



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
Facultad de Ciencias
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Detección de mutaciones puntuales marcadoras
de resistencia a piretroides en el género
*Anopheles***

**TRABAJO ESPECIAL DE
GRADO**

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de
Venezuela, por el bachiller
Antonio José Hernández Conforti
como requisito parcial para optar
al título de Licenciado en Biología

Tutor(a): Dra. Mariana Hidalgo
Rojas

**CARACAS, VENEZUELA
ENERO - 2018**

Agradecimiento

A mi tutora Mariana Hidalgo por permitirme realizar este trabajo en el laboratorio inmunoparasitología e instruirme en todo lo necesario para desenvolverme en el laboratorio. También le agradezco por confiar en mí y permitirme emprender este proyecto en un ambiente de trabajo que me hizo sentir bienvenido.

A todos los miembros del laboratorio de inmunoparasitología, los que se han ido y los que quedan, por su apoyo y colaboración incondicional.

Al IVIC por el apoyo logístico y el espacio adecuado que permitió el desarrollo y culminación de este trabajo.

A la profesora Guillermina Alonso por toda la ayuda y amabilidad que recibí durante la carrera y por haberme guiado hacia el laboratorio de inmunoparasitología donde pasé los últimos momentos de la carrera.

A la facultad de ciencias y la UCV, porque a pesar de todo fueron y son una parte importante de mi vida y por toda la experiencia y conocimiento que me brindaron.

A mi madre, mi padre y hermana por todo, por apoyarme de todas las maneras posibles y haber hecho lo posible para cumplir nuestras metas.

Resumen

La malaria es la enfermedad parasitaria que más personas afecta en el mundo y se registra casi todos los continentes. Esta enfermedad es transmitida por la picadura de un mosquito del género *Anopheles* infectado con el parásito del género *Plasmodium*, por tanto una de las maneras de controlar y eliminar la enfermedad es a través del estudio y control del vector. Como parte de la lucha antivectorial se emplean insecticidas de acción residual. Los insecticidas más usados son los piretroides, ya que ofrecen varias ventajas sobre otras clases de insecticidas, sin embargo la constante exposición a insecticidas propició la aparición de individuos resistentes. Hoy en día esta resistencia se reporta en la mayor parte de los países con transmisión de malaria. Una de las formas más comunes de resistencia involucra mutaciones puntuales en el sitio donde actúa el insecticida, es decir el canal de sodio dependiente de voltaje del sistema nervioso del insecto. Esta resistencia es conocida como resistencia al derribo o *knockdown resistance* (kdr). La mutación más común es causada por una sustitución de la leucina en la posición 1014 por fenilalanina, en el dominio II del segmento 6 del canal, también existen otras mutaciones reportadas en la misma posición. En América, se evidenció por primera vez la presencia de esta resistencia en *An. albimanus*. En Venezuela, en el 2015 se reportó por primera vez la resistencia kdr a través de pruebas moleculares. En este trabajo se continuó los estudios en base a pruebas moleculares para la detección de mutaciones marcadoras de resistencia a piretroides. Se reprodujeron ensayos de PCR semi-anidado reportados en la literatura para la amplificación del gen que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje en *An. gambiae*. La reproducción de estos experimentos en especies de *Anopheles* venezolanos no fue efectiva. Al mismo tiempo se realizó el mismo ensayo de PCR desarrollado en el 2015 que amplifica la región del gen que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje basado en especies de *Anopheles* de Venezuela. La identificación de mutaciones puntuales en la posición 1014, relacionadas con la resistencia *knockdown* a piretroides/DDT, fue posible mediante el alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de los productos de PCR, encontrándose las sustituciones L1014F y L1014C, tanto en muestras de poblaciones del estado Aragua como del estado Sucre.

Palabras claves: Malaria, *Anopheles*, piretroides, PCR, resistencia a insecticidas, kdr.

Tabla de contenido

Agradecimiento	iii
Resumen	iv
Índice de abreviaturas	vii
Índice de tablas y figuras.....	vii
1. Introducción.....	1
1.1 Malaria.....	1
1.2 Situación de la malaria en Venezuela	3
1.3 Control vectorial: Uso de piretroides	3
1.4 Uso de Insecticidas en Venezuela	8
1.5 Resistencia a piretroides	9
2. Antecedentes.....	11
3. Objetivos	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. Materiales y métodos	16
4.1 Muestras.....	16
4.2 Aislamiento de ácidos nucleicos	16
4.3 Reacción en cadena de polimerasa (PCR). PCR semi-anidado	17

4.4 Reacción en cadena de polimerasa (PCR). PCR utilizando los cebadores OL1	18
4.5 Visualización mediante electroforesis en geles de agarosa de ADN genómico y de productos amplificados por PCR	20
4.6 Purificación de productos de PCR	21
4.7 Análisis de secuencias	21
5. Resultados.....	23
6. Discusión	32
7. Conclusiones.....	42
8. Anexos.....	43
9. Bibliografía.....	44

Índice de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local.

DDT: Dicloro difenil tricloroetano.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

IVIC: Instituto venezolano de investigaciones científicas.

kdr: Resistencia al derribo o *knockdown resistance*.

NCBI: Centro nacional para la información biotecnológica.

MEGA: Análisis de genética evolutiva molecular.

Nav: Para-canal de sodio dependiente de voltaje.

NJ: Método de *neighbor joining*.

OMS: Organización mundial de la salud.

PCR: Reacción en cadena de polimerasa.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

TBE: Tampon tris borato EDTA.

Índice de tablas y figuras

Tabla I. Cebadores empleados y sus respectivas temperaturas de hibridación en reacción de PCR semi-anido 18

Tabla II. Componentes de las mezclas de amplificación mediante PCR semi-anidado 18

Tabla III. Cebadores OL1A y OL1B diseñados para la amplificación del gen que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje 19

Tabla IV. Componentes de las mezclas de amplificación mediante PCR con los cebadores OL1A y OL1B.....	20
Tabla V. Secuencias de ADN del canal de sodio voltaje dependiente de diferentes <i>Anopheles</i> spp. usados en el alineamiento múltiple.....	22
Figura 1: Generación de potencial de acción en el canal de sodio dependiente de voltaje.....	6
Figura 2. Representación esquemática de la amplificación utilizando los oligonucleótidos OLA1 y OLB1.	19
Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa al 2%, de los productos de PCR utilizando los cebadores OL1A y OL1B.	23
Figura 4: Frecuencia de los codones silvestre y resistente en las muestras analizadas..	24
Figura 5: Alineamiento múltiple de secuencias con las regiones conservadas resaltadas.	26
Figura 6: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la región kdr.....	27
Figura 7: Matrices de porcentaje de identidad de las secuencias de la región kdr.	29
Figura 8: Árboles filogenéticos de las secuencias de la región kdr.	31

1. Introducción

1.1 Malaria

El paludismo, o malaria, es una enfermedad potencialmente mortal causada por parásitos del género *Plasmodium*, que se transmiten al ser humano por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*. Hay cinco especies de *Plasmodium* causantes de paludismo en el humano, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*, siendo las dos primeras las más prevalentes. Si no se trata adecuada y rápidamente, el paludismo puede poner en peligro la vida del paciente en poco tiempo (OMS, 2017a). En 2016, se estima que hubo 216 millones de casos de paludismo en todo el mundo. También hubo un estimado de 445.000 muertes por esta enfermedad a nivel mundial, la mayoría de los casos y de las muertes se registran en el África subsahariana, pero también se ven afectadas Asia Sudoriental, Latinoamérica y Oriente Medio. En 2016, 91 países y áreas experimentaron transmisión de la enfermedad. En el mundo hay más de 400 especies de *Anopheles*, pero sólo 30 de ellas son vectores importantes de paludismo. Todas las especies que son vectores importantes pican entre el anochecer y el amanecer. La transmisión de la malaria es más intensa en lugares donde los mosquitos tienen una vida relativamente larga que permite que el parásito tenga tiempo para completar su desarrollo en el interior del hospedero, y cuando el vector prefiere picar al ser humano antes que a otros animales. La transmisión también depende de condiciones climáticas que pueden modificar el número y la supervivencia de los mosquitos, como el régimen de lluvias, la temperatura y la humedad. Se pueden producir epidemias de paludismo

cuando el clima y otras condiciones ambientales favorecen súbitamente la transmisión en zonas donde la población tiene escasa o nula inmunidad (OMS, 2017a).

En Venezuela se han descrito 36 especies de mosquitos del género *Anopheles*. *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, *An. (Nys.) aquasalis*, *An. (Nys.) nuneztovari* y *An. (Nys.) marajoara* han sido involucrados como vectores principales, mientras que existen otras especies que bajo diversas situaciones pueden actuar como vectores secundarios (Osborn y col., 2004). Estas especies vectores se encuentran adaptadas a uno o más de los diversos ambientes presentes en el país que abarcan llanos, montañas, bosques húmedos tropicales y zonas costeras. *An. aquasalis*, *An. albimanus* y *An. pseudopunctipennis* son especies costeras. Siendo *An. aquasalis* el vector principal en las zonas costeras del oriente del país, mientras que *An. pseudopunctipennis* y *An. albimanus* son considerados vectores potenciales a lo largo de su distribución. En el piedemonte, *An. nuneztovari* es el vector principal, mientras que *An. marajoara* y *An. oswaldoi* se consideran vectores secundarios existiendo el riesgo potencial de *An. darlingi* y *An. pseudopunctipennis*, este último es además, el único reportado de los valles altos. *An. darlingi* es el vector principal en los llanos y las selvas, donde *An. marajoara* y *An. braziliensis* se consideran vectores secundarios. Sin embargo, recientemente se ha colectado *An. nuneztovari* en regiones selváticas del estado Bolívar, lo cual podría complicar la situación epidemiológica (Osborn y col., 2004).

1.2 Situación de la malaria en Venezuela

En Venezuela el área malárica, tradicionalmente está dividida en tres focos (Aché, 1998; Consenso de Malaria, 2006):

- Foco Occidental: Comprende los estados Zulia, Táchira, Barinas, Mérida, Portuguesa, Apure, Yaracuy y Trujillo.

- Foco Meridional: Comprende los estados Bolívar y Amazonas. En este foco, ocurren más de 80% de los casos de malaria en el país. Las áreas más afectadas son aquellas donde hay actividad minera.

- Foco Oriental: Conformado por los estados Sucre, Anzoátegui, Monagas y Delta Amacuro.

Históricamente, Venezuela ha servido como modelo para la erradicación de la malaria en América, con la región norte declarada libre de malaria por la OMS en 1961 (Griffing y col., 2004). Sin embargo la malaria ha ido aumento desde 2008. Para el año 2016, se reportó un acumulado de 240.613 casos autóctonos de malaria, lo que representa un aumento con respecto al periodo homólogo del año anterior de 76,4% y la incidencia parasitaria anual fue de 21,7 por cada 1.000 habitantes (Ministerio para el poder popular para la salud, 2016). Recientemente, la enfermedad se ha extendido gradualmente a nuevas áreas, incluyendo algunas que anteriormente se declararon libres de malaria (OMS, 2017b).

1.3 Control vectorial: Uso de piretroides

La lucha antivectorial es el medio principal de reducir la transmisión de la malaria. Si la cobertura de las intervenciones de esta índole es suficiente en una zona determinada, se protegerá a toda la comunidad. Para el control efectivo del vector, la

OMS recomienda proteger a toda la población que se encuentra en riesgo de infectarse. Hay dos métodos de lucha contra los vectores que son eficaces en circunstancias muy diversas: el uso de mosquiteros impregnados con insecticidas y la fumigación intradomiciliar con insecticidas de acción residual (OMS, 2016a).

Hasta la fecha, la OMS recomienda cuatro clases de insecticidas para su uso contra los mosquitos adultos en los programas de salud pública: Carbamatos, compuestos organoclorados (por ejemplo DDT), compuestos organofosforados (como el malatión) y piretroides. Entre estos, los piretroides son los más utilizados, ya que ofrecen varias ventajas sobre las otras clases de insecticidas en términos de costo, seguridad humana (baja toxicidad para los mamíferos) y duración de la acción residual (Hemingway, 2015), por ello, además, son ampliamente utilizados en la agricultura y como productos de pesticidas domésticos. Sin embargo, su uso como larvicidas es limitado debido a su alta toxicidad para los organismos acuáticos, incluidos los peces (OMS, 2016a). Para el control del vector en estadio larval existen cinco grupos principales de larvicidas: aceites y agentes superficiales; productos químicos orgánicos sintéticos; larvicidas bacterianos; espinosinas y reguladores de crecimiento de insectos (OMS, 2013).

Los piretroides son una clase de insecticidas derivado de compuestos naturales (las piretrinas) aislados de la planta del género *Chrysanthemum*. Aunque las piretrinas naturales tienen actividad insecticida, también son inestables cuando se exponen a la luz. Por lo tanto, la estructura de la piretrina se modificó para producir compuestos más estables que retenían las deseables propiedades insecticidas y toxicológicas.

Todos los piretroides contienen varias características comunes: un residuo ácido, un enlace éster central y un residuo alcohólico. El residuo ácido contiene dos carbonos quirales; por lo que, los piretroides normalmente existen como compuestos estereoisoméricos, además, algunos compuestos contienen también un carbono quiral sobre el residuo alcohólico, que permite tres carbonos quirales y un total de ocho estéreo-enantiómeros diferentes (Shafer y col., 2005).

Se ha demostrado que el para-canal de sodio (Nav) posee dominios de unión para una variedad de potentes neurotoxinas y es el principal objetivo molecular para la acción de insecticidas; las piretrinas y los piretroides, el DDT, los análogos sintéticos de los insecticidas de N-alquilamida de origen natural y derivados de dihidropirazole tales como Indoxacarb (Davies y col., 2007).

El para-canal de sodio dependiente de voltaje del sistema nervioso de los insectos fue originalmente clonado en 1980 de *Drosophila melanogaster*, (Loughney y col., 1989). Se encontró que era estructural y funcionalmente homólogo a la subunidad alfa de canales sodio dependiente de voltaje de los mamíferos. Consiste en 4 dominios homólogos (I-IV) conectados intracelularmente, cada dominio consiste en 6 segmentos transmembrana (S1-S6) unidos por bucles intracelulares o extracelulares. Dentro de la membrana del axón, los segmentos S5 y S6 forman un poro central conductor de iones con los segmentos S1-S4 formando la parte sensible al voltaje. Los bucles de la horquilla reentrante (bucle P) entre S5 y S6 forman un estrecho filtro ion-selectivo al final del poro (Catterall, 2000).

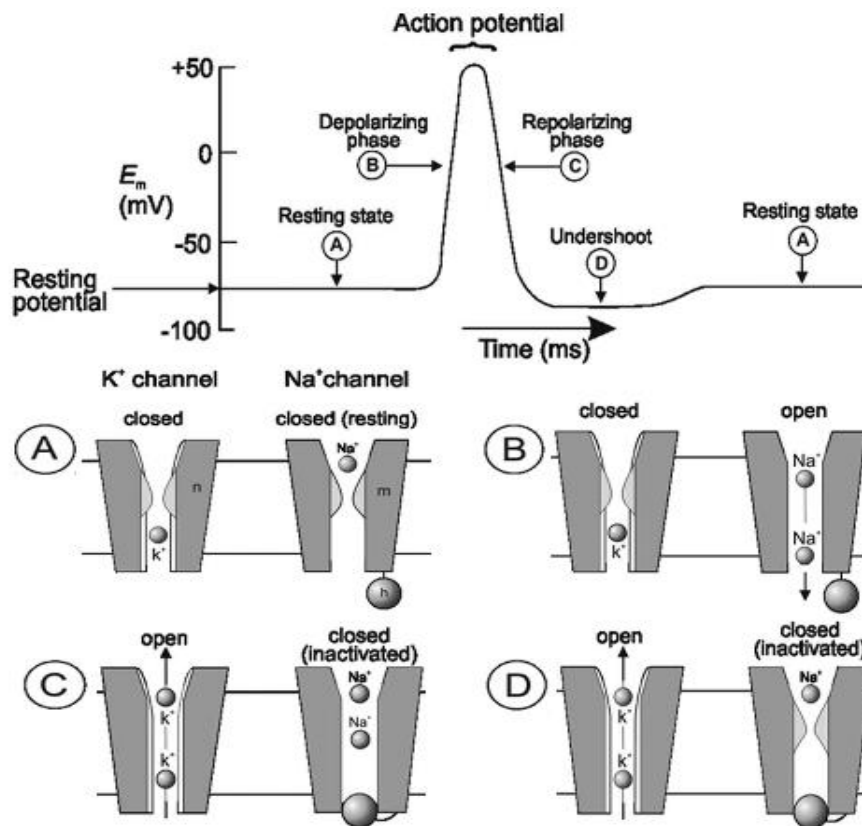


Figura 1: Generación de potencial de acción en el canal de sodio dependiente de voltaje. Tomado y modificado de Davies y col., 2007.

En la figura 1 se representa la generación del potencial de acción. En respuesta a la despolarización el canal experimenta un cambio en la conformación que permite una entrada de Na^+ a través del poro. Durante la despolarización, la permeabilidad del Na^+ aumenta rápidamente y luego decae a medida que el canal se inactiva, permanece en ese estado hasta que la membrana se repolariza y el canal se desactiva. El canal Nav tiene dos compuertas: una "puerta-m" de activación y una de inactivación o "puerta-h". En el potencial de reposo el canal está cerrado porque la puerta-m bloquea el poro del canal, durante la despolarización de la membrana conduce a cambios conformacionales en la "puerta-m". Esto abre el canal durante

unos milisegundos, lo que permite la afluencia de Na^+ . Esta activación dependiente de voltaje conduce al cierre de la puerta de inactivación (“puerta-h”) dentro de 1 - 2 milisegundos. Ahora el canal está en un estado de inactivación debido al bloqueo de la boca intracelular del poro. La inactivación está acoplada a la activación y es más rápida desde el estado abierto pero tiene poca o ninguna dependencia de voltaje. La repolarización de la membrana conduce a una inversión del cambio de conformación en la “puerta-m” que cierra el poro del canal (desactivación). Ambas puertas están ahora cerradas (ya que la puerta de inactivación (h) sigue bloqueando el poro), pero dentro de un período refractario de 2-5ms los cambios conformacionales de la puerta-m obligan a la puerta-h a reabrir trayendo el canal de vuelta al estado cerrado (Davies y col., 2007). Las piretrinas y los piretroides afectan tanto el sistema nervioso central como el periférico de los insectos. Inicialmente estos compuestos estimulan las células nerviosas, producen descargas repetitivas y eventualmente parálisis. Un efecto similar pero más pronunciado que el producido por el dicloro difenil tricloroetano o DDT. E igualmente, solo una pequeña fracción de los canales de sodio necesita ser modificado por el piretroide para la generación de descargas repetitivas. Después de la modificación el canal permanece abierto por el insecticida, que impide el cierre por inactivación o desactivación y retiene la habilidad de conducir Na^+ . Sin embargo el potencial de membrana se desplaza, entonces el nervio funciona en un nuevo y estable estado de hiperexcitación anormal. En insectos esto produce incapacidad, pero con efecto subletal, conocido como derribo o *knockdown*. La amplitud de la corriente de sodio continua sin disminuir hasta que el nivel de hiperexcitación sobrepasa la capacidad de la célula de mantener la actividad de la

bomba de sodio (Davies y col., 2007).

1.4 Uso de Insecticidas en Venezuela

El uso de insecticidas en el país data de 1945 en Morón, estado Carabobo, cuando se inició el uso del DDT como insecticida de acción residual, en escala nacional contra la malaria. Este compuesto fue aplicado solo en la zona malárica del país y los resultados fueron inmediatos: para 1950 la tasa de mortalidad por malaria se había reducido a 9 por cada 100.000 habitantes y la enfermedad se erradicó en un área de 132.000 km². Luego de diez años de iniciada la campaña, en 1955, la tasa había bajado a 1 por cada 100.000 habitantes y el área erradicada aumentó a 305.414 km² (Academia biomedica digital, 1999). En 1971, la región libre de malaria en Venezuela había aumentado al 77% (460,054 km²). El control de la malaria en las regiones palúdicas consistió en fumigación domiciliaria con DDT cada 4 meses, como se había implementado desde 1947 y continuaría hasta 1983 (Gabaldon, 1983). Hoy en día el número de personas protegidas con la fumigación intradomiciliar con insecticidas de acción residual ha disminuido significativamente, de más de 2,7 millones de personas en 2015 a alrededor de 30 000 personas en 2016. El uso de mosquiteros nunca fue alto en el país, protegiendo un máximo de 30.000 personas en 2010 y disminuyendo desde entonces. Los mosquiteros tratados con insecticidas fueron utilizados solo por una pequeña proporción de la población porque no se los consideró la principal intervención de control de vectores (OMS, 2017b).

1.5 Resistencia a piretroides

De los 76 países endémicos de paludismo que proporcionaron datos entre 2010 y 2016, se detectó resistencia por lo menos a un insecticida en un vector de paludismo en 61 países, mientras que en 50 países, se informó resistencia a 2 o más clases de insecticidas (OMS, 2017b). La pérdida de susceptibilidad a insecticidas afecta a todas las principales especies de vectores y se ha determinado para todas las clases de insecticidas. El manejo de esta resistencia se complica por el hecho de que la misma puede deberse a diferentes factores. En términos generales, los mecanismos de resistencia se pueden dividir en dos grupos: resistencia metabólica y resistencia *knockdown* (OMS, 2016a).

En el caso de la resistencia metabólica se ha reportado sobre-producción de carboxilesterasas no específicas como una respuesta evolutiva a la presión selectiva de insecticidas organofosforados y carbamatos, en numerosas especies de artrópodos incluyendo mosquitos, garrapatas, áfidos y cucarachas (Hemingway y col. 1998). En algunas especies de mosquitos resistentes, una elevada actividad de carboxilesterasas involucra una rápida hidrólisis del insecticida más que un incremento del secuestro del mismo. Este mecanismo casi siempre se encuentra en asociación con la resistencia al organofosforado malatión y confiere un espectro de resistencia cruzada más estrecho, que el mecanismo basado en esterasas (Herath y col., 1987; Hemingway, 1982a, b, 1983). Otra forma de resistencia metabólica viene de las monooxigenasas dependientes de citocromo P450, son una importante y diversa familia de enzimas hidrofóbicas involucradas en el metabolismo de numerosos componentes endógenos

y exógenos. En muchos casos hay una conexión entre resistencia a insecticidas y una elevada actividad del citocromo P450, por ejemplo se han reportado recientemente elevados niveles de transcripción del gen *Cyp6z1* en cepas resistentes a piretroides de *An. gambiae* del este de África, (Hemingway y col., 2004).

La forma más común de resistencia contra DDT y piretroides involucra el sitio de acción, conocido como resistencia al derribo o *knockdown resistance* (kdr). Fue identificada en moscas domésticas por Busvine (1951). El factor kdr es conocido actualmente por ser un alelo recesivo confiriendo resistencia cruzada para toda una clase de piretroides y piretrinas, al igual que al DDT y análogos (Davies y col., 2007). Varios análisis demostraron que la mutación que origina la resistencia kdr es causado por una sustitución de la leucina de la posición 1014 por fenilalanina (CTT a TTT) y se encuentra en el dominio II, segmento S6 del Nav. Aunque también se han descrito otras mutaciones, donde se sustituye dicha leucina por histidina o serina. La interpretación más simple del cambio de leucina a fenilalanina es que impone una restricción estérica en el acceso de los piretroides lipofílicos al “bolsillo” de unión hidrofóbica dentro de la región del canal (Farnham y col., 1987). Alternativamente esta mutación puede causar cambios conformacionales en la proteína, que afectan la unión a las regiones vecinas (Williamson y col., 1996).

2. Antecedentes

Una vez encontrada por primera vez la resistencia al derribo o *knockdown resistance* (kdr), inducida por el intenso uso de insecticidas, se comenzó a idear formas de detectar y caracterizar ese tipo de resistencia en poblaciones de mosquitos del género *Anopheles*, en todo el mundo. Uno de los principales vectores de malaria en África y el mundo es *An. gambiae*, sobre el cual se han realizado múltiples estudios sobre su resistencia a insecticidas. Martínez-Torres y colaboradores en 1998, analizaron el dominio II del canal de sodio dependiente de voltaje en cepas de *An. gambiae* susceptibles y resistentes a permetrina, identificando en las cepas resistentes, la mutación puntal L1014F mediante secuenciación, la misma que había sido descrita previamente para moscas (*Musca domestica*) (Williamson y col., 1996) y cucarachas germánicas (*Blattella germanica*) (Miyazaki y col., 1996), esto les permitió concluir que esta sustitución relacionada con la resistencia está altamente conservada en varios géneros. Luego de ello, estos autores lograron el diseño de una prueba de PCR, diagnóstica para los alelos kdr, mediante el uso de cuatro pares de cebadores, esto permitió identificar tres genotipos (L/L, L/F, F/F). Además, la frecuencia de los alelos resistentes fue claramente correlacionada ($p=0,0005$) con la mortalidad observada en bioensayos. Dado que la resistencia kdr es recesiva con la aplicación de pruebas moleculares se puede discriminar entre individuos heterocigotos y homocigotos susceptibles, por lo tanto, el diagnóstico molecular es mucho más eficiente para captar bajas frecuencias de los genes de resistencia que están presentes principalmente en forma heterocigótica, y el manejo de la resistencia podría ser

implementado en una etapa muy temprana (Martinez-Torres y col., 1998). Por otro lado también se han identificado este tipo de resistencia en poblaciones de *An. stephensi* (Enayati y col.,2003) y *Aedes aegypti* (Bregues y col.,2003).

An. albimanus es otro vector clave en la transmisión de la malaria, en este caso en el continente americano (Zimmerman, 1992; Sinka y col., 2010). Las medidas actuales de control de vectores en la región se basan en la distribución en masa de mosquiteros con insecticidas de acción residual y en la fumigación en interiores con piretroides (OMS, 2016a). Lol y colaboradores en el año 2013 intentaron caracterizar la región homóloga kdr del gen de canal de sodio dependiente de voltaje en *An. albimanus* y realizar un análisis retrospectivo preliminar de muestras de campo recogidas en la década de 1990, coincidiendo con un tiempo de aplicación en masa de piretroides, para ello, diseñaron cebadores degenerados para amplificar la región kdr en una cepa de *An. albimanus* de laboratorio susceptible a piretroides. Posteriormente, utilizaron un par de cebadores más específicos para amplificar y secuenciar la región que contiene el codón 1014 asociado con resistencia a piretroides en otras especies de *Anopheles*. La secuenciación de los productos de PCR confirmó la presencia del alelo kdr susceptible en una de la cepa del laboratorio (L1014) y la presencia de alelos kdr resistentes en individuos homocigotos de México (L1014F), Nicaragua (L1014C) y Costa Rica (L1014C). Gracias a este trabajo se describe por primera vez, la región kdr en *An. Albimanus*. Además, la evidencia molecular sugiere la presencia de la resistencia de tipo kdr en las muestras de campo recogido de *An. albimanus* en Mesoamérica en los años noventa (Lol y col., 2013).

Por otro lado, López, A y col. en el año 2015, identificaron mutaciones puntuales en el gen del canal de sodio dependiente de voltaje de *Anopheles* circulantes en Venezuela. Se reprodujeron ensayos de PCR anidado y alelo-especifico reportados en la literatura para la amplificación del segmento transmembrana S6 del dominio II del gen en *An. gambiae* y detección de mutaciones puntuales relacionada con la resistencia kdr, en estos vectores. La reproducción de estos experimentos en especies venezolanas no fue efectiva, por lo cual diseñaron un nuevo ensayo de PCR que permitió amplificar una región del gen del Nav en *Anopheles albimanus*, *An. marajoara* y *An. aquasalis*. La identificación de mutaciones puntuales en la posición 1014, relacionada con la resistencia a insecticida, fue posible, mediante el alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas de los productos de PCR, encontrándose dos tipos de sustituciones L1014F y L1014C. Siendo ésta la primera vez que se reporta la resistencia kdr en aislados venezolanos de *Anopheles* (López, 2015). A pesar de las muchas pruebas moleculares realizadas para detectar mutaciones marcadoras de resistencia *knockdown* a insecticidas en mosquitos del género *Anopheles* en África y Asia, en América no se han registrado la misma variedad de pruebas moleculares en los *Anopheles* típicos del continente. Sin embargo se han probado otros métodos para el estudio de resistencia a través de ensayos bioquímicos o por bioensayos, exponiendo los insectos a distintas concentraciones de insecticidas (OMS, 2016a). Además de lo reportado en *An. albimanus*, también se ha visto en poblaciones de *An. pseudopunctipennis*, *An. darlingi* y *An. vestidipennis*, resistencia a uno o más insecticidas, especialmente en áreas tratadas fuertemente con insecticidas (OMS, 1992). También se ha reportado

resistencia a DDT y a deltametrina en *An. albimanus* del sur de la Península de Yucatán en México, con niveles elevados de glutatión S-transferasas (GST), monooxigenasas y esterasas, y a pirimifos metil (Dzul, y col., 2007). En Colombia se llegó a detectar resistencia a DDT y Lambda-cialotrina en *Anopheles darlingi* (Suárez y col., 1990). También en Colombia, realizaron bioensayos estandarizados de la OMS, además de ensayos bioquímicos de microplacas y se evidenció altos niveles de oxidasas de función mixta y esterasas no específicas (Fonseca-Gonzalez y col., 2009). La OMS ha recopilado varios reportes de la realización de bioensayos para la detección de resistencia a distintos insecticidas en varios países de América como Brasil, Bolivia, Colombia, Ecuador, Guatemala, Haití, Honduras, Nicaragua, Perú y República Dominicana (OMS,2016b). En el caso de Venezuela, en el municipio Libertador, estado Sucre, se realizaron pruebas biológicas y bioquímicas en poblaciones de *An. aquasalis* y se detectó elevación de las esterasas alfa y beta, y alteración de la acetilcolinesterasa. Las enzimas oxidasas de función múltiple, también resultaron alteradas (Molina y Figueroa, 2009). En otros estados del país, el uso prolongado de insecticidas ha generado la aparición de resistencia en poblaciones de vectores como *An. darlingi* y *An. aquasalis* de los estados Sucre y Aragua (Molina y col.,1997), también en el estado Monagas (Cortéz, 1999) y con otros vectores secundarios como *An. albimanus* (Molina, 2000). En Aragua, *An. aquasalis* se encuentra en zonas de desarrollo agropecuario cercanas al Lago de Valencia y recibe presión de insecticidas en forma indirecta, del cual se demostraron niveles significativos de resistencia al piretroide lambdacialotrina y al organofosforado pirimifosmetil (Figueroa y col., 2006).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Identificar mutaciones puntuales marcadoras de resistencia a piretroides en cepas de mosquitos del género *Anopheles* circulantes en Venezuela.

3.2 Objetivos específicos

- Aislar ADN total de distintas especies de *Anopheles* sp.
- Amplificar el dominio II del Canal de sodio dependiente de voltaje en *Anopheles* sp.
- Determinar la prevalencia de la mutación L1014F en *Anopheles* sp. colectados en los estados Aragua y Sucre.
- Investigar la presencia de múltiples mutaciones puntuales en el dominio II del canal de sodio dependiente de voltaje relacionadas con resistencia a piretroides en *Anopheles* sp.

4. Materiales y métodos

4.1 Muestras

Se utilizaron individuos adultos de *Anopheles albimanus* proveídos por el insectario “Octavio Suarez” del Centro de Microbiología y Biología Celular del instituto venezolano de investigaciones científicas (IVIC). Adicionalmente, se usaron individuos adultos de *An. aquasalis* colectados en Maracay, estado Aragua y de Cariaco, estado Sucre. En el caso de las muestras colectadas en el estado Aragua, fueron sometidas a pruebas de bioensayos para determinar resistencia diferentes insecticidas como el piretroide deltametrina y a fenitotrión y malation, ambos compuestos organofosforados.

4.2 Aislamiento de ácidos nucleicos

Se utilizaron 5 individuos adultos por cada muestra. Antes de empezar el aislamiento se retiraron las patas, la cabeza y las alas, para solo utilizar el abdomen. Se suspendieron las muestras en 200 µl de solución de resuspensión o lavado, está constituida por: Tris-HCl 10 mM, cloruro de sodio 60 mM, sacarosa al 5%, EDTA 10 mM a pH 7, después se homogeneizó la muestra en un homogeneizador de embudo y varilla. Luego se añadió 250 µl de solución de lisis, compuesta por: SDS al 1,25 %, tris-HCl 300 mM, sacarosa al 5 %, EDTA 10mM a pH 7,8. Se incubó la mezcla a 65°C por 30 minutos, durante la incubación, cada 10 minutos, se mezcló la muestra con un agitador tipo vórtex. Después se agregó al tubo un volumen de solución de cloroformo-fenol (1:1) y se mezcló por inversión. Inmediatamente se centrifugó a 5000rpm por 10 minutos en una centrifuga marca Eppendorf *centrifuge* (5417C). Del

tubo se colectó la fase acuosa y se llevó a un nuevo tubo. Después se volvió a agregar un volumen de cloroformo-fenol (1:1) y a centrifugar a 5000rpm por 10 minutos. Una vez extraída la fase acuosa en otro nuevo tubo, se añadió ½ volumen de acetato de potasio a pH 4,8. Luego se incubó a -20°C por 15 minutos. Después se centrifugó a velocidad máxima (13.400 rpm) por 10 minutos en una centrifuga marca Eppendorf *minispin*. Luego se descartó la mayor parte del líquido, se secó la muestra en un concentrador de vacío marca Eppendorf *Vacufuge Concentrator*, durante 45 minutos a 60°C. Finalmente se resuspendió en 20 µl de agua ultrapura (Modificado de Sambrook y Russell, 2006).

4.3 Reacción en cadena de polimerasa (PCR). PCR semi-anidado

Esta prueba molecular se basó en lo desarrollado en el trabajo de Martínez-Torres y colaboradores, (1998). Esta prueba consistió en un PCR semi-encestado para la amplificación de la región que codifica para el segmento transmembrana S6, del dominio II del gen que codifica el canal de sodio dependiente de voltaje, donde se emplearon los cebadores D1, Dg2 y Dipd1. Empieza con una primera ronda de PCR con los oligonucleotidos D1 y Dg2, para mayor información sobre los cebadores ver Tabla I. En la primera ronda se realizaran 35 ciclos: 94°C por 1 minuto, 50°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos y una extensión final por 10 minutos a 72°C. Para la segunda ronda se utilizó el oligonucleotido Dipd1 (Tabla I) y nuevamente el oligonucleotido Dg2. Las condiciones son las mismas que en la primera ronda, exceptuando una ligera disminución en la temperatura de hibridación a 48°C. Los componentes de cada reacción se encuentran resumidos en la tabla II.

Tabla I. Cebadores empleados y sus respectivas temperaturas de hibridación en reacción de PCR semi-anido

Cebador	Secuencia 5'-3'	Temperatura de hibridación (°C)	Tamaño esperado (pb)
D1	5'AARYTNGCNAARTCTTGGCC3'	50	409
Dg2	5'GCDATYTTTRTTNGTNGTNTCRTTTRTC3'	50	
Dipd1	5' TGGCCSACRCTKAAAYTTACTC 3'	48	409

Tabla II. Componentes de las mezclas de amplificación mediante PCR semi-anidado

Componentes de la solución de reacción	Concentración o volumen final
Primera ronda	
Master Mix 2X*	1X
Cebador sentido D1 (10 µM)	0,6 µM
Cebador antisentido Dg2 (10 µM)	0,6 µM
Muestra de ADN	5 µl
Agua ultrapura	Hasta completar el volumen final
Volumen final	50 µl
Segunda ronda	
Master Mix 2X*	1X
Cebador sentido Dipd1 (10 µM)	0,6 µM
Cebador antisentido Dg2 (10 µM)	0,6 µM
Muestra de ADN	5 µl
Agua ultrapura	Hasta completar el volumen final
Volumen final	50 µl

* PCR Master Mix es una solución premezclada (PROMEGA), que contiene 50 U/ml de Taq ADN Polimerasa, 400 µM de cada dNTP, 300mmol/L de MgCl₂ y tampones de reacción.

4.4 Reacción en cadena de polimerasa (PCR). PCR utilizando los cebadores OL1

Se hizo otra reacción de PCR para la amplificación de la región que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje, tal y como describe López y col., (2015), utilizando los oligonucleótidos OL1A y OL1B. En la tabla III se indica la secuencia, temperatura de hibridación de los cebadores, así como también el tamaño

esperado del fragmento amplificado. En la tabla VI se presentan de manera general los componentes de las reacciones para la amplificación de las secuencias de interés. La reacción de amplificación consta de 25 ciclos, 98 °C por 30 segundos, 98°C por 10 segundos, 53,1 °C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Tabla III. Cebadores OL1A y OL1B diseñados para la amplificación del gen que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje

Cebador	Secuencia 5'-3'	Temperatura de hibridación (°C)	Tamaño esperado (pb)
OL1A	5'ACTCATTTCATCATGGGCAG3'	59,4	1415
OL1B	5'GGAATGCAAGAGACATCGCCA3'	61,1	

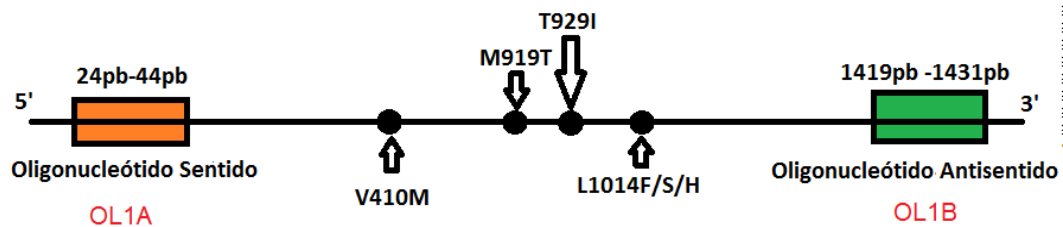


Figura 2. Representación esquemática de la amplificación utilizando los oligonucleótidos OLA1 y OLB1. Los puntos negros indican la ubicación de las mutaciones más comunes, relacionadas con la resistencia a piretroides. Se encuentra señalado el lugar donde se van a unir específicamente los cebadores y su tamaño. Tomado de López y col., 2015.

Tabla IV. Componentes de las mezclas de amplificación mediante PCR con los cebadores OL1A y OL1B

Componentes de la solución de reacción	Concentración o volumen final
Master Mix 2X*	1X
Cebador sentido OL1A (10 μ M)	0,8 μ M
Cebador antisentido OL1B (10 μ M)	0,8 μ M
Cloruro de magnesio (25mmol/L)	1 mmol/L
Muestra de ADN	5 μ l
Agua ultrapura	Hasta completar el volumen final
Volumen final	50 μ l

* PCR Master Mix es una solución premezclada (PROMEGA), que contiene 50 U/ml de Taq ADN Polimerasa, 400 μ M de cada dNTP, 300 mmol/L de MgCl₂ y tampones de reacción.

4.5 Visualización mediante electroforesis en geles de agarosa de ADN genómico y de productos amplificados por PCR

Se tomaron alícuotas de 5 μ l de las muestras de ADN y se sometió a electroforesis de agarosa al 1% para el ADN genómico y 2 % para los productos de amplificación. Los geles de agarosa se prepararon de la siguiente manera: Se disolvió 1 o 2 g de agarosa en 100 ml de tampón Tris-Borato EDTA (TBE). La agarosa disuelta se calentó en microondas y luego en un vaso precipitado se le agregó un colorante fluorescente marca invitrogen, *SYBR Safe*. Se sirvió 30 ml del gel líquido en un molde con el peine del tamaño adecuado, dependiendo del número de muestras y se dejó enfriar. Una vez polimerizado se retiró el peine y se procedió a colocar el gel en una cámara de electroforesis horizontal Enduro XL de marca Labnet International Inc. con fuente de poder integrada., el cual contenía el tampon TBE 0,5X. Luego con una micropipeta se tomó 10 μ l de las muestras de ADN y se mezcló con 3 μ l de tampón de carga *Blue/Orange Loading Buffer 6X* de Promega,

posteriormente se cargó la mezcla en los pocillos formados por el peine. Después se tapó la cámara y aplicó una corriente de 80 voltios por 45 minutos. En el mismo gel donde también está un marcador molecular de 100 o 1000 pb marca Promega *Ladder DNA Marker* para comparar el tamaño de los fragmentos esperados. Luego, el gel se colocó en un transiluminador con luz UV y por fluorescencia se visualizaron los fragmentos de ADN (Sambrook y Russell, 2006).

4.6 Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR fueron secuenciados automáticamente por la empresa Macrogen Inc. Para esto fue necesaria la purificación de 50 µl del producto, a los cuales se le agregó 1 µl de acetato de amonio 7,5M y 125 µl de etanol absoluto. Posteriormente se dejaron en hielo por 30 minutos. Luego se procedió a centrifugar en 5 minutos a 15000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó con 100 µl de etanol a 70%. Se dejó secar y finalmente se resuspendió en 30 µl de agua (Sambrook y Russell, 2006). A la hora de enviar la muestra para su secuenciación, se usaron 5 µl del producto purificado en un tubo y otros dos con 5 µl de los dos cebadores, uno por cada oligonucleótido. Una vez hecha la secuenciación, Macrogen Inc envió dos secuencias por cada muestra.

4.7 Análisis de secuencias

Inicialmente se realizó un análisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que comparó las secuencias de nucleótidos obtenidas por secuenciación con las bases de datos de secuencias nucleotídicas del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), el cual contiene secuencias de canales de sodio de distintas especies de *Anopheles* y calculó la importancia estadística de las coincidencias. Con

Clustal Omega, del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), se realizó un alineamiento múltiple de secuencias, tanto de las obtenidas por la amplificación con los cebadores OL1A y OL1B, como de secuencias del segmento II del canal de sodio dependiente de voltaje de diferentes *Anopheles* spp. guardadas en la base de datos de GenBank (Tabla V). Primero con el programa Bioedit versión 7.2.5 se obtuvo una imagen del alineamiento múltiple de secuencia hecho por clustal omega, tanto de la secuencia de nucleótidos, como de la predicción aminoacídica. Con MEGA 7.0 (Kumar y col.,2016) se identificaron las regiones conservadas del mismo alineamiento múltiple, a su vez se obtuvo la matriz de porcentaje de identidad y los arboles filogenéticos por el método del vecino más cercano (Neighbor-joining).

Tabla V. Secuencias de ADN del canal de sodio voltaje dependiente de diferentes *Anopheles* spp. usados en el alineamiento múltiple

Especie	Identificación de secuencia
<i>An. albimanus</i>	GenBank: KF137581.1
<i>An. gambiae</i>	GenBank: Y13592.1
<i>An. darlingi</i>	GenBank: JQ658981.1 GenBank: JQ658983.1 GenBank: JQ658985.1 GenBank: JQ658984.1
<i>An. marajoara</i>	GenBank: JQ658986.1 GenBank: JQ658987.1 GenBank: JQ658988.1 GenBank: JQ658989.1

5. Resultados

Se evaluaron mediante PCR 27 muestras, de todas ellas cuatro son adultos *An. albimanus* proveídos por el insectario “Octavio Suarez” del IVIC. Adicionalmente, se usaron 12 muestras de *An. aquasalis* colectados en el estado Sucre. Por otro lado 11 muestras, también de *An. aquasalis*, fueron colectadas en el estado Aragua. Estas últimas, después de colectadas, se sometieron a pruebas de bioensayos con la cual se demostró que eran resistentes a deltametrina, fenitotrión y malatión.

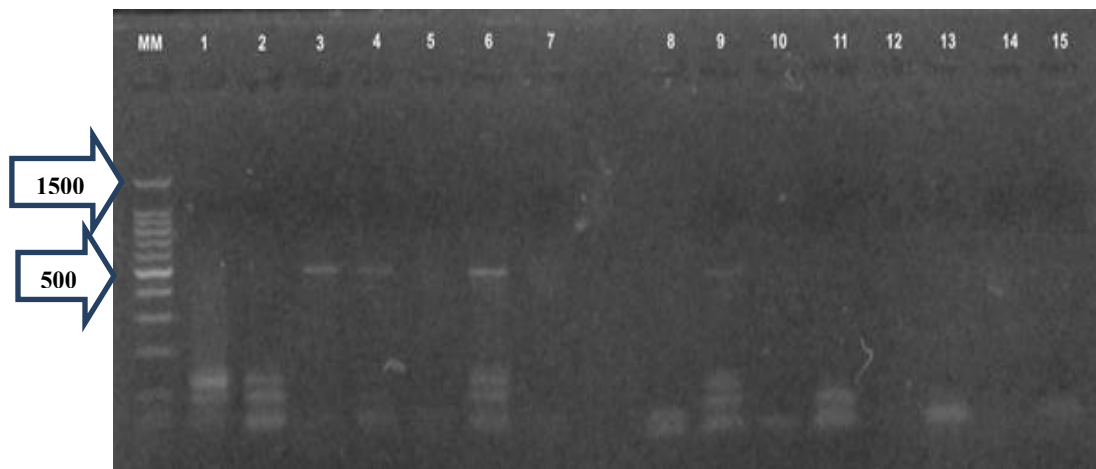


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa al 2%, de los productos de PCR utilizando los cebadores OL1A y OL1B. Carril MM: marcador molecular de 100 pb, Carril 1: An7/8, Carril 2: An7/8', Carril 3: AnF, Carril 4: AnF', Carril 5: Aqmcy4112, Carril 6: Aqmcy4112III, Carril 7: AqmcyS4112, Carril 8: Aqmcy1222, Carril 9: Aqmcy1222III, Carril 10: Aqmcy1212, Carril 11: Aqmcy1212III, Carril 12: Aqmcy4122-1, Carril 13: Aqmcy4122-1III, Carril 14: Aqmcy4122-2, Carril 15: Aqmcy4122-2III, (ver anexos).

Al realizar las pruebas de PCR con los cebadores OL1A y OL1B, se esperaba una amplificación de 1415 pb. Sin embargo, una vez realizada la electroforesis de agarosa de los productos de PCR (figura 3), se observó una banda de aproximadamente 500pb en los carriles 3, 4, 6 y 9. Es importante destacar que este resultado fue consistente en las muestras analizadas.

En contraste no fue efectiva la obtención de una amplificación al realizar los ensayos de PCR semi-anidado, basados en lo reportado en la literatura para la amplificación del segmento S6 del gen en *An. gambiae*, , utilizando la técnica descrita por Martinez-Torres y col. en 1998. Los productos de PCR de 17 muestras fueron enviados a Macrogen Inc. (Corea) para la secuenciación automatizada de los mismos.

El análisis BLAST de las muestras obtenías por secuenciación mostró que las siguientes secuencias de nucleótidos son homólogas con las del canal de sodio de *Anopheles* spp., guardadas en la base de datos del NCBI: Aqmcys4112, Aqmcy1222, Aqmcy1222III, Aqmcy1212, Aqmcy1212III, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. En el caso de las muestras: An 7/8, AnF, AnF', Aqmcy4112, Aqmcy4112III, Aqmcy4122-1, Aqmcy4122-1III, Aqmcy4122-2, Aqmcy4122-2III la calidad de la secuencia obtenida no permitió evidenciar alguna similitud con las secuencias del Nav.

El alineamiento (figura 5) permitió separar aquellas secuencias que mostraban mutaciones puntuales en la posición 1014 de las que mantenían el codón silvestre, encontrándose 9 secuencias con la mutación L1014F y 5 secuencias con la mutación L1014C, esto indica que de las 22 secuencias analizadas 64% representan aislados resistentes de *An. aquasalis*, tanto del estado Aragua como de Sucre (Figura 4).

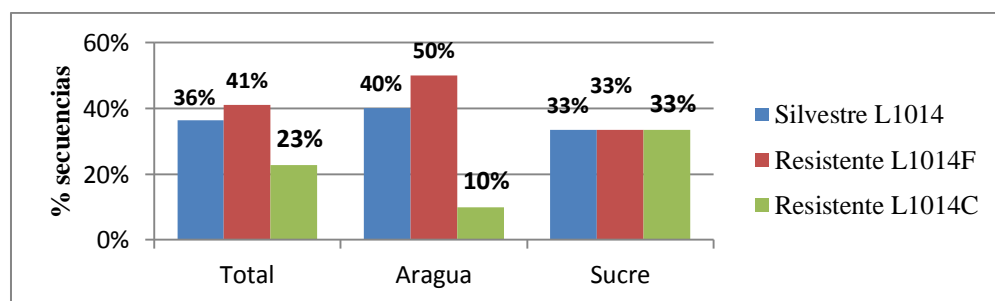


Figura 4: Frecuencia de los codones silvestre y resistente en las muestras analizadas.

5-A

	ATGCATTCA	TATGATTGT	GTTTCGTGA	TATGTGGAG	AATGGATAGA	ATCAATGTGG
An. albiman						
Aqmcy1212	T	C	C	G	CA	TG.AT
Aqmcy1212II	T	C	C	G	CA	TG.AT
Aqmcy1212III	T	C	C	G	CA	TG.AT
Aqmcy1212IV	T	C	C	G	CA	TG.AT
Aqmcys4112	T	C	C	G	CA	TG.AT
2	T	C	C	G	CA	TG.AT
3	T	C	C	G	CA	TG.AT
5	T	C	C	G	CA	TG.AT
6	T	C	C	G	CA	TG.AT
8	T	C	C	G	CA	TG.AT
9	T	C	C	G	CA	TG.AT
11	T	C	C	G	CA	TG.AT
12	T	C	C	G	CA	TG.AT

	GATTGTATGT	TAGTTGGAGA	TGTGTCGTGC	ATACCATTCT	TCTTAGCAAC	TGTAGTTATA
An. albiman						
Aqmcy1212	G	C	T	G	A	C
Aqmcy1212II	G	C	T	G	A	C
Aqmcy1212III	G	C	T	G	A	C
Aqmcy1212IV	G	C	T	G	A	C
Aqmcys4112	G	C	T	G	A	C
2	T	A	G	C	T	G
3	T	A	G	C	T	G
5	T	A	G	C	T	G
6	T	A	G	C	T	G
8	T	A	G	C	T	G
9	T	A	G	C	T	G
11	T	A	G	C	T	G
12	T	A	G	C	T	G

	GGAAAC	TTGS	TCGTAAGTGC	ATTTACTGAT
An. albiman				
Aqmcy1212	T	C	C	T
Aqmcy1212II	T	C	C	T
Aqmcy1212III	T	C	C	T
Aqmcy1212IV	T	C	C	T
Aqmcys4112	T	C	C	T
2	T	C	C	T
3	T	C	C	T
5	T	C	C	T
6	T	C	C	T
8	T	C	C	T
9	T	C	C	T
11	T	C	C	T
12	T	C	C	T

5-B

	ATGCATTCA	TATGATTGT	GTTTCGTGA	TATGTGGAG	AATGGATAGA	ATCAATGTGG
An. albimanus						
Aqmcy1222	T	C	C	G	CA	TG.AT
Aqmcy1222II	T	C	C	G	CA	TG.AT
Aqmcy1222III	T	C	C	G	CA	TG.AT
Aqmcys4112II	T	C	C	G	CA	TG.AT
1	T	C	C	G	CA	TG.AT
4	T	C	C	G	CA	TG.AT
7	T	C	C	G	CA	TG.AT
10	T	C	C	G	CA	TG.AT

	GATTGTATGT	TAGTTGGAGA	TGTGTCGTGC	ATACCATTCT	TCTTAGCAAC	TGTAGTTATA
An. albiman						
Aqmcy1222	G	C	T	G	A	C
Aqmcy1222II	G	C	T	G	A	C
Aqmcy1222III	G	C	T	G	A	C
Aqmcys4112II	G	C	T	G	A	C
1	G	C	T	G	A	C
4	G	C	T	G	A	C
7	G	C	T	G	A	C
10	G	C	T	G	A	C

	GGAAAC	TTG	TCGTAAGTGC	ATTTACTGAT
An. albiman				
Aqmcy1222	T	C	C	T
Aqmcy1222II	T	C	C	T
Aqmcy1222III	T	C	C	T
Aqmcys4112II	T	C	C	T
1	T	C	C	T
4	T	C	C	T
7	T	C	C	T
10	T	C	C	T

5-C

	GGAGAATGGA	TAGAATCAAT	GTGGGATTGT	ATGTTAGTTG	GAGATGTGTC	GTGCATACCA
An. albima						
An gambiae	T	C	C	T	A	C
An darling	R	Y	R	N	G	
An darling	R	Y	R	N	G	
An darling	R	Y	R	N	G	
An darling	R	Y	R	N	G	
An marajoa	R	Y	R	N	C	A
An marajoa	R	Y	R	N	C	A
An marajoa	R	Y	R	N	C	A
An marajoa	R	Y	R	N	C	A

	TTCTTCTTAG	CAACTGTAGT	TATAGGAAC	TTGGTCGTAA	GTGCATTAC	TGATACGAAC
An. albima						
An gambiae	T	G	C	A	T	A
An darling	T	G	C	A	T	A
An darling	T	G	C	A	T	A
An darling	T	G	C	A	T	A
An darling	T	G	C	A	T	A
An marajoa	T	G	C	A	T	A
An marajoa	T	G	C	A	T	A
An marajoa	T	G	C	A	T	A
An marajoa	T	G	C	A	T	A

	ATTGCAAA	T
An. albima		
An gambiae	C	TTGTCA
An darling	C	TT.TCN
An darling	C	TTGTCTN
An darling	C	TTGTCTN
An darling	C	TTGTCTN
An marajoa	C	TTGTCT
An marajoa	C	TTGTCTN
An marajoa	C	TTGTCTN
An marajoa	C	TTGTCTN

5-D

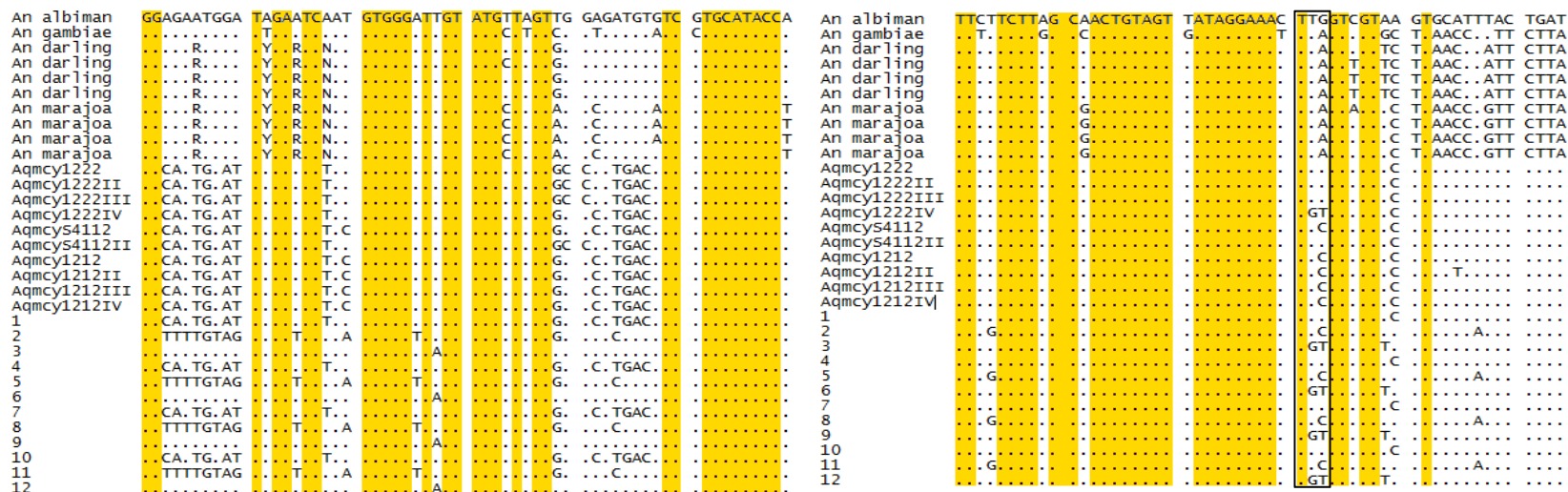


Figura 5: Alineamiento múltiple de secuencias con las regiones conservadas resaltadas. Cada grupo de secuencias fue alineada entre sí, las posiciones idénticas a la región del dominio II del Nav de *An. albimanus* (GenBank: KF137581.1), son representadas con un punto y se muestra cualquier cambio de base en la secuencia. El codón 1014 está encerrado en el cuadrado negro (A) Secuencias con presencia de la mutación *kdr*. (B) Secuencias sin presencia de mutación *kdr*. (C) Secuencias de diferentes *Anopheles* spp. guardadas en la base de datos de GenBank (ver tabla V). (D) Todas las secuencias anteriores juntas.

Luego se realizó la traducción *in silico* de las secuencias obtenidas y se compararon mediante un alineamiento múltiple con las secuencias depositadas en el banco de genes del NCBI (figura 6), lo cual permitió corroborar los resultados mostrados anteriormente y evidenciar el cambio de aminoácido en la posición estudiada.

6-A

An. albimanus	MHSFMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDVSCIPFFLATVVIGN	L	V	S	A	F	T	D
Aqmcyl212 NGL. T. VT.	F	.	R
Aqmcyl212II NGL. T. VT.	F	.	R
Aqmcyl212III NGL. T. VT.	F	.	R
Aqmcyl212IV NGL. T. VT.	F	.	R
Aqmcyl222IV NGL. VT.	C	.	R
Aqmcys4112 NGL. T. VT.	F	.	R
2 FVVD. K. V. A. V.	F	Y.
3 S.	C
5 FVVD. K. V. A. V.	F	Y.
6 S.	C
8 FVVD. K. V. A. V.	F	Y.
9 S.	C
11 FVVD. K. V. A. V.	F	Y.
12 S.	C

6-B

An. albiman	MHSFMIVFRV LCGEWIESMW DCMLVGDVSC IPFFLATVVI GN	L	V	S	A	F	T	D
Aqmcyl222 NGL. PVT.	R
Aqmcyl222II NGL. PVT.	R
Aqmcyl222III NGL. PVT.	R
Aqmcys4112II NGL. PVT.	R
1 NGL. VT.	R
4 NGL. VT.	R
7 NGL. VT.	R
10 NGL. VT.	R

6-C

An albiman	GEWIESMWDC MLVGDVSCIP FFLATVVIGN	L	V	S	A	F	T	D	T	N	I	A	N	X
An gambiae	L	N	L	F	L	A	L	L	L	S	.
An darling	.X.XXX.....	.	.	L	N	L	F	L	A	L	L	L	X	.
An darling	.X.XXX.....	.	.	L	N	L	F	L	A	L	L	L	X	.
An darling	.X.XXX.....	.	.	L	N	L	F	L	A	L	L	L	X	.
An darling	.X.XXX.....	.	.	L	N	L	F	L	A	L	L	L	X	.
An marajoa	.X.XXX.....	.	.	L	N	L	F	L	A	L	L	L	S	.
An marajoa	.X.XXX.....	.	.	L	N	L	F	L	A	L	L	L	X	.
An marajoa	.X.XXX.....	.	.	L	N	L	F	L	A	L	L	L	X	.
An marajoa	.X.XXX.....	.	.	L	N	L	F	L	A	L	L	L	X	.

6-D

An albiman	GEWIESMWDC MLVGDVSCIP FFLATVVIGN	L	V	S	A	F	T	D
An gambiae	.X.XXX.....	.	.	L	N	L	F	L
An darling	.X.XXX.....	.	.	L	N	L	F	L
An darling	.X.XXX.....	.	.	L	N	L	F	L
An darling	.X.XXX.....	.	.	L	N	L	F	L
An marajoa	.X.XXX.....	.	.	L	N	L	F	L
An marajoa	.X.XXX.....	.	.	L	N	L	F	L
Aqmcyl222 NGL. PVT.	R
Aqmcyl222II NGL. PVT.	R
Aqmcyl222III NGL. PVT.	R
Aqmcyl222IV NGL. VT.	C	.	R
Aqmcys4112 NGL. T. VT.	F	.	R
Aqmcys4112II NGL. PVT.	R
Aqmcyl212 NGL. T. VT.	F	.	R
Aqmcyl212II NGL. T. VT.	F	.	R
Aqmcyl212III NGL. T. VT.	F	.	R
Aqmcyl212IV NGL. T. VT.	F	.	R
1 NGL. VT.	R
2 FVVD. K. V. A. V.	F	Y.
3 S.	C
4 NGL. VT.	R
5 FVVD. K. V. A. V.	F	Y.
6 S.	C
7 NGL. VT.	R
8 FVVD. K. V. A. V.	F	Y.
9 S.	C
10 NGL. VT.	R
11 FVVD. K. V. A. V.	F	Y.
12 S.	C

Figura 6: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la región kdr. Cada grupo de secuencias fue alineada entre sí, las posiciones idénticas a la región de *An. albimanus* (GenBank: KF137581.1), son representadas con un punto y se muestra cualquier cambio de aminoácido en la secuencia. El lugar del cambio de aminoácido está encerrado en el cuadrado negro. (A)

Secuencias con presencia de la mutación kdr. (B) Secuencias sin presencia de mutación kdr. (C) Secuencias de diferentes *Anopheles spp.* guardadas en la base de datos de GenBank (ver tabla V). (D) Todas las secuencias anteriores juntas

Se evidenció que el cambio de aminoácido de leucina a fenilalanina fue en 41% de las muestras y de leucina por cisteína en 29%. Tomando en cuenta los resultados se realizó un análisis de distancias filogenéticas con el programa MEGA 7.0 (figura 7), lo cual nos indica la identidad entre secuencias y su grado de similitud, esto con la intención de evaluar otros polimorfismos distintos al mostrado en la posición 1014.

7-A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. An.albimanus														
2. Aqmcy1222IV	0.15													
3. AqmcyS4122	0.15	0.02												
4. Aqmcy1212	0.15	0.02	0.00											
5. Aqmcy1212III	0.16	0.03	0.01	0.01										
6. Aqmcy1212III	0.15	0.02	0.00	0.00	0.01									
7. Aqmcy1212IV	0.15	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00								
8. 2	0.15	0.14	0.12	0.12	0.13	0.12	0.12							
9. 3	0.03	0.15	0.17	0.17	0.18	0.17	0.17	0.17						
10. 5	0.15	0.14	0.12	0.12	0.13	0.12	0.12	0.00	0.17					
11. 6	0.03	0.15	0.17	0.17	0.18	0.17	0.17	0.17	0.00	0.17				
12. 8	0.15	0.14	0.12	0.12	0.13	0.12	0.12	0.00	0.17	0.00	0.17			
13. 9	0.03	0.15	0.17	0.17	0.18	0.17	0.17	0.17	0.00	0.17	0.00	0.17		
14. 11	0.15	0.14	0.12	0.12	0.13	0.12	0.12	0.00	0.17	0.00	0.17	0.00	0.17	
15. 12	0.03	0.15	0.17	0.17	0.18	0.17	0.17	0.17	0.00	0.17	0.00	0.17	0.00	0.17

7-B

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. An.albimanus								
2. AqmcyS4112II	0.17							
3. Aqmcy1222	0.17	0.00						
4. Aqmcy1222II	0.17	0.00	0.00					
5. Aqmcy1222III	0.17	0.00	0.00	0.00				
6. 1	0.16	0.02	0.02	0.02	0.02			
7. 4	0.16	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00		
8. 7	0.16	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	
9. 10	0.16	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00

7-C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. An.albimanus									
2. An.gambiae	0.18								
3. An.darlingi	0.12	0.07							
4. An.darlingi2	0.13	0.06	0.01						
5. An.darlingi3	0.12	0.06	0.01	0.01					
6. An.darlingi4	0.13	0.06	0.00	0.00	0.00				
7. An.marajoara	0.16	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04			
8. An.marajoara2	0.15	0.05	0.04	0.03	0.03	0.04	0.00		
9. An.marajoara3	0.15	0.05	0.04	0.03	0.03	0.04	0.00	0.00	
10. An.marajoara4	0.14	0.05	0.04	0.03	0.03	0.03	0.01	0.00	0.00

7-D

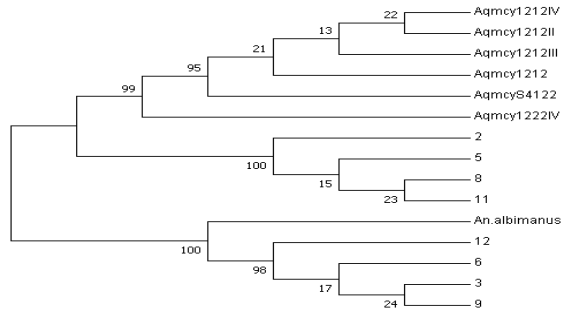
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31			
1. An.albimanus																																		
2. An.gambiae	0.27																																	
3. An.darlingi	0.17	0.14																																
4. An.darlingi2	0.15	0.14	0.02																															
5. An.darlingi3	0.16	0.15	0.01	0.01																														
6. An.darlingi4	0.16	0.15	0.01	0.01	0.00																													
7. An.marajoara	0.20	0.13	0.08	0.08	0.09	0.09																												
8. An.marajoara2	0.22	0.13	0.09	0.10	0.10	0.10	0.02																											
9. An.marajoara3	0.21	0.12	0.09	0.09	0.10	0.10	0.01	0.01																										
10. An.marajoara4	0.21	0.12	0.09	0.09	0.10	0.10	0.01	0.01	0.00																									
11. Aqmcys4112	0.14	0.40	0.29	0.26	0.27	0.27	0.30	0.33	0.31	0.31																								
12. Aqmcys4112II	0.13	0.42	0.29	0.26	0.27	0.27	0.33	0.36	0.34	0.34	0.05																							
13. Aqmcys1222	0.13	0.42	0.29	0.26	0.27	0.27	0.33	0.36	0.34	0.34	0.05	0.00																						
14. Aqmcys1222II	0.13	0.42	0.29	0.26	0.27	0.27	0.33	0.36	0.34	0.34	0.05	0.00	0.00																					
15. Aqmcys1222III	0.13	0.42	0.29	0.26	0.27	0.27	0.33	0.36	0.34	0.34	0.05	0.00	0.00	0.00																				
16. Aqmcys1222IV	0.14	0.40	0.29	0.26	0.27	0.27	0.30	0.33	0.31	0.31	0.03	0.05	0.05	0.05	0.05																			
17. Aqmcys1212	0.14	0.40	0.29	0.26	0.27	0.27	0.30	0.33	0.31	0.31	0.00	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03																		
18. Aqmcys1212II	0.15	0.40	0.28	0.26	0.27	0.27	0.30	0.33	0.31	0.31	0.01	0.06	0.06	0.06	0.06	0.04	0.01																	
19. Aqmcys1212III	0.14	0.40	0.29	0.26	0.27	0.27	0.30	0.33	0.31	0.31	0.00	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.00	0.01																
20. Aqmcys1212IV	0.14	0.40	0.29	0.26	0.27	0.27	0.30	0.33	0.31	0.31	0.00	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.00	0.01	0.00															
21. 1	0.12	0.38	0.27	0.25	0.26	0.26	0.29	0.31	0.30	0.30	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02														
22. 2	0.14	0.45	0.31	0.29	0.30	0.30	0.36	0.39	0.37	0.37	0.15	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.15	0.16	0.15	0.15	0.16													
23. 3	0.04	0.30	0.19	0.16	0.17	0.17	0.23	0.26	0.25	0.25	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.14	0.17	0.19	0.17	0.17	0.16	0.17												
24. 4	0.12	0.38	0.27	0.25	0.26	0.26	0.29	0.31	0.30	0.30	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.00	0.16	0.16											
25. 5	0.14	0.45	0.31	0.29	0.30	0.30	0.36	0.39	0.37	0.37	0.15	0.17	0.17	0.17	0.17	0.15	0.16	0.15	0.15	0.16	0.00	0.17	0.16											
26. 6	0.04	0.30	0.19	0.16	0.17	0.17	0.23	0.26	0.25	0.25	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.14	0.17	0.19	0.17	0.17	0.16	0.17	0.00	0.16	0.17									
27. 7	0.12	0.38	0.27	0.25	0.26	0.26	0.29	0.31	0.30	0.30	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.00	0.16	0.16	0.00	0.16	0.16								
28. 8	0.14	0.45	0.31	0.29	0.30	0.30	0.36	0.39	0.37	0.37	0.15	0.17	0.17	0.17	0.17	0.15	0.16	0.15	0.15	0.16	0.00	0.17	0.16	0.00	0.17	0.16								
29. 9	0.04	0.30	0.19	0.16	0.17	0.17	0.23	0.26	0.25	0.25	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.14	0.17	0.19	0.17	0.17	0.16	0.17	0.00	0.16	0.17	0.00	0.16	0.17						
30. 10	0.12	0.38	0.27	0.25	0.26	0.26	0.29	0.31	0.30	0.30	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.00	0.16	0.16	0.00	0.16	0.16	0.00	0.16	0.16					
31. 11	0.14	0.45	0.31	0.29	0.30	0.30	0.36	0.39	0.37	0.37	0.15	0.17	0.17	0.17	0.17	0.15	0.16	0.15	0.15	0.16	0.00	0.17	0.16	0.00	0.17	0.16	0.00	0.17	0.16	0.00	0.17	0.16		
32. 12	0.04	0.30	0.19	0.16	0.17	0.17	0.23	0.26	0.25	0.25	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.14	0.17	0.19	0.17	0.17	0.16	0.17	0.00	0.16	0.17	0.00	0.16	0.17	0.00	0.16	0.17	0.00	0.16	0.17

Figura 7: Matrices de porcentaje de identidad de las secuencias de la región kdr. Estimados de distancia evolutiva entre los diferentes grupos de secuencias. Se muestra el número de sustituciones de bases por sitio entre secuencias. **(A)** Secuencias con presencia de la mutación kdr. **(B)** Secuencias sin presencia de mutación kdr. **(C)** Secuencias de diferentes *Anopheles* spp. guardadas en la base de datos de GenBank (ver tabla V). **(D)** Todas las secuencias anteriores juntas.

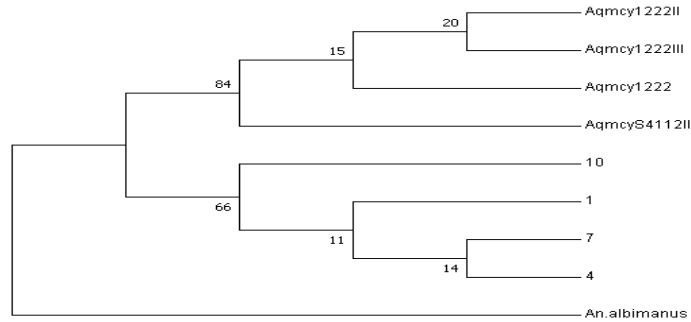
Se observó en la figura 6, que las secuencias más conservadas con respecto a las depositadas en el banco de genes (del NCBI) fueron las del estado Sucre con presencia de la mutación L1014C (3,6,9,12) mientras que las más variables fueron todas las del estado Aragua y las muestras de Sucre con el alelo silvestre y la mutación L1014F. También se observó una mayor variabilidad dentro del grupo de secuencias del estado Sucre, a su vez en el grupo del estado Aragua comparándolo con las secuencias de Sucre se encontró que las secuencias más conservadas correspondían con las que no tenían presencia de la mutación kdr, mientras hay una mayor variedad con las resistentes sin distinguir el tipo de mutación presente. A diferencia del grupo de secuencias de Sucre, se observó poca variabilidad dentro de las muestras del estado Aragua.

Estos resultados permitieron realizar árboles filogenéticos por el método de NJ, tal y como se puede apreciar en la figura 8, lo que indicó que las secuencias sin la mutación kdr de las muestras de Aragua se agruparon con las de Sucre, también con el alelo TTG. Cerca de este primer grupo se observaron el resto de las secuencias de Aragua y en otra rama las secuencias de Sucre con la mutación L1014F. La secuencia de *An. albimanus* guardada en la base del NCBI se agrupó con las secuencias de Sucre con la sustitución de leucina a cisteína. El resto de las secuencias depositadas en el banco de genes se agruparon entre sí en una rama aparte del resto.

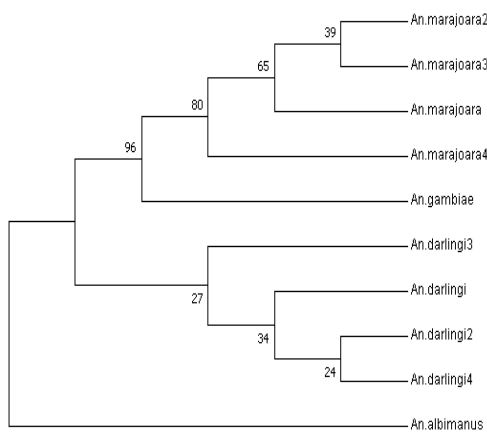
8-A



8-B



8-C



8-D

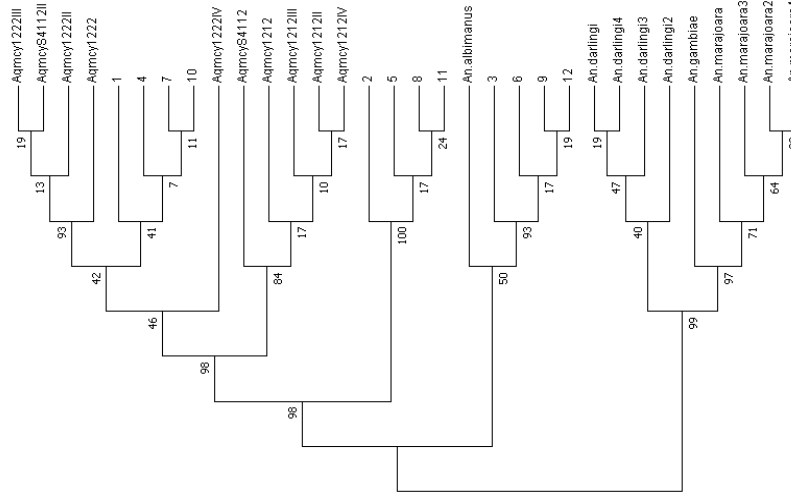


Figura 8: Árboles filogenéticos de las secuencias de la región kdr. Las distancias evolutivas están en unidades de número de sustituciones de bases

por sitio. **(A)** Secuencias con presencia de la mutación kdr. **(B)** Secuencias sin presencia de mutación kdr. **(C)** Secuencias de diferentes *Anopheles* spp. guardadas en la base de datos de GenBank (ver tabla V). **(D)** Todas las secuencias anteriores juntas.

6. Discusión

La malaria es la enfermedad parasitaria más importante del mundo. El incremento de la frecuencia de mosquitos con resistencia a los insecticidas para control vectorial ha aumentado la necesidad de impulsar el desarrollo de métodos más precisos y rápidos para detectar la presencia de individuos resistentes en poblaciones de *Anopheles* y así implementar las medidas necesarias para control vectorial. Actualmente, el desarrollo de herramientas para el estudio a gran escala de poblaciones naturales, permite predecir la predisposición de poblaciones para desarrollar resistencia a los insecticidas (Silva y col. 2014).

Una multitud de ensayos moleculares han sido desarrollados para detectar los alelos kdr. Estos son usualmente para investigaciones de laboratorio que monitorean la resistencia y gradualmente son incorporados en programas nacionales de control de malaria. Los ensayos para detectar las mutaciones genéticas responsables del fenotipo de resistencia en insectos individuales proporcionan una advertencia temprana de la aparición de resistencia que puede no haber sido detectada mediante bioensayos que sólo pueden registrar la respuesta de la población. La presencia de un solo individuo con un alelo conocido para conferir resistencia es motivo de preocupación ya que la resistencia puede extenderse muy rápidamente en una población, a menos que la presión selectiva disminuya y/o que el costo genético asociado con el alelo resistente sea alto. A la inversa, un resultado negativo de un ensayo molecular no debe conducir a pensar que no hay resistencia. Por otro lado, los ensayos moleculares están actualmente disponibles solo para la resistencia del sitio objetivo y el no detectar

resistencia kdr no puede interpretarse como una ausencia de resistencia en una población. Por lo tanto los ensayos moleculares son como un complemento de los bioensayos (Corbel y col., 2013).

Una vez realizado el PCR con los cebadores OL1, se logró una amplificación de la región del Nav cercana al punto de la mutación kdr. Sin embargo las bandas no tenían el tamaño esperado de 1415 pb, tal y como se había reportado en López y col., (2015). Estas diferencias pueden deberse a las variaciones interespecíficas en la secuencia de aminoácidos del canal de sodio de *Anopheles* sp. Hay que destacar la presencia de dos intrones que preceden y siguen a la región codificante que contiene el alelo kdr, especialmente al intron 2, que está a solo 4pb del alelo kdr (Martínez-Torres y col., 1998). Se ha determinado que el tamaño de los intrones varía entre distintas especies. Para el intron 1, por ejemplo, se reportó variabilidad en la longitud de la secuencia tanto dentro como entre especies de zonas del Pacífico; *An. punctulatus* s.s. rango de 880 a 923 pb, *An. farauti* s.s. 928 pb, *An. hinesorum* 939 a 950 pb, *An. farauti-4* 925 a 938 pb, y *An. koliensis* 940 a 953 pb (Henry-Halldin y col., 2012). Con el intron 2 se sabe que el tamaño en *An. albimanus* es de 71 pb, *An. gambiae*, 57 pb, *An. punctipennis* 68pb, también se ha descrito esta variación en *An. vestitipennis* y *An. pseudopunctipennis* (Lol y col., 2013). Estas diferencias interespecíficas también pueden explicar por qué no fue exitoso la amplificación de *An. aquasalis* con la prueba de PCR semi-anidado, la cual fue desarrollada solo para *An. gambiae*. Al mismo tiempo la prueba con los cebadores OL1, estaban basadas en poblaciones de *Anopheles* en Venezuela, *An. albimanus*, *An. marajoara* y *An. aquasalis*. Los cuales presentan regiones más conservadas entre sí que con *An.*

gambiae, que solo está presente en África, tal como se pudo observar en el árbol filogenético, donde esta especie se encontraban en ramas distintas.

La ausencia de bandas en varios de los carriles del gel de agarosa, a los cuales si se logró secuenciar, se explican por una baja eficiencia en la amplificación, esto no significa que no se lograra amplificar la muestra sino que las cantidades fueron tan reducidas que no pudieron ser visualizadas en el gel de agarosa, sin embargo si fueron suficientes para ser procesadas por el secuenciador de la empresa Marcrogen inc, el cual presenta mayor sensibilidad a los fragmentos de ADN.

Se ha reportado que el uso prolongado de insecticidas ha generado la aparición de resistencia en poblaciones de campo de vectores principales de malaria como *An. darlingi* y *An. aquasalis* de los estados Sucre y Aragua (Molina y col., 1997). Esto es consistente con lo hallado en el presente trabajo, es decir un mayor porcentaje de individuos resistentes de *An. aquasalis* tanto en Aragua como en Sucre. Lo observado en muestras colectadas en Aragua y Sucre muestran la misma tendencia de muchos otros países endémicos de malaria producto del constante uso de insecticidas sin los controles adecuados para evitar precisamente el desarrollo de la resistencia (OMS, 2012).

Por otra parte, las secuencias obtenidas a partir de muestras de ADN aislado de *An. aquasalis*, mostraron 3 distintos genotipos para el codón 1014 (Susceptible: L1014; Resistente: L1014F y L1014C). Estas mutaciones fueron reportadas originalmente en especies americanas por Lol y col. en el 2013 cuando amplificaron la region *kdr* de *An. albimanus* aislados de varias localidades. Hallando el codón resistente TGT en una secuencia de México y Nicaragua, en la secuencia de Costa

Rica el codón resistente correspondía al TTC, mientras en el resto de muestras de campos resultaron con el codón silvestre susceptible. En el caso de Venezuela, López y col. en 2015, realizaron un alineamiento múltiple de las secuencias, de las 8 secuencias estudiadas determinaron la presencia del codón TTC en 4 secuencias y el codón TGT en 2. Estos reportes son similares a lo encontrado en este estudio, tanto por una mayor proporción de individuos resistentes como por una mayor frecuencia de la mutación L1014F (figura 3).

Los resultados de este trabajo siguen la misma tendencia de distintos lugares del mundo, lo que motivaría a una investigación posterior donde se compara la tendencia histórica en el uso de insecticidas tanto en Venezuela como en las localidades mencionadas. Con respecto a la proporción de mutaciones se observan casos especiales en Asia donde la mutación L1014S está en mayor proporción que las otras o directamente es la única mutación. En el resto de los lugares, incluyendo los resultados de Venezuela hay una mayor presencia de L1014F. La otra mutación estudiada es la L1014C, curiosamente solo está presente en zonas de China, Corea y, como se mencionó anteriormente, en localidades de América. No se conoce del todo la razón por la cual la mutación L1014C es menos frecuente que L1014F, vale la pena destacar que la mutación L1014C no aparece en un solo cambio puntual, sino en dos, ya que el alelo silvestre susceptible presenta el codón TTG y el alelo en cuestión corresponde a TGT, evidenciando que la segunda y tercera base nitrogenada del codón fueron sustituidas, y en consecuencia el aminoácido codificado resulta ser cisteína y no leucina. Este cambio al ser de dos bases termina siendo menos frecuente que el de una sola base, tal y como ocurre en la mutación L1014F. Sin embargo no se

puede descartar que la sustitución por cisteína conlleve a un espectro de resistencia distinto para los piretroides y DDT que no resulte tan exitosa bajo las condiciones de presión selectiva en el momento que fueron colectados. Tal y como ocurre con el alelo L1014S, hasta ahora no encontrado en ningún *Anopheles* de América, se determinó que ésta sustitución alternativa por serina, traía como consecuencia un espectro de resistencia distinto, mayor para el DDT, menor para piretroides y adicionalmente encontraron que su frecuencia era menor a la del alelo L1014F en las poblaciones naturales estudiadas. Antiguamente, se utilizaba el DDT para el control de los vectores de malaria en varias zonas de África, por lo cual los individuos que exhibían una mayor resistencia a este insecticida fueron seleccionados incrementando la frecuencia del alelo L1014S en la población, pero al sustituirse el DDT por los piretroides, estos individuos se vieron afectados ya que poseen una menor resistencia a ésta clase de insecticidas y en consecuencia la frecuencia del alelo disminuyó y paralelamente aumentó la frecuencia del alelo L1014F que produce espectro de resistencia más elevado a ésta clase de insecticidas (Ranson y col., 2000). El hallazgo del alelo L1014C en especies circulantes en Venezuela debería servir de base al estudio del espectro de resistencia producto de esta segunda sustitución encontrada y así poder relacionar ésta al patrón de uso de DDT y piretroides en el país (López y col.2015).

En el estado Aragua, *An. aquasalis* se encuentra en zonas de importante desarrollo agropecuario cercanas al Lago de Valencia y es sometido a presión de insecticidas en forma indirecta, ya que estos insecticidas son dirigidos al control de plagas agrícolas, al mismo tiempo ha sido expuesto a medidas de control vectorial

con DDT y posteriormente a varios tipos de piretroides. Esta constante presión selectiva produjo una reducción de la población de mosquitos y van quedando mayoritariamente individuos resistentes, estos son los que dejan mayor descendencia y con el tiempo hay un aumento de la frecuencia de individuos resistentes, esto genera una nueva población con menor variabilidad, debido a que la población original de resistentes era reducida. Tal y como se ve en las figuras 5 y 6, los individuos resistentes no solo presentan cambios en el codón 1014, sino en varios lugares de la región kdr. Estos polimorfismos en el gen del canal de sodio no parecen afectar el funcionamiento del canal, por tanto permiten ser heredados a nuevas generaciones de *An. aquasalis*. Vale la pena acotar, que las muestras aqmcy1222, aqmcy1222` y aqmcyS4112 cuya resistencia a piretroides y feniltotrión fue comprobada mediante bioensayos, mostró el alelo susceptible TTG, por lo que genotípicamente no poseía resistencia kdr, sin embargo, es altamente probable que fenotípicamente haya exhibido pérdida de sensibilidad a los insecticidas a través de otro mecanismo de resistencia, como la resistencia metabólica. Lamentablemente, no fue posible secuenciar la región de interés para *Anopheles* identificados como susceptibles, mediante bioensayos, por tanto no se pudo evaluar polimorfismo.

Por otro lado, las distancias filogenéticas observadas en las figuras 7 y 8, entre las secuencias de Aragua y Sucre y la de *An. albimanus* reportada en la base de datos del NCBI (GenBank: KF137581.1), fueron menores que con respecto a las secuencias de *An. gambiae*, *An. darlingi* y *An. marajoara* (ver tabla V). Esto pudiera explicarse dado que la mayoría de las especies evaluadas en este estudio aunque son del género *Anopheles* pertenecen al subgénero *Nyssorynchus*, mientras que *A. gambiae*

corresponde al subgénero *Cellia*, lo que apoyaría los polimorfismos observados entre especies, basado en su distancia filogenética (Harbach, 2003). Para *An. darlingi* y *An. marajoara* aunque sean del subgénero *Nyssorynchus*, estas especies suelen habitar regiones del interior del continente, incluyendo a Venezuela, en cambio *An albimanus* y *An. aquasalis* son predominantemente de zonas costeras (Sinka y col., 2010; Osborn y col., 2004). A pesar de la cercanía entre *An albimanus* y *An. aquasalis*, por presentar regiones altamente conservada, existen pequeñas regiones donde ocurren polimorfismos y ya que los individuos estudiados en este trabajo no eran clonales y eran de distintas especies, aunque pertenezcan a un mismo género existe una amplia variabilidad genética entre ellas.

Dentro del grupo de muestras de Sucre se encontró una mayor variedad comparándola con *An. albimanus*. Básicamente se puede dividir las muestras en tres grupos, por el alelo *kdr* presente: TTG, TGT y TTC. Esta mayor variabilidad puede parecer extraña tomando en cuenta que en Sucre también se realizaron jornadas de fumigación en distintas épocas, pero hay diferencias importantes con respecto al estado Aragua. Para empezar hay una menor población y una densidad poblacional más reducida, lo que reduce el número de lugares en los que se vuelve necesario fumigar. A su vez mientras Aragua es una zona de importancia agrícola, Sucre no, es decir no se usan plaguicidas para el control agrícola, lo que reduce la probabilidad de que más mosquitos se expongan a los insecticidas y por ende disminuye la presión selectiva. También hay que resaltar que hoy en día en el estado Sucre se encuentra casi exclusivamente *An. aquasalis* (Osborn y col., 2004), así que esta especie no se ve sometida a una competencia con otros *Anopheles*. Todos estos factores evitarían la

reducción abrupta de la población y permitiría una mayor presencia de individuos susceptibles aun con el aumento de individuos resistentes.

Ahora bien, las secuencias del estado Sucre sin el alelo TTG son más conservadas con respecto a las del estado Aragua, tomando en cuenta que es una misma especie y están en zonas costeras relativamente cercanas, se puede pensar que ambos grupos provienen originalmente de una sola población con el alelo silvestre TTG y esta se empezó a dispersar por la costa, lo que se puede interpretar viendo la figura 8. También existe la posibilidad de que haya migración de individuos de una localidad a otra, apoyada además por la actividad humana. Si bien la región kdr es altamente conservada con el paso del tiempo empiezan a surgir pequeñas variaciones, como las observadas en la figura 5D. En el caso de los individuos resistentes hay una mayor variabilidad por la misma reducción poblacional que se mencionó anteriormente para el estado Aragua, sólo que menos acentuado. Curiosamente, en las figuras 7 y 8 se aprecia que las muestras de Sucre con el alelo TGT eran las más conservadas con respecto a la secuencia de *An. albimanus*. Estas diferencias podrían explicarse, como se mencionó anteriormente, en la posibilidad de que la sustitución por cisteína conlleve a un espectro de resistencia distinto para piretroides y DTT.

En términos de control epidemiológico, el manejo de la resistencia puede ser difícil por la escasez de datos fiables sobre el impacto en la resistencia a insecticidas y esto debe ser una prioridad para futuras investigaciones. Aunque los reportes nacionales indican una reducción en el uso de piretroides para el control de los vectores de malaria (Ministerio para el poder popular para la salud, 2015), ésta clase de insecticidas siguen siendo usados en la agricultura como controladores de plagas,

manteniendo la presión selectiva que produce un incremento en la frecuencia de las mutaciones que confieren resistencia *knockdown* o kdr. Sin embargo, al disminuir la presión selectiva de los piretroides, tendería a incrementar la frecuencia del alelo silvestre susceptible en las poblaciones de vectores y por ende el equilibrio se desplazaría nuevamente hacia el genotipo susceptible, aunque la manera en que esto ocurre sigue en estudio. Como se dijo anteriormente *An. aquasalis* es el principal vector de malaria en Sucre, donde fueron colectados 8 individuos cuyas secuencias del Nav mostraron sustituciones en la posición 1014 y por ende poseían un genotipo resistente. El hecho de encontrar la presencia de mutaciones relacionadas con la resistencia *knockdown* puede interpretarse como una alerta para tomar una actitud activa en los estudios sobre el estatus de la resistencia para evitar comprometer la eficacia de las intervenciones contra vectores y a su vez desarrollar planes más eficientes para el control de la transmisión de la malaria en la región, de manera de reducir la incidencia de la malaria.

El diseño de un PCR alelo-específico para determinar la presencia de mutaciones puntuales relacionadas con la resistencia a piretroides en las especies de *Anopheles* serviría como una poderosa herramienta de detección temprana de resistencia en poblaciones de vectores. Con esta detección temprana se pueden diseñar planes preventivos que evitaría que la frecuencia de resistentes aumente. Algunos de estos planes ya estudiados e implementados son el uso de varios insecticidas en rotación, combinación, mosaico y/o mezcla (OMS, 2012). Sin embargo el diseño de una prueba específica para las especies del género *Anopheles* de Venezuela puede ser difícil dado que las mutaciones encontradas no ocurren siempre

en la misma posición y en el caso del alelo L1014C, producto de 2 mutaciones puntuales, el diseño de un cebador que reconozca ambas mutaciones no sería sencillo. Esto podría lograrse haciendo un PCR-RFLP, en donde se amplificaría la región donde se encuentra las mutaciones y una vez obtenidos los productos de PCR se someterían a digestiones con enzimas de restricción que tengan las mismas condiciones de actividad óptima y que nos permitan detectar diferencialmente los tres alelos en un solo ensayo (López y col.,2015).

El estudio molecular de la resistencia *knockdown* propuesto en éste trabajo es uno de los primeros que se realiza para especies de *Anopheles* Venezolanas, con estos resultados se permitiría tener una mejor idea del estatus de resistencia presente en los vectores de malaria circulantes en el país y de ésta manera realizar las aproximaciones iniciales en manejo de la resistencia a piretroides por parte de estos vectores.

7. Conclusiones

- Se logró amplificar efectivamente la secuencia que codifica al segmento transmembrana S6, del dominio II del gen que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje en *Anopheles sp.* mediante el ensayo de PCR con los cebadores OL1A y OL1B, utilizando como templado ADN genómico perteneciente a muestras de grupos de individuos de *An. aquasalis*.
- No fue posible amplificar el mismo segmento con el PCR semi-anidado diseñado por Martínez-Torres y col. 1994.
- Se encontró la sustitución L1014F en 50% y L1014C en 10% de las muestras de Aragua y 33,33% de ambas sustituciones en Sucre.
- La sustitución L1014F tuvo una mayor frecuencia que la sustitución L1014C en los individuos evaluados en este estudio.
- A través del estudio de los polimorfismos en la secuencia del segmento 6 del dominio II del canal de sodio se encontró más variabilidad en las muestras del estado Sucre, que en las de Aragua.

8. Anexos

Lista de abreviaturas de muestras

An7/8, An7/8', AnF, AnF': Cada muestra consta de 5 individuos adultos de *Anopheles albimanus* provenientes del insectario "Octavio Suarez" del IVIC.

Aqmcy4112, Aqmcy4112III y AqmcyS4112: Cada muestra consta de cinco individuos *Anopheles aquasalis* colectados en zonas de Maracay, estado Aragua, sometidos a bioensayos con 5µg deltametrina a 0,1%.

Aqmcy1222 y Aqmcy1222III: Cada muestra consta de cinco individuos *Anopheles aquasalis* colectados en zonas de Maracay, estado Aragua, sometidos a bioensayos con 5 µg fenitotrión.

Aqmcy1212 y Aqmcy1212III: Cada muestra consta de cinco individuos *Anopheles aquasalis* colectados en zonas de Maracay, estado Aragua, sometidos a bioensayos con 5µg malation.

Aqmcy4122-1 y Aqmcy4122-1III: Cada muestra consta de cinco individuos *Anopheles aquasalis* colectados en zonas de Maracay, estado Aragua, sometidos a bioensayos con 1 µg de deltametrina.

Aqmcy4122-2 y Aqmcy4122-2III: Cada muestra consta de cinco individuos *Anopheles aquasalis* colectados en zonas de Maracay, estado Aragua, sometidos a bioensayos con 2 µg de deltametrina.

Muestras 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12: Cada muestra consta de un individuo *Anopheles aquasalis* colectados en el muelle de Cariaco, estado Sucre.

9. Bibliografía

- Aché, A. 1998. Situación actual de la Malaria en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. y San. Amb.* **38** (1): 68-72.
- Brengues, C., Hawkes, NJ., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., Manguin, S. y col. 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.
- Busvine, J.R. 1951. Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature.* **168**:193-195.
- Catterall, W. A. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* **26**:13 – 25.
- Corbel, V., N'Guessan, R. 2013. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors, Chapter 19: Distribution, Mechanisms, Impact and Management of Insecticide Resistance in Malaria Vectors: A Pragmatic Review. InTech, Editado por Sylvie Manguin, Rijeka, Croacia.
- Cortez, G. 1999. Evaluación de la resistencia a insecticidas y sus mecanismos en *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* Curry, 1932 (Diptera: Culicidae) del municipio Bolívar del estado Monagas, Venezuela. Tesis de Licenciatura. Universidad de Oriente. Venezuela.
- Davies, T., Field, L., Usherwood, P., Williamson, M. 2007. DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels. *IUBMB Life.* **59**(3): 151 –162.
- Dzul, FA., Patricia Penilla, R., Rodríguez, AD. 2007. Susceptibility and insecticide resistance mechanisms in *Anopheles albimanus* from the southern Yucatan Peninsula, Mexico. *Sal. Púb. Méx.* **49**(4):302-311.
- Enayati, AA., Vatandoost, H., Ladonni, H., Townson, H., Hemingway, J. 2003. Molecular evidence for a kdr-like pyrethroid resistance mechanism in the malaria vector. mosquito *Anopheles stephensi*. *Med Vet Entomol.* **17**:138-44.
- Farnham, AW., Murray, AWA., Sawicki, RM., Denholm, I., White, JC. 1987. Characterization of the structure-activity relationship of kdr and two variants of super-kdr to pyrethroids in the housefly (*Musca domestica*). *Pesticide Sci.* **19**: 209-220
- Figueroa, L., Marín, M., Pérez, Enrique., Molina, D. 2006. Mecanismos de resistencia a insecticidas organosintéticos en una población de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) del estado Aragua. *Bol. Malariol. Sal. Amb.* **46**(1): 39-47.
- Fonseca-Gonzalez, I., Quinones, ML., McAllister, J., Brogdon, WG. 2009. Mixed-function oxidases and esterases associated with cross-resistance between DDT and lambda-cyhalothrin in *Anopheles darlingi* Root 1926 populations from Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **104**(1):18-26.
- Gabaldón, A. 1983. Malaria eradication in Venezuela: doctrine, practice, and achievements after twenty years. *Am J Trop Med Hyg.* **32**:203-11.

- Griffing, SM., Villegas, L., Udhayakumar, V. 2014. Malaria control and elimination, Venezuela, 1800s -1970s. *Emerg Infect Dis*, **20**(10):1697–1704.
- Harbach R. 2004. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of Entomological Research*. **94**: 537–553.
- Hemingway, J., 1982a. Genetics of organophosphate and carbamate resistance in *Anopheles atroparvus* (Diptera: Culicidae). *J. Econ. Entomol.* **75**:1055–1058.
- Hemingway, J., 1982b. The biochemical nature of malathion resistance in *Anopheles stephensi* from Pakistan. *Pestic. Biochem. Physiol.***17**:149–155.
- Hemingway, J. 1983. Biochemical studies on malathion resistance in *Anopheles arabiensis* from Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**: 477–480.
- Hemingway, J., Karunaratne, S.H.P.P. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med. Vet. Entomol.* **12**:1–12.
- Hemingway, J., Hawfes, NJ., McCarroll, L., Ranson, H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* **34**: 653–665.
- Hemingway, J. 2015. Malaria: fifteen years of interventions. *Nature*. **526**(7572):198–199.
- Henry-Halldin, C. N., Nadesakumaran, K., Keven, J. B., Zimmerman, A. M., Siba, P., Mueller, I., Zimmerman, P. A. 2012. Multiplex Assay for Species Identification and Monitoring of Insecticide Resistance in *Anopheles punctulatus* Group Populations of Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg.* **86**(1), 140–151.
- Herath, P.R.J., Hemingway, J., Weerasinghe, I.S., Jayawardena, K.G.I. 1987. The detection and characterisation of malathion resistance in field populations of *Anopheles culicifacies* B in Sri Lanka. *Pestic. Biochem. Physiol.* **29**: 157–162.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. and Evol.* **33**:1870-1874.
- Lol, J.C., Castellanos, M.E., Liebman, K.A., Lenhart, A., Pennington, P.M., Padilla, N.R. 2013. Molecular evidence for historical presence of knock-down resistance in *Anopheles albimanus*, a key malaria vector in Latin America. *Parasites Vectors*. 6-268.
- Lopez, A. 2015. Identificación de mutaciones puntuales en el gen que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje relacionadas con resistencia a piretroides en *Anopheles sp.* circulantes en Venezuela. Tesis de licenciatura en biología. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Loughney, K., Kreber, R, Ganetzky, B. 1989. Molecular analysis of the para locus, a sodium-channel gene in *Drosophila*. *Cell*. **58**: 1143 – 1154.
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, MS., Darriet, F., Berge, JB., Devonshire, AL., Guillet, P., y col. 1998. Molecular characterization of

pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* **7**:179–84.

- Miyazaki, M., Ohyama, K., Dunlap, D., Matsumura, F. (1996) Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Mol Gen Genet.* **252**: 61-68.
- Molina de Fernández, D., Saume, F., Bisset, J., Hidalgo, O., Anaya, W., González, J., Salas, O., Barazarte, H. 1997. Establecimiento de la línea de susceptibilidad de la fase adulta de *Anopheles* Spp. a insecticidas químicos. *Bol. Dir. Mal. y San. Amb.* **37**: 55-69.
- Molina de Fernández, D. 2000. Ecología y Comportamiento de *Anopheles albimanus* de Aragua frente a insecticidas químicos. Tesis doctoral Postgrado en Entomología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Molina, D., Figueroa, L. 2009. Resistencia metabólica a insecticidas organofosforados en *Anopheles aquasalis* Curry 1932, municipio Libertador, estado Sucre, Venezuela. *Biomédica.* **29(4)**:604-615.
- Organización mundial de la salud. 1992. Vectors resistance to pesticides. Fifteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. *Who Tech. Rep. Ser.* **818**: 17-24.
- Organización mundial de la salud. 2012. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM). *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.* Ginebra, Suiza.
- Organización mundial de la salud. 2013. Larval source management: a supplementary measure for malaria vector control: an operational manual. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.* Luxemburgo.
- Organización mundial de la salud. 2016a. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Segunda edición, Ginebra, Suiza.
- Organización mundial de la salud. 2017b. World malaria report 2017. Ginebra. Suiza.
- Osborn, F., Rubio-Palis, Y., Herrera, M., Figuera, A., Morena, J. 2004. Caracterización Ecoregional de los Vectores de Malaria en Venezuela. *Bol. Malariol. Sal. Amb.* **44(2)**: 77-92.
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J. M., Wang, X., Hemingway, J., Collins, F.H. 2000. 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(5)**, 491–497.
- Sambrook, J. Russell, D. 2006. The condensed protocols from molecular cloning: A laboratory manual. 3era edición. Cold Spring Harbor. Nueva York, EEUU.
- Silva, A. Santos, J. Martins, A. 2014. Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids – a review. *Parasit Vectors* **7**:450.

- Sinka, ME., Rubio-Palis, Y., Manguin, S., Patil, AP., Temperley, WH., Gething, PW., Van Boeckel, T., y col. 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and biologic precis. *Parasit Vectors*. **3**: 72-10.1186/1756-3305-3-72.
- Suárez, M., Quiñonez, M., Palacios, J., Carrillo, A. 1990. First record of DDT resistance in *Anopheles darlingi*. *JAMCA*. **6**: 72-74.
- Shafer, T., Meyer, A., Crofton, K. 2005. Developmental Neurotoxicity of Pyrethroid Insecticides: Critical Review and Future Research Needs. *Environ Health Perspect*. **113**(2): 123–136.
- Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A., Devonshire, A.L. 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.
- Zimmerman, RH. 1992. Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **87**: 371-383.

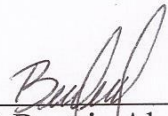
Consultas en línea

- Academia biomédica digital de la facultad de medicina, Universidad Central de Venezuela. Cronología de la lucha contra la malaria en Venezuela. Fecha de consulta: 7 octubre de 2017. Disponible en: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=54&m=3&n=1924&e=1928>.
- Consenso de Malaria. 2006. Sociedad Venezolana de infectología. Fecha de consulta: 17 de noviembre de 2017. Disponible en: <http://www.svinfectologia.org/images/stories/Consenso%20malaria006.pdf>.
- Ministerio del poder popular para la salud. Boletín epidemiológico N°52 del año 2015 y 2016. Fecha de consulta: 6 de octubre de 2017. Disponible en: <http://www.mpps.gob.ve>.
- Organización mundial de la salud. Paludismo. Nota descriptiva, 2017a. Fecha de consulta: 6 de octubre de 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/es/>.
- Organización mundial de la salud. Repositorio de datos del observatorio global de salud, malaria, resistencia a los insecticidas de vectores, 2016b. Fecha de consulta: 8 de diciembre de 2017. Disponible en: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.RESISTANCE?lang=en>.

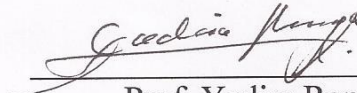
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL Br. ANTONIO JOSÉ HERNÁNDEZ CONFORTI**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Antonio José Hernández Conforti, C.I: 20.654.566, titulado “**Detección de mutaciones puntuales marcadoras de resistencia a piretroides en el género *Anopheles***”, para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que el trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

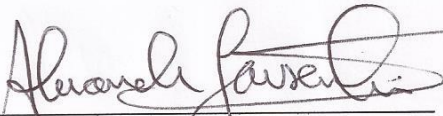
Para dar fe de ello se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas, a los catorce días del mes de febrero del año dos mil dieciocho, dejando constar que el profesor Alexander Laurentin actuó como Asesor Académico y como Coordinador del jurado examinador.



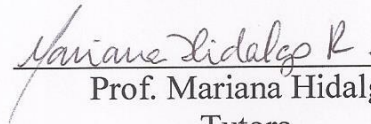
Prof. Beatriz Alves
Jurado



Prof. Yadira Rangel
Jurado



Prof. Alexander Laurentin
Asesor académico
Coordinador



Prof. Mariana Hidalgo
Tutora