

## Artículo de revisión

# Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública

Insecticide resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae): mechanisms, detection and monitoring in public health

IDALYD FONSECA<sup>1</sup>, MARTHA L. QUIÑONES<sup>2</sup>

**Resumen.** Uno de los obstáculos más serios en los programas de control de vectores de enfermedades humanas es el desarrollo de resistencia a los insecticidas usados. Según la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente el 40% de los 506 artrópodos de importancia médica presentan algún grado de resistencia a insecticidas. De estas especies, cerca del 50% son especies de mosquitos vectores de malaria, dengue, fiebre amarilla y filariasis. Los dos principales mecanismos de resistencia a insecticidas son las alteraciones en el sitio blanco y un incremento en la tasa de detoxificación de los insecticidas. Una vez se detectan niveles de resistencia en una población de vectores es fundamental determinar su base bioquímica y molecular. La identificación de los mecanismos de resistencia permite la selección de los insecticidas a usar en los programas de control y la evaluación del potencial desarrollo de resistencia a insecticidas alternativos. Esta revisión presenta información básica acerca de los principales mecanismos de resistencia a insecticidas identificados en mosquitos vectores de enfermedades humanas y las metodologías más usadas para su vigilancia y detección.

**Palabras clave:** Mecanismos moleculares. Vectores. Control Químico. Vigilancia.

**Summary.** Among the most serious obstacles in vector control programs for human diseases is the development of resistance to the insecticides used. According to WHO, approximately 40% of the 506 medically important arthropods show some degree of insecticide resistance. Of these species, about 50% are species of mosquitoes that vector malaria, dengue, yellow fever and filariasis. The two principal mechanisms of insecticide resistance are alterations in the target site or an increase in the detoxification rate of the insecticide. Once resistance is detected in a vector population it is crucial to determine its molecular and biochemical basis. Identification of resistance mechanisms permits the selection of insecticides to use in control programs and the evaluation of potential development of resistance to alternative insecticides. This review presents basic information regarding the main mechanisms of insecticide resistance identified in mosquito vectors of human diseases and the methodologies most used to monitor and detect them.

**Key words:** Molecular mechanisms. Vectors. Chemical Control. monitoring.

### Introducción

Cada año, millones de personas alrededor del mundo se enferman y mueren por enfermedades transmitidas por insectos vectores, como malaria, dengue, leishmaniosis y tripanosomiasis. Estas enfermedades causan gran impacto económico y social, particularmente en países tropicales como Colombia. Actualmente, ningún método efectivo de inmunización está disponible para controlar dichas enfermedades y la única forma de controlar la transmisión está dirigida hacia sus vectores. El uso de insecticidas químicos ha sido la forma más utilizada en los programas de control. Éstos se han empleado por más de 60 años con resultados variables. Inicialmente se usaron piretrinas, de corto efecto de noqueo. Posteriormente se introdujeron insecticidas de mayor acción residual como los organoclorados, carbamatos y organofosforados.

A partir de 1990, el desarrollo de piretroides sintéticos fotoestables y las presiones de grupos ambientalistas desplazaron el uso del DDT (Dicloro-difenil-tricloroetano) para la fumigación intradomiciliar en los programas de control de malaria, siendo en la actualidad el tipo de insecticida más usado tanto en rociamientos intradomiciliares como en la impregnación de toldillos (Lengeler *et al.* 1996; Phillips 2001).

En 1947, tan solo un año después de la introducción de insecticidas para el control de vectores, se notificaron los primeros casos de resistencia a DDT en *Aedes tritaeniorhynchus* (Weidemann) y *Ae. sollicitans* (Walker) (Brown 1986). Desde entonces se han señalado más de 100 especies de mosquitos resistentes a uno o más insecticidas, de las cuales 56 son Anophelinos y 39 Culicinos, además de triatomíneos, pulgas, piojos y

garrapatas (WHO 1992). Actualmente, el Comité de Acción para la Resistencia a Insecticidas (IRAC) cita en su página web (<http://www.plantprotection.org/irac>) resistencia en 21 especies de *Aedes*, entre ellas el vector de dengue *Ae. aegypti* (Linnaeus) (resistente a 16 insecticidas) y 63 especies de *Anopheles*, incluyendo *Anopheles albimanus* Weidemann, *An. darlingi* Root, *An. pseudopunctipennis* Theobald y *An. rangeli* Galabdon, Cova García & López, todas éstas importantes en la transmisión de malaria en Colombia.

En Colombia, la descentralización de los programas de control de malaria y dengue desde 1992 ha dificultado la vigilancia permanente del estado de la resistencia a insecticidas en las poblaciones vectoras. No obstante, existen registros de resistencia al DDT y Temefos en diferentes especies de *Anopheles* y *Ae.*

1 Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales – PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Calle 62 No 52-59, Edificio de Sede de Investigación Universitaria, Medellín, Colombia. A. A 1226. Fax: (4) 210 6502. E-mail: idalydf@guajiros.udea.edu.co

2 Autor para correspondencia: Martha L. Quiñones P. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales – PECET, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Lab 632, A. A 1226, Medellín, Colombia. Fax: (4) 210-6502. E-mail: mquinones@guajiros.udea.edu.co

*aegypti* en el país, respectivamente (Quiñones *et al.* 1987; Suárez *et al.* 1990), los cuales sugieren que las poblaciones de vectores presentan características genéticas favorables para la emergencia de resistencia cuando éstas sean presionadas por insecticidas. Sin embargo, debido a que no hay conocimiento de los mecanismos bioquímicos que generaron la resistencia al DDT y a otros químicos, se desconoce el impacto que podría tener el uso de otros insecticidas que compartan el mismo mecanismo de acción, causado por efectos de resistencia cruzada.

La resistencia a insecticidas o resistencia fisiológica se define como la capacidad de una población de insectos de tolerar dosis de un insecticida que serían letales para la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie y es el resultado de la presión de selección positiva ejercida por el insecticida (WHO 1975) sobre genes inicialmente en baja frecuencia. Los genes de resistencia pueden luego dispersarse en la población local de insectos e incluso en el mundo. Los patrones de distribución de estas variantes genéticas en poblaciones naturales son el efecto conjunto de varias fuerzas evolutivas y factores demográficos como la selección, mutación y el ciclo de vida (Gazave *et al.* 2001).

Numerosos factores influyen en la evolución de la resistencia a insecticidas, los cuales pueden agruparse en tres categorías: factores genéticos, biológicos y operacionales. Los factores genéticos se relacionan principalmente con la frecuencia y dominancia de los alelos de resistencia, en tanto que los biológicos incluyen el ciclo de vida, el número de descendientes por generación y las tasas de flujo génico. Los factores genéticos y biológicos son intrínsecos a las especies y por lo tanto se escapan del control humano. Los factores operacionales si pueden ser manejados a fin de evitar o retardar el desarrollo de resistencia. Estos factores se asocian directamente con el tiempo, dosis y formulación del insecticida, el estadio seleccionado y el uso previo de insecticidas relacionados (Georghiou 1990).

### Mecanismos de Resistencia

Los dos principales mecanismos de resistencia a insecticidas son las alteraciones en el sitio blanco y un incremento en la tasa de detoxificación de los insecticidas. Se proponen también mecanismos basados en la respuesta al estrés térmico (Patil *et al.* 1996), penetración disminu-

da, incremento en las tasas de excreción y cambios de comportamiento que eviten el contacto con los insecticidas aunque los vectores sean susceptibles a éstos (Brogdon y McAllister 1998a).

La resistencia mediada por el sitio blanco ocurre cuando el insecticida no logra unirse a su sitio de acción ya sea porque hay disminución en la sensibilidad del sitio blanco o modificación de éste (Hemingway y Ranson 2000). La resistencia basada en enzimas detoxificantes se presenta cuando niveles elevados o actividades modificadas de estas enzimas contribuyen a disminuir la dosis efectiva de un insecticida evitando que llegue a su sitio de acción (Ranson *et al.* 2002a). (Fig. 1).

### 1. Alteraciones en el sitio blanco

La causa más común de resistencia en el sitio blanco es la presencia de mutaciones puntuales no silentes en genes estructurales. Para que dichas mutaciones sean seleccionadas favorablemente, el cambio en el aminoácido debe disminuir la unión al insecticida sin causar pérdida de la función primaria del sitio blanco. Por lo tanto, el número de posibles sustituciones de aminoácidos es limitado y comúnmente se encuentran mutaciones idénticas asociadas con resistencia a través de taxa altamente divergentes. El grado de deterioro de la función, ocasionado por la mutación que confiere resistencia, se refleja en la eficacia biológica de los individuos resistentes en ausencia de selección por el insecticida. Este costo en la eficacia biológica tiene importantes implicaciones para la persistencia de resistencia y/o reversión a la susceptibilidad en poblaciones de campo (Berticat *et al.* 2002).

#### 1.1. Cambios en el Receptor GABA (Ácido $\gamma$ -aminobutírico)

En insectos, el receptor GABA es un canal heteromultimérico abierto por el ión cloro, un inhibidor de canales de neurotransmisión en el sistema nervioso y las uniones neuromusculares (Bermudez *et al.* 1991).

El receptor GABA es el sitio de acción para ciclodienos y avermectinas al igual que para fipronil (Ffrench-Constant *et al.* 1993a). La resistencia está dada por el gen *Rdl* (Resistencia a dieldrín), el cual codifica para la subunidad RDL del receptor GABA. La sustitución Ala302Ser confiere insensibilidad al insecticida al interactuar directamente con el sitio de unión del insecticida dentro del poro del canal iónico y alostéricamente, desesta-

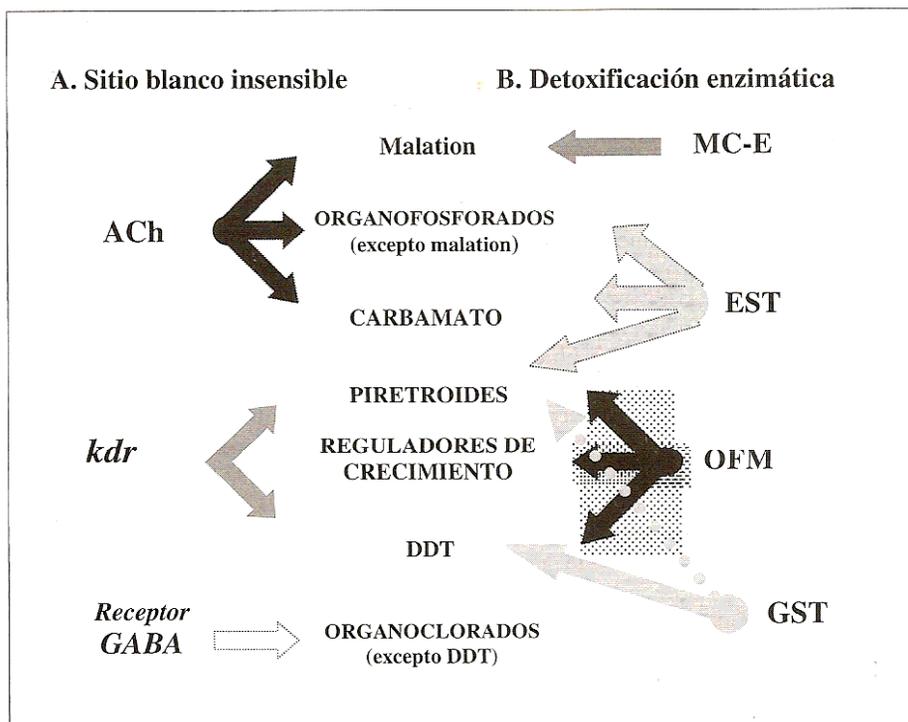
bilizando la conformación preferida del insecticida, a través de un fenómeno conocido como desensibilización (Ffrench-Constant *et al.* 1998). En *Drosophila* se identificaron por primera vez subunidades del receptor GABA conteniendo *Rdl*, las cuales se han encontrado expresadas en el sistema nervioso de insectos resistentes a dieldrín, entre ellos *Ae. aegypti* (Thompson *et al.* 1993). En *Drosophila simulans* Sturtevant y *Myzuspersicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), el mismo residuo es reemplazado por glicina (Ffrench-Constant *et al.* 1993b).

#### 1.2. Canales de sodio dependientes de voltaje (*kdr*)

Los canales de sodio dependientes de voltaje son el blanco de acción del DDT y piretroides. Estos insecticidas actúan sobre el sistema nervioso del insecto causando decaídas lentas del potencial de acción, generando la iniciación de descargas repetitivas en los axones motores y sensoriales (Soderlund y Bloomquist 1989). Estudios electrofisiológicos en *Ae. aegypti* y *An. stephensi* Liston han demostrado que estos fenómenos resultan de la modificación en la cinética de apertura de estos canales (Hemingway *et al.* 1989; Vatandoost *et al.* 1996).

El *para*-canal de sodio es un complejo de proteínas de más de 2000 aminoácidos, compuesto por 4 dominios homólogos separados por enlaces hidrofílicos. Cada uno de estos dominios contiene 6  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas extendidas sobre la membrana (S1-S6) y cuyas secuencias contribuyen a las propiedades funcionales del canal (Loughney *et al.* 1989).

El gen *Para*, el cual codifica el canal de sodio, se clonó originalmente de *D. melanogaster* (Loughney *et al.* 1989) pero la primera mutación confiriendo resistencia, denominada "Resistencia Knockdown" o *kdr*, se identificó en *Musca domestica* Linnaeus (Williamson *et al.* 1993). Los fenotipos *kdr* poseen una mutación puntual (Leu1014Fen) en el segmento transmembranal S6 del dominio II, la cual produce 10-30 veces resistencia a DDT y piretroides en *M. domestica* (Williamson *et al.* 1996). Esta mutación se ha identificado en insectos resistentes a piretroides pertenecientes a los órdenes Diptera (*M. domestica*, *An. gambiae* Giles), Blattodea (*Blatella germanica* (Linnaeus)) (Dong 1997), Lepidoptera (*Plutella xylostella* Linnaeus) (Schuler *et al.* 1998) y Hemiptera (*M. persicae*) (Martínez-Torres *et al.* 1999).



**Figura 1.** Mecanismos de Resistencia a Insecticidas. *AchE*: Acetilcolinesterasa Inhibida. *Kdr*: resistencia "Knockdown". *GST*: Glutathion S-transferasas. *EST*: Esterasas inespecíficas. *OFM*: Oxidasas de función mixta. *MC-E*: Malation carboxil-esterasas.

Otras mutaciones puntuales en el mismo nucleótido (Leu1014His: *An. gambiae*. Leu1014Ser: *An. gambiae*, *Culex pipiens* Linnaeus) también confieren resistencia a DDT y piretroides, aunque con menor frecuencia (Martínez-Torres *et al.* 1998; Ranson *et al.* 2000a).

Una sustitución adicional encontrada en cepas de *M. domestica*, Metionina918-Treonina, cerca al dominio IIS4-S5, en combinación con la mutación Leu1014-Fen, presenta niveles elevados de resistencia a piretroides (más de 500 veces), denominándose resistencia *super-kdr* (Williamson *et al.* 1996). Esta mutación no tiene efecto sobre la dependencia de voltaje del canal de sodio pero sí reduce la disponibilidad de los canales e incrementa la tasa de inicio y recuperación de la inactivación (Vais *et al.* 2001).

Martínez-Torres *et al.* (1998) desarrollaron una prueba diagnóstica basada en la amplificación por PCR de alelos específicos, la cual permite discriminar entre individuos homocigóticos susceptibles, homocigóticos resistentes y heterocigóticos con la mutación Leu1014Fen. Debido a que el fenotipo *kdr* es semi o totalmente recesivo (Paton *et al.* 2000), con genes de resistencia en bajas frecuencias, la capacidad de identificar heterocigóticos es importante en la detección temprana y manejo de la resistencia en el

campo. Esta prueba diagnóstica ha sido modificada por Ranson *et al.* (2000a) para identificar la mutación Leu1014Ser en *An. gambiae*.

En *Drosophila* se ha usado un enfoque diferente para aislar mutantes tipo *kdr* utilizando un método basado en el fenotipo de sensibilidad a la temperatura. De esta forma se han identificado dos clases de mutaciones ubicadas en posiciones equivalentes a las mutaciones *kdr* y *super-kdr* pero hasta la fecha no se ha establecido su papel en el desarrollo de resistencia (Ffrench-Constant *et al.* 1998).

### 1.3. Acetilcolinesterasas (AChE)

La acetilcolinesterasa es una enzima clave en el sistema nervioso al catalizar la hidrólisis del neurotransmisor Acetilcolina sobre las membranas de los nervios post-sinápticos. En insectos, la forma molecular predominante es un dímero anfífilo globular anclado en la membrana mediante un glicolípido (Vontas *et al.* 2002). *AchE* es el principal blanco para organofosforados y carbamatos, los cuales inhiben la actividad enzimática mediante fosforilación covalente o carbamilitando el residuo de serina dentro del sitio activo (Corbett 1974).

La resistencia a insecticidas mediada por *AchE* está relacionada con cambios cua-

litativos y cuantitativos en la enzima y con mutaciones puntuales generalmente acompañadas por modificación de los parámetros cinéticos de la hidrólisis de acetilcolina. Tales mutaciones involucran sustituciones de aminoácidos en el sitio activo de la enzima (Walsh *et al.* 2001).

En general, los niveles de insensibilidad a insecticidas conferidos por cada sustitución individual son bajos pero en combinación producen enzimas altamente resistentes. El alto número de mutaciones puntuales en *AchE* contrasta con las pocas mutaciones responsables para resistencia fuerte, encontradas en otros sitios blancos alterados (GABA o *kdr*). Este número elevado de mutaciones presentes en *AchE* se atribuye a la comunalidad sustrato-análogo insecticida y los receptores de acetilcolina (Vontas *et al.* 2002). Se han registrado mutaciones específicas en *AchE* que confieren resistencia en *D. melanogaster* Meigen (Mutero *et al.* 1994) y *M. domestica* (Walsh *et al.* 2001).

En *Cx. pipiens* existen mínimo dos genes, *AchE1* y *AchE2*, los cuales se diferencian en su especificidad de sustrato, sensibilidad y patrones de migración electroforética (Malcolm *et al.* 1998). *AchE2* es ligado al sexo pero aun no ha sido asociado con resistencia. En *Ae. aegypti* y *An. stephensi*, también se han identificado genes *AchE* aunque son pocas las referencias de mecanismos de resistencia basados en *AchE* en estas especies (Vaughan *et al.* 1998). Estos genes también están ligados al sexo. Esto sugiere que los genes clonados a partir de estos mosquitos no representan el sitio blanco del insecticida o por el contrario, si existe la resistencia basada en *AchE* alterada, ésta debe estar ligada al sexo en estas especies (Hemingway y Ranson 2000).

En *Drosophila* se han identificado cinco mutaciones puntuales dentro del gen *AchE* asociadas con resistencia a organofosforados y carbamatos (Mutero *et al.* 1994). Estas mutaciones también se han identificado mediante estudios de mutagénesis sitio-dirigida en el gen *AchE* de *Ae. aegypti* (Milatovic *et al.* 1997), pero ninguna de ellas se ha identificado en cepas coleccionadas en el campo o seleccionadas en el laboratorio.

## 2. Incremento en la tasa de detoxificación de los insecticidas

En el metabolismo de los insecticidas se involucran principalmente tres familias enzimáticas: carboxilesterasas, glutathion S-transferasas (*GST*) y mono-oxigenasas.

La actividad de una o más de estas enzimas a menudo es elevada en poblaciones de insectos resistentes, pero en contraste con la resistencia dada por alteraciones en el sitio blanco, no se conocen totalmente los mecanismos moleculares de esta resistencia metabólica. La identificación de enzimas involucradas en la resistencia a insecticidas se complica además por la complejidad de tales familias enzimáticas y las dificultades para identificar genes ortólogos entre diferentes especies de insectos (Ranson *et al.* 2002a).

### 2.1. Carboxil-esterasas

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de ésteres carboxílicos y se han asociado como primer mecanismo de resistencia a organofosforados, carbamatos y en menor proporción a piretroides (Hemingway y Karunaratne 1998). Se han encontrado niveles elevados de esterasas inespecíficas en el 90% de los casos de tolerancia a insecticidas y en más de 30 especies de insectos resistentes (Hemingway *et al.* 2000).

Las esterasas comprenden seis familias proteicas pertenecientes a la superfamilia  $\alpha/\beta$  hidrolasas (Cygler *et al.* 1993). En Diptera, estas enzimas son codificadas por un grupo de genes sobre el mismo cromosoma (Cr. 3R), donde cada uno de sus miembros puede sufrir modificaciones que confieren resistencia. Tales modificaciones pueden ser cambios aminoacídicos que alteren la especificidad del sustrato (encontrado en *An. arabiensis* Patton, *An. stephensi*, *An. culicifacies* Giles), presencia de múltiples copias génicas amplificadas en insectos resistentes (*Cx. quinquefasciatus* Say, *Cx. tarsalis* Coquillett, *Cx. pipiens*, *Cx. tritaeniorhynchus* Giles), mutaciones puntuales (*An. arabiensis*, *An. culicifacies*, *An. stephensi*) o sobreproducción constitutiva (*An. albimanus*, *An. culicifacies*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tarsalis*) (Hemingway y Ranson 2000).

Bioquímicamente, las esterasas actúan uniéndose rápidamente al insecticida pero liberando lentamente los metabolitos de éste, es decir, secuestrando el insecticida antes que llegue a su sitio de acción. Lo anterior requiere altas cantidades de estas enzimas debido a la estequiometría de la reacción, desencadenando la sobreproducción enzimática y por ende el desarrollo de resistencia (Karunaratne *et al.* 1993). Molecularmente, el mecanismo más común de resistencia mediado por esterasas es la co-amplificación de los genes *est $\alpha$ 2'* y

*est $\beta$ 2'*, los cuales presentan distribución mundial y cuya base bioquímica y molecular de resistencia ha sido bien caracterizada en el mosquito *Cx. quinquefasciatus* (Vaughan *et al.* 1997).

La alta homología entre los genes *est $\alpha$*  y *est $\beta$*  sugiere que éstos han surgido como resultado de un evento ancestral de duplicación génica (Raymond *et al.* 1991). Los genes *est $\alpha$ 2'* y *est $\beta$ 2'* se encuentran en el mismo amplicón alejados 2.7 kb en insectos resistentes y solo 1.7 kb en insectos susceptibles. La diferencia está dada por la presencia de tres inserciones en el espacio intergénico amplificado (Vaughan *et al.* 1997). Las inserciones pueden haber introducido elementos reguladores adicionales (Hemingway *et al.* 1998).

Recientemente se ha descrito co-amplificación de *est $\alpha$ 2'* y *est $\beta$ 2'* ligada a un tercer gen, aldehído oxidasa, el cual a su vez se encuentra co-elevado dentro del mismo amplicón con tales alelos pero no con otros genotipos de esterasas (Hemingway *et al.* 2000).

El análisis de fragmentos de restricción y homología de secuencias en cepas de insectos resistentes procedentes de distintos continentes, ha permitido confirmar que la co-amplificación de *est $\alpha$ 2'* y *est $\beta$ 2'*, posee un origen único y se ha propagado mundialmente (Hemingway y Karunaratne 1998; Raymond *et al.* 1998). Esta rápida e inesperada migración de insectos resistentes sugiere una gran ventaja en la eficacia biológica de los portadores de este amplicón en presencia del insecticida (Hemingway y Karunaratne 1998), resultando en serias implicaciones para el control del vector y la enfermedad.

Otros fenotipos de resistencia más variables y menos comunes involucran coamplificación de *est $\alpha$ 3* y *est $\beta$ 1*, o amplificación individual de *est $\beta$ 1*, o *est $\alpha$ 1* y *est $\alpha$ 5'*, los cuales presentan distribución geográfica restringida (Guillemaud *et al.* 1997; Severini *et al.* 1997; Vaughan *et al.* 1997). La región cromosómica que contiene estos genes de esterasas, presumiblemente representa un punto susceptible de amplificación, una teoría sustentada por la amplificación de genes esterasa  $\beta$  homólogos en *Cx. tritaeniorhynchus* (Karunaratne *et al.* 1998).

### 2.2. Glutation-S-transferasas

La enzima Glutation S-transferasa (GST) pertenece a una gran familia de isoenzimas multifuncionales involucradas en el metabolismo, detoxificación y excre-

ción de un amplio rango de xenobióticos incluyendo los insecticidas. Ellas se encargan de proteger a las células del estrés oxidativo y de los tóxicos químicos, catalizando la conjugación de los componentes electrofílicos con el grupo tiol de la glutatión reducida (GSH), obteniendo productos más hidrosolubles y de mayor excreción (Salinas y Wong 1999).

En eucariontes se han identificado más de 40 genes GST clasificados en 13 grupos según la identidad de sus secuencias, propiedades inmunológicas y en algunos casos, especificidad de sustrato (Sheehan *et al.* 2001). En insectos se han reconocido solo tres clases: *Delta*, *Sigma* y *Epsilon* (Ranson *et al.* 2001), las cuales están potencialmente relacionadas con el desarrollo de resistencia a insecticidas.

GST se asocia principalmente con resistencia a DDT (catalizando la dehidroclorinación del DDT a su metabolito menos tóxico DDE) (Clark y Shamaan 1984), organofosforados y recientemente piretroides (Kostaropoulos *et al.* 2001; Vontas *et al.* 2001), a través de mecanismos de cambio en la especificidad del sustrato (*An. gambiae*), niveles elevados de actividad (*An. gambiae*, *An. dirus* Peyton & Harrison, *An. stephensi*, *An. subpictus* Grassi, *An. culicifacies* y *Aedes aegypti*) y regulación génica (con posible amplificación) (*An. gambiae*, *An. dirus* y *Ae. aegypti*), aunque los elementos reguladores que controlan la expresión de GST no se han identificado aún (Hemingway y Ranson 2000).

GST de la clase *Delta* son codificadas por una familia multigénica. En *D. melanogaster* y *An. gambiae* tal familia se encuentra agrupada (Toung *et al.* 1993; Ranson *et al.* 1998), en contraste con *M. domestica*, donde estos genes se encuentran dispersos a través de todo el genoma (Zhou y Syvanen 1997). Los genes de esta subfamilia han sido localizados sobre el cromosoma 2R, división 18B y 19D y se expresan en niveles elevados tanto en larvas como adultos de *An. gambiae* (Ranson *et al.* 1998; Ranson *et al.* 2001). La familia GST de la clase *Sigma* consiste de un único gen en todas las tres especies (Beall *et al.* 1992; Reiss y James 1993). Se ha observado que la resistencia a DDT en *An. gambiae* es diferencial dependiendo del estadio de su ciclo de vida; así, el gen *GSTs1* se expresa en larvas pero su detección es escasa en insectos adultos, estadio responsable de la transmisión de malaria (Reiss y James 1993).

Recientemente se ha descrito GST clase *Epsilon* en *An. gambiae* y se sugiere que representa la mayor familia enzimática confiriendo resistencia a DDT en este vector. Se han identificado dos genes codificando enzimas funcionales *GSTe1* y *GSTe2*. Uno de estos genes, *GSTe2*, presenta actividad dehidroclorinasa y niveles de sobre-expresión cinco veces mayores en cepas resistentes que en cepas susceptibles (Ranson *et al.* 2001). Estos genes se ubican en la división 33B sobre el cromosoma 3R que contiene uno de los dos mayores loci (*rtD1*) para rasgos cuantitativos asociados con resistencia a DDT (Ranson *et al.* 2000b). Ranson *et al.* (2001) propusieron que *rtD1* podría ser un elemento regulador actuando en *Cis*, el cual estaría controlando la expresión de los genes GST clase *Epsilon*. Si múltiples miembros de esta familia génica están bajo el control de un factor regulador común, una mutación en este factor podría explicar la elevada actividad de GST observada en ensayos bioquímicos (Ding *et al.* 2003).

Un estudio sobre las propiedades bioquímicas e inmunológicas de la subfamilia *Epsilon* identificó un alelo *GSTe1K*, el cual presentó altos niveles de actividad peroxidasa (Ortelli *et al.* 2003). En *Nilaparvata lugens* Stal (Hemiptera: Delphacidae) se ha demostrado que la actividad de peroxidasa protege contra daños causados por productos de la peroxidación lipídica inducidos por la exposición a piretroides (Vontas *et al.* 2001). Aunque este mecanismo no se ha identificado en mosquitos, es posible que insectos portadores de este alelo posean ventajas en su eficacia biológica en presencia de insecticidas (Ortelli *et al.* 2003).

### 2.3. Citocromos P450

Los citocromos P450 son una superfamilia de hemoproteínas responsables del metabolismo oxidativo de una amplia variedad de componentes exógenos (aleloquímicos vegetales, promutágenos e insecticidas) y endógenos (hormonas juveniles, ecdisteroides, feromonas) del metabolismo (Scott y Wen 2001). P450 han sido encontrados en todos los sistemas vivos y en un rango diverso de especies de insectos, incluyendo Diptera (Scott 1999), Lepidoptera (Rose *et al.* 1997) y Coleoptera (Sharf *et al.* 2001).

Se ha identificado resistencia mediada por P450 para casi todas las clases de insecticidas, principalmente piretroides (Berge *et al.* 1998), organoclorados y reguladores de crecimiento (Brogdon y McAllister

1998a). Se proponen dos posibles mecanismos genéticos: (1) Cambios estructurales en P450s específicos o (2) Niveles elevados de expresión de P450s. Mutaciones puntuales dentro de genes estructurales P450 pueden resultar en actividades catalíticas incrementadas o alta afinidad por el insecticida (Scott y Wen 2001). Algunos estudios han registrado sobre-expresión constitutiva (CYP6G1, CYP12D1) e inducción post exposición a DDT (CYP12D1) en cepas de insectos resistentes (Brandt *et al.* 2002), pero en pocos casos se ha establecido conexión definitiva entre la expresión elevada de un gen P450 específico y el desarrollo de resistencia.

En *D. melanogaster* se han aislado 83 genes putativos para codificar P450s funcionales. Estos han sido clasificados en 25 familias, pero más del 50% pertenece a las familias CYP4 o CYP6 (Tijet *et al.* 2001). Recientemente, Daborn *et al.* (2002) utilizando análisis de microarreglos sobre todos los P450s de *D. melanogaster* demostraron que *DDT-R*, un gen que confiere resistencia a DDT, está asociado con un incremento en la transcripción del gen *Cyp6g1*. Esto se confirmó mediante análisis transgénicos de *Cyp6g1*, los cuales demostraron que la transcripción es necesaria y suficiente para el desarrollo de resistencia.

En *An. albimanus* se identificaron 17 genes que codifican proteínas de las familias CYP4 y CYP9. En *An. gambiae* se identificaron 34 genes P450: 14 genes pertenecientes a la familia CYP6, 18 genes para CYP4 y 2 para CYP9. Estos genes se localizan en el cromosoma 3R, división 30A (CYP6), cromosoma 2R, división 13C (CYP6P) y división 12C (CYP4H) (Ranson *et al.* 2002b). Lo anterior se relaciona con la identificación de dos loci de resistencia para permethrina, uno de los cuales se localiza en el cromosoma 3R, división 30 (Ranson *et al.* 2002b). La co-localización de este loci de resistencia con un grupo de genes P450, plantea el papel de una o más de estas proteínas en conferir resistencia a piretroides en *An. gambiae*.

### 2.4. Aldehído Oxidasa

En vertebrados superiores, la enzima aldehído oxidasa está involucrada en el metabolismo oxidativo de xenobióticos y en la reducción de nitrosaminas, ácidos hidroxámicos, N-óxidos, hidrocarburos aromáticos nitropolíclicos, colorantes azo y sulfóxidos (Calzi *et al.* 1995), pero

existen pocos estudios sobre su papel en el metabolismo de los insectos.

Esta enzima pertenece al grupo de hidrolasas que contienen Molibdeno. Se asume que para todas las enzimas de este grupo, los sustratos actúan en el molibdeno central, reduciéndolo del estado Mo(VI) a Mo(IV). Posteriormente, los equivalentes reductores son transferidos vía centros de sulfuro de hierro y la enzima es re-oxidada por interacción con el oxígeno (Turner *et al.* 1995).

Esta enzima se describió por primera vez para insectos en la cepa PELRR resistente de *Cx. quinquefasciatus* (Hemingway *et al.* 2000). El gen que codifica esta enzima fue identificado en ligamiento con el gen *estα*, dentro del amplicón de 30 kb asociado con resistencia a insecticidas el cual contiene los genes *estα2'* y *estβ2'*. Lo anterior coincide fuertemente con estudios previos de mapeo genético en *An. albimanus* (Narang y Seawright 1983) y sugiere una ventaja selectiva de los individuos portadores de este amplicón con respecto a los amplicones que contienen otras esterasas (Coleman *et al.* 2002).

Coleman *et al.* (2002), mediante análisis de secuenciamiento y clonación, identificaron para aldehído oxidasa una secuencia de 1266 aminoácidos, la cual transcribe una proteína de 150 kDa. Análisis por RT-PCR en cepas susceptibles y resistentes sugieren que el gen amplificado es transcrito en todas las fases del ciclo de vida de los mosquitos, presentando mayor actividad en larvas resistentes, con un pico en los estadios 3 y 4, disminuyendo progresivamente en pupas y adultos.

Aunque el papel específico del gen aldehído oxidasa en la resistencia a insecticidas no se ha determinado totalmente, se ha demostrado que insecticidas como el paration y herbicidas conteniendo el grupo aldehído son reconocidos como sustratos o inhibidores enzimáticos (Hemingway *et al.* 2000). Trabajos realizados en mamíferos han involucrado esta enzima en el desarrollo del sistema nervioso central, uno de los principales blancos de acción de los insecticidas (Calzi *et al.* 1995), lo cual es otra evidencia de su posible papel en la resistencia a insecticidas.

### Resistencia Cruzada

La resistencia cruzada implica el mismo mecanismo de resistencia para dos clases de insecticidas no relacionados (Najera y Zaim 2002). Este tipo de resistencia se pre-

senta principalmente entre piretroides y DDT en diferentes especies de insectos. Registros de resistencia tipo *kdr* en *An. gambiae* en África oriental postulan que la resistencia ha sido seleccionada por el uso temprano de DDT y/o el uso agrícola de piretroides (Chandre *et al.* 1999). La resistencia cruzada es específica de producto más no del tipo de insecticida, lo cual se ha demostrado en *An. stephensi* donde la resistencia a permetrina no confiere resistencia cruzada a deltametrina en larvas y adultos pero sí a otros ciano-piretroides (Curtis y Townson 1998) y Etofenprox (Curtis 1993). Recientemente se ha registrado resistencia cruzada tipo *kdr* en *Ae. aegypti* (Bregues *et al.* 2003). La presencia de resistencia cruzada tipo *kdr* entre DDT y piretroides amenaza el uso de piretroides tanto en rociamientos intradomiciliares como en toldillos impregnados para el control de malaria.

Un estudio realizado en *An. funestus* Giles demostró elevados niveles de resistencia a piretroides pero no a DDT (Hargreaves *et al.* 2000). Estas evidencias han motivado la idea de restaurar los programas de rociamiento con DDT en países como Madagascar y en la provincia de Kwazulu/Natal en Sur África, en áreas donde se advierte alta transmisión de malaria (Brooke *et al.* 2001). El impacto del uso reciente de DDT ha sido asociado con una reducción del 60% de los casos de malaria durante el 2001 en Sur África (Curtis 2002).

### Detección y Vigilancia de la Resistencia

La capacidad de prevenir o retardar la evolución del desarrollo de resistencia a insecticidas se fundamenta en la implementación de estrategias para el manejo y vigilancia de la resistencia. Tres aspectos importantes en el diseño de tales estrategias son (1) el establecimiento de líneas-base de susceptibilidad, (2) la identificación de los mecanismos de resistencia y (3) el uso de métodos que vigilen las frecuencias de resistencia y el efecto de las estrategias de control (Brogdon y McAllister 1998a).

La identificación de los mecanismos de resistencia determina el espectro de resistencia cruzada, facilita la escogencia de insecticidas alternativos y permite el mapeo detallado de áreas con poblaciones resistentes. Los bioensayos o pruebas biológicas tienen la capacidad de encontrar casos de resistencia producidos por cualquiera de los diferentes mecanismos bioquímicos o neurofisiológicos.

La OMS (WHO 1981) implementó el uso de papeles impregnados con insecticidas o sinergistas en dosis estandarizadas, basados en la correlación entre mortalidad vs tiempo de exposición y mortalidad vs dosis letales. Otra alternativa para la realización de los bioensayos es el uso de botellas de vidrio impregnadas con insecticidas la cual ha sido estandarizada por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades en Estados Unidos (CDC). Esta aproximación simplifica el procedimiento de los bioensayos convencionales e incrementa la cantidad de información que puede obtenerse de un grupo limitado de mosquitos (Brogdon y McAllister 1998b).

Debido a que los piretroides causan inducción de parálisis temporal, más conocida como "knockdown", se ha asociado la resistencia a piretroides con un incremento significativo en el tiempo de noqueo antes de disminuir la mortalidad, por lo que dicho tiempo es un buen indicador para la detección temprana de resistencia a piretroides (WHO 1992) y puede incluirse en los programas de vigilancia de resistencia a estos insecticidas al aportar información inicial acerca de la resistencia basada en el gen *kdr* (Chandre *et al.* 1999).

Los métodos bioquímicos y moleculares pueden identificar mecanismos específicos de resistencia y detectar genes de resistencia cuando éstos aun estén en bajas frecuencias y utilizando un número mínimo de insectos (Brogdon 1984). Las pruebas bioquímicas están disponibles para la evaluación de esterasas inespecíficas, oxidasas de función mixta, glutatión S-transferasas y acetilcolinesterasas inhibidas, las cuales pueden ser detectadas en un mismo individuo. Aunque las pruebas están inicialmente diseñadas para realizarse en condiciones de laboratorio, pueden estandarizarse bajo condiciones de campo directamente en las áreas de vigilancia.

Actualmente se dispone de estudios comparativos de la estructura y función de los genomas totales de *An. gambiae* y *D. melanogaster* (Ranson *et al.* 2000b). Estos análisis permitirán descubrir nuevas moléculas hormonales, neuronales y reguladoras que puedan utilizarse como blancos para el desarrollo de nuevas clases de insecticidas; Igualmente, los avances recientes en genómica funcional permitirán determinar los cambios moleculares precisos que resulten en fenotipos de resistencia, contribuyendo así al manejo

de la resistencia en las poblaciones de campo (Hemingway *et al.* 2002).

Para el manejo de la resistencia se están desarrollando numerosas herramientas, desde nuevos insecticidas químicos hasta mosquitos transgénicos. Se han considerado también distintas estrategias, entre ellas el uso de mezclas de insecticidas con diferentes modos de acción (Corbel *et al.* 2002), las cuales deben producirse industrialmente. Entre las estrategias más comunes se encuentran la aplicación de insecticidas en mosaico y rotaciones. La aplicación en mosaico consiste en dividir el área a tratar en zonas, seleccionar dos insecticidas de resistencia no cruzada y aplicar en cada zona uno de éstos (Ej., alternando piretroides y organofosforados). En la estrategia de rotación se aplica un insecticida en un ciclo y otro, que no sea de resistencia cruzada, en el ciclo siguiente. (Por Ej., piretroides – organofosforados /carbamatos) (Penilla *et al.* 1998).

Se han desarrollado modelos matemáticos y simulaciones *in vitro* de la evolución de los genes de resistencia asociados a diferentes patrones de usos de los insecticidas (Tabashnik 1990), pero estos modelos no han sido aplicados en estudios de campo dada la dificultad práctica de estimar correctamente los cambios en las frecuencias de los genes de resistencia en los programas de control químico aplicados en gran escala (Penilla *et al.* 1998; Hemingway y Ranson 2000).

### Conclusiones

Todos los insecticidas químicos ejercen, en mayor o menor extensión, presiones selectivas sobre las poblaciones de insectos que intentan controlar; por lo cual, en un tiempo las poblaciones resistentes comienzan a emerger. El tiempo necesario para el desarrollo de resistencia depende de numerosos factores incluyendo la frecuencia y naturaleza de los genes de resistencia, las estrategias para su manejo, las dosis y frecuencias de aplicación de los insecticidas y la eficacia biológica de las poblaciones resistentes en relación con las susceptibles. Mientras no haya alternativas efectivas al uso del control químico, éste debe enmarcarse en programas de control integrado, adaptándose a las condiciones locales con énfasis en la rotación de insecticidas a fin de prevenir, retardar o revertir el desarrollo futuro de resistencia en las poblaciones de insectos vectores. Es indispensable en los programas de control de las enfermedades transmitidas por vectores el uso de mé-

todos que vigilen las frecuencias de resistencia y el efecto de las estrategias de control. Todas las decisiones sobre el uso de insecticidas deben tomarse considerando los componentes del manejo de la resistencia y el impacto mínimo sobre los humanos, los organismos no blanco y el ambiente.

### Literatura citada

- BEALL, C.; FYRBERG, C.; SONG, S.; FYRBERG, E. 1992. Isolation of a *Drosophila* gene encoding glutathione S-transferase. *Biochemical Genetics* 30: 515-527.
- BERGE, J. B.; FEYEREISEN, R.; AMICHOT, M. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 353: 1701-1705.
- BERMÚDEZ, I.; HAWKINS, C. A.; TAYLOR, A. M.; BEADLE, D. J. 1991. Actions of insecticides on the insect GABA receptor complex. *Journal of Receptor Research* 11: 221-232.
- BERTICAT, C.; BOQUIEN, G.; RAYMOND, M.; CHEVILLON, C. 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical Research* 79: 41-47.
- BRANDT, A.; SHART, M.; PEDRA, J. H. F.; HOLMES, G.; DEAN, A.; KREITMAN, M.; PITTENDRIGH, B. R. 2002. Differential expression and induction of two *Drosophila* cytochrome P450 genes near the *Rst(2)DDt* locus. *Insect Molecular Biology* 11: 337-341.
- BRENGUES, C.; HAWKES, N. J.; CHANDRE, F.; MCCARROLL, L.; DUCHON, S.; GUILLET, P.; MANGUIN, S.; MORGAN, J. C.; HEMINGWAY, J. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology* 17: 87-94.
- BROGDON, W. G. 1984. Mosquito protein microassay. I. Protein determinations from small portions of single-mosquito homogenates. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry* 79: 457-9.
- BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. 1998a. Insecticide Resistance and Vector Control. *Emerging Infectious Diseases* 4: 605-613.
- BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. 1998b. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association* 14: 159-164.
- BROOKE, B. D.; KLOKE, G.; HUNT, R. H.; KOEKEMOER, L. L.; TEMU, E. A.; TAYLOR, M. E.; SMALL, G.; HEMMINGWAY, J.; COETZEE, M. 2001. Bioassay and biochemical analysis of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research* 91: 265-272.
- BROWN, A. W. A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *Journal of the American Mosquito Control Association* 2: 123-140.
- CALZI, M.; RAVILO, C.; GHIBAUNDI, E.; DE GIOIA, L.; SALMONA, M.; CAZZANIGA, G.; KUROSAKI, M.; TERAQ, M.; GARATTINI, E. 1995. Purification, cDNA cloning and tissue distribution of bovine liver aldehyde oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 31037-31045.
- CHANDRE, F.; DARRIER, F.; MANGA, L.; AKOGBETO, M.; FAYE, O.; MOUCHET, J.; GUILLET, P. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bulletin of the World Health Organization* 77(3): 230-234.
- CLARK, A. G.; SHAMAAN, N. A. 1984. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the housefly is a glutathione S-transferase. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 22: 249-261.
- COLEMAN, M.; VONTAS, J. G.; HEMINGWAY, J. 2002. Molecular characterization of the amplified aldehyde oxidase from insecticide resistant *Culex quinquefasciatus*. *European Journal of Biochemistry* 269: 768-779.
- CORBEL, V.; DARRIET, F.; CHANDRE, F.; HOUGARD, J. M. 2002. Insecticide Mixtures for Mosquito Net Impregnation Against Malaria Vectors. *Parasite* 9: 255-259.
- CORBETT, J. R. 1974. *The Biochemical mode of action of pesticides*. Academic Press, London, UK. pp. 102-130.
- CURTIS, C. F. 1993. Workshop on bednets at the International Congress of Tropical Medicine. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*. 44: 65-68.
- CURTIS, C. F. 2002. Should the use of DDT be revived for malaria vector control? *Biomedica* 22: 455-61.
- CURTIS, C. F.; TOWNSON, H. 1998. Malaria: existing methods of vector control and molecular entomology. *British Medical Bulletin* 54: 311-325.
- CYGLER, M.; SCHRAG, J. D.; SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; SILMAN, I.; GENTRY, M. K. 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. *Protein Science* 2: 366-82.
- DABORN, P. J.; YEN, J. L.; BOGWITZ, M. R.; LEGOFF, G.; FEIL, E.; JEFFERS, S.; TIJET, N.; PERRY, T.; HECKEL, D.; BATTERMAN, P.; FEYEREISEN, R.; WILSON, T. G.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297: 2253-2256.
- DING, Y.; ORTELLI, F.; ROSSITER, L. C.; HEMINGWAY, J.; RANSON, H. 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *Genomics* 13: 4-35.
- DONG, K. 1997. A single amino acid change in the *para* sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides in German cockroaches. *Insect Molecular Biology* 27: 93-100.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H.; STEICHEN, J.; ROCHELAU, T. A.; ARONSTEIN, K.; ROUSH, R. T. 1993a. A single amino-acid substitution in a  $\gamma$ -aminobutyric acid subtype. A receptor locus associated with Cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 1957-1961.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H.; ROCHELAU, T. A.; STEICHEN, J. C.; CHALMERS, A. E. 1993b. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363: 449-451.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H.; PITTENDRIGH, B.; VAUGHAN, A.; ANTHONY, N. 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 353: 1685-1693.
- GAZAVE, E.; CHEVILLON, C.; LENORMAND, T.; MARQUINE, M.; RAYMOND, M. 2001. Dissecting the cost of insecticide resistance genes during the overwintering period of the mosquito *Culex pipiens*. *Heredity* 87: 441-448.
- GEORGHIOU, G. P. 1990. Overview of insecticide resistance. Pages 18-41. In: M. B. Green, H.M. LeBaron and W. K. Moberg (eds.). *Managing resistance to agrochemical from fundamental research to practical strategies*. American Chemical Society Series. 421, Washington. DC. 421 p.
- GUILLEMAUD, T.; MAKATE, N.; RAYMOND, M.; HIRST, B.; CALLAGHAN, A. 1997. Esterase gene amplification in *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology* 6: 319-327.
- HARGREAVES, K.; KOEKEMOER, L. L.; BROOKE, B. D.; HUNT, R. H.; MTHEMBU, J.; COHETES, M. 2000. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 181-189.

- HEMINGWAY, J.; BODDINGTON, R. G.; HARRIS, J.; DUNBAR, S. J. 1989. Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. *Bulletin of Entomological Research* 79: 123-130.
- HEMINGWAY, J.; HAWKES, N.; PRAPANTHADARA, L.; JAYAWARDENA, K. G. I.; RANSON, H. 1998. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 353: 1695-1699.
- HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. H. P. P. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 1-12.
- HEMINGWAY, J.; RANSON, H. 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annual Review of Entomology* 45: 371-391.
- HEMINGWAY, J.; COLEMAN, M.; PATON, M.; MCCARROLL, L.; VAUGHAN, A.; DESILVA, D. 2000. Aldehyde Oxidase is coamplified with the World's most common *Culex* mosquito insecticide resistance-associated esterases. *Insect Molecular Biology* 9: 93-99.
- HEMINGWAY, J.; FIELD, L.; VONTAS, J. 2002. An Overview of Insecticide Resistance. *Science* 298: 96-97.
- KARUNARATNE, S. H. P. P.; JAYAWARDENA, K. G. I.; HEMINGWAY, J.; KETTERMAN, A. J. 1993. Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *The Biochemical Journal* 294: 575-579.
- KARUNARATNE, S. H. P. P.; VAUGHAN, A.; PATON, M. G.; HEMINGWAY, J. 1998. Amplification of a serine esterase gene is involved in insecticide resistance in Sri Lankan *Culex tritaeniorhynchus*. *Insect Molecular Biology* 7: 307-315.
- KOSTAROPOULOS, I.; PAPADOPOULOS, A. I.; METAXAKIS, A.; BOUKOUVALA, E.; PAPADOPOULOU—MOURKIDOU, E. 2001. Glutathione S-transferase in the defense against pyrethroid insecticides. *Insect Molecular Biology* 31: 313-319.
- LENGELER, C.; CATTANI, J.; DE SAVIGNY, D. 1996. Net Gain: A New Method for preventing malaria deaths. International Development Research Center, Ottawa and World Health Organization, Geneva.
- LOUGHNEY, K.; KREBER, R.; GANETZKY, B. 1989. Molecular analysis of the *para* locus, sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell* 58: 1143-1154.
- MALCOLM, C. A.; BOURGUET, D.; ASCOLLILLO, A.; ROOKER, S. J.; GARVEY, C. F. 1998. A sex linked *Ace* gene, not linked to insensitivity acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology* 7: 107-20.
- MARTÍNEZ-TORRES, D.; CHANDRE, F.; WILLIAMSON, M. S.; DARRIET, F.; BERGE, J. B.; DEVONSHIRRE, A. L.; GUILLET, P.; PASTEUR, N.; PAURON, D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* 7: 179-184.
- MARTÍNEZ-TORRES, D.; FOSTER, S. P.; FIELD, L. M.; DEVONSHIRRE, A. L.; WILLIAMSON, M. S. 1999. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology* 8: 339-346.
- MILATOVIC, D.; MORETTO, A.; OSMAN, K. A.; LOTTI, M. 1997. Phenyl valerate esterases other than neuropathy target esterase and the promotion of organophosphate polyneuropathy. *Chemical Research in Toxicology* 10(9): 1045-1048.
- MUTERO, A.; PRALAVORIO, M.; BRIDE, J. M.; FOURNIER, D. 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 5922-5926.
- NAJERA, J. A.; ZAIM, M. 2002. Malaria Vector Control: Decision making criteria and procedures for judicious use of insecticides. WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES), World Health Organization, Geneva.
- NARANG, S.; SEAWRIGHT, J. A. 1983. Genetic mapping and characterization of an aldehyde oxidase of *Anopheles albimanus*. *Biochemical Genetics* 21: 653-660.
- ORTELLI, F.; ROSITER, L. C.; VONTAS, J.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide resistance locus, from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *The Biochemical Journal* 373: 957-963.
- PATIL, N. S.; LOLE, K. S.; DEOBAGKAR, D. N. 1996. Adaptive larval thermotolerance and induced cross-tolerance to propoxur insecticide in mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology* 10: 277-82.
- PATON, M. G.; KARUNARATNE, S. H. P. P.; GIAKOU MAKI, E.; ROBERTS, N.; HEMINGWAY, J. 2000. Quantitative analysis of gene amplification in insecticide resistant *Culex* mosquitoes. *The Biochemical Journal* 346: 17-24.
- PENILLA, R. P.; RODRÍGUEZ, A. D.; HEMINGWAY, J.; TORRES, J. L.; ARREDONDO-JIMÉNEZ, J. I.; RODRÍGUEZ, M. H. 1998. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in Mexico. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 217-233.
- PHILLIPS, R. S. 2001. Current status of malaria and potential for control. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 208-226.
- QUÍÑONES, M. L.; SUÁREZ, M. F.; FLEMING, G. A. 1987. Estado de la susceptibilidad al DDT de los principales vectores de malaria en Colombia y su implicación epidemiológica. *Biomedica* 7: 81-86.
- RANSON, H.; COLLINS, F. H.; HEMINGWAY, J. 1998. The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within *Anopheles gambiae* class I GST family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 14284-14289.
- RANSON, H.; JENSEN, B.; VULULE, J. M.; WANG, X.; HEMINGWAY, J.; COLLINS, F. H. 2000a. Identification of a novel mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Anopheles gambiae* associated with resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Molecular Biology* 9: 491-497.
- RANSON, H.; JENSEN, B.; WANG, X.; PRAPANTHADARA, L.; HEMINGWAY, J.; COLLINS, F. H. 2000b. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 9: 499-507.
- RANSON, H.; ROSSITER, L.; ORTELLI, F.; JENSEN, B.; WANG, X.; ROTH, C. H.; COLLINS, F. H.; HEMINGWAY, J. 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *The Biochemical Journal* 359: 295-304.
- RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M. V.; UNGER, M. F.; COLLINS, F. H.; FEYEREISEN, R. 2002a. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298: 179-181.
- RANSON, H.; NIKOU, D.; HUTCHINSON, M.; WANG, X.; ROTH, C. W.; HEMINGWAY, J.; COLLINS, F. H. 2002b. Molecular analysis of multiple Cytochrome P450 genes from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 11(5): 409-418.

- RAYMOND, M.; CALLAGHAN, A.; FORT, P.; PASTEUR, N. 1991. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature* 14: 350: 151-3.
- RAYMOND, M.; CHEVILLON, C.; GUILEMAUD, T.; LENORMAND, T.; PASTEUR, N. 1998. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 353: 1707-1711.
- REISS, R. A.; JAMES, A. A. 1993. A glutathione S-transferase gene of the vector mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 2: 25-32.
- ROSE, R. L.; GOH, D.; THOMPSON, D. M.; VERMA, K. D.; HECKEL, D. G.; GAHAN, L. J.; ROE, R. M.; HODGSON, E. 1997. Cytochrome P450 CYP9A1. *Heliothis virescens*: the first member of a new CYP family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 605-615.
- SALINAS, A. E.; WONG, M. G. 1999. Glutathione S-transferases – a review. *Current Medicinal Chemistry* 6: 279-309.
- SCHULER, T. H.; MARTÍNEZ-TORRES, D.; THOMPSON, A. J.; DENHOLM, I.; DEVONSHIRE, A. L.; DUCE, I. R.; WILLIAMSON, M. S. 1998. Toxicological, electrophysiological, and molecular characterization of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 59: 169-182.
- SCOTT, J. G. 1999. Cytochromes P450 and Insecticide Resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 757-777.
- SCOTT, J. G.; WEN, Z. 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Management Science* 57: 958-967.
- SEVERINI, C.; ROMI, R.; MARINUCCI, M.; GUILEMAUD, T.; RAYMOND, M. 1997. Esterases A5-B5 in organophosphate-resistant *Culex pipiens* from Italy. *Medical and Veterinary Entomology* 11: 123-126.
- SHARF, M. E.; PARIMI, S.; MEINKE, L. J.; CHANDLER, L. D.; SIEGFRIED, B. D. 2001. Expression and induction of three family cytochrome P450 genes identified from insecticide-resistant and susceptible western corn rootworms. *Insect Molecular Biology* 10: 139-146.
- SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M.; DOWD, C. A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferase: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *The Biochemical Journal* 360: 1-16.
- SODERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R. 1989. Neurotoxic action of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Entomology* 34: 77-96.
- SUAREZ, M. F.; QUIÑONES, M. L.; PALACIOS, J. D.; CARRILLO, A. 1990. First Record of DDT Resistance in *Anopheles darlingi*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 6: 72-74.
- TABASHNIK, B.E. 1990. Implications of gene amplification for evolution and management of insecticide resistance. *Journal of Economic Entomology* 83: 1170-1176.
- THOMPSON, M.; SHOTKOSKI, F.; FFRENCH-CONSTANT, R.H. 1993. Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *FEBS Letters* (Netherlands). 325: 187-190.
- TIJET, N.; HELVIG, C.; FEYEREISEN, R. 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* 262: 189-198.
- TOUNG, Y-P. S.; HSIEH, T.; TU, C-P. D. 1993. The glutathione S-transferase D genes: a divergently organized, intronless gene family in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 9737-9746.
- TURNER, A.; DOYLE, W. A.; VENTOM, A. M.; BRAY, R. C. 1995. Properties of rabbit liver aldehyde oxidase and the relationship of the enzyme to Xanthine Oxidase and dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry* 232: 646-657.
- VAIS, H.; WILLIAMSON, M. S.; DEVONSHIRE, A. L.; USHERWOOD, P. N. R. 2001. The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. *Pest Management Science* 57: 877-888.
- VATANDOOST, H.; MCCAFFERY, A. R.; TOWNSON, H. 1996. An electrophysiological investigation of target site insensitivity mechanisms in permethrin-resistant and susceptibility strains of *Anopheles stephensi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90: 216.
- VAUGHAN, A.; HAWKES, N.; HEMINGWAY, J. 1997. Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide resistance *Culex quinquefasciatus*. *The Biochemical Journal* 325: 359-365.
- VAUGHAN, A.; CHADEE, D. D.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. 1998. Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitos from Trinidad. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 318-321.
- VONTAS, J. G.; SMALL, G. J.; HEMINGWAY, J. 2001. Glutathione S-transferase as antioxidant defense agents confers pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *The Biochemical Journal* 357: 365-372.
- VONTAS, J. G.; HEJAZI, M. J.; HAWKES, N. J.; COSMIDIS, N.; LOUKAS, M.; HEMINGWAY, J. 2002. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology* 11: 329-336.
- WALSH, S. B.; DOLDEN, T. A.; MOORES, G. D.; KRISTENSEN, M.; LEWIS, T.; DEVONSHIRE, A. L.; WILLIAMSON, M. S. 2001. Identification and characterization of mutations in house fly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *The Biochemical Journal* 359: 175-181.
- WHO. 1975. Manual on Practical Entomology in Malaria. Part II. Methods and Techniques. World Health Organization, Geneva.
- WHO. 1981. Resistance of vectors and reservoirs of disease to pesticides. WHO Technical Report Series No 737, 87 pp. World Health Organization, Geneva.
- WHO. 1992. Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control. WHO Technical Report Series No 818, 55 pp World Health Organization, Geneva.
- WILLIAMSON, M. S.; DENHOLM, I.; BELL, C. A.; DEVONSHIRE, A. L. 1993. Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). *Molecular and General Genetics* 240: 17-22.
- WILLIAMSON, M. S.; MARTÍNEZ-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 pyrethroids insecticides. *Molecular and General Genetics* 252:51-60.
- ZHOU, Z. H.; SYVANEN, M. 1997. A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*. *Molecular and General Genetics* 256: 187-194.









