

FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN “KDR” ILE1,016 EN *AEDES AEGYPTI* (DIPTERA: CULICIDAE) DE GÓMEZ PALACIO, DURANGO.

FREQUENCY OF “KDR” MUTATION ILE1,016 IN *AEDES AEGYPTI* (DIPTERA: CULICIDAE) FROM GOMEZ PALACIO, DURANGO.

José Luis García Hernández¹, Aldo Iván Ortega Morales², Verónica Ávila Rodríguez³, Jorge Sáenz Mata³, Quetzaly Karmy Siller Rodríguez^{3*}

*Autor de correspondencia: qksr@hotmail.com

¹Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango, Carretera Tlahualilo s/n, Venecia Dgo. México.

²Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, Torreón Coah., CP 27084, México.

³Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Universidad s/n, Fracc. Filadelfia C.P. 35070, Gómez Palacio Dgo. México.

RECIBIDO: 23/08/2017 RESUMEN

ACEPTADO: 04/12/2017

PALABRAS CLAVE:

kdr
frecuencia alélica
Mutación *Ile1*,
016,
resistencia,
Aedes aegypti.

KEYWORDS:

kdr,
allelic frequency,
Ile1,
016 mutation,
resistance,
Aedes aegypti.

La mutación *kdr Ile1,016* fue descubierta en el 2007 en una cepa de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) resistente a permetrina proveniente de Isla Mujeres, Quintana Roo, México. Estudios posteriores revelaron alta asociación entre esta mutación y la resistencia a permetrina así como el aumento de la frecuencia de la mutación *Ile1,016* en México a través de los años. Sin embargo, existen muchas zonas en México donde no se han realizado estudios que indiquen la presencia de esta mutación. Para contribuir en el conocimiento sobre la frecuencia de la mutación *kdr Ile1,016* en *Ae. aegypti* de Gómez Palacio, Durango, se realizaron colectas de huevecillos por medio de ovitrampas en dos colonias de la ciudad durante el año 2013. Los especímenes colectados fueron criados hasta el estado adulto. Se aisló ADN de 37 mosquitos y posteriormente se amplificó el gen que codifica el canal de sodio demostrando la presencia de la mutación *kdr Ile1,016* con una frecuencia alélica de 0.30.

ABSTRACT

The *Ile1,016 kdr* mutation was discovered during 2007 in a strain of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) resistant to permethrin, from Isla Mujeres, Quintana Roo, Mexico. Further studies revealed a high association between this mutation and the resistance to permethrin, as well as increasing frequency in Mexico over the years. However, there are many areas in Mexico where no studies indicating the presence of this mutation have been performed. To contribute to the knowledge of the *kdr Ile1,016* mutation frequency in *Ae. aegypti* from Gomez Palacio, Durango, collections of eggs were made during 2013, by means of ovitraps located within two neighborhoods from the city. The collected specimens were raised to adulthood. DNA was isolated from 37 mosquitoes and later, the gene encoding the sodium channel was amplified demonstrating the presence of the *kdr Ile1,016* mutation with an allele frequency of 0.30.

INTRODUCCIÓN

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) es el principal vector del virus del dengue, enfermedad conocida popularmente como fiebre quebrantahuesos y que se ha posicionado como la enfermedad viral en humanos más importante transmitida por mosquitos vectores (Guzman e Istúriz, 2010). La prevalencia del dengue se ha enfocado históricamente a las regiones tropicales

y subtropicales del mundo particularmente en bajas latitudes y en los últimos años *Ae. aegypti* ha logrado ampliar su distribución de forma que el dengue es ahora una amenaza seria para regiones templadas y altas (Parreira y Sousa, 2015). Las principales estrategias de prevención de esta enfermedad se orientan primordialmente en el control del mosquito vector tales como la eliminación de criaderos y la aplicación de insecticidas, siendo esta última la más aplicada

en temporadas donde las poblaciones de mosquitos aumenta así como en la aparición de brotes epidémicos de dengue y otras enfermedades asociadas al mosquito, sin embargo la resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti* se ha hecho presente como un problema global reportándose en muchas regiones como en el Sureste de Asia (Jirakanjanakit et al., 2007), y en América Latina (Flores et al., 2006; Rawlins et al., 1998; Rodríguez et al., 2005; Saavedra et al., 2007). Uno de los mecanismos de resistencia más estudiados es la alteración del sitio blanco, donde la molécula se asocia para ejercer su acción tóxica que generalmente ocurre a nivel del sistema nervioso (Brogdon y McAllister, 1998).

La membrana del canal de sodio de las neuronas es el sitio blanco de los piretroides y el DDT. Al momento que las moléculas de estos insecticidas se fijan al canal de sodio inhiben su cierre de manera que producen una transmisión continua del impulso nervioso, las consecuencias de esta transmisión continua son temblores y parálisis muscular en el insecto provocando un efecto de *knock-down* (Liu et al., 2004). Existe una mutación puntual en el gen que codifica a la membrana del canal de sodio (*para*) la cual que produce un cambio de un aminoácido que disminuye la asociación del insecticida en la membrana del canal (Knipple et al., 1994).

El canal de sodio está compuesto de cuatro dominios y cada dominio presenta 6 segmentos transmembranales, las mutaciones de resistencia *knock-down* llamadas “*kdr*” suelen ser localizadas en el dominio II segmento transmembranal 6 (S6II), este tipo de mutaciones se han identificado en diferentes insectos tanto de importancia médica como agrícola (Davies et al., 2007). Se han reportado cuatro mutaciones en S6II en *Ae. aegypti* (Bregues et al., 2003; Saaverda et al., 2007); una de ellas fue descubierta en cepas de mosquitos de Isla Mujeres Quintana Roo resistentes al piretroide permetrina, un cambio de valina por isoleucina en la posición 1,016 produce un cambio en la proteína del canal de sodio inhibiendo la asociación de la permetrina al canal, esto fue demostrado por Saavedra y colaboradores (2007) al realizar cruza con mosquitos homocigotos *Ile1,016* y homocigotos *Val1,016* (no mutados), la descendencia fue expuesta a 5 - 10 µg de permetrina en bioensayos de botellas, los resultados mostraron resistencia en 100% de los mosquitos homocigotos *Ile1,016*, 4.3 - 14% en heterocigotos (*Val1,016/Ile1,016*) y 0% en homocigotos *Val1,016* (Saaverda et al., 2007). Posteriormente colecciones de *Ae. aegypti* de México del año 1996 al 2008 fueron examinadas encontrándose que la frecuencia de la mutación *Ile1,016* presentó un incremento de 1% de 1996 al 2000, de 2% a 5% de 2003 a 2006 y 38.3% a 88.3% de 2002 al 2009 (Ponce et al., 2009), consecuentes investigaciones sobre cepas de *Ae. aegypti* de Acapulco, Guerrero colectadas en el año 2009 revelaron una fijación de la mutación *Ile1,106* (Siller et al., 2011).

La importancia de conocer las frecuencias de las mutaciones asociadas a resistencia de insecticidas en poblaciones de mosquitos ayuda a aplicar acciones adecuadas y eficientes con la finalidad de controlar la diseminación de mosquitos, sin embargo, a pesar de la relevancia de esto, en ningún municipio del estado de Durango se cuenta con reportes de mutaciones *kdr* en *Ae. aegypti*. Por consiguiente esta nota determina la frecuencia alélica de la mutación *Ile1,106* en muestras de *Ae. aegypti* de Gómez Palacio Durango.

METODOLOGÍA

La Jurisdicción Sanitaria N° 2 de Durango donó 20 papeletas con huevecillos colectados por medio de ovitrampas (una ovitrampa por domicilio) colocadas en el peridomicilio en el año 2013, 10 papeletas fueron de la Colonia Héctor Mayagoitia Domínguez y 10 del Centro de Gómez Palacio (Fig. 1), las papeletas fueron llevadas al Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UJED, donde se criaron hasta el estado adulto siguiendo las recomendaciones de la guía para la instalación y mantenimiento del insectario de *Ae. aegypti* del CENAPRECE (Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades). Se procesaron 37 mosquitos adultos de forma individual para la extracción de ADN mediante la técnica de extracción de sales (Black y DuTeau, 1997), el ADN de cada mosquito se resuspendió en 50 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) y se almacenó a -70°C. Una Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue realizada en cada mosquito para la amplificación del sistema *Val1,016Ile* utilizando 3 oligonucleótidos manufacturados por SIGMA®, en el caso de la amplificación del alelo Valina fue *Val1,016* (5'-[GCGGGCAGGGCGGGCGGGGGCGGGGCC] ACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG-3'), el de isoleucina *Ile1,016* (5'-[GCGGGC] ACAAATTG TTTCCCACCCGCACTGA-3) y el oligonucleótido de reversa 1016r 5'-GGATGAACCSAAATTGGACAAAAGC-3'. Las reacciones se realizaron en volúmenes de 15 µl con una concentración final de 1X de buffer 10X, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 0.04 u/µl de polimerasa, 0.5 µM de cada oligonucleótido y 100 ng de ADN. Las condiciones de desnaturalización, alineamiento y extensión fueron las siguientes: 95°C/5 min en el ciclo 1, 95°C/1 min, 60°C/1 min y 72 °C/1.15 min con 29 repeticiones en el ciclo 2 y 72°C/10 min en el ciclo 3.

Para la caracterización genotípica se realizó una electroforesis con gel agarosa al 3% donde fueron identificados 3 genotipos; homocigotos dominante (*Val1,016/Val1,016*) con una banda de 78 pb, homocigoto recesivo (*Ile1,016/Ile1,016*) con una banda de 98 pb y heterocigotos (*Val1,016/Ile1,016*) con las dos bandas respectivamente mencionadas, el marcador de peso molecular utilizado fue de 25 a 500 pb. Las frecuencias genotípicas y alélicas se calcularon según la fórmula de proporciones de Hardy-Weinberg $p^2 + 2pq + q^2 = (p +$

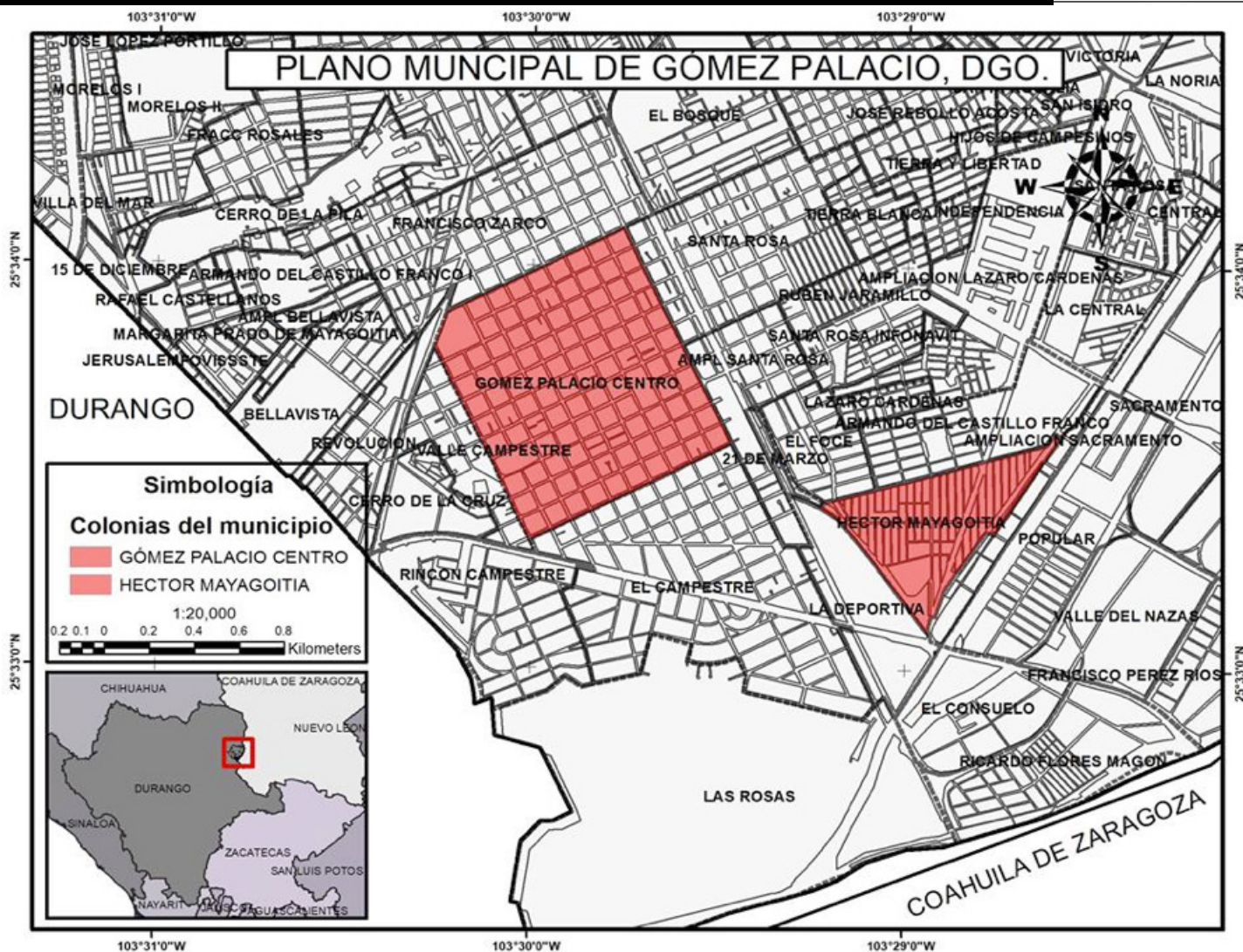


Figura. 1 Áreas de colecta de huevos de *Ae. aegypti* por medio de ovitrampas en el año 2013 correspondientes a la colonia Hektor Mayagoitia y Centro de Gómez Palacio.

$q^2 = 1$, donde p^2 representa el homocigoto dominante, $2pq$ el heterocigoto y q^2 el homocigoto recesivo.

RESULTADOS

En esta investigación se obtuvieron datos que mostraron la presencia de la mutación *Ile1,016* en *Ae. aegypti* colectados en Gómez Palacio, Durango, durante el año 2013, también se registró la presencia de los 3 genotipos referentes al sistema *Val1,016Ile*, la frecuencia genotípica fue la siguiente: homocigotos *Val1,016* de 0.594, homocigotos *Ile1,016* de 0.19 y heterocigotos de 0.216. La frecuencia alélica para *Val1,016* fue de 0.7 y la frecuencia de la mutación *Ile1,016* fue de 0.30.

DISCUSIÓN

La aparición de mosquitos resistentes a permetrina en *Ae. aegypti* en México se atribuye a que desde 1999 en este país los programas de control de vectores se enfocaron en la aplicación de insecticidas piretroides a base de permetrina para el control de mosquitos adultos, por establecimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-

032-SSA2-2002. Esto posiblemente provocó que las poblaciones de mosquitos con la mutación *Ile1,016* tuvieran mayor probabilidad de sobrevivir ante la presencia de este insecticida aumentando la frecuencia de la mutación con el paso del tiempo (Flores et al., 2006).

Estudios anteriores han demostrado variaciones en las frecuencias alélicas de la mutación *Ile1,016* en *Ae. aegypti* correspondientes a diferentes localidades de México. Estas frecuencias alélicas van desde 0.01 en cepas del estado de Nuevo León (Ciénega de Flores) hasta de 0.97 en cepas del estado Guerrero, donde la mutación presenta una fijación en los mosquitos de los municipios de Iguala y Acapulco, Guerrero, colectados en el 2009. En el caso de la cepa de mosquitos de Gómez Palacio, Durango colectada en el 2013, la frecuencia alélica es similar a dos cepas colectadas en el estado de Veracruz en el 2007 correspondientes a la cepa de la localidad Martínez de la Torre con una frecuencia alélica de 0.38 y la cepa del estado de Veracruz con una frecuencia alélica de 0.24 (Siller et al., 2011).

Las variaciones en las frecuencias de la mutación *Ile1,016* pueden ser el resultado de deriva génica, endogamia, flujo genético continuo, aumento o disminución de presión de selección por insecticidas piretroides y/o introducción de los alelos *Val1,016* e *Ile1,01*, debido al comercio de recipientes para uso doméstico con huevos de mosquitos adheridos (Ponce et al., 2009).

Debido a que se ha demostrado la variabilidad en tiempo y espacio de la frecuencia de la mutación *Ile1,016* en *Ae. aegypti* de México es indispensable el monitoreo constante de cepas de mosquitos del municipio de Gómez Palacio, ya que ayudará a conocer la fluctuación de las frecuencias genotípicas y alélicas. Cabe señalar que como consecuencia del incremento de casos de dengue en la Comarca Lagunera en los dos últimos años, las autoridades correspondientes en el área de salud pública han tomado como medidas primordiales el uso de insecticidas, entre ellos insecticidas piretroides aplicados en el área urbana de Gómez Palacio y sus alrededores, lo que podría favorecer la disminución de mosquitos homocigotos susceptibles (*Val1,016/Val1,016*) y un aumento en el número de mosquitos homocigotos resistentes (*Ile1,016/Ile1,016*), por lo tanto un aumento en la frecuencia del alelo que confiere resistencia.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Jurisdicción Sanitaria N°2 del Estado de Durango por facilitar el material biológico, especialmente al Biólogo Rafael Pérez.

LITERATURA CITADA

Black, W.C. y DuTeau, N.M. 1997. RAPDPCR 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. Chapman and Hall, New York, 361-373.

Bregues, C. N., Hawkes, J., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., Manguin, S., Morgan, J.C., y Hemingway, J. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. Med. Vet. Entomol.17: 87-94

Brogdon, W.G. y McAllister, J.C. 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in bottles. J. Am. Mosq. Control Assoc.14: 159-164.

Centro nacional de programas preventivos y control de enfermedades (CENAPRECE). Sitio web. Panorama Epidemiológico de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue, información publicada hasta la semana Epidemiológica 41, Actualizada el 14 de

octubre del 2013 [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2013/Pano_dengue_sem41_sem2013.pdf]

Davies, T.G., Field, L.M., Usherwood, P.N., y Williamson, M.S. 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. IUBMB Life, 59: 151- 162.

Flores, A.E., Grajales, J.S., Salas, I.F., García, G.P. y Becerra, M.H.L. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. J. Am. Mosq. Cont. Assoc. 22: 672-677

Guzman, A. y Istúriz, R.E. 2010. Update on the global spread of dengue. Int. J. Antimicrob. Agents. 36: S40-S42.

Jirakanjanakit N., Leemingsawat, S., Thongrunkiat, S., Apiwathnasorn, C., Singhaniyom, S., Bellec, C. y Dujardin, J. P. 2007. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. Tropical Medicine and International Health 12: 1354-1360.

Liu, H., Cupp, E.W. y Guo, A. N. 2004. Liu Insecticide Resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus* Journal of Medical Entomology, 41: 946-952

Knipple D. C., Doyle, K. E., Marsella-Herrick, P. A., y Soderlund, D. M. 1994 Tight genetic linkage between the *kdr* insecticide resistance trait and a voltage-sensitive sodium channel gene in the house fly. Proc. Natn. Acad. Sci. USA 91, 2483-2487.

NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. Sitio web oficial [<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/032ssa202.html>]

Organización Panamericana de la Salud/Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. 2000. Definiciones de caso: Dengue y Leptospirosis. Boletín Epidemiológico. 21(2).

Perreira, R., y Sousa, S.A. 2015. Dengue fever in Europe: Could there be an epidemic in the future? Expert. Rev. Anti-Infect. Ther. 13:29-40

Ponce, G.G., Flores, A.E., Fernández, I.S., Saavedra, K. R., Reyes, G.S., Lozano, F.S., Bond, G.J., Casas, M.M., Ramsey, J.M., García R.J., Domínguez, G.M., Ranson, Hemingway, H., J., Eisen, L. y Black IV, W.C. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. PLoS Negl Trop Dis. 3:531

Rawlins, S. C. 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. Pan Am. J. Public Health 4:243-251.

Rodríguez, M.M., Bisset, J.A., De Armas, Y. y Ramos, F. 2005. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *J Am Mosq Control Assoc.* 21:437–445

Saavedra, R.K., Urdaneta, M.L., Rajatileka, S., Moulton, M., Flores, A.E., Fernandez, S.I., Bisset, J., Rodríguez, M., McCall, P.J., Donnelly, M.J., Ranson, H., Hemingway, J., y Black, W.C.. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect. Mol. Biol.* 16: 785–798.

Siller, Q., Ponce, G., Lozano, S. y Flores, A.E. Update on the frequency of Ile1016 mutation in voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *J. Am Mosq. Control Assoc.* 2011 Dec; 27:357-62.