

Comportamiento frente a insecticidas organosintéticos en *Anopheles nuneztovari* Gabaldon 1940, de una zona malárica minera del Estado Bolívar, Venezuela.

Darjaniva Molina de Fernández¹,
Luisa Elena Figueroa Acosta¹,
Danny Bastidas¹,
Nieves Molina¹,
Víctor Sánchez¹,
William Anaya¹,
Claudia Domínguez² & Jorge Moreno².

¹ Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental, Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldón" Ministerio del Poder Popular para la Salud. Avenida Bermúdez Sur No 93, Maracay, edo. Aragua. Venezuela, darja2410@gmail.com

² Centro de Investigaciones de Campo Dr. Francesco Vitanza, Tumeremo, edo. Bolívar. Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldón" Ministerio del Poder Popular para la Salud, jorermo@gmail.com

RESUMEN

Anopheles nuneztovari Gabaldon 1940, es considerado el principal vector de malaria en la región andina, recientemente ha sido reportado en el estado Bolívar, donde se produce más de 60% de la malaria en Venezuela. Se propuso como objetivo estudiar el comportamiento de *An. nuneztovari* s.l. de Las Manacas, municipio Sifontes, en el estado Bolívar, frente a los cuatro grupos toxicológicos de insecticidas (organofosforados, organoclorados, carbamatos y piretroides) y determinar los posibles mecanismos de resistencia a insecticidas involucrados, por medio de pruebas biológicas en botellas, pruebas bioquímicas en microplacas y electroforesis. *Anopheles nuneztovari* s.l. resultó resistente a los insecticidas fenitrothion, pirimifosmetil y DDT, pero susceptible a propoxur, lambdacialotrina y deltametrina. Este fenómeno fue confirmado por pruebas bioquímicas observándose valores elevados de acetilcolinesterasa insensible (0,1083), al mismo tiempo que valores normales para la acetilcolinesterasa (0,1095), esterasas α (0,4930), esterasas β (0,5293) y oxidasas de función múltiple (0,1215). Estos resultados fueron comprobados en las electroforesis, observándose bandas bien definidas y fuertemente teñidas tanto de esterasas A4 como de B2, las cuales han sido reportadas como mecanismos de resistencia en vectores de enfermedades. Estos hallazgos contribuyen al planteamiento de nuevas estrategias para el buen uso y prolongación de la vida útil de los insecticidas.

Palabras clave: *Anopheles nuneztovari*; esterasas; oxidasas; resistencia a insecticidas; malaria; Venezuela.

BEHAVIOR TO ORGANOSYNTHETIC INSECTICIDES IN *ANOPHELES NUNEZTOVARI* GABALDON 1940 OF A MALARIOUS MINING ZONE FROM BOLIVAR STATE, VENEZUELA.

ABSTRACT

Anopheles nuneztovari Gabaldon 1940, is considered the main vector of malaria in the Andean region, has recently been reported in the Bolívar state, where more than 60% of malaria is produced in Venezuela. The objective was to study the behavior of *An. nuneztovari* s.l. of Las Manacas, municipality Sifontes, in the Bolívar state, in front of the four toxicological groups of insecticides (organophosphorus, organochlorine, carbamates and pyrethroids) and to deter-

mine the possible mechanisms of resistance to insecticides involved, by means of biological tests in bottles, biochemical tests in microplates and electrophoresis. *Anopheles nuneztovari* s.l. It was resistant to insecticides fenitrothion, pirimiphosmethyl and DDT, but susceptible to propoxur, lambda-cyhalothrin and deltamethrin. This phenomenon was confirmed by biochemical tests observing high values of insensitive acetylcholinesterase (0.1083), at the same time as normal values for acetylcholinesterase (0.1095), esterases α (0.4930), esterases β (0.5293) and multiple function oxidases (0.1215). These results were checked in the electrophoresis, observing well defined and strongly stained bands of both A4 and B2 esterases, which have been reported as resistance mechanisms in disease vectors. These findings contribute to the approach of new strategies for the good use and prolongation of the useful life of the insecticides.

Keywords: *Anopheles nuneztovari*; esterases; oxidases; insecticide resistance, malaria; Venezuela.

INTRODUCCIÓN

Anopheles nuneztovari Gabaldon 1940, se encuentra distribuida en sur América desde Venezuela hasta Brasil (Sinka *et al.*, 2012). Hasta 2004 se pensó que la especie estaba confinada a las regiones del oeste de Venezuela, asociada a la ecoregión de piedemonte andino, hallándosele ocasionalmente en los llanos y bosques interiores en tierras bajas (Osborn *et al.*, 2004; Rubio-Palis, 2000); sin embargo, Moreno *et al.*, (2004) la colectaron en tres localidades del municipio Sifontes en el estado Bolívar. Esta especie se encuentra en zonas con altitudes que van desde 200 hasta 1352 msnm, con precipitaciones y temperaturas medias anuales de 1000 a 4000 mm de lluvia y 25 a 28 °C (Sinka *et al.*, 2010); siendo considerado el principal vector de malaria por *Plasmodium vivax* en el occidente de Venezuela y norte de Colombia, así como de *P. falciparum* en Surinam durante las epidemias (Panday 1977). Fue encontrado por primera vez infectado en la naturaleza con *Plasmodium* spp. por Rey y Renjifo (1950). *Anopheles nuneztovari* s.l. ha sido encontrada naturalmente infectada con *Plasmodium* en Brasil (Arruda *et al.*, 1986; Póvoa, 1993; Tadei *et al.*, 1998), Colombia (Brochero, *et al.*, 2007) y Perú (Hayes *et al.*, 1987); mientras que en Venezuela la infección ha sido reportada por Pintos y Sabril (1965), Pintos *et al.*, (1968) y Rubio-Palis *et al.*, (1992), siendo el último reporte el de Abou Orm *et al.* (2017)

en el municipio Sifontes del estado Bolívar. Gabaldón y Guerrero (1959) observaron que en algunas áreas donde *An. nuneztovari* estaba transmitiendo malaria los índices esplénicos eran cercanos a 100%. Hamon *et al.*, (1970) también señalaron que la importancia de este vector dependía de la densidad de vegetación en los alrededores de las casas, reduciéndose la densidad del vector cuando la vegetación peridoméstica se eliminaba. Esta especie es antropofílica y las hembras abandonan las casas poco después de alimentarse de sangre, por consiguiente, al no reposar sobre las paredes evitan ponerse en contacto con dosis letales de insecticidas. Gabaldón (1972) consideraba que esta intensa exofilia ha sido responsable en gran medida de la malaria "refractaria" en Venezuela.

Para 2017 La Incidencia Parasitaria Anual (IPA) del país fue de 21,7 por cada 1.000 habitantes (MPPS, 2017). El control exitoso de la malaria se basa en la integración de las medidas de educación sanitaria hacia la comunidad, orientadas a crear conciencia sobre la protección individual y aquellas medidas llevadas a cabo por los Programas de control, dirigidas a actuar sobre los vectores y sobre el parásito. Sin embargo, las estrategias de control en malaria, no pueden ser estáticas, en virtud de las capacidades adaptativas de los parásitos a los medicamentos y los vectores a los insecticidas (Wide, *et al.*, 2011). El control mediante rociamiento residual intradomiliario y el uso de mosquiteros insecticidas de larga duración, seguirá siendo fundamental, desafortunadamente, debido a la presión, los mosquitos siguen desarrollando resistencia a los insecticidas. Se ha identificado resistencia a insecticidas en los anofelinos vectores de malaria en 64 países con transmisión activa de la enfermedad, afectando todas las regiones del mundo, detectándose en algunas áreas, resistencia a las cuatro clases de insecticidas utilizados en salud pública para el control de vectores (IRAC, 2011). La comunidad mundial para el control de la malaria ha tomado en serio esta amenaza, el Plan Mundial para el Manejo de la Resistencia a Insecticidas en los vectores de malaria (GPIRM, por sus siglas en inglés) advierte sobre la necesidad de actuar antes que este

problema ponga en peligro las estrategias actuales de control de vectores (OMS, 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y muestra

La población objeto de estudio fue *An. nuneztovari* s.l. de la localidad de Las Manacas (6° 12' 24" N; 61° 22' 40" O; fig. 1) ubicada en la parroquia San Isidro del municipio Sifontes en el estado Bolívar.

La muestra estuvo constituida por mosquitos hembras adultas de esta especie colectadas entre las 18:00 y 20:00 horas, reposando sobre vaqueras y paredes de las viviendas a una frecuencia de dos veces por semana de septiembre a diciembre de 2017. No se contó con una cepa patrón susceptible a insecticidas, de la especie.

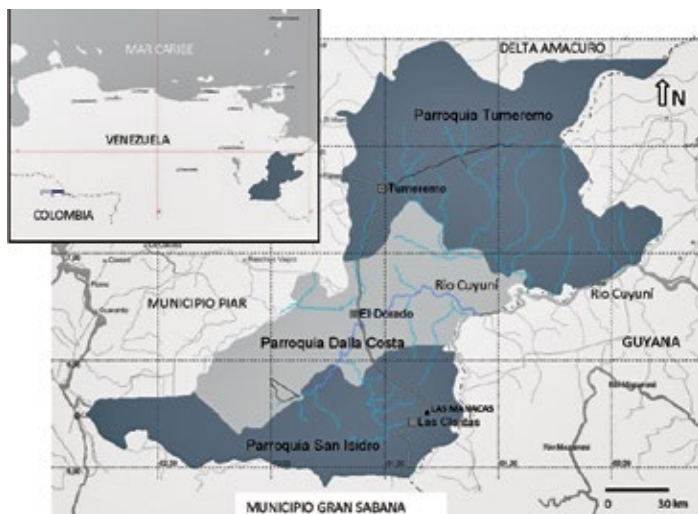


Figura 1

Ubicación geográfica de la localidad de Las Manacas, Parroquia San Isidro, Municipio Sifontes, edo. Bolívar, Venezuela.

Insecticidas

Se evaluaron el organoclorado DDT (98%), los organofosforados fenitrothion (95%) y pirimifosmetil (89,08%); los piretroides lambdacialotrina (70%) y deltametrina (70%) y el carbamato propoxur (99,3%), los insecticidas grado técnico sin valor comercial que fueron suministrados por Insecticidas Internacionales Compañía Anónima INICA.

Pruebas biológicas

Los bioensayos se realizaron siguiendo el método de las botellas del CDC (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA). Los mosquitos adultos hembras colectados fueron expuestos a botellas de vidrio tipo Wheaton de 250 ml, tratadas con soluciones cetónicas de insecticidas, las cuales fueron usadas como cámaras de prueba para detectar la resistencia a los insecticidas en mosquitos adultos, para los ensayos se emplearon las dosis recomendadas por la OMS (2016) que señala la dosis diagnóstica como la menor de la dosis que mata el mayor porcentaje de los insectos expuestos. Las botellas controles del experimento solo fueron tratadas con acetona. Los ensayos se realizaron a temperaturas aproximadas de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ y humedad relativa de $75\% \pm 5$. Se expusieron aproximadamente 10 mosquitos adultos (♀) por botella y se evaluaron cuatro repeticiones por cada concentración de insecticida y dos repeticiones como grupo control. Los ensayos fueron replicados tres veces en días distintos, durante el tiempo que se lograba el 100% de mortalidad. De esta manera se determinó el efecto del insecticida en función del tiempo de exposición, Con esta misma metodología se procedió para los bioensayos con los sinergistas.

Pruebas bioquímicas

Cada mosquito fue homogeneizado en 50 µl de amortiguador fosfato y diluido a 0.5 ml del mismo amortiguador. Se tomaron alícuotas de 50 µl de cada muestra y se colocaron en placas para microtitulación de 96 pocillos. Se evaluaron seis diferentes enzimas que confieren resistencia a insecticidas; esterasas α y β , multifunción oxidasa (MFO), glutatión-S-transferasa (GST), acetilcolinesterasa (AChE) y acetilcolinesterasa insensible (AChEi). Los substratos utilizados en cada ensayo incluyen α y β -naftil acetato para las esterasas no específicas, el TMBZ (3,3',5,5'-Tetrametil Benzidina) para las oxidasas (hemo peróxidasa) y el yoduro de acetilcolina usado para medir la actividad de la acetilcolinesterasa normal, para la acetilcolinesterasa insensible se añadió el insecticida carbamato propoxur a la muestra. La absorbancia fue medida en un lector de

ELISA, Multiskan Plus de Fisher Scientific, empleando filtros de 405 nm para AChe y AChe_i, mientras que para las esterasas y oxidasas se empleó filtro de 620 nm (Hemingway y Brogdon, 1998).

Identificación de esterasas por electroforesis.

Seguendo el procedimiento descrito por García-Segua, se prepararon las muestras en una proporción de 1:1; 10 µl de homogenato con 10 µl de amortiguador de carga para un total de 20 µl. Luego se preparó el gel tampón colocándolo en la placa y se esperó la polimerización del mismo. Seguidamente se preparó el gel de corrida, añadiéndolo a la placa nuevamente, colocando el peine separador. Una vez ocurrida la polimerización se retiró el peine, y el gel del soporte. Se llenó la cámara con amortiguador de corrida, luego se colocó el gel dentro y las muestras en cada pocillo correspondiente. La corrida se realizó a 150 voltios aproximadamente 1 hora u 1 hora y 20 minutos. Pasado el tiempo se sacó el gel y se colocó en un recipiente contentivo de 50 ml de substrato, se incubó por 20 minutos para luego añadir el colorante Fast Blue por 5 minutos, enjuagar y sumergirlo en solución fijadora 50 ml por 20 minutos; después se procedió a secar a 80°C por 1 hora y 45 minutos, por último se retiró el gel y se cuantificaron las bandas.

Análisis de los resultados

Los datos obtenidos con las **pruebas biológicas** fueron sometidos a un análisis de regresión y correlación lineal probit, donde se determinaron los tiempos letales 50 y 98 (TL₅₀ y TL₉₈), así como la pendiente de la recta y el X₂ y graficados en el programa Excel, empleando una curva sigmoidal de porcentaje de mortalidad versus tiempo en minutos. Los resultados obtenidos en las **pruebas bioquímicas** de la acetilcolinesterasa, acetilcolinesterasa insensible, esterasas elevadas y multifunción oxidasa, fueron analizados en función de los valores de absorbancias según el siguiente criterio: valores de absorbancia por encima de 0,3; 0,02; 0,8 y 0,5 respectivamente, son considerados como evidencia de presencia del mecanismo en concordancia con los resultados de los bioensayos con insecticidas. Para **Identificación**

de esterasas por electroforesis, se determinó la razón de movilidad (R_f = distancia de migración de la banda/ distancia de migración del indicador xilencianol) y se buscó identificar las esterasas A4 (R_f = 0,7) y B2 (R_f = 0,2), que han sido reportadas como mecanismo de resistencia en otras especies de importancia médica (Georghiou y Pasteur, 1978).

RESULTADOS

Se determinó el efecto del insecticida en función del tiempo de exposición en comparación al umbral de resistencia categorizando los mosquitos como resistentes o susceptibles. En el tratamiento control no se encontró mortalidad por lo que no fue necesario corregir. La relación tiempo (dosis) mortalidad de los especímenes de *An. nuneztovari s.l.* de Las Manacas, expuestos al órgano clorado DDT y los organofosforados fenitrothion y pirimifosmetil, evidencian resistencia, mientras que los expuestos al insecticida piretroide deltametrina y al carbamato propoxur resultaron susceptibles (tabla I, figura 2), por cuanto 100 % de los individuos expuestos murieron entre 15 y 20 minutos, con relación al umbral referencial para la especie de 30 minutos, determinado por Fonseca-González et al (2010). Adicionalmente, se observó sinergismo del butóxido de piperonilo con el pirimifosmetil (figura 3), más no con la deltametrina (figura 4). Este fenómeno fue confirmado por las pruebas bioquímicas donde se observaron valores elevados en absorbancia de acetilcolinesterasa insensible (0,1083), pero valores normales en acetilcolinesterasa (0,1095), esterasas alfa (0,4930), esterasas beta (0,5293) y oxidasas de función múltiple (0,1215) (tabla II). Asimismo, esto fue comprobado en las electroforesis, en las cuales se pudo observar bandas bien definidas y fuertemente teñidas tanto de esterasas A4 (figura 5), como de B2 (Figura 6), que también sugieren mecanismos de resistencia basados en estas enzimas.

Insecticidas	Dosis ¹	TL ₅₀ ²	IC ³	TL ₉₈ ⁴	IC ⁵	b±DS ₆	X ²
Pirimifos metil	20	46.4	42.8-50.1	70.5	64.4-80.6	0.8+/-0.01	10
Fenitroton	50	46	43.6-48.4	71.4	67-77.5	0.8+/-0.007	25
Delta metrina	12.5	10	9.5-10.5	14.5	13.5-16	0.5+/-0.05	2.4
Lambda cialotrina	12.5	10.3	9.7-10.8	15	14-16.5	0.4+/-0.04	1.1
DDT	100	-	-	65.3	60-72.6	9.7+/-0.8	12.9
Propoxur	10	8.8	8.1-9.3	12.4	11.5-13.9	0.6+/-0.08	1.4

Tabla I

Tiempos letales para seis insecticidas (µg/ml) en adultos de *Anopheles nuneztovari* s.l. de Las Manacas, municipio Sifontes, estado Bolívar.

1= µg/ml, 2= Tiempo letal 50 (minutos), 3= Intervalo de confianza a 95% (minutos), 4= Tiempo letal 98 (minutos), 5= Intervalo de confianza a 95% (minutos) y 6= Pendiente de la Línea de regresión +desviación estándar.

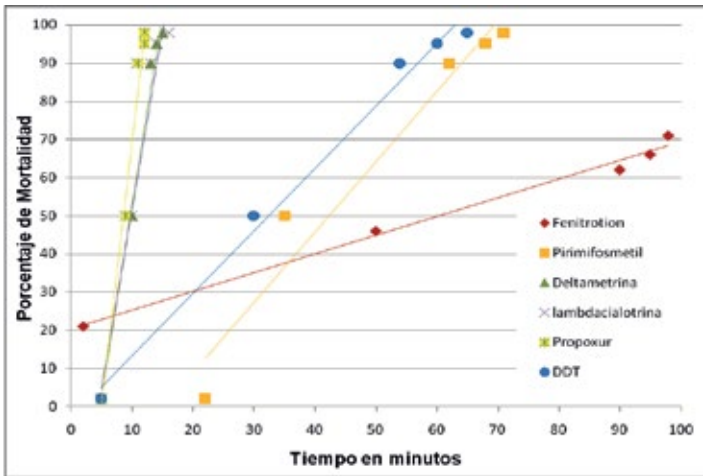


Figura 2

Tendencia de los datos tiempo-mortalidad en adultos de *Anopheles nuneztovari* s.l. expuestos a seis insecticidas en Las Manacas, municipio Sifontes, estado Bolívar.

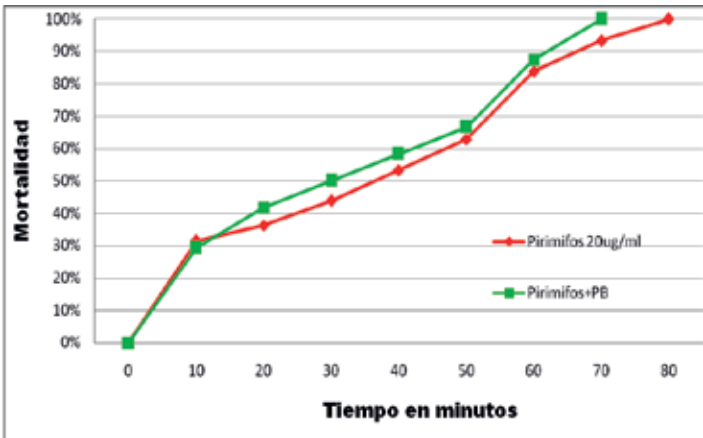


Figura 3

Tendencia de los datos tiempo-mortalidad en adultos de *Anopheles nuneztovari* s.l. expuestos a pirimifosmetil y butóxido de piperonilo, Las Manacas, municipio Sifontes, estado Bolívar.

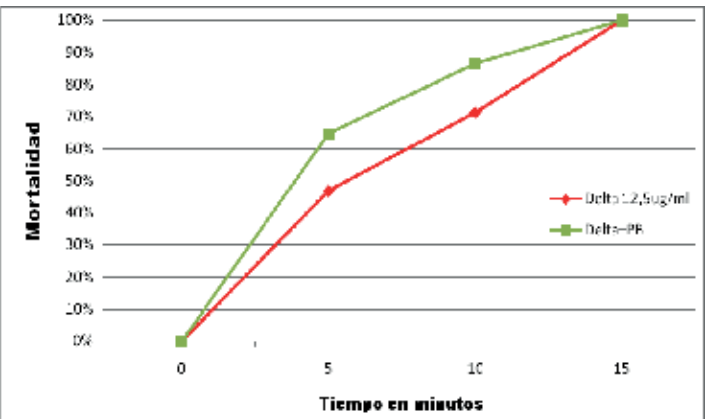


Figura 4

Tendencia de los datos tiempo-mortalidad en adultos de *Anopheles nuneztovari* s.l. expuestos a deltametrina y butóxido de piperonilo, Las Manacas, municipio Sifontes, estado Bolívar.

Estadística Descriptiva				
Mecanismo	Criterio de resistencia (absorban-cia)	Promedio	Desviación Standard	Resultado
Acetilco-linesterasa	0,3	0,1095	0,0263	normal
Acetilco-linesterasa				
Insensible	0,02	0,1083	0,0252	elevada
Esterasas alfa	0,8	0,4930	0,0922	normal
Esterasas beta	0,8	0,5293	0,0833	normal
Oxidasa	0,5	0,1215	0,0272	normal

Tabla II

Mecanismos de resistencia determinados en adultos hembras de *Anopheles nuneztovari* s.l., Las Manacas, municipio Sifontes, estado Bolívar.

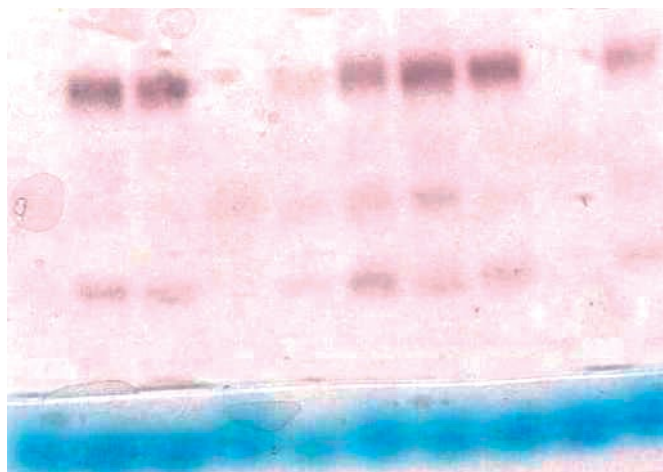


Figura 5

Patrones electroforéticos de esterasas alfa en adultos hembras de *Anopheles nuneztovari s.l.* de Las Manacas, municipio Sifontes, estado Bolívar.

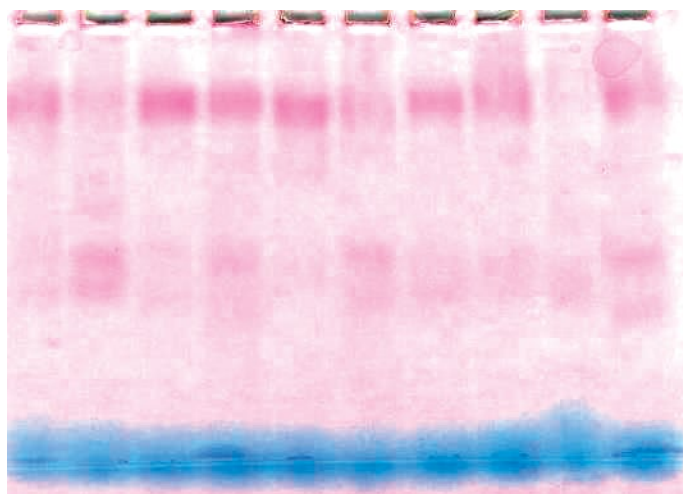


Figura 6

Patrones electroforéticos de esterasas beta en adultos hembras de *Anopheles nuneztovari s.l.* de Las Manacas, municipio Sifontes, estado Bolívar.

(Figuras 5 y 6: No se pudo disponer de una mejor resolución de la imagen por parte de los autores)

DISCUSIÓN

Anopheles nuneztovari s.l. del estado Bolívar, se fue encontrado resistente al organoclorado DDT y a los organofosforados pirimifosmetil y fenitrothion, mientras que sigue respondiendo de manera favorable a los piretroides deltametrina y lambdacialotrina y al carbamato propoxur. La resistencia encontrada posiblemente esté siendo mediada por la acetilco-

linesterasa insensible y las esterasas A4 y B2 reveladas en la electroforesis. Existen reportes de especies de anofelinos en diferentes regiones del mundo, que todavía son susceptibles a los insecticidas piretroides, pero resistentes a los organofosforados por ejemplo en Venezuela, Figueroa Acosta *et al.* (2006) publicaron un estudio en *An. aquasalis* de Aragua en el cual se determinó su nivel de resistencia a lambdacialotrina y a pirimifosmetil, además se identificaron mecanismos de resistencia *in vivo* con los sinergistas Butóxido de Piperonilo (PB) y S, S, S, Tributilfosforotriotioato (DEF) e *in vitro* con el sustrato beta naftil acetato. Las enzimas de multifunción oxidasa (MFO) y las esterasas pudieran estar interviniendo en la resistencia encontrada a estos insecticidas.

También Molina de Fernández *et al.*, (2007) describen el nivel de resistencia a insecticidas organosintéticos en *albitarsis s.l.* (marajoara Galvão & Damasceno, 1942), en estudios realizados en zonas agrícolas de Calabozo, en el estado Guárico, donde hay brotes de malaria, esporádicos, con metodología combinada OMS y CDC, con la cual también se determinaron mecanismos de resistencia a insecticidas *in vivo* e *in vitro*. Las poblaciones adultas de *An. albitarsis s.l.* de esta zona mostraron resistencia cruzada entre DDT y piretroides, entre piretroides y a los organofosforados evaluados. En este caso, la resistencia a piretroides y organofosforados fue fuertemente reducida por el sinergista butóxido de piperonilo demostrando la presencia de multifunción oxidasa. Las pruebas bioquímicas indicaron aumento en el nivel de enzimas esterasas no específicas, y hubo evidencia de acetilcolinesterasa insensible. Estos resultados fueron discutidos en términos de resistencia múltiple a insecticidas, reportada por primera vez para esta especie y en la cual el uso de insecticidas se encuentra claramente comprometido con la aplicación de insecticidas en la agricultura, debido a que esta especie de importancia epidemiológica habita ecosistemas de arrozales. Del mismo modo, Fonseca-González *et al.*, 2009, a fin de establecer el estatus de susceptibilidad para *An. darlingi* de Colombia, condujeron ensayos bioquímicos en microplacas, encontrando niveles

elevados de enzimas, relacionados con la resistencia a insecticidas que incluyen MFO, NSE, GST y Achei. El metabolismo incrementado a través de MFO y NSE, pudiera estar envuelto en la resistencia cruzada a DDT y lambdacialotrina. Nuevamente, González *et al.*, (2009a), reportaron para *An. nuneztovari*, evidencia de algunos mecanismos de resistencia tales como OFM y Achei, que implica resistencia cruzada entre DDT y piretroides, también se reportó resistencia a fenitrotión. Esta resistencia encontrada a estos insecticidas, es debido a que son los más comúnmente usados por las autoridades de salud para el control de los vectores de malaria. Por último, Molina de Fernández y Figueroa Acosta (2009), señalan resistencia metabólica en *An. aquasalis* del municipio Libertador, Sucre. Se detectaron niveles elevados de esterasas alfa y beta, así como también la Acetilcolinesterasa alterada. Las enzimas oxidasas de función múltiple en las poblaciones de *An. aquasalis* de tres de las localidades evaluadas también resultaron alteradas, por lo que ambos sistemas enzimáticos pudieran estar intervinando en la expresión de resistencia a insecticidas organofosforados en las poblaciones de estudio. Por otro lado, la actividad enzimática de la Glutathion-S-transferasa solo está operando en Río de Agua, esto podría explicarse, por cuanto la zona ha sido sometida a fuerte presión con insecticidas organoclorados, en el pasado, específicamente el DDT, ejercida por los organismos de salud en esa zona para el control de la malaria.

REFERENCIAS

- ABOU ORM S., MORENO J., CARROZZA M., ACEVEDO P. y HERRERA F. (2017). Tasas de infección de *Plasmodium* spp. para algunos *Anopheles* spp. del municipio Sifontes, Estado Bolívar, Venezuela. *Boletín de malariología y Salud Ambiental*, 57(1):12-25.
- ARRUDA M., CARVALHO M., NUSSENZWEIG R., MARACIC M., FERREIRA W., COCHRANE A. (1986). Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35(5):873-881.
- BROCHERO H., LI C., Y WILKERSON R. (2007). A newly recognized species in the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albiparvus* complex (Diptera: Culicidae) from Puerto Carreño, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76(6):1113-7.
- FIGUEROA ACOSTA L. E., MARÍN ÁLVAREZ M., PÉREZ PINTO E., MOLINA DE FERNÁNDEZ D. (2006). Mecanismos de resistencia a insecticidas organosintéticos en una población de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) del estado Aragua. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 46(1): 39-47.
- FONSECA-GONZÁLEZ I., CÁRDENAS R., GÓMEZ W., SANTA-COLOMA L., BROCHERO H., OCAMPO C., SALAZAR M., MCALLISTER J., BROGDON W., QUIÑONES M. (2010). Dosis diagnósticas para vigilar la resistencia a insecticidas de los vectores de malaria en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 36 (1): 54-61.
- FONSECA-GONZÁLEZ I., QUIÑONES M., MCALLISTER J., BROGDON W. (2009). Mixed-function oxidases and esterases associated with cross-resistance between DDT and lambda-cyhalothrin in *Anopheles darlingi* Root 1926 populations from Colombia. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1): 18-26.
- FONSECA-GONZÁLEZ I., CÁRDENAS R., QUIÑONES M., MCALLISTER J., BROGDON W., (2009a). Pyretroid an organophosphate resistance in *Anopheles nuneztovari* (N.) Gabaldon populations from malaria endemic areas in Colombia. *Parasitology Research* 5:1399-1409.
- GABALDON A. (1972). Difficulties confronting malaria eradication. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 21:634-639.
- GABALDON A. Y GUERRERO L. (1959). An attempt to eradicate malaria by weekly administration of pyrimethamine in areas of out-of-doors transmission in Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 8:433-439.
- GARCIA-SEGUA J., GAVILANES J., MARTINEZ A., MONTERO F., OÑADERRA M., Y VIVANCO F. (2002). Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica. España: Síntesis, SA.
- GEORGHIOU G. Y PASTEUR N. (1978). Electrophoretic esterase patterns in insecticide-resistant and susceptible mosquitoes. *Journal of Economic Entomology* 71: 201-205.
- HAMON J., MOUCHET J., BRENGUES J. Y CHAUVET G. (1970). Problems facing anopheline vectors control. Vector ecology and behavior before, during and after application of control measures. *Entomol Soc Am Misc Publ* 7: 28-41.
- HAYES J., CALDERON G., FALCON R., ZAMBRANO V. (1987). Newly incriminated anopheline vectors of human malaria parasites in Junin department, Perú. *Journal of the American Mosquito Control Association* 3(3): 418-422.
- HEMINGWAY J. y BROGDON W. (1998). Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (IRAC). (2011). Prevention and management of insecticide resistance in vectors of public health importance [en línea]. Disponible en <http://www.irc-online.org>.
- MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD. (2017). Boletín epidemiológico semanal, año 66, semana epide-

- miológica N° 53. [en línea]. Disponible en: <http://www.mppps.gov.ve/ms/modulesphp> (Consulta: Enero, 19, 2018).
- MOLINA DE FERNÁNDEZ D. Y FIGUEROA ACOSTA LE. (2009). Resistencia metabólica a Insecticidas Organofosforados en *Anopheles aquasalis* Curry 1932, Municipio Libertador, estado Sucre, Venezuela. *Biomédica* 29(4): 604-615.
- MOLINA DE FERNÁNDEZ D., FIGUEROA ACOSTA LE Y PÉREZ E. (2007). Resistencia Múltiple a Insecticidas en *Anopheles marajoara* Galvao & Damasceno, 1942 en zonas agrícolas. *Salud & Desarrollo Social*, N° 3 Art. 3 pp. 21-31.
- MORENO, J., RUBIO-PALIS Y., SÁNCHEZ V. Y MARIANY D. (2004). Primer registro de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* Gabaldon, 1940 (Diptera: Culicidae) en el estado Bolívar, Venezuela y sus implicaciones eco-epidemiológicas. *Entomotropica* 19: 55-58.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (O.M.S). (2012). Plan Mundial para el Manejo de la Resistencia a Insecticidas en los vectores de malaria. [en línea]. Disponible en: <http://www.who.org/AD/DPC/CD/mal.htm> (Consulta: Enero, 08, 2018).
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (O.M.S). (2016). Programa mundial sobre el paludismo. Procedimientos de las pruebas para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos vectores del paludismo. Ginebra, Suiza.
- OSBORN F., RUBIO- PALIS Y., HERRERA M., FIGUERA A. Y MORENO J. (2004). Caracterización Ecoregional de los Vectores de Malaria en Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 44 (2): 77-92.
- PANDAY R. (1977). *Anopheles nuneztovari* and malaria transmission in Suriname. *Mosquito News* 37: 728-737.
- PINTOS P. Y SABRIL H. (1965). Infección natural de *Anopheles nuneztovari* en un brote de malaria en ausencia de insecticida. *Boletín Informativo de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental*, 4: 169-171. (2): 77-92.
- PINTOS P., SABRIL H. Y LÓPEZ V. (1965). Esporozoitos de *Anopheles* (N.) *nuneztovari* en área de malaria refractaria. *Boletín Informativo de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental*, 8: 169-171. (2): 375-381.
- POVOA M. (1993). Studies on malaria in Serra do Navio región, Amapá state, Brazil. PhD Thesis. University of London, 259 p.
- REY H., Y RENJIFO J. (1950). *Anopheles* (N.) *nuneztovari* infectado en la naturaleza con *Plasmodium*. *Academia Colombiana de Ciencias Exactas Fis-Quim y Nat. Rev.* 7: 534-537.
- RUBIO PALIS Y., WIRTZ R., CURTIS C. (1992). Malaria entomological inoculation rates in western Venezuela. *Acta Tropica* 52_: 167-174.
- RUBIO-PALIS, Y. (2000). *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) de Venezuela, taxonomía, bionomía, ecología e importancia médica. Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental "Dr. Arnoldo Gabaldón" y el proyecto control de enfermedades endémicas. Maracay, edo. Aragua, Venezuela.
- SINKA M., BANGS M., MANGUIN S., RUBIO-PALIS Y., CHAREONVIRIYAPHAP, Y., COETZEE, M., MBOGO C., HEMINGWAY J., PATIL A., TEMPERLEY W., GETHING P., KABARIA C., BURKOT T., HARBACH R. Y HAY S. (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors* 5:69.
- SINKA M., RUBIO-PALIS Y., MANGUIN S., PATIL A., TEMPERLEY W., GETHING P., VAN BOECKE P., KABARIA C., HARBACH R., HAY S. (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis *Parasites & Vectors* 3:72.
- TADEI W., DUTARY THATCHER B., SANTOS J., SCARPASSA V., RODRIGUES I., SILVA RAFAEL M. (1998). Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59(2):325-335.
- WIDE A.; CAPALDO J.; ZERPA N. Y PABÓN R. (2011). Fundamentos en el diagnóstico y control de la malaria. SAI-AE "Dr. Arnoldo Gabaldon". Maracay. Estado Aragua. Venezuela.