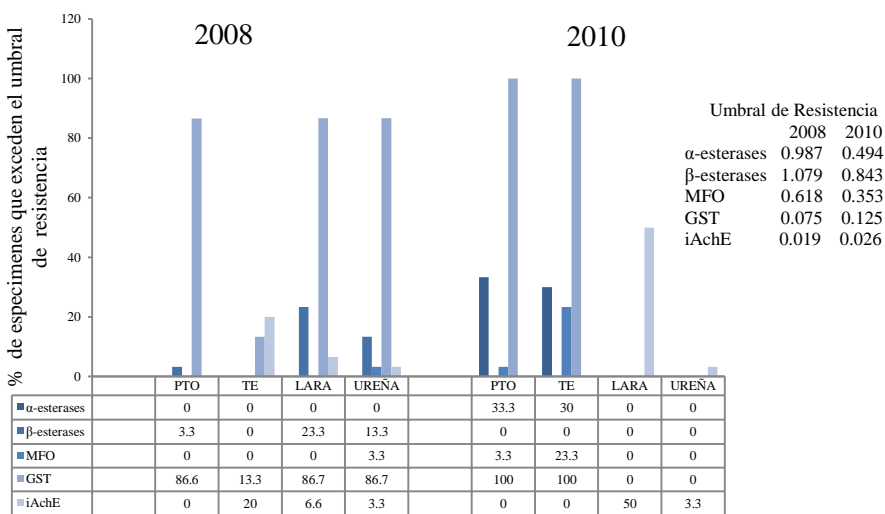
Enzima	2008		2010	
	Coefficiente de Determinación	Significancia	Coefficiente de Determinación	Significancia
	R ²		R ²	
α -esterasas	0.004	0.920	0.222	0.424
β -esterasas	0.039	0.751	0.198	0.453
MFO	0.791	0.044*	0.050	0.719
GST	0.359	0.286	0.002	0.950
iAChE	0.063	0.685	0.771	0.050

* P<0.05



* promedio significativamente superior ($P < 0.05$) en especímenes supervivientes comparados con los muertos en la misma sub-población y superiores a los supervivientes de la cepa NO.

Figura 24. Niveles enzimáticos en *Aedes aegypti* de Venezuela expuestos a la CL₅₀-deltametrina durante los años 2008 y 2010.



Alterado: mas de 50%, Incipientemente alterado: entre 25 y 50, No alterado: menos de 25%

Figura 25. Clasificación de los mecanismos enzimáticos basada en el porcentaje de especímenes supervivientes que exceden el Umbral de Resistencia.

6.3.5.2 Enzimas seleccionadas con DK₅₀

Las sub-poblaciones de campo en el año 2010 fueron expuestas a las DK₅₀-deltametrina y determinados los niveles de enzimas detoxificativas en hembras que no fueron derribadas luego de 1h de exposición, las que se recuperaron a las 4h y las supervivientes y muertas a las 24 horas. En las sub-poblaciones Pampanito, Tres Esquinas y Ureña se observó que los niveles de alfa-esterasas se incrementaron significativamente entre las 4 h y 24 horas post-exposición, sin diferencia con los niveles obtenidos en la cepa susceptible NO. En la sub-población Lara no se observaron diferencias significativas entre los niveles enzimáticos a los diferentes horarios ni con los obtenidos en la cepa NO.

Con respecto a las beta-esterasas, en las sub-poblaciones Pampanito, Lara y Ureña se observó incremento significativo en las hembras supervivientes a las de 24 horas post-exposición, siendo diferentes significativamente a los obtenidos en la cepa susceptible NO; al comparar estos resultados con los observados en las muertas a las 24h se encontró que solo en la sub-población Ureña los niveles en los supervivientes a las 24h fueron superiores significativamente. En Tres Esquinas no hubo diferencia entre los niveles enzimáticos expresados en la sub-población en los diferentes horarios ni con los de la cepa NO.

Niveles incrementados de MFO fueron encontrados en hembras supervivientes de las sub-poblaciones Lara y Ureña los cuales fueron significativamente superiores a los obtenidos en las hembras muertas solo en la sub-población Ureña y al compararlos con los obtenidos en los supervivientes de la cepa NO no se encontró diferencia entre ellos.

En las sub-poblaciones Pampanito y Ureña los niveles de GST se comportaron similar a las otras enzimas, aumentando entre 4 h y 24 h post-exposición sin diferencia con los niveles expresados en las muertas pero superiores a niveles encontrados en las supervivientes de la cepa NO. En todas las sub-poblaciones estudiadas no se encontraron diferencias entre los niveles de iAChE incluyendo a los obtenidos en la cepa NO (Tabla 16 y Fig. 26).

En base a los resultados obtenidos podemos sugerir que las sub-poblaciones estudiadas presentan un patrón de comportamiento similar en la expresión enzimática luego de ser expuestas a la DK₅₀-deltametrina, incrementándose o activándose entre 4 h

y 24h posteriores a la exposición con el insecticida. Análisis de regresión lineal fueron llevados para conocer el grado de asociación entre los niveles enzimáticos y las DK_{50} a las cuales fueron expuestas las sub-poblaciones, no encontrándose en ningún caso alta correlación en base al valor de la R^2 para cada enzima (Tabla 17), por lo que no se asoció la sobre-expresión enzimática con la resistencia al derribo.

Tabla 16. Promedio y Desviación standard de las absorbancias para cada enzima en *Ae. aegypti* de Venezuela expuestas a la DK_{50} con deltametrina.

Sub-población		α -esterasas (DS)	β -esterasas (DS)	MFO (DS)	GST (DS)	iAChE (DS)
NO	1h	0.775 (0.045)	0.732(0.054)	0.118(0.034)	-0.018 (0.087)	-0.025 (0.006)
	4h	0.881 (0.676)	0.797 (0.094)	0.114(0.030)	-0.046(0.033)	*0.010(0.006)
	24S	0.893 (0.043)	0.680 (0.060)	*0.247 (0.100)	-0.062 (0.057)	0.008 (0.005)
	24M	0.929 (0.098)	0.618 (0.047)	0.155 (0.029)	0.043 (0.009)	-0.004 (0.018)
PTO	1h	0.735 (0.044)	0.690 (0.064)	°0.183 (0.059)	°0.041 (0.010)	0.003 (0.006)
	4h	0.726 (0.058)	0.660 (0.078)	0.171 (0.041)	-0.015 (0.035)	0.007 (0.189)
	24S	*0.896 (0.132)	* °0.780 (0.079)	0.182 (0.057)	* °0.042 (0.012)	-0.017 (0.098)
	24M	0.817 (0.058)	0.771 (0.088)	0.189 (0.053)	0.0361 (0.008)	0.008 (0.011)
TE	1h	0.473 (0.042)	0.749 (0.082)	0.134 (0.036)	°0.035 (0.007)	-0.022 (0.058)
	4h	*0.716 (0.074)	0.694 (0.065)	0.151 (0.054)	°0.037 (0.007)	0.007 (0.011)
	24S	*0.885 (0.112)	0.694 (0.053)	0.186 (0.080)	°0.034 (0.013)	-0.015 (0.029)
	24M	0.760 (0.013)	0.755 (0.065)	*0.128 (0.035)	0.029 (0.010)	0.007 (0.006)
Lara	1h	0.752 (0.066)	0.600 (0.056)	°0.175 (0.057)	°0.034 (0.011)	0.001 (0.013)
	4h	0.762 (0.084)	*0.748 (0.097)	°0.211 (0.061)	°0.037 (0.010)	0.003 (0.013)
	24S	0.719 (0.054)	*°0.819 (0.067)	*0.283 (0.120)	°0.038 (0.010)	0.009 (0.008)
	24M	0.747 (0.055)	0.835 (0.101)	0.195 (0.071)	0.029 (0.010)	0.003 (0.009)
Ureña	1h	°0.874 (0.078)	0.799 (0.074)	°0.220 (0.036)	°0.046 (0.009)	°0.01 (0.005)
	4h	0.835 (0.100)	0.745 (0.069)	0.186 (0.044)	-0.016 (0.070)	0.003 (0.020)
	24S	*0.954 (0.120)	*°1.021 (0.121)	*0.218 (0.061)	*°0.038 (0.009)	-0.05 (0.090)
	24M	*°1.152 (0.187)	°0.755 (0.058)	0.149 (0.038)	°0.008 (0.047)	0.011(0.006)

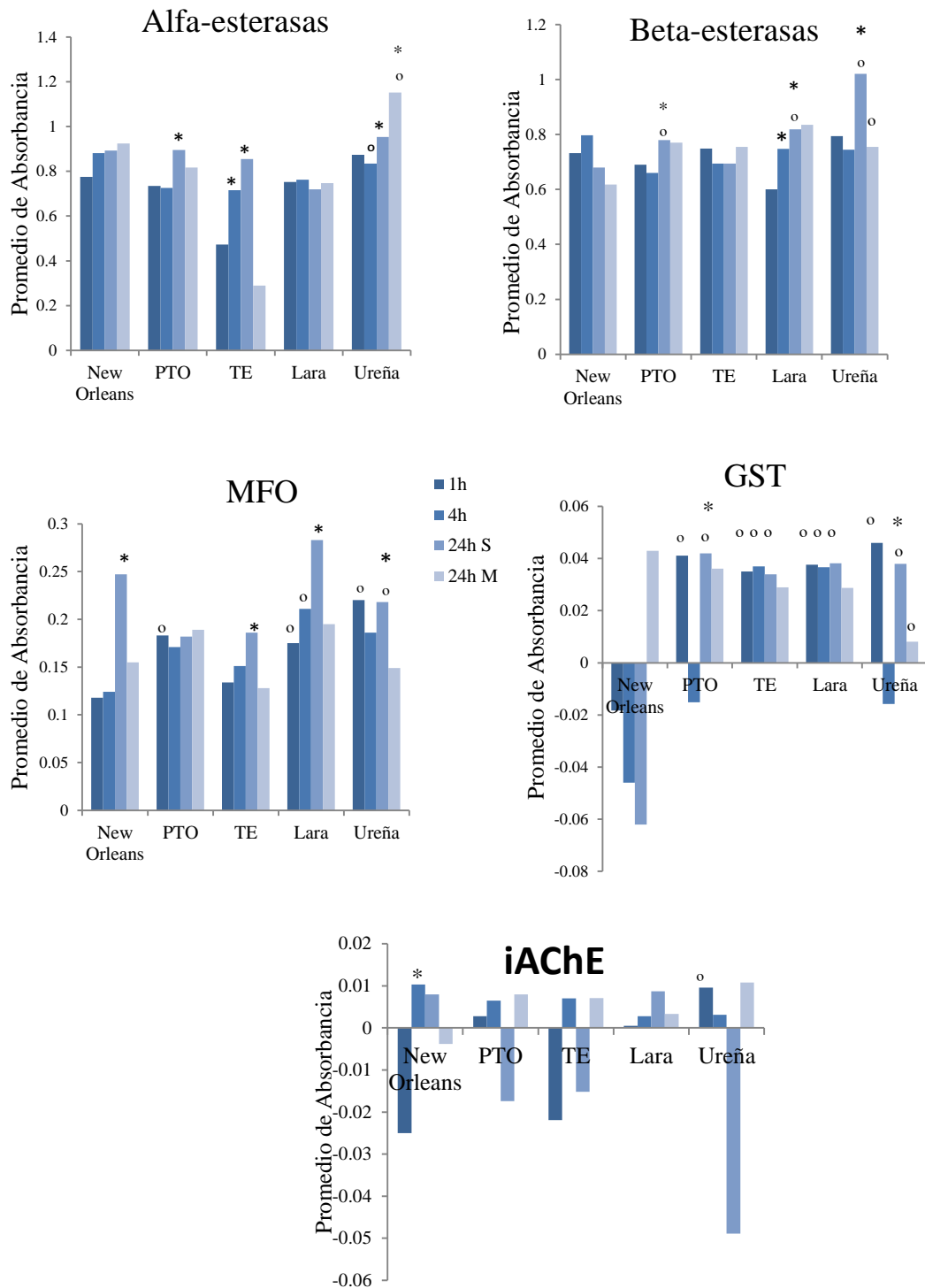
* promedio significativamente superior ($P<0.05$) entre especímenes de la misma sub-población.

° promedio significativamente superior ($P<0.05$) con respecto a los supervivientes de la cepa NO.

Tabla 17. Regresión Lineal y R^2 entre los valores de DK_{50} y los niveles de enzimas (promedio de absorbancia) en hembras de *Ae. aegypti* de Venezuela.

Enzima		R^2	Significancia
Alfa-esterasas	1h	0.006	0.901
	4h	0.127	0.557
	24S	0.006	0.676
	24M	0.015	0.842
Beta-esterasas	1h	0.007	0.895
	4h	0.007	0.896
	24S	0.524	0.167
	24M	0.697	0.079
MFO	1h	0.534	0.161
	4h	0.743	0.060
	24S	0.013	0.856
	24M	0.007	0.897
GST	1h	0.732	0.065
	4h	0.431	0.229
	24S	0.683	0.085
	24M	0.706	0.075
iAChE	1h	0.468	0.203
	4h	0.431	0.229
	24S	0.242	0.400
	24M	0.529	0.164

En la sub-población Ureña se encontraron niveles sobre-expresados de Beta-esterasas superiores significativamente en hembras supervivientes que en las muertas y a superiores a los niveles encontrados en la cepa NO y al evaluar el grado de asociación estos niveles enzimáticos y el valor de la DK_{50} , se encontró baja correlación entre ambas variables (R^2 0.524 sig. 0.167) por lo que se infiere que la DK_{50} no induce a la sobre-expresión de las Beta-esterasas.



S: supervivientes M: muertas, *Promedio significativamente ($P < 0.05$), °Promedio superior ($P < 0.05$) con respecto a NO.

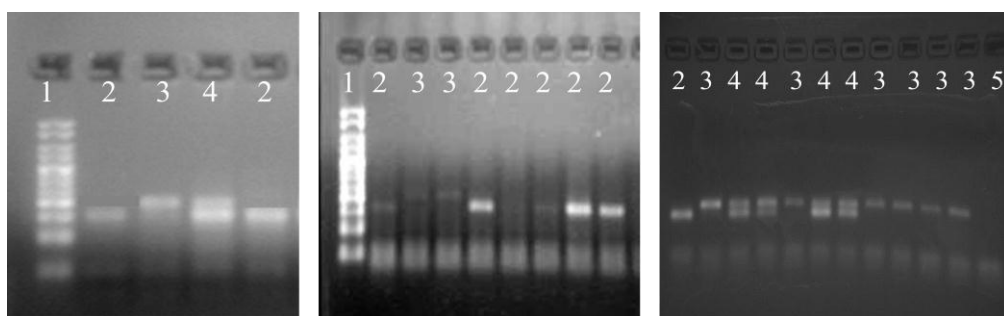
Figura 26. Niveles enzimáticos en *Ae. aegypti* de Venezuela luego de ser expuestos a la DK_{50} -deltametrina durante los años 2008 y 2010.

6.3.6 Mecanismo de Resistencia *kdr*

6.3.6.1 Frecuencia de la mutación *Ile1,016* en sub-poblaciones naturales de *Aedes aegypti* de Venezuela.

Los productos de PCR alelo-específico para el sistema *Val1,016Ile* fueron fragmentados por electroforesis en geles de agarosa al 3% disuelto en buffer TBE 1X, detectando al alelo silvestre G/G (*Val1,016/Val1,016*) el cual correspondió a una banda de 98 pb y al alelo mutante A/A (*Ile1,016/Ile1,016*) a una banda de 78pb tal como se muestra en Figura 26. Ambas bandas se detectaron en los mosquitos heterocigotos *Val1,016/Ile1,016*.

La sub-población Pampanito en el 2008 y en el 2010 no presentó homocigotos mutantes *Ile1,016Ile1,016* en ambos períodos de investigación con predominio del genotipo homocigoto silvestre *Val1,1016/Val1,016* (96%), así como en las sub-poblaciones Tres Esquinas y Lara 2010 con 97% y 85% respectivamente. En contraste, en las sub-poblaciones Lara 2008 y Ureña 2010 se observaron homocigotos mutantes con 18% y 6.6% respectivamente. En todas las sub-poblaciones se presentaron heterocigotos *Val1,016/Ile1,016* en diferente proporción. En la tabla 18 se muestran los valores de las frecuencias del alelo *Ile1,016* en las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* de Venezuela registrándose la mayor frecuencia en la sub-población Lara 2008 con un valor de 0.37, seguida por la sub-población Ureña 2010 con una frecuencia de 0.23, Lara 2010 con 0.07, Pampanito 2008-2010 con 0.02 y Tres Esquinas 2010 con 0.01.



1. Marcador de Peso Molecular de 25-500 pb
2. Genotipo homocigoto mutante *Ile1,016/Ile1,1016* (IMU5) .
3. Genotipo homocigoto silvestre *Val1,016/Val1,106* (New Orleans)
4. Genotipo heterocigoto *Val1.016/Ile1.016*.
5. Control negativo (Agua Ultrapurificada)

Fig. 27. Geles de agarosa al 3% mostrando los genotipos de la mutación *Ile1,016* en *Ae. aegypti* de Venezuela.

Tabla 18 Genotipos y frecuencia del alelo *Ile*/1,016 en *Aedes aegypti* de Venezuela.

Sub-población	Año de Colección	N	A/A	A/G	G/G	Frecuencia alélica <i>Ile</i> 1,016
Pampanito	2008	27	0	1	26	0.02
	2010	33	0	1	32	0.02
Tres Esquinas	2010	36	0	1	35	0.01
Lara	2008	38	7	14	17	0.37
	2010	34	0	5	29	0.07
Ureña	2010	15	1	5	9	0.23

N: Número de mosquitos evaluados

G/G: genotipo *Val*1,016/*Val*1,016, A/G: *Val*1,016/*Ile*1,016 y A/A: *Ile*1,016/*Ile*1,016.

Nuestros resultados muestran que la frecuencia alélica *Ile*1,016 en la sub-población Pampanito no experimentó cambios para el 2010, lo cual concuerda con los resultados obtenidos mediante bioensayos, evidenciando que la resistencia al derribo no evolucionó para el 2010 con valores similares de las DK_{50} y FR_{DK50} menores a 5. Con respecto a la sub-población Lara, se observó incongruencia entre los resultados obtenidos mediante bioensayos y las frecuencias alélicas en 2008 y 2010, ya que la mayor frecuencia alélica fue encontrada en el 2008 y la mayor DK_{50} en el 2010, si evaluamos los valores de FR_{DK50} en ambos períodos de investigación tenemos que estos están comprendidos entre 5 y 10 correspondiendo a moderada resistencia al derribo asociada con la presencia del genotipo heterocigoto de la mutación *Ile*1,016. En contraste, la sub-población Ureña en la cual se observó mayor resistencia al derribo para el 2010 (FR_{DK50} 19.6) se encontró la mayor frecuencia alélica para este período mostrando correlación entre los bioensayos y las pruebas moleculares.

Todas las sub-poblaciones estuvieron en equilibrio genético para el locus estudiado según la Ley de Hardy-Weinberg con base en la prueba de χ^2 de Pearson, ya que los valores calculados fueron inferiores al valor tabulado (3.84). Al determinar los coeficientes de endogamia (F_{IS}) se obtuvieron valores de menores a 0 en las sub-poblaciones Pampanito 2008 y 2010 y Tres Esquinas 2008, en contraste con lo encontrado en las sub-poblaciones Lara 2008 y 2010 y Ureña 2010 donde los valores de F_{IS} fueron superiores a 0 (Tabla 19).

Tabla 19. Frecuencia del alelo *Ile1,016*, intervalos de confianza 95% y coeficientes de endogamia en sub-poblaciones naturales de *Ae. aegypti* de Venezuela.

<i>Sub-población</i>		<i>Frecuencia Ile1,016</i>	<i>Wald 95% CI</i>	<i>F_{IS}</i>
Pampanito	2008	0.02	-0.02 / 0.18	-0.02
	2010	0.02	-0.02 / 0.18	-0.02
Tres Esquinas	2010	0.01	-0.01 / 0.14	-0.01
Lara	2008	0.37	0.23 / 0.53	0.21
	2010	0.07	0.02 / 0.22	-0.07
Ureña	2010	0.23	0.09 / 0.49	0.07

CI: Intervalo de Confianza

F_{IS}: Coeficiente de Endogamia

6.4.2 Asociación entre genotipos y fenotipos de la mutación *Ile1,016* en sub-poblaciones sometidas a la DK₅₀ durante el año 2010.

El genotipo homocigoto mutante *Ile1,016/Ile 1,016* no se presentó en las hembras que no fueron derribadas luego de 1h en la sub-población Pampanito, baja proporción (3.3%) en las sub-poblaciones Tres Esquinas (n=1) y Lara (n=1) y en mayor proporción (53%) en Ureña (n=16).

Las hembras recuperadas a las 4 horas resultaron en un 26.6% de la sub-población Pampanito heterocigotos (n= 8), 36.6% en Tres Esquinas (n=11), 40% en Lara (n=12) y 33.3% en Ureña (n=10) concordando con lo encontrado por Saavedra *et al.*, (2007) quienes encuentran que la mitad de los mosquitos recuperados a las 4 horas fueron heterocigotos, por lo que sugieren 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.

En los supervivientes de la sub-población Tres Esquinas a las 24 horas se observó mayor proporción del genotipo homocigoto silvestre *Val1,016/Val1,016* (100%), seguida por la sub-población Pampanito con 93.3% (n=28), Lara 73.3% (n=22) y en menor proporción en Ureña con 20% (n=6).

Tabla 20. Genotipos y fenotipos de la mutación *Ile1,016* en sub-poblaciones de *Ae. aegypti* de Venezuela sometidas a la DK₅₀ en el 2010.

Sub-población		A/A	G/A	G/G
Pampanito	1h	0	10	20
	4h	0	8	22
	24 S	1	1	28
	24 M	0	3	27
Tres Esquinas	1h	1	10	19
	4h	0	11	19
	24 S	0	0	30
	24 M	0	15	15
Lara	1h	1	9	20
	4h	2	12	16
	24 S	0	8	22
	24 M	1	14	15
Ureña	1h	16	7	7
	4h	6	10	14
	24 S	2	22	6
	24 M	3	20	7

A/A: homocigoto mutante, G/A: heterocigoto, G/G: homocigoto silvestre.

7. DISCUSIONES

En Venezuela, temefos granulado al 1% es el único larvicida químico usado para el control del mosquito vector del dengue por más de 40 años, y resulta sorprendente la susceptibilidad de las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* evaluadas en el presente estudio a este insecticida. A pesar de que para 1995 en Venezuela Mazzarri and Georghiou encuentran poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes al temefos en las localidades de Coro y Maracay, al igual que Bisset *et al.* en el (2001) en Aragua, Miranda y Táchira los valores de FR_{DL50} fueron bajos (< 5) mostrando baja resistencia al larvicida y solo en la población de Apure encontraron alta resistencia FR_{DL50} (11.1) con niveles de α -esterasas A4 sobre expresados.

En las sub-poblaciones evaluadas se observó un comportamiento similar, ya que mostraron baja resistencia al temefos con valores para los $FR_{CL50} < 5$ y con niveles sobre-expresados de β -esterasas y MFO, los cuales no fueron asociados con la baja resistencia encontrada, pudiéndose deber a la aplicación interrumpida del químico, tal como lo refiere Wirth and Georghiou (1999) quienes sugieren que la resistencia al temefos es inestable en ausencia de la presión de selección, justificando la efectividad mantenida en el tiempo de este larvicida. Aun cuando en el presente estudio no se encontró una resistencia importante al temefos, se sugiere evaluación continua de este larvicida en cualquier población del vector que se desee controlar, así como la rotación con insecticidas biológicos o inhibidores de crecimiento para tratar conservar poblaciones susceptibles o impedir evolución de la resistencia, preservar la vida útil del producto o evitar problemas de resistencia cruzada con otros insecticidas.

Con respecto al malatión, la resistencia al organofosforado en *Ae. aegypti* se ha difundido por todo el Caribe, América Central y América del Sur, pero existen aún reportes de poblaciones susceptibles en Panamá, Cuba (Bisset *et al.*, 2003, 2004) y Viet Nam (Huong *et al.*, 2004). En esta investigación se encontraron valores de FR_{CL50} inferiores 5 en ambos períodos de evaluación, mostrando baja resistencia al malatión en las sub-poblaciones de los estados Trujillo, Lara y Táchira, concordando con lo reportado por Mazzarri and Georghiou (1997) en poblaciones *Ae. aegypti* de los estados

venezolanos Aragua y Falcón y en contraste con el estudio de Pérez and Molina (2009) quienes encuentran alta resistencia al malatión en larvas de *Ae. aegypti* de los municipios Girardot, Mario Briceño Irigorri y Urdaneta del estado Aragua en Venezuela (FR_{50} 69.5, 150.6 y 113.5) con sobre-expresión de esterasas y citocromo oxidadas, quedando demostrado que la resistencia es focal.

Las sub-poblaciones evaluadas durante los años 2008 y 2010 exhibieron niveles sobre-expresados de α -esterasas, β -esterasas y MFO, cuya participación en el metabolismo del malatión no fue dilucidada, a pesar de existir reportes que involucran a estos mecanismos enzimáticos como responsables de la resistencia al malatión en poblaciones de *Ae. aegypti* de Venezuela y de Latinoamérica (Rodríguez *et al.*, 2007, Pérez and Molina, 2009).

Luego de aproximadamente cuatro décadas de la introducción de los piretroides, aun estos siguen siendo unos de los principales grupos de insecticidas aplicados para el control de una amplia gama de plagas agrícolas y vectores de enfermedades (Davies and Williamson 2009). La resistencia a piretroides y en especial a la deltametrina ha sido reportada en diferentes poblaciones de *Ae. aegypti* de Venezuela (Mazarri and Georghiou, 1995; Pérez and Molina, 2002, Rodríguez *et al.*, 2007). En las sub-poblaciones evaluadas se demostró la evolución de la resistencia al derribo a la deltametrina en el 2010, debido a la presencia de la mutación *Ile1,016* en el gen que codifica para el canal de sodio, específicamente en el dominio II segmento transmembranal 6 (IIS6). Las mayores frecuencias del alelo *Ile1,016* para el 2010 se presentaron en las sub-poblaciones Lara (0.07) y Ureña (0.23) en las cuales se obtuvieron los máximos valores de los FR_{DK50} 18.6 y 19.6 respectivamente, asociando la presencia de la mutación *Ile1,016* con la resistencia *kdr* a la deltametrina. Desde el año 2007 Rodríguez *et al.*, reportaron la presencia de las mutaciones *Ile1,016*, *Met1,011* y *Val1,011* presentes en el segmento hidrofóbico del dominio II del gen que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje, en 9 poblaciones naturales de *Ae. aegypti* procedentes de los estados venezolanos Sucre, Anzoátegui, Lara, Portuguesa, Zulia, Táchira, Miranda, Bolívar y Apure, encontrando frecuencias para *Ile1,016* comprendidas entre 0.00 y 0.140, para *Met1,011* entre 0.203 y 0.512 y para *Val1,011* 0.000 y 0.087. Estos mismos autores realizaron experimentos de selección, uno con deltametrina en una

población de campo de Santiago de Cuba y otro con permetrina en una población denominada Isla Mujeres, México y estimaron las frecuencias alélicas de las mencionadas mutaciones, encontrando que la frecuencia de *Ile1,016* se incrementó significativamente desde 0.033 en la colección original de Santiago de Cuba hasta 0.567 (prueba exacta de Fisher, $P= 6.6 \times 10^{-10}$) en la generación F12 y 0.883 ($P= 2.20 \times 10^{-16}$) después de una selección adicional con deltametrina, de forma similar, la frecuencia de *Ile1,016* se incrementó de 0.259 hasta la fijación después de cinco generaciones de selección con permetrina de la cepa de Islas Mujeres ($P= 2.20 \times 10^{-16}$). En contraste, la frecuencia del alelo *Met1,011* decreció de 0.517 en la colección original de Santiago de Cuba de 0.533 a 0.283 en las generaciones F12 y F13, respectivamente, después de la selección con deltametrina (prueba exacta de Fisher, $P = 1.000, 0.015$ respectivamente), así como, también disminuyó de 0.317 en la población de Isla Mujeres a 0.125 después de cinco generaciones seleccionadas con permetrina ($P = 0.0224$). En el presente estudio se encontraron frecuencias del alelo *Ile1,016* para el 2010 superiores a las reportadas por Rodríguez *et al.*, en el 2007 sugiriendo una mayor presión de selección con piretroides al pasar de los años, específicamente en la sub-población de Lara (Barquisimeto) en el 2007 cuya frecuencia alélica *Ile1,016* fue de 0.010 (Rodríguez *et al.*, 2007) y para el 2010 de 0.07, así como, en Táchira para el 2007 la frecuencia fue de 0.000 y para el 2010 de 0.23 y aunque los sitios de recolecta fueron diferentes pertenecen al mismo estado pudiendo ser este el reflejo de la situación general en *Ae. aegypti* en Venezuela debido a la fuerte presión de selección con insecticidas químicos para el control del dengue y plagas agrícolas. En el presente estudio se evidenció que la presión de selección favoreció la evolución de la resistencia a la deltametrina en las sub-poblaciones evaluadas lo cual se vio de manera más acentuada en la sub-población de Ureña procedente de una localidad cuya principal actividad económica es la agricultura, experimentando para el 2010 aumento en los valores de las CL_{50} y DK_{50} 9.5 y 2.5 veces respectivamente.

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 sub-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. Rodríguez *et al.* (2007) asocian la resistencia a la deltametrina en larvas de *Ae. aegypti* de Venezuela y otros países de Latinoamérica con la actividad de dos enzimas metabólicas, las esterasas y las GSTs, así como las citocromo oxidasa (Berge *et al.*, 1998), sin embargo, en esta investigación no se encontraron mecanismos enzimáticos asociados con la resistencia post-recuperación a la deltametrina, concordando con Hemingway *et al.*, (1989) quienes refieren que la resistencia a piretroides en cepas de *Ae. aegypti* de Puerto Rico se debía a un incremento en sitios alterados que provocaban insensibilidad nerviosa (*kdr*), más que a mecanismos metabólicos. La supervivencia de las hembras además 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 (2007). Este autor menciona que las tripsinas y quimiotripsinas son la principales enzimas envueltas en la digestión de proteínas y que la sobre-expresión de los genes que codifican para ellas han sido reportado 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).

Es importante destacar que los estados Lara y Táchira (Ureña) son dos de los siete estados venezolanos que aportaron mayor número de casos de dengue durante los años 2008 y 2010 y a pesar del esfuerzo realizado por los entes gubernamentales para tratar de controlar a *Ae. aegypti* en estas y otras entidades federales, la falla en los programas de control es evidente, reflejándose en la casuística del dengue para el 2010 la cual se incrementó de 48.048 en el 2008 a 106.725 casos en la semana epidemiológica No. 43 del 2010, pudiéndose deber a la resistencia de *Ae. aegypti* a la deltametrina, entre otras causas. La lucha contra el dengue en Venezuela se centra en la fumigación de áreas críticas para destruir la población adulta de *Ae. aegypti* y en campañas informativas para que la población tome conciencia del problema y elimine los focos de agua contaminada en los que este insecto deposita sus huevos, por lo que los resultados obtenidos en este estudio aportan información importante que debe ser considerada para continuar o suspender el uso de deltametrina en los programas de control.

8. CONCLUSIONES

Se demostró la baja resistencia al larvicida temefos en las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* de los estados Trujillo, Lara y Táchira durante los años 2008 y 2010, con sobre-expresión de las enzimas β -esterasas y MFO no asociándolas con la baja resistencia encontrada.

Las sub-poblaciones evaluadas mostraron baja resistencia al organofosforado malatión en ambos periodos de investigación con valores de FR_{DL50} inferiores a 5, exhibiendo niveles sobre-expresados de α y β estererasas no pudiendo dilucidar el papel de estas enzimas en el metabolismo del insecticida.

La evolución de la resistencia a la deltametrina tanto al derribo como post-recuperación fue demostrada en las sub-poblaciones Pampanito, Tres Esquinas, Lara y Ureña para el 2010. Específicamente en las sub-poblaciones Ureña y Lara se observaron los mayores valores de las CL_{50} y DK_{50} sugiriendo que estas sub-poblaciones han estado sometidas a una fuerte presión de selección en el campo para el control de *Ae. aegypti* y de plagas agrícolas.

La mutación *Ile1,016* que confiere resistencia a piretroides fue observada en todas las sub-poblaciones evaluadas registrándose la mayor frecuencia alélica *Ile1,016* en la sub-población Ureña seguida de la sub-población Lara para el 2010, asociando la presencia de esta mutación con la resistencia encontrada. Todas las sub-poblaciones estuvieron en equilibrio Hardy-Weinberg para el locus evaluado.

El genotipo homocigoto mutante estuvo presente solo en los mosquitos que no fueron derribados a la 1h luego de ser expuestos a los respectivos valores de DK_{50} con deltametrina en las sub-poblaciones Lara 2008-2010 y Ureña 2010 y en baja proporción.

La detección temprana de los alelos de la mutación *Ile1,016* y otras mutaciones asociadas a la resistencia al derribo es de suma importancia ya que aporta información valiosa que debe ser considerada en los programas de control tanto de *Ae. aegypti* como de otros vectores de interés en salud pública.

9. LITERATURA CITADA

- Abbott WS.1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Econ Entomol 18: 265–267.
- Ader DB, Celluzzi C, Bisbing J, Gilmore L, Gunther V, Peachman HH, Rao M, Barvir D, Sun W, Palmer DR. 2004. Modulation of dengue virus infection of dendritic cells by *Aedes aegypti* saliva. Viral Immunol. 17, 252–265.
- Agresti A, Coull BA. 1998. Appoximate is better than “exact” for interval estimation of binominal proportions. American Statistician 52: 119-126.
- Ahmed S, Wilkins RM, Mantle D. 1998. Comparison of proteolytic enzyme activies in adults of insecticide resistant and susceptible strains of the housefly *Musca domestica* L. Insect Biochem. Mol Biol. 28:629-639.
- Alvarez L, Castillo C, Oviedo M., Briceño F. 2008. Diferencias en la susceptibilidad a la deltametrina en poblaciones de *Aedes aegypti* de Trujillo, Venezuela. 2008. Bol. Mal. Salud Amb. 48(2): 169-175.
- Ayesa P, Harrington LC, Scott JG. 2006. Evalutation of Novel Insecticides for Control of dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J. MED. Entomol. 43(1): 55-60.
- Barrera R, Delgado N, Jiménez M, Villalobos I, Romero I. 2000. Estratificación de una ciudad hiperendémica en dengue hemorrágico. Rev. Pan. Salud Púb. 8: 233-255.

- Bennett KE, Olson KE, Muñoz M, Salas-Fernández I, Fafan-Ale JA, Higgs S, Black IV WC, Beaty B. 2002. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and United States. *Am J Trop Med Hyg.* 67: 85-92.
- Berge JB, Feyereisen R, Amichot. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 352, 1701-1705.
- Bisset JA, Rodríguez MM, Cáceres L. 2003. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en 2 cepas de *Aedes aegypti* de Panama. *Rev. Cubana Med. Trop.* 55: 191-195.
- Bisset J, Rodríguez MM, Fernández D, Pérez O. 2004. Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en larvas del municipio Playa,colectadas durante la etapa intensiva contra el *Aedes aegypti* en Ciudad de La Habana, 2001-2002. *Rev. Cubana Med. Trop.* 56:61-66.
- Bisset JA, Rodríguez MM, Molina D, Diaz C, Soca LA.2001. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. *Rev. Cubana Med Trop* 5: 37-43.
- Black W, Munsterman LM. 1996. Molecular Taxonomy and Systematic of Arthropod vectors. *Biology Disease Vector*, 438-470 pp. W.C. Marquardt y beaty. University Press of Colorado, Boulder, CO.
- Bloomquist JR, Miller TA. 1986. Sodium channel neurotoxin as probes of the knockdown resistance mechanism. *Neurotoxicology.* 7.
- Bregues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway, J. 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 WG. 1989. Biochemical Resistance Detection: an alternative to bioassay. *Parasitology Today.* 5(1): 56-60.

Brogdon WG, McAllister JC. 1998a. Insecticide resistance and Vector Control. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 605-613.

Brogdon WG, McAllister JC. 1998(b). Simplification of adult mosquito bioassay through use of time mortality determinations in glass bottles. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 14(2): 159-164.

Brogdon WG, McAllister JC, Corwin AM, Cordon-Rosales C. 1999. Oxidase-Based DDT-Pyrethroid Cross-Resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 64: 101-111.

Brown AW, Abedi ZH. 1960. Cross-resistance characteristic of malathion-tolerant strain developed in *Aedes aegypti*. *Mosq. News.* 20:118-124.

Brown AW. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 2: 123- 140.

Brown AW, Pal R. 1971. Insecticide resistance in arthropods. World Health Organization, Geneva, Swizerland.

Casida J, Quistad G. 1998. Golden age of insecticide research: Past, Present, or future?. *Ann. Rev. Entomol.* 43: 1-16.

Chandre F, Darriet F, Darder M, Cuany A, Doannio JMC, Pasteur N, Guillet P. 1998. Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* (Say) from West African Journal of Medical Entomology. 12: 359-366.

- Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato*. Bull World Health Organ. 77: 230-234.
- Davies TGE, Williamson MS. 2009. Interactions of pyrethroids with the voltage-gated sodium channel. Bayer CropScience Journal 62: 159-178.
- Enayati, AA, Vatandoost H, Ladonni H, Townson H, Hemingway. 2003. Molecular evidence for a kdr-like pyrethroid resistance mechanism in the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. Med. Vet. Ent. 17:138-144.
- French-Constant RH, Rocheleau R, Steichen JC, Chalmers AE. 1993. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. Nature 363: 449-451.
- French-Constant, Steichen JC, Shotkoski F. 1994. Polymerase chain reaction diagnostic for cyclodiene insecticide resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. Medical and Veterinary Entomology 8: 99-100.
- Finney JD. 1971. Probit Analysis (3 ra ed.) Cambridge University Press. Cambridge 50-80.
- Flores A, Albeldano W, Fernández, I., Badii M, Becerra H, Ponce G, Lozano S, Brogdon W, Black, W, Beaty, B. 2003. Elevated α -esterases levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti*(L) from Baja California, México. Pesticide Biochemistry and Physiology 82: 66-78.
- Food Agriculture Organization (FAO) 1982. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Plant Protection Bull. 30: 36-71, 141-143.

- Georghiou GP, Wirth M, Tran H, Saume F, Knudsen AB. 1987. Potential for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* in the Caribbean area and neighbouring countries. *J. Med. Entomol* 24: 290-294.
- Gong M, Yan G, Hu X, Sun Y, Ma L, Li X, Sun L, Sun J, Qian J, Zhu C. 2005 Cloning and Overexpression of *CYP6F1*, a Cytochrome P450 Gene, from Deltamethrin-resistant *Culex pipiens pallens*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 37(5):317-326.
- Gordon J. 1988. Health Education Research: Mixed strategies in health education and community participation: an evolution of dengue control in the Dominican Republic. *Oxford University Press* 3(4): 399-419.
- Grazt NG. 1991. Emergency control of *Aedes aegypti* as a disease vector in urban areas. *J. Am. Mosq. Control Assoc* 7: 353-365.
- Gubler DJ. 1989. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. *Am J Trop Med Hyg*: 571-578.
- Gubler DJ. 1996. The global resurgence of arboviral diseases. *Trop Med Hyg* 90: 449-451.
- Gubler DJ. 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. pp: 1-22. En: *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Eds. Gubler D. J. & Kuno G. Cab International, New York.
- Gubler DJ. 1998a. Resurgent vector-borne disease as a global health problem. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 442-450.

- Gubler DJ, Clark GG. 1995. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emer. Infect. Dis.* 1: 55-57.
- Gubler DJ, Trent DW. 1994. Emergence of epidemic Dengue: Dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infectious Agent and Disease* 2: 383-393.
- Guerrero FD, Jamroz RC, Kammlah DM, Kunz SE. 1997. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of *kdr* and *superkdr* point mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27:745-755.
- Hardy JL. 1988. Susceptibility and resistance of vector mosquitoes. In *The arbovirus: epidemiology and ecology* Monath T.P 87–126. *Eds.* Boca Raton, FL:CRC Press.
- Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. 1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu. Rev. Entomol.* 28, 229–262.
- Hemingway J, Boddington RG, Harris J. 1989. Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. *Bull Ent Res.* 79:123-30.
- Hemingway J, Karunaratne, SHPP. 1998. Mosquito carboxylesterases:a review of the molecular biology and biochemistry of major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12:1-12.
- Hemingway J, Ranson H. 2000. Insecticide resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu. Rev. Entomol* 45: 371-391.
- Huong VD, Bach NNT, Hien DT, Bich LNT. 2004 Susceptibility of *Aedes aegypti* to Insecticides in Viet Nam. *Dengue Bulletin* 28: 179-183.

- Karch S, Asidi N, Manzambi Z, Salaun J, Mouchet J. 1995. Impact of deltamethrin-impregnated bednets on biting rates of mosquitoes in Zaire. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11(2): 191-194.
- Kroeger A, Lenhart A, Ochoa M, Villegas E, Alexander N, Castillo CE, Levy M, McCall P. 2006. Effective dengue vector control with insecticide treated curtains and water container covers: cluster randomized trials in Mexico and Venezuela. *British Medical Journal* 332: 1247-1252.
- Ku SS, Chiang FM, Hsin CY, Yao YE, Sun CN. 1994. Glutathione transferase isozymes involved in insecticide resistance of diamondback moth larvae. *Pest Biochem Physiol.* 50:191-7.
- Lagunes T, Villanueva JA. 1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Colego ed Postgraduados. México. 264.
- Lourenço OR, Vazeille M, Bispo A, Failloux A-B. 2002. Oral susceptibility to yellow fever virus of *Aedes aegypti* from Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97: 437-439
- Luleyap, HU, Alptekin D, Kasap H, Kasap M. 2002. Detection of knockdown resistance mutations in *Anopheles sacharovi* (Diptera:Culicidae) and genetic distance with *Anopheles gambiae* (Diptera:Culicidae) using cDNA sequencing of the voltage-gated sodium channel gene. *J. Med. Ent.* 39: 870-874.
- Lumjuan N, McCarroll, Prapanthadara L, Hemingway J, Ranson H. 2005. Elevated activity of Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 861-871.

- Lynd A, Ranson H, McCall PJ, Randle NP, Black IV W, Walker ED, Donnelly MJ. 2005. A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (kdr) detection in *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*. 4:16.
- Malcolm CA, Bourguet D, Ascolillo A, Rooker SJ, Garvey CF, Hall LM, Pasteur N, Raymond. 1998. A sex-linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology* 7(2): 107-120.
- Martínez-Torres D, Chandre F, Williamson M, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* 7: 179-184.
- Martínez-Torres D, Cevillon C, Brun-Barale A, Berge JB, Pasteur N, Pauron D. 1999a. Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. *Pestic. Sci.* 55:1012-1020.
- Mazzarri MB, Georghiou GP. 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.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud. (2010). Boletín Epidemiológico No. 52 Venezuela.
- Montella IR, Martins AJ, Fernández VP, Pereira JB, Braga IA, Valle D. 2007. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77: 467-477.
- Mouchet J. 1967. La resistance aux insecticides chez *Aedes aegypti* et les espèces voisines. *Bull. WHO.* 36 : 569-577.

- Mulla M. 1994. Mosquito Control then, now, and in the future. *J. Am. Mos. Con. Assoc.* 10(4): 574-584.
- Mutero A, Pralavorio M, Bride JM, Fournier D. 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 5922-5926.
- Nikou D, Ranson H, Hemingway. 2003. An adult specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* 318: 91-102.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1990. Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiol Bull.* 11: 7-9.
- Philip CB, Rozenboom LE. 1973. Medico-veterinary entomology: a generation of progress. In: Smith RF, Miller TE, Smith CN, editors. *History of entomology*. Palo Alto (CA): Annual Reviews Inc.
- Pinheiro FP, Corber S. 1997. Emergence of dengue and dengue haemorrhagic fever and its emergence in the Americas. *Wld Hlt Org* 1997; 15: 244-251.
- Pedra JH, McIntyre LM, Scharf ME, Pittendrigh BR. 2004. Genome-wide transcription profile of field and laboratory selected dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)-resistant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7034-7039.
- Pérez EE, Fernández MD. 2002. Resistance of *Aedes aegypti* to pyrethroides in municipalities of Aragua state, Venezuela. In Clark, G.; Quiroz, M. H. *Mosquito Control and Biology in Latin America An Eleventh Symposium*. *J. Am. Mos. Con. Assoc.* 17 (3): 166-180.

- Pérez EE, Fernandez MD. 2009. Resistencia focal a insecticidas organosintéticos en *Aedes aegypti* (Linneaus,1762) (Díptera: Culicidae) de diferentes municipios del estado Aragua, Venezuela. Bol. Mal. Salud. Amb. Vol. XLIX (1): 143-150.
- Platt KB, Linthicum KJ, Myint KS, Innis BL, Lerdthusnee K, Vaughn DW. 1997. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg. 57(2): 119-125.
- Prapanthadara L, Promtet N, Koottathep S, Somboon P, Suwonkerd W, McCarroll L, Hemingway J. 2002. Mechanisms of DDT and Permethrin Resistance in *Aedes aegypti* from Chiang mai, Thailand. Dengue Bull. 26: 185-189.
- Quaterman K. D., Schoof H. F. 1958. The status of insecticide resistance in arthropods of public health importance in 1956. Am. J. Trop. Med. Hyg. 7: 74-83.
- Ranson H, Claudianos C, Orтели F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. Science 298:179-181.
- Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH. 2006. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. Insect Mol. Biol. 9:491-497.
- Ranson H, Prapanthadara L, Hemingway J. 1997. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from DDT resistant strain of *Anopheles gambiae*. Biochem. J. 324(1):97-102.

- Rawlins, SC. 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Rev Panam Salud Publica* 4 :243-51.
- Raymond M. 1985. Presentation d' un programme d'analyse log-probit pour microordinateur cahiers Orstrom *Ser. Entomo. Med. Parasitol* 23 (2): 117-121.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C. 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 230: 244-251.
- Rodríguez MM, Bisset JA, Fernandez D. 2007. Determinacion *in vivo* del papel de las enzimas esterases y glutation transferasas en la resistencia a piretroides en *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). *Rev. Cubana Med. Trop.* 59(3) :209-212.
- Rodríguez MM, Bisset JA, Molina D, Lauzan L, Soca A. 2001. Detection of resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from Cuba and Venezuela. *J. Med. Entomol.* 38:623-628.
- Rodríguez MM, Bisset JA, Ruiz M, Soca A. 2002. Cross-Resistance to Pyrethroid and Organophosphorus Insecticides induced by selection with Temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J. Med. Entomol.* 39(6): 882-888.
- Saavedra K, Urdaneta L, Rajatilekat S, Moulton M, Flores, AE, Fernández I, Bisset J, Rodríguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, Black WC 4th. 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.
- Saume F. 1992. Introducción a la química y toxicología de insecticidas. Industria Gráfica Integral C.A., Maracay, Venezuela. 212 pp.

- Scott JA. 1995. The molecular Genetics of Resistance : Resistance as a Response to Stress. Florida Entomologist. 78 (3) : 399-414.
- Soderlund D, Bloomquist, 1990. Molecular Mechanism of Insecticide Resistance. 58-96. en Pesticide Resistance in Arthropods editada por Roush RT, Tabashnik BE, Routledge Chapman & Hall Inc. Geat Britain.
- Strode C, Wondji C, David J, Hawkes N, Lumjuan N, Nelson D, Drane D, Parakrama S, Hemingway J, Black W IV, Ranson H. 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 38: 113–123
- Vaughan A, ffrench-Constant. 1998. Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. Med. Vet. Entomol. 12:318-321.
- Vaughan A, Rocheleau T, ffrench-Constant. 1997. Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivty. Exper Parasit 87:237-244.
- Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Chungue E, Failloux A B. 1999. Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the island of Tahiti and Moorea, French Polynesia. Am J Trop Med Hyg. 60: 292-299.
- Villani F, Hemingway J. 1987. The detection and interaction of multiple organophosphorus and carbamate insecticide resistance genes in populations of *Culex pipiens* from Italy. Pest Bioche Physiol. 27: 218-228.
- Vontas JG, David JP, Nikou D, Hemingway J, Christophides GK, Louis C, Ranson H. 2007. Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensis*

using cross-species microarray hybridization. *Insect Molecular Biology*. 16(3): 315-332.

Vulule, JM, Beach RF, Atieli FK, McAllister JC, Brogdon WG, Robets JM, Mwangi RW, Hawley WA. 1999. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenya villages using permethrin-impregnated nets. *Med. Vet. Ent* 13:239-244.

Wilce MC, Board PG, Feil SC, Parker MW. 1995. Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. *EMBO J* 14(10): 2133-2143.

Williamson MS, Denhold I, Bell CA, Devonshire AL. 1993. Knockdown resistance (*kdr*) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene in the housefly (*Musca domestica*). *Mol Gen Genet* 240:17-22.

Williamson MS, Martínez D, Hick CA, Devonshire AL. 1996. Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 252 : 51-60.

Wirth MC, Georghiou GP. 1999. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15 :315-320.

Woodring JL, Higgs S, Beaty BJ. 1996. Natural cycles of vector-borne pathogens. In *The biology of disease vectors* Beaty B.J, Marquardt W.C 1996pp. 51–72. Eds. Niwot, CO:University Press of Colorado.

World Health Organization (WHO). 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. 1981. WHO/VBC/81.807. 6p. Geneva. Switzerland.

World Health Organization (WHO). 1986. Resistance of vectors and reservoirs of disease of pesticides. Tech. Rep. Ser 737.

World Health Organization (WHO). 1997. Dengue hemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. 2da edition, Geneva.

World Health Organization (WHO). 2002. Dengue and Dengue haemorrhagic fever. Fact sheet No. 117. World Health Organization, Geneva.

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. Tropical Medicine and International Health 16: 501.-509.

RESUMEN BIOGRAFICO

Leslie Coromoto Álvarez González

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con acentuación en Entomología Médica

Tesis: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE SUB-POBLACIONES SILVESTRES DE *Aedes aegypti* (L) DE VENEZUELA SOMETIDAS A PRESIÓN CON INSECTICIDAS DE USO COMÚN

Campo de estudio: Entomología Médica

Datos Personales: Nacido en Maracaibo Estado Zulia, Venezuela el 09 de Febrero de 1969 hija de Félix Álvarez Bermúdez y Negda González de Álvarez.

Educación: Egresada de la Universidad de los Andes, Venezuela, grado obtenido Licenciada en Bioanálisis 1991, con mención honorífica y segundo lugar en la generación.

Egresada del Núcleo Universitario “Rafael Rangel” de la Universidad de los Andes, Venezuela, grado obtenido Magister en Protozoología 1998.

Experiencia Profesional: Profesor e Investigador a Dedicación Exclusiva de la Universidad de los Andes, Venezuela desde 2001. Actualmente Agregado.

Miembro del Sistema Venezolano de Promoción al Investigador desde 2003.
Actualmente Nivel 1.

Primer Lugar en la Latin American Student Paper Competition de la Asociación
Americana de Control de Mosquitos AMCA 2011.

Publicaciones:

Álvarez L, Scorza JV, Rojas E, Bisset J, Molina D. 2002. Determinación de dosis diagnósticas y tiempos letales en *Lutzomyia youngi* de Calderas Trujillo-Venezuela a cuatro insecticidas. Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental, Maracay, Venezuela. Vol XIII No 1 y 2. 33 –38 pp.

Detección de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en una comunidad rural en el estado Trujillo Venezuela. 2003 Academia (3): 36-38.

Álvarez, L., Mendoza, M., Márquez, L. Infección por *Helicobacter pylori* en niños que acuden al Hospital “José Gregorio Hernández” de Trujillo. 2003. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 23 (1).

Elina Rojas, Tatiana Scorza, Leslie Alvarez, José Vicente Scorza. Changes in sandfly populations following anthropic action in an andean venezuelan coffee plantation. 2004. Entomología y Vectores 11(3): 495-503.

J.P. Dubey, A. Lenhart*, C. E. Castillo†, L. Alvarez†, P. Marcet*, C. Sreekumar, and T. Lehmann*. *Toxoplasma gondii* infections in chickens from Venezuela: Isolation, tissue distribution, and molecular characterization. 2005. *J. Parasitol.* 91(6) 1332–1334.

Álvarez L¹, Duran Y², González A², Suárez J², Oviedo M¹. Concentraciones letales y dosis diagnosticas de lambdacyhalotrina y fenitrotion sobre *Lutzomyia evansi* (Díptera: Psychodidae) de los Pajones, estado Trujillo, Venezuela. 2006. Bol. Mal. y Salud Amb. Vol. XLVI (1): 9-15.

Álvarez, L, Briceño Arelis y Oviedo Milagros. Resistencia al temephos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del occidente de Venezuela. 2006. Revista Colombiana de Entomología. Vol 32(2).

Álvarez L¹, Castillo C¹, Oviedo M¹, Briceño F². 2008. Diferencias en la susceptibilidad a la deltametrina en poblaciones de *Aedes aegypti* de Trujillo, Venezuela. Bol. Mal. y Salud Amb. Vol. XLVIII (2): 169-175.

Álvarez-González L¹, Oviedo-Araujo M¹, Ponce-García G², Flores-Suárez A². Respuesta de poblaciones de *Aedes aegypti* de Venezuela a los adulticidas malatión y deltametrina. 2010. Entomología Mexicana Vol 9: 783-787.

Suarez J¹, Oviedo M², Álvarez L³, González A⁴, Lenhart A⁵. Evaluación del regulador de crecimiento Pyriproxyfen en poblaciones de *Aedes aegypti* de Trujillo, Venezuela. 2011. Revista Colombiana de Entomología 37 (1): 91-94.

Divulgación de investigaciones emanados del trabajo de tesis doctoral. Asistencia y participación en Congresos:

Respuesta de poblaciones de *Aedes aegypti* de Venezuela a los adulticidas malatión y deltametrina. Congreso Mexicano de Entomología. 2010

Susceptibility to temephos and enzymatic activity in populations of *Aedes aegypti* from Venezuela during 2008 and 2010. Reunión Anual de la Asociación Americana de Control de Mosquitos AMCA. 2010.

Susceptibility and enzymes associated with malathion and deltamethrin in four populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. Reunión Anual de la Asociación Americana de Control de Mosquitos AMCA. 2010.

Ile1,016 mutation frequency in populations of *Aedes aegypti* from western Venezuela. Reunión Anual de la Asociación Americana de Control de Mosquitos AMCA. Marzo 2012.

KDR mutations *Ile1,016* and *Cys1,552* associated with pyrethroid resistance in *Ae. aegypti* from Venezuela. Enviado para ser presentado en 2013.