



# Mutación asociada a la resistencia a insecticidas piretroides en el mosquito transmisor de dengue (*Aedes aegypti*)

KARLA SAAVEDRA RODRÍGUEZ\*, GUSTAVO PONCE GARCÍA\*, ILDEFONSO FERNÁNDEZ SALAS\*, RAÚL TORRES ZAPATA\*, ADRIANA E. FLORES SUÁREZ\*



Los piretroides sintéticos, como la permetrina, deltametrina, resmetrina y sumitrina se aplican con frecuencia como adulticidas de mosquitos. El uso de pabellones, cortinas y otros artículos hogareños tratados con piretroides para protección personal ha incrementado<sup>1</sup> y promete generalizarse en el futuro para el control del vector del dengue.<sup>2</sup> La aparición de resistencia podría volverse común en muchas poblaciones del mundo; por lo tanto, el monitoreo de la resistencia será crucial para asegurar el control vectorial. La resistencia metabólica y la insensibilidad del sitio blanco son los principales tipos de resistencia a los piretroides.<sup>3,5</sup> La resistencia *Knockdown* (kdr) es un término genérico aplicado a los insectos que no pierden la coordinación inmediatamente después de una exposición a los piretroides.

Típicamente, kdr no es afectado por sinérgicos que inhiben a esterasas y monooxidasas. Kdr surge debido a mutaciones no-sinónimas en el gen del

canal de sodio dependiente de voltaje (*locus* de parálisis en *Drosophila melanogaster*), las cuales reducen la unión de los piretroides a los canales de sodio que se encuentran en la membrana celular nerviosa.

Kdr usualmente limita en diversos grados la efectividad de los piretroides, dependiendo de que el insecticida contenga alcohol adesciano-3-phenoxybenzyl (piretroide tipo I) o un alcohol  $\alpha$ -ciano-3-phenoxybenzyl (tipo II). La detección de kdr en campo tiene severas consecuencias en la continuación del uso de los piretroides para control de mosquitos. La detección y caracterización temprana de kdr es crítica para el desarrollo de estrategias de manejo de la resistencia.

El mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV1-4).<sup>6,7</sup> Ocurren de 50 a 100 millones de infecciones del dengue cada año; mientras la mayoría son leves o asintomáticas, el número de infecciones severas con *shock* o hemorrágicas ha incrementado, con una fatalidad de 20%.<sup>8,9</sup> Brengues *et al.*<sup>10</sup> examinaron la resistencia al DDT y piretroides en *Ae. aegypti* de trece localidades y encontraron evidencia de resistencia al DDT y piretroides de cepas provenientes de Semarang en

□ El presente artículo está basado en la investigación "Mapeo cuantitativo de *loci* que controlan la resistencia a insecticidas en el mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*)", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2008 en la categoría de Ciencias Naturales, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario, en septiembre de 2008.

\*Laboratorio de Entomología Médica, FCB-UANL.  
E-mail: adrflares@fcb.uanl.mx.

Java Central, Belem en Brazil y Long Hoa, en Vietnam. Obtuvieron la secuencia de la región que codifica al segmento hidrofóbico 6 del dominio II del gen del canal de sodio dependiente de voltaje de diez mosquitos de las trece cepas. Analizaron los exones 19 a 21 que codifican los aminoácidos 908–1036. El exón 19 contiene aminoácidos asociados con la resistencia ‘super kdr’, e incluye: la metionina en la posición 918, leucina en la 925, treonina en la 929 y leucina en la 932.<sup>11</sup> El exón 20 contiene la sustitución de leucina a fenilalanina en la posición 1014, la cual confiere insensibilidad nerviosa a los piretroides en un amplio rango de especies de insectos, incluyendo *Anopheles gambiae*.<sup>11</sup> Brengues *et al.*<sup>10</sup> descubrieron siete nuevas mutaciones en *Ae. aegypti* en relación con *An. gambiae*. La cepa de Belem tuvo una valina en la posición 923 (exón 19), mientras que tres cepas de *Ae. aegypti* y *An. gambiae* tuvieron una glicina en el mismo sitio (se refiere como Val923). Todas las cepas de *Ae. aegypti* contienen una isoleucina en la posición 952 (exón 20) y una lisina en la 961 (exón 20), mientras que *An. gambiae* contiene una valina e histidina en las mismas posiciones, respectivamente. La cepa de Long Hoa contiene un triptófano en la posición 982 (exón 20), mientras que las otras tres cepas de *Ae. aegypti* y *An. gambiae* tienen una leucina en el mismo sitio (Trp982). La sustitución en la posición 1014 de leucina a fenilalanina estuvo ausente en todas las cepas de *Ae. aegypti*.

Sin embargo, la cepa de Belem tuvo una metionina en la posición 1011 (exón 20), mientras que tres cepas de *Ae. aegypti* y *An. gambiae* presentaron una isoleucina en el mismo sitio (Met1011). Más aún, la cepa de Tailandia presentó una glicina en la posición 1016 (exón 21), mientras tres cepas de *Ae. aegypti* y *An. gambiae* codificaron una valina en el mismo sitio (Gly1016). Ensayos neurofisiológicos directos sobre larvas individuales de cepas con estas mutaciones mostraron una reducción en la sensibilidad nerviosa a la permetrina o lambda cialotrina al ser comparadas con las cepas susceptibles.

## Material y métodos

En una búsqueda inicial de estas mutaciones no sinónimas en los exones 20 y 21, a partir de 87 mosquitos de 30 cepas de *Ae. aegypti* de América Latina, se descubrieron dos nuevas mutaciones en los codones 1,011 y 1,016. Una transición A/G en la primera posición de 1,011 codifica un cambio a valina (Val1,011) y una transición A/G en la primera posición de 1,016 codifica una sustitución a isoleucina (Iso1,016). La relación de estos seis alelos en los codones 1,011 y 1,016 de *para* en *Ae. aegypti* se encuentran en la tabla I. También se reporta el desarrollo de un ensayo de PCR para cada uno de estos alelos, cuyos resultados pueden leerse ya sea en un gel de agarosa, o bien, mediante una curva de desnaturalización en una máquina de PCR tiempo real. En 30 cepas de América Latina y en las cepas susceptibles de Rockefeller y New Orleans se estiman las frecuencias de Iso1,011, Met1,011, Val 1,011, Val 1,016, Iso1,016, y Gly1,016. En adición, se muestran dos experimentos de selección: uno con deltametrina en una cepa de campo de Santiago de Cuba,<sup>12</sup> y otro con permetrina en una cepa de Isla Mujeres, México, donde ocurre un rápido incremento en la frecuencia del alelo Iso1,016 y decrece la frecuencia en el exón 1,011.

Una intercruza F1 se realizó entre la cepa susceptible de New Orleans y la cepa F5 de Isla Mujeres, previamente seleccionada para resistencia a permetrina. Los bioensayos en la generación F3 indicaron que Iso1,016 actúa como un alelo recesivo para conferir kdr. Análisis de segregación entre los alelos de los codones 1,011 y 1,016 en la descendencia F3 sugieren que existe una alta proporción de recombinación, aunque los dos codones están separados solamente por un intrón de ~270 bp. Finalmente, con la secuencia del intrón que separa a los exones 20 y 21 se realizó un análisis filogenético a 87 mosquitos, con el propósito de evaluar la historia progresiva entre estos cuatro alelos.

## Cepas de mosquitos y extracción de ADN

La tabla II muestra un listado de las cepas de *Ae. aegypti* analizadas, los nombres, localidades de colecta, país, coordenadas de los sitios de colecta (o, en el caso de las cepas de Cuba, las publicaciones que describen los sitios de colecta). También se enlista el número de mosquitos analizados por cada cepa.

Las cuatro cepas seleccionadas de Cuba (delta-metrina F12 y F13, propoxur F14 y temefos F6) se originaron en la misma colección de Santiago de Cuba descrita por Rodríguez *et al.*<sup>12</sup> Las condiciones de selección para la F12 y F13 con delta-metrina se describen en Rodríguez *et al.*<sup>13</sup>

Las condiciones de selección para la cepa temefos F6 se describen en Rodríguez *et al.*<sup>13</sup> y la selección de propoxur F14 aparece en Bisset *et al.*<sup>14</sup> *Aedes aegypti* también se colectó en Isla Mujeres, justo al noreste de Cancún, México.<sup>15</sup> Éste es un sitio turístico donde ambos, temefos y piretroides, son regularmente utilizados para control de larvas y adultos, respectivamente. Después de establecer una población F1 en laboratorio, los adultos F2 fueron expuestos a 5 µg de permetrina en un bioensayo de botella.<sup>16</sup> Después de una hora de exposición, los mosquitos se colocaron en una jaula. Transcurridas 24 horas, 14% de los mosquitos sobrevivientes se alimentó con sangre para obtener huevecillos F3. Los adultos de la F3 se expusieron otra vez a 5 µg de permetrina por una hora y se colocaron en una jaula. Después de 24 horas, 90% de los mosquitos sobrevivientes fueron alimentados con sangre para obtener huevecillos F4. Esto se repitió una vez más, y 98% de los mosquitos F4 sobrevivió la exposición.

La generación seleccionada F5 de Isla Mujeres se cruzó con la cepa susceptible de New Orleans para el mapeo cuantitativo de loci (QTL).<sup>17</sup> La generación F3 se expuso a 1.2 µg de permetrina en un ensayo de botella durante una hora. Los adultos activos se registraron como vivos, y los adultos restantes se revisaron después de cuatro horas y se registraron como recuperados o muertos. Aquí sólo se muestran los datos de la segregación de alelos en el locus *para*. El resto de las cepas de mosquitos analizado proviene de huevecillos F1 a partir de adultos que emergieron de larvas colectadas en campo. El ADN se aisló individualmente de mosquitos mediante la extracción por sales<sup>18</sup> y fue resuspendido en 500 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0). El ADN se dividió en cinco alícuotas de 100 µl y se almacenó a -70°C.

## Resultados y discusiones

### Evolución de las mutaciones *kdr*

Se amplificaron y secuenciaron directamente al intrón que separa los exones 20 y 21 para examinar la evolución de las cuatro mutaciones *para*. Los iniciadores *kdr20f* y *kdr21r* fueron utilizados para amplificar la terminación 3' del exón 20, el intrón completo y la región 5' del exón 21. Las secuencias de 87 mosquitos seleccionados con base en los genotipos en las posiciones 1,011 y 1,016 fueron obtenidas. Las secuencias fueron alineadas utilizando CLUSTALW. Los archivos de las cromatografías contenían dos curvas cuando los mosquitos eran heterocigotos para los polimorfismos en el intrón. En estos mosquitos

Tabla I. Mutaciones en los codones 1011 y 1016 de *para* en *Ae. aegypti*.

Fuente	Codones			
	1011		1016	
Silvestre	Iso	ATA	Val	GTA
Beregues <i>et al.</i> 2003 <sup>10</sup>	Met	ATG	Gly	GGA
Presente estudio	Val	GTA	Iso	ATA

Tabla II. Cepas de *Ae. aegypti* analizadas en el estudio de frecuencia de mutaciones kdr. La ciudad, país y coordenadas de los sitios de colecta, así como el número de mosquitos analizados están adjuntos. Para las cepas de Cuba, seleccionadas con insecticidas, se agregó la publicación donde se describe la selección y sitios de colecta.

<i>Cepa</i>	<i>Localidad</i>	<i>País</i>	<i>Latitud</i>	<i>Longitud</i>	<i>Numero de muestra</i>
Rockefeller	Puerto Rico	USA	*		30
New Orleans	New Orleans	USA			30
PCHI	Puerto Chiapas	México	14.7142	-92.4152	48
CHID	Ciudad Hidalgo	México	14.6799	-92.0229	48
RIOF	Río Florido	México	14.2611	-93.3361	48
PIJI	Pijijiapan	México	15.6811	-93.2069	48
HUET	Huehuetán	México	15.0155	-92.3860	48
HUIX	Huixtla	México	15.1376	-92.4696	48
MAZA	Mazatán	México	14.8676	-92.4496	48
MOTZ	Motuzintla	México	15.3638	-92.2431	48
ESQI	Esquintla	México	15.3268	-92.6587	48
MAPA	Mapastepec	México	15.4366	-92.9028	48
IMU5	Isla Mujeres	México	21.2345	-86.7316	30
Santiago de Cuba	Santiago de Cuba	Cuba	*		30
F12 Deltamethrin	Santiago de Cuba	Cuba	***		30
F13 Deltamethrin	Santiago de Cuba	Cuba	***		30
F14 Propoxur	Santiago de Cuba	Cuba	++		30
F6 Temephos	Santiago de Cuba	Cuba	**		30
La Habana	Ciudad de La Habana	Cuba	*		30
Nicaragua	Managua	Nicaragua			30
Costa Rica	Guanacaster	Costa Rica	*		30
Panamá	Río Abajo	Panamá			30
Cumaná	Sucre	Venezuela	10.4332	-64.1825	58
Barcelona	Anzoategui	Venezuela	8.9093	-64.6768	50
Barquisimeto	Lara	Venezuela	10.0781	-69.4010	50
Guanare	Portuguesa	Venezuela	9.5781	-69.2523	55
Caja Seca	Zulia	Venezuela	9.1944	-71.0033	51
La Fría	Tachira	Venezuela	8.1974	-72.2360	54
Los Teques	Miranda	Venezuela	10.1735	-65.8065	50
Cd. Bolívar	Bolívar	Venezuela	8.0688	-63.5565	55
San Fernando	Apure	Venezuela	7.8422	-67.5283	55

\* Rodríguez et al., 2000, \*\* Rodríguez et al., 2002, \*\*\* Rodríguez et al., 2005, + Bisset et al., 2006.

las secuencias de haplotipos fueron certificadas al clonar y secuenciar los productos de PCR.

El número de sitios de segregación, inserciones/delecciones, haplotipos, diversidad nucleotídica ( $\pi$ , 19), el número promedio de diferencias nucleotídicas ( $k$ , 20), el número mínimo de eventos de recombinación ( $R_m$ , 21) y los coeficientes de desequilibrio de unión<sup>22</sup> fueron estimados usando DnaSP 4.10.9.<sup>23</sup> DnaSP no analiza las posiciones alineadas que contienen inserciones/delecciones.

La reconstrucción filogenética fue realizada usando un análisis de máxima parsimonia en PAUP 4.0,<sup>24</sup> en las cuales las inserciones/delecciones fueron tratadas como un quinto carácter y un análisis con 1000 replicaciones fue realizado para probar la filogenia derivada a partir del análisis.

### Frecuencia alélica y genotípica

Las frecuencias de los alelos Iso1,016, Met1,011 y Val1,011 fueron estimadas junto con los intervalos de confianza a 95%. La estimación FIS de Wright fue utilizada para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg entre los genotipos, donde:  $FIS = 1 - (\text{heterocigotos observados} / \text{heterocigotos esperados})$ . Si un exceso de heterocigotos fue observado, entonces  $FIS < 0$ , y si un exceso de homocigotos fue observado, entonces  $FIS > 0$ . Una prueba de  $\chi^2$  de ajuste fue usada para probar la hipótesis nula que de que  $FIS = 0$ . Notar que FIS fue igual a 0 en el *locus* 1,016 en todas las cepas, excepto en un caso (Iso1,016 en F14 propoxur) y en todos los análisis de Val1,011. Sin embargo, las frecuencias genotípicas de Met1,011 no estuvieron en equilibrio en doce cepas. Cabe resaltar que no se encontró un patrón consistente en los valores FIS. En seis cepas,  $FIS < 0$  (exceso de heterocigotos) en todas las pruebas significativas, por otro lado,  $FIS > 0$  (exceso de homocigotos) en otras seis cepas.

En el *locus* 1,016 en colecciones de campo que no fueron sujetas a selección en laboratorio, la frecuencia de Iso1,016 varió de 0.00 en cuatro

colecciones de Tapachula, México, y en cinco colecciones de Venezuela a una frecuencia de 0.293 en La Habana. Para el *locus* 1,011 en colecciones de campo no seleccionadas en laboratorio, la frecuencia de Val1,011 varió entre 0.00 en cuatro colecciones de Tapachula, México, dos colecciones de Cuba, una colección de Venezuela y 0.188 in Huehuetá, México. En el mismo codón, Met1,011 fue polimórfico en todas las cepas, la frecuencia varió de 0.193 en Huixtla, México, a 0.583 en La Habana. Las cepas deltametrina F12 y F13, propoxur F14 y temefos F6 surgieron a partir de la selección con su insecticida correspondiente a partir de la colecta de Santiago de Cuba. La cepa de Isla Mujeres surgió a partir de la selección en laboratorio con permetrina durante cinco generaciones. La frecuencia de Iso1,016 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. En forma similar, la frecuencia de Iso1,016 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, Iso1,016 disminuyó no significativamente de 0.033 a 0.018 ( $P = 1.000$ ) en la línea seleccionada con temefos, pero incrementó a 0.400 ( $P = 8.78 \times 10^{-7}$ ) en la línea seleccionada con propoxur.

Una respuesta contraria a la respuesta de la selección fue observada en la frecuencia de Met1,011. Este alelo 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). Met1,011 también disminuyó de 0.317 en la cepa de Isla Mujeres a 0.125 después de cinco generaciones de selección con permetrina ( $P = 0.0224$ ). La frecuencia de Met1,011 aumentó ligeramente de 0.517 a 0.621 ( $P = 0.3517$ ) en la línea seleccionada con temefos, e incrementó a 0.950 ( $P = 6.03 \times 10^{-8}$ ) en la línea seleccionada con propoxur.

Ninguno de los cambios en la frecuencia de Val1,011 fueron significativos.

Se analizó un total de 420 descendientes F3 generados de una cruce entre una hembra P1 de Isla Mujeres (Iso1,011/Met1,011, Iso1,016/Iso1,016) y un macho de la cepa susceptible New Orleans (Iso1,011/Iso1,011, Val1,016/Val1,016). La descendencia F3 fue expuesta a 1.2 µg de permetrina en bioensayos de botella.<sup>16</sup> Después de una hora, una porción de los adultos fue registrada como vivos (volando o caminando). El resto de los mosquitos se colocó en una jaula en el insectario. Después de cuatro horas, estos adultos fueron registrados como recuperados o muertos. El ADN de todos los adultos fue colectado y el genotipo para el codón 1,016 fue registrado. Todos los mosquitos con genotipo Iso1,016/Iso1,016 sobrevivieron, mientras que sólo 9.4% de Val1,016/Iso1,016 y ninguno de los Val1,016/Val1,016 sobrevivieron. Después de 4 hr 57.5% de los mosquitos con genotipo Val1,016/Iso1,016 estuvieron activos, mientras que sólo 15% de los Val1,016/Val1,016 se re-activaron. Un análisis de contingencia  $\chi^2$  (3x3) fue altamente significativo (prueba exacta de Fisher,  $P = 9.14 \times 10^{-89}$ ). Iso1,016 actúa como un alelo recesivo y condiciona la sobrevivencia de *Ae. aegypti* al ser expuesta a la permetrina.

Este análisis fue repetido en los 400 descendientes de la F3 para el alelo Met1,011, sin embargo, el análisis de contingencia  $\chi^2$  (3x3) no fue significativo ( $P = 0.411$ ) sugiriendo que este alelo no confiere resistencia a la permetrina. Este resultado no se esperaba, ya que estos dos codones se encuentran separados solamente por un intrón de ~270 bp y la recombinación entre éstos debió haber ocurrido en sólo tres generaciones. Más aún, los genotipos de los padres F1 fueron Iso1,011/Met1,011 e Iso1,016/Val1,016 y consecutivamente se esperaban sólo tres genotipos en ambos locus para la generación, en este caso, se detectaron nueve. Un análisis de contingencia  $\chi^2$  (3x3) fue realizado en los genotipos 1,011 y 1,016 resultando

no significativo ( $P = 0.347$ ), sugiriendo una segregación independiente.

La observación de la ocurrencia de más de tres genotipos de *dilocus* 1,011 y 1,016 en los 400 descendientes F3 no era esperada dado que los dos codones están separados por un intrón de sólo ~270 bp. Es posible sugerir que esta región representa un punto de alta recombinación en el genoma de *Ae. aegypti*. Sin embargo, esta hipótesis es muy simple, dado que los estimados de  $r$  no se ajustaron satisfactoriamente a los números de genotipos de *dilocus* observados.

A pesar de la evidencia de recombinación en sólo tres generaciones y la predicción general de equilibrio de unión en otros estudios de genes de *Ae. aegypti*, el alelo Iso1,016 ocurre en desequilibrio con un gran número de sitios de segregación en el intrón y un gran exceso de alelos Iso1,016 se encontraron asociados con la clada 2 en el análisis filogenético. Ninguno de estos patrones fue encontrado en alguno de los tres alelos del codón 1,011. Este patrón es consistente con la hipótesis de que un deslice genético del alelo Iso1,016 y la secuencia intrónica próxima ha ocurrido a partir de la selección con DDT y subsecuentemente con los piretroides. Más aún, este evento ha ocurrido recientemente y no ha habido tiempo suficiente para que la recombinación elimine el desequilibrio entre el alelo Iso1,016 y la secuencia intrónica aproximada.

Desarrollamos un ensayo de PCR para estos seis alelos que pueden ser leídos ya sea en un gel de agarosa o en una curva de desnaturalización. El PCR de alelos específicos presentado aquí ha probado ser una vía rápida y relativamente económica para diagnosticar los genotipos en los sitios de segregación en colecciones de campo de *Ae. aegypti*. El costo por determinación de genotipo utilizando un análisis de curva por desnaturalización en una máquina de tiempo real (figura 1) es de 0.73 dólares (EUA) y el costo cuando se utilizan condiciones de PCR estándar por electroforesis en geles de agarosa (figura 2) es de 0.35 dólares (EUA). Aproximadamente 0.15 dólares de este costo es-

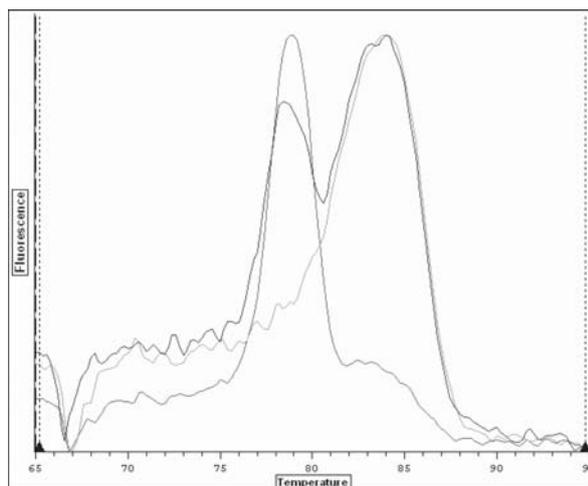


Fig. 2. Gráfica de las temperaturas de desnaturalización para detección de alelos específicos en el sistema *Val1,016Iso* del gen *para* de *Ae. aegypti*. El genotipo mutante *Iso1,016/Iso1,016* produjo una curva a 77°C. El genotipo silvestre *Val1,016/Val1,016* produjo una curva a 84°C. El genotipo heterocigoto *Iso1,016/Val1,016* presentó ambas curvas.

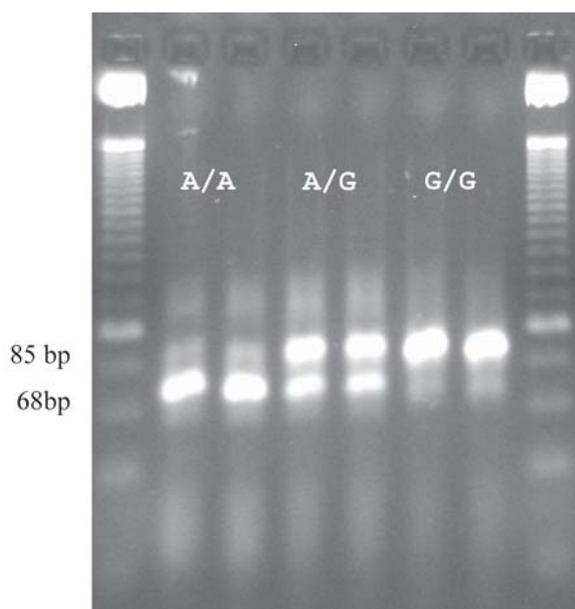


Fig. 3. Fragmentación de productos de PCR alelo-específicos del sistema *Val1,016Iso* del gen *para* de *Ae. aegypti*, en gels de agarosa a 4%. La banda de 68 pares de bases (bp) presente en los carriles 1 y 2 corresponde al genotipo mutante *Iso1,016/Iso1,016* (A/A). La banda de 85 pb en los carriles 5 y 6 corresponde al genotipo silvestre *Val1,016/Val1,016* (G/G). El genotipo heterocigoto *Val1,016/Iso1,016* (A/G), de los carriles 3 y 4, presentó ambas bandas. La letra M corresponde al marcador de peso molecular de 25 pb.

tán asociados al uso de agarosa de alta resolución (GenePure HiRes or Metaphor).

Por último, la validación de *Iso1,016* como un marcador de *kdr* en *Ae. aegypti* de América Latina requerirá probar la asociación de *Iso1,016* y la susceptibilidad a piretroides en material colectado en campo. Ya que *Iso1,016* actúa como un alelo recesivo para condicionar la sobrevivencia y la frecuencia de los homocigotos *Iso1,016* es baja en líneas no seleccionadas, este esfuerzo requeriría aplicar selección con piretroides por varias generaciones para poder generar homocigotos *Iso1,016* antes de probar la asociación entre *Iso1,016* y la resistencia. Las herramientas e información presentada aquí debe proveer un medio para la detección temprana y caracterización de *kdr* que sea disponible y práctica para muchos laboratorios de países en vías de desarrollo. Esta información será crítica para el desarrollo de estrategias de manejo de resistencia.

## Resumen

Los piretroides se aplican con frecuencia como adulticidas de mosquitos, y la evolución de la resistencia a estos compuestos es la principal amenaza para salud pública. La resistencia 'Knockdown' (*kdr*) hacia los piretroides es causada frecuentemente por mutaciones no sinónimas en la proteína transmembranal del canal de sodio dependiente de voltaje (*para*), la cual reduce la unión de los piretroides. La detección temprana de *kdr* es crítica en el desarrollo de estrategias de manejo de resistencia en mosquitos, incluyendo *Aedes aegypti*, el vector más prevalente del los virus del dengue y la fiebre amarilla. Se encontraron siete mutaciones nuevas en el segmento hidrofóbico 6 del dominio II de *para* en *Ae. aegypti*. Los ensayos en larvas que presentan estas mutaciones indicaron una reducida sensibilidad nerviosa a la inhibición por piretroides. Dos de éstos ocurrieron en los codones *Iso1011* y *Val1016* en los exones 20 y 21, respectivamente. Una transición en la tercera posición de *Iso1011* codifica una sustitución a

Met1011, y una transversión en la segunda posición de Val1016 codificó una sustitución a Gly1016. Se evaluó esta misma región en 1,318 mosquitos de 32 cepas adicionales, 30 de América Latina. Mientras el alelo Gly1016 no fue detectado en América Latina, se encontraron dos nuevas mutaciones en estos mismos codones. Una transición en la primera posición del codón 1,011 codifica una sustitución a valina, mientras que una transición en la primera posición del codón 1016 codifica una sustitución a isoleucina. Aquí se desarrolló un ensayo de PCR para estas cuatro mutaciones, y el genotipo puede ser leído en un gel de agarosa o en una curva de desnaturalización. Los experimentos de selección, uno con deltametrina en una cepa de campo proveniente de Santiago de Cuba y otro realizado con permetrina en una cepa de Isla Mujeres, incrementaron rápidamente la frecuencia del alelo Iso1,016. Los bioensayos con la descendencia F3 proveniente de los padres homocigotos Val1,016 susceptibles a la permetrina y homocigotos Iso1,016 resistentes a la permetrina demostraron que Iso1,016 segrega como un alelo recesivo para conferir kdr. El análisis de segregación entre los alelos de los codones 1011 y 1016 en la F3 mostró un alto grado de recombinación, aun cuando los dos codones estuviesen separados solamente por un intrón de ~270 bp. Las herramientas e información presentada aquí proveen medios para la detección y caracterización temprana de kdr, la cual es crítica para el desarrollo de estrategias de manejo de resistencia a insecticidas.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*, Mutación kdr, Piretroides.

## Abstract

Pyrethroids are commonly used as mosquito adulticides and evolution of resistance to these compounds is a major threat to public health. 'Knockdown resistance' to pyrethroids (kdr) is frequently caused by nonsynonymous mutations in

the voltage-gated sodium channel transmembrane protein (para) that reduce pyrethroid binding. Early detection of kdr is critical to the development of resistance management strategies in mosquitoes including *Aedes aegypti*, the most prevalent vector of dengue and yellow fever viruses. Brengues et al. described seven novel mutations in hydrophobic segment 6 of domain II of para in *Aedes aegypti*. Assays on larvae from strains bearing these mutations indicated reduced nerve sensitivity to permethrin inhibition. Two of these occurred in codons Iso1011 and Val1016 in exons 20 and 21 respectively. A transition in the third position of Iso1011 encoded a Met1011 replacement and a transversion in the second position of Val1016 encoded a Gly1016 replacement. We have screened this same region in 1318 mosquitoes in 32 additional strains; 30 from throughout Latin America. While the Gly1016 allele was never detected in Latin America, we found two new mutations in these same codons. A transition in the first position of codon 1011 encodes a Val replacement while a transition in the first position of codon 1016 encodes an Iso replacement. We developed PCR assays for these four mutations that can be read either on an agarose gel or as a melting curve.

Selection experiments: one with deltamethrin on a field strain from Santiago de Cuba and another with permethrin on a strain from Isla Mujeres, Mexico rapidly increased the frequency of the Iso1016 allele. Bioassays of F3 offspring arising from permethrin susceptible Val1016 homozygous parents and permethrin resistant Iso1016 homozygous parents show that Iso1016 segregates as a recessive allele in conferring kdr. Analysis of segregation between alleles at the 1011 and 1016 codons in the F3 showed a high rate of recombination even though the two codons are only separated by a ~250 bp intron. The tools and information presented provide a means for early detection and characterization of kdr that is critical to the development of strategies for resistance management.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, Kdr mutation, Pyrethroids.

## Referencias

- Zaim, M., Aitio, A. and Nakashima, N. (2000) Safety of pyrethroid treated mosquito nets. *Med Vet Entomol* 14: 1-5.
- Kroeger, A., Lenhart, A., Ochoa, M., Villegas, E., Levy, M., Alexander, N., v (2006) Effective control of dengue vectors with curtains and water container covers treated with insecticide in Mexico and Venezuela: cluster randomised trials. *BMJ* 332:1247-1250.
- Soderlund, D.M. and Bloomquist, J. R. (1990) Molecular mechanisms of insecticide resistance. *Pesticide Resistance in Arthropods* (Roush, R.T. and Tabashnik, B.E., eds), pp. 58-96. Chapman and Hall, New York.
- Soderlund, D. M. (1997) Molecular mechanisms of insecticide resistance. *Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals* (Sjut, V., ed), pp. 21-56. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Soderlund, D.M. and Knipple, D.C. (1999) Knockdown resistance to DDT and pyrethroids in the house fly (Diptera: Muscidae): from genetic trait to molecular mechanism. *Ann Entomol Soc Am* 92: 909-915.
- Monath, T.P. (1994) Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2395-400.
- Gubler, D.J. (2002a) The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 33: 330-342.
- Pan American Health Organization (1994) *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control*. Washington, DC: PAHO Scientific Publication No.548.
- Gubler, D. J. (2002b) Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 10: 100-103.
- Bregues, C., Hawkes, N.J., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P. et al. (2003) Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* 17: 87-94.
- Soderlund, D.M. and Knipple, D.C. (2003) The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 563-577.
- Rodríguez, M.M., Bisset, J. A., De Armas, Y. and Ramos, F. (2005) Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *J Am Mosq Control Assoc* 21: 437-445.
- Rodríguez, M.M., Bisset, J., Ruiz, M. and 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: 882-888.
- Bisset, J., Rodríguez, M. M. and Fernández, D. (2006) Selection of insensitive acetylcholinesterase as a resistance mechanism in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Santiago de Cuba. *J Med Entomol* 43: 1185-1189.
- Flores, A.E., Grajales, J. S., Salas, I. F., Garica, G.P., Becerra, M.H.L., Lozano, S. et al. (2006) Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 22: 672-677.
- Brogdon, W.G. and McAllister, J.C. (1998) Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J Am Mosq Control Assoc* 14: 159-164.
- Karla Saavedra-Rodríguez, Clare Strode, Adriana Flores Suárez, Ildefonso Fernández Salas, Hilary Ranson, Janet Hemingway and William C. Black IV. 2008. QTL mapping

- of gene regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* 18 (2): 0-0.
18. Black, W.C. and DuTeau, N.M. (1997) RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual* (Crampton, J., Beard, C.B. and Louis, C., eds), pp. 361-373. Chapman and Hall, New York.
  19. Okimoto, R. and Dodgson, J.B. (1996) Improved PCR amplification of multiple specific alleles (PAMSA) using internally mismatched primers. *Biotechniques* 21: 20-22.
  20. Tajima, F. (1993) Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis. *Genetics* 135: 599-607.
  21. Hudson, R.R. and Kaplan, N.L. (1985) Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA-sequences. *Genetics* 111: 147-164.
  22. Rozas, J., Sánchez-Del Barrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
  23. Swofford, D.L. (1993) PAUP - a computer-program for phylogenetic inference using maximum parsimony. *J Gen Physiol* 102: A9-A9.26.
  24. Rongsriyam, Y. & Busvine, J. R. (1975) Cross-Resistance in Ddt- Resistant Strains of Various Mosquitos (Diptera, Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 65, 459-471.
  25. Gorrochotegui-Escalante, N., Lozano-Fuentes, S., Bennett, K. E., Molina-Cruz, A., Beaty, B. J. & Black, W. C. (2005) Association mapping of segregating sites in the early trypsin gene and susceptibility to dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, 35, 771-88 .

*Recibido: 1 de septiembre de 2008*

*Aceptado: 12 de septiembre de 2008*