

IPK
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"PEDRO KOURÍ"

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN
***Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE).**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en
Ciencias de la Salud

Autor: Lic. María Magdalena Rodríguez Coto

Asesor: Dr. Juan A. Bisset Lazcano

Ciudad de La Habana

2008

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"PEDRO KOURÍ"**

Laboratorio de Toxicología y Genética

**ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS
EN
Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)**

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autor: Lic. María Magdalena Rodríguez Coto

Asesor: Dr. Juan A. Bisset Lazcano

Ciudad de La Habana

2008

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Dr. Juan A. Bisset Lazcano, por brindarme siempre su apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

A los técnicos por todo el esfuerzo y apoyo brindado en el laboratorio y en el mantenimiento de las colonias de *Aedes aegypti* en el insectario, entre ellos Lázaro Alaín Soca, Francisco Ramos, Ditter Fernández, así como también a la Dra. Omayda Pérez.

Al Dr. Sarracent y a la Dra. Suset Oropesa por su rigurosa revisión al trabajo y por sus sugerencias que contribuyeron a mejorar la calidad del mismo.

A la Dra. Nereida Cantelar, Subdirectora docente por su apoyo e incentivo o para la culminación de este trabajo.

A Maribel Chao, que ante cualquier duda, brindó su ayuda incondicional

A Zudilma Lamouro, Maureen Leyva y Jorge Sánchez, por su ayuda incondicional en la presentación del documento final.

Gracias a todo el colectivo del departamento de Control de Vectores, quienes siempre me han acompañado y apoyado y con quienes comparto gran parte de mi tiempo.

A Prof. Janet Hemingway, Directora del Instituto de Medicina Tropical de Liverpool, quien siempre nos ha apoyado en nuestras investigaciones.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis Padres,

A mi esposo y a mi Hijo

Y al IPK

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Introducción</i>	1
1.2. <i>Hipótesis</i>	5
1.3. <i>Objetivos</i>	5
1.3.1. <i>Objetivo General</i>	5
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i>	5
1.4. <i>Importancia práctica</i>	6
1.5. <i>Novedad científica</i>	6
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. <i>Resistencia a insecticidas</i>	7
2.1.1. <i>Resistencia a insecticidas</i>	7
2.1.2. <i>Resistencia cruzada y Resistencia múltiple</i>	7
2.1.3. <i>Evolución de la resistencia a insecticidas</i>	8
2.1.4. <i>Factores que influyen en la evolución de la resistencia</i>	9
2.1.5. <i>Insecticidas y sus sitios activos</i>	9
2.1.6. <i>Modo de acción de los insecticidas organofosforados y carbamatos</i>	10
2.2. <i>Mecanismos de resistencia a insecticidas</i>	11
2.2.1. <i>Comportamiento de la resistencia</i>	12
2.2.2. <i>Penetración reducida</i>	12
2.2.3. <i>Insensibilidad en el sitio de acción</i>	12
2.2.3.1. <i>Acetilcolinesterasa alterada</i>	13
2.2.3.2. <i>Receptores gaba (ácido amino butírico)</i>	15
2.2.3.3. <i>Alteraciones en los canales de sodio (Na⁺)</i>	16
2.2.4. <i>Resistencia metabólica</i>	16
2.2.4.1. <i>Esterasas inespecíficas</i>	16
2.2.4.2. <i>Glutathion transferasa (GSTs)</i>	19
2.2.4.3. <i>Citocromo P-450 monooxigenasas (P450)</i>	21
2.3. <i>Detección de la resistencia</i>	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. <i>Cepas de Aedes aegypti utilizadas para el trabajo</i>	24
3.2. <i>Bioensayos</i>	25
3.2.1. <i>Insecticidas utilizados</i>	25
3.2.2. <i>Bioensayos en larvas</i>	25
3.2.3. <i>Bioensayos en adultos</i>	26

3.3. Métodos para la detección de los mecanismos de resistencia.....	26
3.3.1. Esterasas inespecíficas.....	26
3.4.1.1. Adaptación del método de esterazas inespecíficas para <i>Aedes aegypti</i>	27
3.4.2. Glutathion transferasa.....	28
3.4.2.1. Adaptación del método de GST para <i>Aedes aegypti</i>	28
3.4.3. Acetilcolinesterasa modificada (AChE).....	29
3.5. Cálculo de la frecuencia de individuos resistentes.....	30
3.6. Determinación in vivo, a través del uso de sinergistas de los mecanismos de esterazas y monooxigenasas.....	31
3.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida para la caracterización de esterazas.....	31
3.8. Selección de cepas de referencia de <i>Aedes aegypti</i> resistentes a insecticidas... 33	33
3.8.1. Selección de una cepa de <i>Aedes aegypti</i> resistente a temefos.....	33
3.8.1.1. Metodología.....	33
3.8.1.2. Evolución de la resistencia a temefos durante el proceso de selección.....	34
3.8.1.3. Resistencia cruzada a otros insecticidas.....	34
3.8.1.4. Determinación de los mecanismos de resistencia in vivo, a través del uso de sinergistas.....	34
3.8.1.5. Variación de la frecuencia de los mecanismos de resistencia.....	34
3.8.1.6. Ensayos de inhibición de esterazas en gel de poliacrilamida.....	35
3.8.2. Selección de una cepa de <i>Aedes aegypti</i> resistente a deltametrina.....	35
3.8.2.1. Evolución de la resistencia a deltametrina.....	35
3.8.2.2. Resistencia cruzada a otros insecticidas.....	35
3.8.2.3. Determinación in vivo de los mecanismos, a través del uso de sinergistas.....	36
3.8.2.4. Variación de la frecuencia de los mecanismos de resistencia.....	36
3.8.2.5. Ensayos de inhibición de esterazas en gel de poliacrilamida.....	36
3.8.3. Selección de una cepa de <i>Aedes aegypti</i> resistente a propoxur.....	36
3.8.3.1. Evolución de la resistencia a propoxur durante el proceso de selección.....	37
3.8.3.2. Resistencia cruzada a otros insecticidas.....	37
3.8.3.3. Determinación in vivo de los mecanismos, a través del uso de sinergistas.....	37
3.8.3.4. Variación de la frecuencia e los mecanismos de resistencia.....	37
3.9. Determinación de la frecuencia de una mutación del gen <i>Kdr</i>.....	38
3.9.1. Purificación del ADN.....	38
3.9.2. Electroforesis del ADN extraído.....	38
3.9.3. PCR.....	39
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Estudio de resistencia en cepas de <i>Aedes aegypti</i> de Cuba y otros países de América Latina.....	41
4.1.1 Bioensayos de susceptibilidad y/o resistencia en larvas.....	41
4.1.2. Bioensayos de susceptibilidad y/o resistencia en adultos.....	44
4.2. Determinación de los mecanismos de resistencia utilizando sinergistas.....	46

4.3. Modificación de las técnicas bioquímicas.....	49
4.3.1 Esterasas.....	49
4.3.2 Glutation transferasa (GST).....	50
4.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida para esterases en cepas de <i>Aedes aegypti</i>.....	52
4.6. Selección de cepas de referencia resistentes a insecticidas.....	53
4.6.1.1. Evolución de la resistencia a temefos.....	54
4.6.1.2. Resistencia cruzada a insecticidas organofosforados	54
4.6.1.3. Resistencia cruzada a insecticidas piretroides	56
4.6.1.4. Variación de la frecuencia de los mecanismos de resistencia.....	57
4.6.1.5. Estudios con sinergistas	58
4.6.1.6. Detección de la actividad de esterases en gel de poliacrilamida	60
4.6.2. Selección de una cepa de <i>Aedes aegypti</i> resistente a malation.....	61
4.6.2.1. Evolución de la resistencia a malation	61
4.6.2.2. Resistencia cruzada a insecticidas organofosforados	63
4.6.2.3. Resistencia cruzada a piretroides	64
4.6.2.4. Variación de la frecuencia de los mecanismos de resistencia.....	67
4.6.3. Selección de una cepa de <i>Aedes aegypti</i> resistente a deltametrina.....	68
4.6.3.1. Evolución de la resistencia a deltametrina.....	68
4.6.3.2. Resistencia cruzada a insecticidas organofosforados	69
4.6.3.3. Resistencia cruzada a piretroides	69
4.6.3.4. Variación de la frecuencia de los mecanismos de resistencia.....	69
4.6.3.5. Estudios con sinergistas	72
4.6.3.7. Bioensayos de adultos.....	75
4.6.4. Selección de una cepa resistente al insecticida carbamato propoxur.....	75
4.6.4.1. Evolución de la resistencia a propoxur.....	75
4.6.4.2. Estudios con sinergistas para determinar <i>in vivo</i> los mecanismos de resistencia a propoxur.	76
4.6.4.3. Resistencia cruzada a insecticidas organofosforados	77
4.7. Frecuencia de una mutación posiblemente asociada al gen <i>Kdr</i> en las cepas resistentes a insecticidas.....	78
5. DISCUSIÓN.....	81
6. CONCLUSIONES.....	90
7. RECOMENDACIONES.....	91
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
8.1. Bibliografía del autor relacionada con el tema.....	107
8.2. Bibliografía del autor no relacionada con el tema.....	109
8.3. Presentación en eventos científicos.....	113
8.4. Resultados relevantes.....	114
9. ANEXOS.....	115

ABREVIATURAS

OF: Organofosforado

AchE: Acetilcolinesterasa

AchEr: Acetilcolinesterasa modificada o resistente

GST: Glutation transferasa

MO: Monooxigenasa

FR: Factor de Resistencia

FS: Factor de Sinergismo

CL₅₀: Concentración letal media (causa el 50 % de mortalidad)

CL₉₀: Concentración letal que causa el 90 % de mortalidad

SCT: Santiago de Cuba Techo

SC: Santiago de Cuba

D.O: Densidad óptica

Ac: Acetilcolina

OC: Organoclorados

GABA: Receptores Ácido ganma amino butírico.

Kdr: Knock down resistance

OMS: Organización Mundial de la Salud

TFF: Trifenil fosfato

PB: Piperonil butóxido

DEF: S, S, S trybutyl phosphorotrithioate

AE: Ácido etacrínico

FAO: Organización para la alimentación y la agricultura.

SÍNTESIS

Aedes aegypti, Linnaeus, es el principal vector en la transmisión de la fiebre amarilla y dengue en las Américas. El control del vector es hasta la fecha la única opción para prevenir o reducir la transmisión de esta enfermedad, pero la resistencia a los insecticidas ha dificultado el control de esta especie. En este trabajo se evaluó la resistencia a insecticidas en ocho cepas de *Aedes aegypti*, colectados en Cuba (Ciudad Habana y Santiago de Cuba), y en otros países de la región de las Américas (Jamaica, Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Perú y Venezuela). En larvas se evaluaron insecticidas organofosforados (OF) y en adultos, insecticidas piretroides, el OF clorpirifos y el organoclorado DDT. De los OF evaluados en larvas, al que se observó mayor resistencia fue a temefos, seguido de pirimifos metil y clorpirifos. Todas las cepas mostraron susceptibilidad a fenitrothion y malation y solo la cepa de C. Habana mostró alta resistencia a fenitrothion. En el estado adulto, de las ocho cepas, cinco resultaron susceptibles a cipermetrina, cuatro a lambda-cialotrina, tres a ciflutrina y una a deltametrina. Al organofosforado clorpirifos resultaron susceptibles tres cepas y se observó resistencia a DDT en todas las cepas.

Se modificaron los métodos bioquímicos para la detección de la actividad de las enzimas esterasas y glutatión transferasa (GST) en *Aedes aegypti* para poder diferenciar entre cepas susceptibles y resistentes a insecticidas. A través de estudios in vivo con sinergistas e in vitro con ensayos bioquímicos y la selección de cepas con genes para la resistencia a insecticidas en larvas se demostró que los mecanismos de acción metabólica (esterasas, GST y monooxigenasas) juegan un papel importante en la resistencia detectada a insecticidas organofosforados y piretroides. Por otra parte la mutación asociada a la resistencia al knockdown (gen Kdr) a DDT y piretroides estuvo presente a alta frecuencia en la cepa seleccionada con deltametrina y propoxur. El mal manejo del uso de insecticidas ha conducido al aumento de la resistencia a los mismos en esta especie. Las modificaciones en los métodos bioquímicos introducidas en este trabajo nos permiten monitorear los cambios en la actividad de esas enzimas en poblaciones de *A. aegypti* tratadas con insecticidas. Monitorear los cambios de esas enzimas nos permitirá detectar la resistencia tempranamente y evitar el desarrollo de la misma, a través de la creación de estrategias de uso de insecticidas con mecanismos de resistencia diferentes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

Las enfermedades transmitidas por *Aedes aegypti* (L.) se mantienen en áreas tropicales del tercer mundo, donde existen simultáneamente las peores condiciones de vida, las cuales constituyen los principales factores de re-emergencia de las mismas. Dentro de estas enfermedades se incluyen la fiebre amarilla, el dengue y su forma más severa, la fiebre hemorrágica del dengue (FHD). Estas patologías causan gran impacto en la salud pública y están distribuidas en áreas urbanas de América Latina y El Caribe, Asia, el Pacífico y África, (Lehane, 1991). Su localización está relacionada con la distribución geográfica de su principal vector: *Aedes aegypti* Linneaus (WHO, 1989).

En un informe de la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 1997) se afirmó que desde esa década de los 90 ya en la región de Centro América, El Caribe y América del Sur existían condiciones epidemiológicas y sociales similares a las que favorecieron el agravamiento del dengue hemorrágico en Asia durante el decenio de los años cincuenta. Es decir, se encontraban altas densidades del vector junto con circulación de varios serotipos del virus del dengue y hacinamiento de poblaciones marginadas en los cinturones de pobreza de las grandes ciudades. Además afirmaron que la situación en la Región estaba siguiendo una evolución similar a la que se inició en la región de Asia en ese decenio, debido a las escasas medidas de control.

El control del vector ha sido la única opción para prevenir o reducir la transmisión del dengue en el mundo hasta la fecha. La reducción de los criaderos y los programas de saneamiento ambiental con la activa participación de la comunidad son importantes componentes dentro de las estrategias sostenibles de control de *Aedes aegypti*, sin embargo todavía no es suficiente para el control de las poblaciones de este vector. Los insecticidas han desempeñado un papel esencial en la disminución y erradicación de estas enfermedades (Zaim y Guillet, 2002). En los últimos 25-30 años en Cuba y otros países de América Latina se han utilizado insecticidas organofosforados en recipientes de agua doméstica y para tratamiento residual intradomiciliario o rociado espacial para reducir las densidades de *Aedes aegypti* (Georghiou y cols., 1987 y Gratz, 1991).

Dentro de los insecticidas organofosforados más utilizados se encuentran el temefos como larvicida en el tratamiento focal; fention, fenitrothion y malation en tratamiento perifocal o en rociado intradomiciliario o espacial. A partir de la década de los 90 hasta la fecha se han utilizado en la mayoría de los países de América Latina, los insecticidas piretroides para el control de adultos en caso de epidemias o en presencia de altos índices de infestación del vector. *Aedes aegypti* ha desarrollado resistencia a una amplia variedad de insecticidas (WHO, 1986), lo que constituye el principal problema operacional que afecta su control.

Entre los mecanismos de resistencia más importantes en insectos se encuentran la resistencia metabólica y el sitio insensible o sitio blanco alterado. La forma más importante de resistencia metabólica incluye la multifunción oxidasa o monooxigenasas, glutathione transferasa (GST) y las esterasas. Estos mecanismos, cuya amplificación genética es generalmente inducida en los organismos durante la exposición a los insecticidas, pueden generar resistencia a la mayoría de los insecticidas disponibles (Hemingway y cols., 2004). Las esterasas se han identificado a menudo en insectos como mecanismos de resistencia a insecticidas organofosforados y carbamatos y en menos casos a piretroides (Hemingway and Ranson, 2000). El posible papel de las enzimas esterasas en la detoxificación de insecticidas en *Aedes aegypti* fue notificado primeramente por Chen y Sudderuddin en 1978, quienes encontraron que las larvas que fueron más tolerantes a compuestos organofosforados (OF) mostraron una alta actividad de esterasas. Subsiguientemente, Field y cols., en 1984 encontraron una asociación entre los niveles de resistencia (10x) y el incremento de la actividad esterasas en cepas de *Aedes aegypti* provenientes de Puerto Rico, luego de someterlas a una selección con malation. Otros autores han asociado la actividad de esterasas como mecanismo fundamental de resistencia a temefos en *Aedes aegypti* (Mazarri y Georghiou 1995, Vaughan y cols., 1998, Paeporn y cols., 2003; Saelim y cols., 2005).

La dehidrocloración del DDT a DDE es un importante mecanismo de resistencia a DDT y esta reacción es catalizada por la enzima GST, lo cual fue notificado por primera vez en *Musca domestica* (Clark y Sharman, 1984). La sobre-expresión de una GST de la clase Épsilon, (GSTe2), ha sido implicada como enzima responsable del metabolismo del DDT en, *Anopheles gambiae* (Ranson y cols, 2001; Ding y cols., 2003; Ortelli y cols., 2003).

La GST no ha sido implicada en el metabolismo de piretroides, pero sí en la detoxificación de los productos de oxidación de los lípidos, provocado por la acción de los piretroides, como se demostró en la especie *Nilaparvata lugens*, plaga del arroz (Vontas y cols., 2001; 2002). También esta enzima puede actuar como mecanismo de resistencia a través del secuestro de insecticidas piretroides en algunos insectos (Kostaropoulos y cols., 2001). En *Aedes aegypti* de Tailandia se identificó la sobreexpresión de un gen perteneciente a la clase epsilon 2 de la GST (AgGSTe2) en una cepa resistente a DDT y permetrina. Ellos confirmaron por estudios metabólicos que la enzima GST era responsable de la resistencia a DDT (Lumjuan y cols., 2005). Jean-Philippe y cols., 2005, demostraron a través de la técnica de microarreglos que en la especie *Anopheles gambiae* las enzimas de acción metabólica se sobreexpresaron en una cepa resistente a piretroides.

La segunda categoría de mecanismo de resistencia, que se basa en el sitio blanco alterado, incluye a la acetilcolinesterasa (sitio blanco para los organofosforados y carbamatos) y el tipo de resistencia al knockdown (gen Kdr), basado en la insensibilidad en los canales de sodio a la unión de los piretroides debido a mutaciones puntuales que ocurren en un gen denominado "para" de la membrana nerviosa del insecto y ha sido bien caracterizado en *Anopheles gambiae* (Martínez-Torres, 1998) y en *Musca domestica* (Williamson y cols. 1996). La resistencia mediada por la acetilcolinesterasa ocurre mediante cambios cualitativos en el sitio activo de la enzima o a su alrededor debido a mutaciones genéticas, lo que genera una capacidad reducida para unir a los organofosforados (OF) y carbamatos. Estas mutaciones genéticas, asociadas con la resistencia a insecticidas están bien caracterizadas en *Anopheles gambiae* (Weill y cols., 2004^a); pero no han sido identificadas aún mutaciones del gen de esta enzima, asociadas con la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*.

La práctica de utilizar un insecticida hasta que aparezca resistencia, es un factor que ha limitado la disponibilidad de estos químicos para el control de vectores. Se han realizado estrategias de manejo de resistencia a través del empleo de insecticidas en forma rotacional, alternándolos o en mosaico (Curtis y cols., 1993). Se han ideado modelos matemáticos para poder estimar la mejor forma de utilizar estas estrategias (Tabashnik, 1989).

Sin embargo estos modelos son difíciles de evaluar en condiciones de campo debido a lo difícil de estimar los cambios en la frecuencia de los genes de resistencia en poblaciones grandes de insectos (Hemingway y cols., 1997).

La incorporación de técnicas bioquímicas y moleculares apropiadas para detectar cambios en la frecuencia de genes para la resistencia a insecticidas hace más factible establecer estrategias de manejo de resistencia a insecticidas. Se han modificado técnicas bioquímicas en placas de microtitulación para medir la actividad de enzimas específicas que metabolizan insecticidas en poblaciones de insectos (Brogdon y cols., 1983; Hemingway y cols., 1990; Díaz y cols., 2004), las cuales permiten monitorear fenotipos resistentes, los que pueden ser detectados, aún a baja frecuencia.

En Cuba comenzaron los estudios de resistencia a insecticidas en 1986, cuando se realizaron los primeros trabajos en *Culex quinquefasciatus* y se demostró la existencia de resistencia a malation en esta especie (Bisset y cols., 1990a; 1990b; 1991a; 1991b). El malation fue utilizado en Cuba desde la epidemia de dengue, ocurrida en 1981 y fue reemplazado en 1986 por piretroides para el control de adultos de esta especie. Otros estudios de resistencia permitieron un mejor conocimiento de este fenómeno en *Culex quinquefasciatus* (Díaz y cols., 1993; Bisset y cols., 1994; 1995; 1998; 2000).

Los mecanismos de acción metabólica están bien caracterizados hasta el nivel molecular en algunas especies de insectos vectores, pero no en *Aedes aegypti*, al igual que los mecanismos de insensibilidad en el sitio de acción como son la acetilcolinesterasa alterada y el mecanismo tipo gen Kdr, los cuales son importantes determinar en cada especie específica para poder monitorear sus cambios.

Por la necesidad de realizar estudios de resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, nuestro trabajo incluyó un compendio de técnicas para el estudio de la resistencia a insecticidas en cepas de *Aedes aegypti* de Cuba y de otros países de América Latina. Además se sometió una cepa de SANTIAGO DE CUBA a presión de selección con insecticidas de diferentes grupos químicos para lograr un mejor conocimiento de este fenómeno en *Aedes aegypti* de Cuba, información útil para poder elaborar estrategias de uso correcto de insecticidas.

Este estudio constituye el primer reporte a nivel internacional sobre la caracterización de la resistencia a insecticidas en *A. aegypti* de Cuba y son novedosos también estos resultados para los países de A. Latina estudiados. De ahí la importancia y relevancia de esta investigación, que nos permitirá trazar o elaborar nuevas estrategias para el uso correcto de insecticidas para el control del vector, única opción disponible hasta el momento para reducir o prevenir la transmisión del dengue.

Es de destacar que actualmente se están creando laboratorios para la introducción de las técnicas bioquímicas modificadas en este trabajo, para la detección de mecanismos de resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* en Panamá y Perú y ya están creados en Venezuela, Colombia, México y Brasil.

1.2. Hipótesis

El uso de insecticidas OF por más de 25 años en América Latina para el control de *Aedes aegypti* ha permitido al insecto desarrollar mecanismos de resistencia de acción metabólica que generan resistencia cruzada o multiresistencia a insecticidas piretroides.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Contribuir al conocimiento del fenómeno de la resistencia a insecticidas, a través de un estudio de la misma en *Aedes aegypti* de Cuba y de otros países de América Latina.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Determinar el nivel de susceptibilidad y/o resistencia en larvas y adultos de *Aedes aegypti* de Cuba y otros países de América Latina a insecticidas organofosforados y piretroides.
2. Modificar los métodos de detección de la actividad de esterasas y glutatión transferasa (GST), utilizados en *Culex quinquefasciatus*, para *Aedes aegypti*.
3. Determinar los mecanismos de resistencia de esterasas, glutatión transferasa, monooxigenasas y acetilcolinesterasa modificada en *Aedes aegypti* de Cuba y otros países de América Latina.
4. Seleccionar cepas resistentes a insecticidas de diferentes grupos químicos: organofosforados (temefos y malation), carbamato (propoxur) y piretroide (deltametrina).
5. Determinar los cambios en la frecuencia de una mutación, posiblemente asociada al gen Kdr (resistencia al knock down) en *Aedes aegypti*, como mecanismo de resistencia a DDT y piretroides.

1.4. Importancia práctica

Debido a la importancia del uso de insecticidas en los programas de control de *Ae. aegypti*, y lo costoso de la síntesis y registros de nuevos insecticidas, el mantenimiento de la efectividad de los productos que se están utilizando y de otros que pueden ser utilizados como alternativos, constituye un importante objetivo. Para ello nuestro país por primera vez dispone de técnicas bioquímicas para la detección de los mecanismos de resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, la cual conforma una base sólida para la detección rápida de la resistencia en esta especie de mosquito.

Los resultados de esta investigación aportan información a la unidad Nacional de Vigilancia y Lucha Antivectorial que contribuye a la creación de estrategias sobre el uso de insecticidas con mecanismos de detoxificación diferentes, de forma tal que se evite el fenómeno de resistencia cruzada y alargue, así, la vida útil de los insecticidas en uso.

Una correcta política de uso de insecticidas contribuye a un uso racional de los mismos, lo que favorecería que las gestiones de compra de insecticidas sean más eficientes y no se malgasten los recursos que invierten los Ministerios a disposición de este rubro.

El laboratorio dispone de cepas con genes para la resistencia a insecticidas de diferentes grupos químicos, las cuales podrán ser utilizadas como cepas de referencia tanto a nivel nacional como internacional para estudios moleculares de resistencia a insecticidas que nos permitan ahondar más en el conocimiento de este fenómeno.

1.5. Novedad científica

Constituye el primer estudio a nivel nacional e internacional relacionado con la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* de Cuba, aportando también novedosos e interesantes resultados para otros países de A. Latina. Además los resultados de este trabajo de investigación se han publicado en 15 artículos, de ellos, 8 en revistas internacionales de amplia difusión.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Resistencia a insecticidas

2.1.1. Resistencia a insecticidas

El fenómeno de resistencia se evidencia cuando una representación de insectos fomenta la capacidad de tolerar dosis de tóxicos que resultarían letales para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie (WHO, 1957). Según la Organización para la alimentación y la agricultura., FAO, (1970), se define como resistencia la respuesta disminuida de la población de una especie de animales o plantas a un plaguicida o agente de control como resultado de su aplicación.

En el 5^{to} Informe del Comité de Expertos de la OMS en Biología de los Vectores y Lucha Antivectorial se expresa que la resistencia es un fenómeno que aparece en intervalos de tiempo sumamente variables, en especies diferentes y aún en la misma especie sometida a distintas intensidades de aplicación de insecticidas (WHO, 1980).

La resistencia a los insecticidas se explica en base a factores multidimensionales dependientes de la bioquímica, fisiología, genética y ecología de los vectores teniendo en cuenta que todo esto varía con la especie, poblaciones y localización geográfica. Las cepas resistentes se desarrollan a través de la sobrevivencia y reproducción, después de la exposición a un insecticida, de los individuos que tienen un gen de resistencia. Se puede considerar que la proporción de sobrevivientes refleja la presencia del gen o genes que codifican para mecanismos que confieren resistencia (WHO, 1992).

2.1.2. Resistencia cruzada y Resistencia múltiple

La resistencia cruzada es el fenómeno mediante el cual los insectos generan resistencia a un rango de insecticidas, a los cuales, puede ser, que nunca hayan sido expuestos. La base de la resistencia cruzada es un mecanismo de resistencia generado por insecticidas con similares modo de acción o estructura. (Wood, 1981). En términos actuales, resistencia cruzada se define como el mecanismo por el cual un gen simple confiere resistencia a un número de químicos del mismo grupo, tal es el caso de las fosfotriesterasas que brindan resistencia a varios organofosforados, o a diferentes grupos, como el gen *kdr* que confiere resistencia al DDT y a los piretroides (WHO, 1957).

En *Anopheles gambiae* de Costa de Marfil se encontró resistencia cruzada entre piretroides y DDT (Chandre y cols., 1999). En *Aedes aegypti* también se ha reportado resistencia cruzada entre DDT y piretroides dado por el mecanismo de resistencia de los canales de sodio (Na⁺) alterados (Bregues y cols., 2003). También se ha demostrado en esta especie resistencia cruzada dentro de un mismo grupo, como es el caso de la resistencia generada a permetrina producto de la selección en larvas con deltametrina (Urmila y cols., 2001). En *Culex quinquefasciatus* de Cuba se reportó resistencia cruzada a malation en una cepa sometida a presión de selección con lambdacialotrina (Bisset y cols., 1998), por otra parte la selección con malation en una cepa de *Cx. quinquefasciatus* procedente del Río Quibú, Ciudad Habana generó resistencia cruzada a temefos y propoxur (Díaz y cols., 1993). La justificación práctica de los estudios de resistencia cruzada es la necesidad de seleccionar un insecticida alternativo cuando se desarrolla resistencia.

Se atribuye el término de resistencia múltiple cuando dos o más mecanismos de resistencia están operando en el mismo insecto. Cuando dos mecanismos de resistencia actúan sobre un mismo insecticida el nivel de resistencia es a menudo mucho mayor que la adición simple de los niveles de resistencia conferidos por ambos mecanismos independientemente. Este tipo de resistencia se encuentra a menudo en condiciones de campo, donde los mosquitos son expuestos simultáneamente o secuencialmente a diferentes insecticidas. La resistencia múltiple puede extenderse a grupos químicos diferentes.

2.1.3. Evolución de la resistencia a insecticidas.

Más de medio siglo ha transcurrido desde que se reportó el primer caso de resistencia a insecticidas. Este hecho tuvo lugar específicamente en 1947 y fue para el pesticida organoclorado DDT (Georghiou, 1980). Desde entonces se ha desarrollado en relación a diferentes condiciones ecológicas y bajo la influencia de distintos métodos de empleo de estos compuestos tóxicos. Luego se empezó a observar este fenómeno para los OFs y carbamatos. Desde 1980, 51 especies de mosquitos desarrollaron resistencia a uno o más insecticidas, de estas, 30 especies eran resistentes a DDT, 47 especies eran resistentes a dieldrin y 30 especies eran resistentes a ambos insecticidas. Además, 10 especies de mosquitos desarrollaron resistencia a organofosforados y 4 especies eran resistentes a carbamatos (WHO, 1980).

A finales de 1989 se reportaron 504 especies de artrópodos resistentes a uno o más plaguicidas. Este fenómeno se extendió hasta abarcar al grupo de los insecticidas piretroides, de más reciente surgimiento; reportándose en 1992, 100 especies de mosquitos resistentes a insecticidas. De estas, 56 especies eran de *Anopheles*, 19 de *Aedes* y 20 de *Culex* (WHO, 1992). Según estos datos, es lógico pensar que, sin duda alguna, la resistencia es probablemente el obstáculo más grande en la lucha contra las enfermedades transmitidas por insectos.

2.1.4. Factores que influyen en la evolución de la resistencia.

Las categorías de factores que actúan en el desarrollo temporal de la resistencia a insecticidas fueron definidas por Georghiou y Taylor en 1976 como:

(A) Factores genéticos: Frecuencia de alelos resistentes, número de alelos resistentes, dominancia de alelos resistentes, penetración, expresividad e interacción entre alelos resistentes, selección pasada por otros productos químicos, grado de interacción del genoma resistente con los factores de disposición (idoneidad, oportunidad).

(B) Factores biológicos: Renovación de la generación, progenie por generación, monogamia, poligamia y partenogénesis, aislamiento y migración.

(C) Factores operacionales: **C.1 Químicos:** Naturaleza química del plaguicida, frecuencia y aplicación, relación con sustancias químicas usadas anteriormente, persistencia de residuos de formulación. **C.2 Aplicaciones:** Umbral de aplicación, etapas de vida selecta, modo de aplicación, selección de espacio limitado, selección alterna.

2.1.5. Insecticidas y sus sitios activos

Existen seis grandes grupos de insecticidas usados en la actualidad para el control de vectores. Estos son: organofosforados (OF), organoclorados (OCs), carbamatos, piretroides, reguladores del crecimiento e insecticidas microbianos. Los cuatro primeros actúan por afectación de la transmisión de los impulsos nerviosos, mientras que los otros dos interfieren en el desarrollo y permeabilidad de la membrana plasmática de las células nerviosas de los insectos respectivamente.

Los insecticidas pueden entrar al cuerpo del insecto por tres vías (Callaghan, 1989):

- **Por contacto:** El insecticida penetra la cutícula del insecto hasta alcanzar el sitio blanco; por ejemplo, OF (malation), OCs (DDT), carbamatos (propraxur), piretroides (permetrina), análogos de las hormonas juveniles (metopreno) y el inhibidor de crecimiento de la quitina (diflubenzurón).
- **Por ingestión:** El insecticida es ingerido y absorbido a través del intestino; por ejemplo, insecticidas biológicos como *Bacillus thuringiensis israelensis*, el que actúa por liberación de una endotoxina, la que es capaz de desintegrar la pared celular del intestino medio del insecto.
- **Por fumigantes:** Entran al cuerpo del insecto a través de espiráculos del sistema respiratorio. Un gran número de insecticidas además, de penetrar por contacto, lo hacen también por esta vía; por ejemplo: diclorvos.

2.1.6. Modo de acción de los insecticidas organofosforados y carbamatos

Los insecticidas organofosforados y carbamatos actúan como análogos del neurotransmisor Ac y son sustratos inespecíficos de la AchE. Los insecticidas OFs forman enlaces covalentes muy estables con la enzima. Existe la posibilidad de que la AchE pueda regenerarse mediante hidrólisis, pero esto es remoto pues la unión del OFs con la enzima es mucho más estable que la unión Ac-AchE y por tanto, su liberación es mucho más lenta.

La no regeneración de la enzima trae como consecuencia mayor cantidad de neurotransmisor libre y la función del nervio se altera (Reiner, 1971). Como resultado se origina una actividad incoordinada a través de todo el animal que padecerá de temblores, convulsiones, parálisis muscular y finalmente morirá.

Los piretroides actúan sobre la membrana nerviosa, ocasionando interferencias que provocan cambios conformacionales de las proteínas en la interfase lípido-proteína. Estas alteraciones originan un retardo en el cierre de los canales de Na⁺ después de ocurrido el impulso nervioso (Zerva, 1988).

Existen evidencias neurofisiológicas que permiten clasificar a los piretroides en dos grupos (Miller, 1988):

- **Tipo 1:** No presentan grupo α -ciano en la parte alcohólica de su estructura y actúan principalmente, sobre el Sistema Nervioso Periférico. Provocan descargas repetitivas en las fibras nerviosas a causa de la prolongación de la corriente de Na^+ . Como resultado no ocurre una gran despolarización de la membrana y no se bloquea la conducción del impulso nervioso. La disminución de la fase de repolarización del potencial de acción, bajo el efecto del piretroide, puede dar lugar a una actividad eléctrica repetitiva que origine una parálisis subsiguiente.
- **Tipo 2:** En su composición alcohólica cuentan con el grupo α -ciano y preferentemente actúan sobre el Sistema Nervioso Central. Ocasionan una despolarización de la membrana nerviosa y bloquea la conducción del impulso debido a una excesiva prolongación de la corriente de sodio.

2.2. Mecanismos de resistencia a insecticidas

Los mecanismos de resistencia a insecticidas pueden agruparse en mecanismos cualitativos y cuantitativos. Los primeros involucran una alteración estructural en la enzima diana, lo cual afecta su interacción con los insecticidas. La alteración puede ser consecuencia de una mutación cualitativa en el gen estructural o de una modificación que repercuta en el procesamiento post-transcripcional de la proteína en cuestión. La resistencia cuantitativa puede implicar un incremento o decremento en la cantidad de enzima detoxificadora o en la cantidad de proteína blanco disponible. Ésto puede ser el resultado de una alteración en el número de genes que codifican para la proteína en cuestión o de una expresión alterada de los genes estructurales, afectándose la cantidad de gen transcrito. En la práctica, todos estos mecanismos no han sido encontrados.

Miller en 1988 diversificó la resistencia en cuatro categorías:

- **Resistencia por comportamiento:** El insecto cambia sus hábitos y no contacta con el depósito de insecticida.
- **Resistencia a la penetración o mecanismo físico de resistencia:** Se basa en la modificación de la composición del exoesqueleto inhibiéndose la penetración del insecticida.

- **Sitio insensible o sitio blanco alterado:** El insecto logra modificar el sitio de acción del tóxico, disminuyendo la sensibilidad a la forma activa de éste.
- **Resistencia metabólica:** Involucra enzimas no específicas que normalmente detoxifican productos químicos lipofílicos extraños.

2.2.1. Comportamiento de la resistencia

Este es un mecanismo mediante el cual el insecto evita o reduce el contacto con el insecticida, desarrollando un comportamiento que lo aleja del lugar donde se encuentra el insecticida. Esto ha sido notificado en de Tailandia, donde, *An minimus* cambió su hábito de reposo intradomiciliario por extradomiciliario debido a los rociados de DDT intradomiciliario en la Campaña nacional para el control de la malaria (Bang, 1985).

2.2.2. Penetración reducida

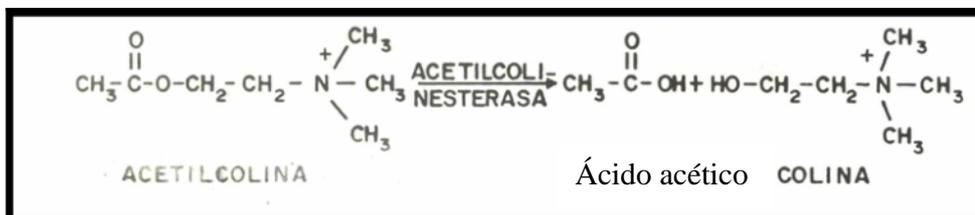
El radio de penetración de un insecticida está en dependencia de las características físicas de la molécula tóxica y de las propiedades del tegumento interno del insecto. La penetración reducida puede causar resistencia en los insectos. Este mecanismo ha sido identificado en *Culex tarsalis* (Apperson and Georghiou, 1975). Se plantea que está dado por el gen (PEN), el cual influye en la penetración del insecticida aumentando el contenido total de lípidos, esto permite que haya un mayor tiempo para que ocurra la detoxificación de los insecticidas, ya que este incremento provoca que la liberación de los compuestos lipídicos solubles en el cuerpo sea más lenta (Wood, 1981).

2.2.3. Insensibilidad en el sitio de acción

Este tipo de resistencia se atribuye a un mecanismo en el cual los sitios blancos se alteran y disminuye la interacción con el tóxico. Existen tres blancos principales de la acción de los insecticidas que son afectados por este mecanismo, en la mayoría de los casos el mecanismo involucra una sustitución de un simple aminoácido del sitio activo: la AchE (el blanco para los organofosforados y carbamatos) y los canales de Na⁺ de la membrana de las células nerviosas (para algunos organoclorados y piretroides) y los receptores GABA (para los ciclodienos).

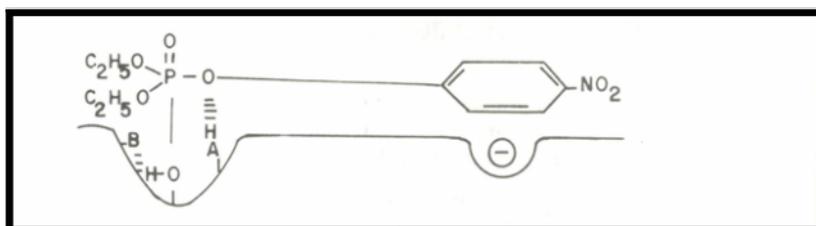
2.2.3.1. Acetilcolinesterasa alterada

La AchE es el sitio activo de los organofosforados y carbamatos (Gepner y cols., 1978), los cuales se unen a la AchE, formando un compuesto fosforilado o carbamilado, el cual impide la función normal de la AchE que es la hidrólisis de la acetilcolina (Ac). La enzima (AchE) juega un papel importante en las funciones nerviosas. Esta molécula tiene como función específica catalizar la hidrólisis del neurotransmisor excitatorio Ac, lo cual hace que sea un componente clave para la sinápsis colinérgica en el sistema nervioso tanto de insectos, donde la Ac es el principal neurotransmisor (Toutant, 1989), como de todas aquellas especies que presentan este sistema como parte de su fisiología.

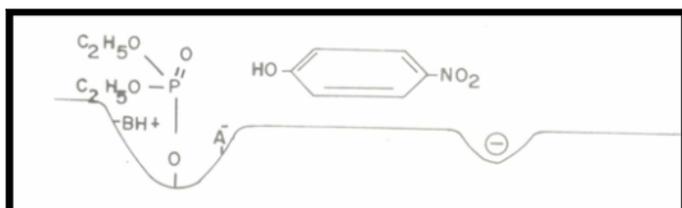


Como se ha dicho con anterioridad, la AchE es el principal blanco molecular de insecticidas OFs y carbamatos, aunque se conoce que la resistencia es más pronunciada para el caso de estos últimos (Bourguet y cols., 1996). La actividad de la enzima es inhibida por fosforilación o carbamitación del residuo de serina que se localiza en el subsitio esterásico de su centro activo (Toutant, 1989).

FORMACIÓN DEL COMPLEJO ENZIMA-INHIBIDOR



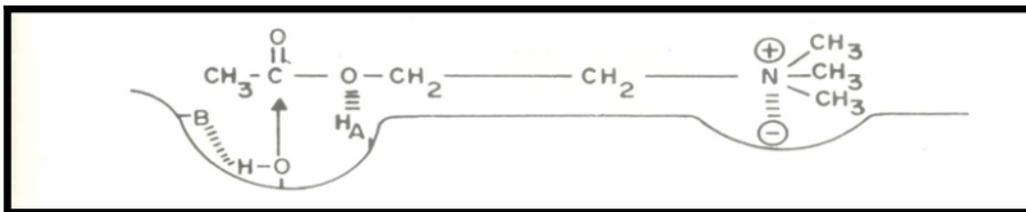
HIDRÓLISIS DEL COMPLEJO ENZIMA INHIBIDOR, QUEDANDO LA ENZIMA FOSFORILADA O CARBAMILADA.



El sitio catalítico de la AchE contiene dos subsitios: uno esterásico, al cual nos referimos anteriormente, y otro aniónico. El primero posee una serina activa con el grupo OH-involucrado en un sistema relativamente cargado, el grupo imidazol de una histidina y el grupo COO⁻ de un aspartato (Toutant, 1989).

El sitio aniónico contiene un carboxilo libre (Asp y/o Glu). La atracción del sustrato al sitio catalítico de la enzima ocurre a través de una interacción electrostática entre la carga positiva del amonio cuaternario de la Ac y las cargas negativas del subsitio aniónico.

COMPLEJO ENZIMA SUSTRATO



SITIO ESTERÁSICO

OH. AA. Serina

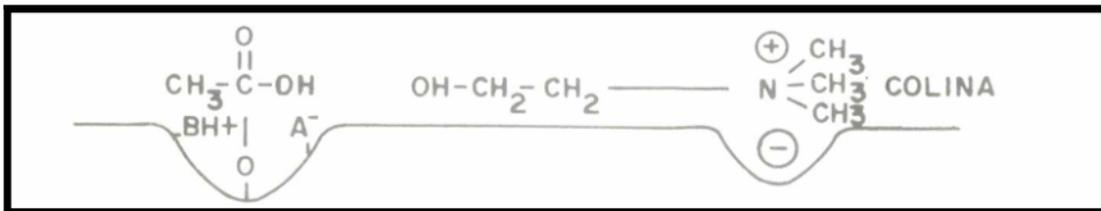
AH. AA. Tirosina

B. AA. Histidina

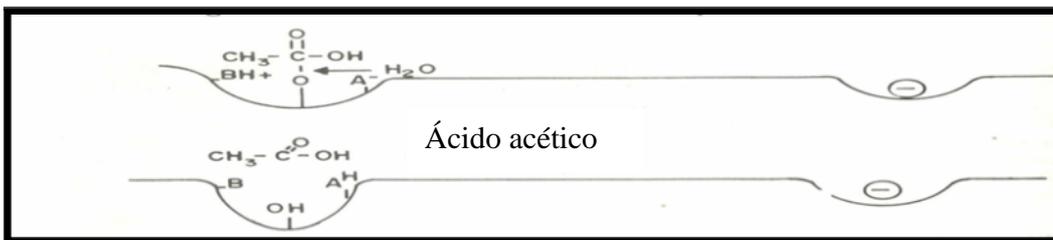
SITIO ANIÓNICO

AA Áspartico y Glutámico

Después de la formación del complejo enzima-sustrato (k+1), la enzima es acetilada en la serina del centro activo (k₂) y la porción colina de la Ac es liberada.



En una etapa posterior (k₃), la enzima es desacetilada liberando ácido acético y un nuevo ciclo tiene lugar (Toutant, 1989).



La resistencia mediada por la AchE se ubica dentro del tipo de resistencia, basada en la insensibilidad en el sitio de acción (Miller, 1988) y tiene lugar debido a cambios cualitativos en el sitio activo de la enzima o a su alrededor, lo que causa una disminución en la reactividad frente a los insecticidas OFs y carbamatos así como una hidrólisis más lenta de la Ac por esta molécula modificada, en comparación con la AchE normal. Algunos estudios sugieren como explicación para el mecanismo de sitio blanco insensible, mutaciones puntuales simples o múltiples. Para el caso del locus AchE se demostró que un determinado número de mutaciones puntuales a este nivel provocaron afectación en la sensibilidad de la AchE cuando fue inhibida por OFs y carbamatos en *M. domestica* (Kozaki y cols., 2001), *Cx. pipiens* y *An. gambiae* (Weill y cols. 2004a). Las mutaciones genéticas asociadas con la resistencia a insecticidas no han sido aún descritas en *Aedes aegypti*.

2.2.3.2. Receptores gaba (ácido amino butírico)

Los receptores GABA están localizados en los canales de los iones Cl^- de la membrana nerviosa, los cuales controlan el flujo de estos iones a través de la misma. Ellos son receptores del neurotransmisor. Los ciclodienos, los cuales constituyen un subgrupo de los organoclorados, también afectan la función del nervio, pero por la unión con los receptores GABA. La resistencia a ciclodienos está asociada con el reemplazamiento de un simple aminoácido (alanina 302) de una subunidad del gen de resistencia a dieldrin (Rdl), que codifica para el receptor GABA. En los insectos resistentes a ciclodienos, el residuo alanina es reemplazado por residuos de serina o por glicina y esta mutación convierte al receptor GABA insensible a la unión con el insecticida. Estas mutaciones en sólo dos residuos de aminoácidos, así como limitados cambios de residuos que ocurren en otros genes que confieren resistencia a insecticidas, como el gen de la acetilcolinesterasa y el gen Kdr, fueron investigados por ffrench-Constant y cols., 1998. La alteración en los receptores GABA los hace insensible a los ciclodienos y esto ocurre en *Aedes aegypti* (Thompson y cols., 1993) y en *Drosophila melanogaster* (ffrench-Constant y cols., 1992).

2.2.3.3 Alteraciones en los canales de sodio (Na^+)

El canal de Na^+ es el sitio fisiológico primario de acción de los insecticidas piretroides, DDT y sus análogos. La alteración del canal de sodio o la reducción de la afinidad de las proteínas del canal por el insecticida es un importante mecanismo de resistencia que confiere insensibilidad nerviosa y es además conocida como resistencia por knock down (gen kdr). Este tipo de mecanismo ofrece resistencia cruzada a los piretroides modernos, los cuales se están utilizando en la actualidad para el control de vectores. Estudios electrofisiológicos han identificado a los canales de Na^+ dependientes de voltaje, como esenciales en la generación de potenciales de acción, como el principal blanco de acción de los piretroides. Estos modifican la apertura cinética de dichos canales por incremento en la duración de la fase de apertura (Herve, 1983). Como consecuencia ocurren aumentos en la conductancia de los iones Na^+ y K^+ a nivel del axón durante la excitación de las células nerviosas (Castella y cols., 1997). Existen estudios que han revelado mutaciones en un único amino ácido del gen homólogo que al parecer, también causan resistencia knock down (kdr) al DDT (Severson, y cols., 1997). También se ha identificado en *Cx. quinquefasciatus* (Amin and Hemingway, 1989), *An stephensi* (Omer y cols., 1980), y en *Aedes aegypti* (Bregues y cols., 2003).

2.2.4. Resistencia metabólica

Las enzimas metabólicas involucradas en la resistencia pueden incrementarse cuantitativamente o la actividad de su centro catalítico puede alterarse para mejorar su especificidad sobre uno o más insecticidas

2.2.4.1. Esterasas inespecíficas

En la resistencia a OF se encuentran involucradas dos tipos de esterazas (A y B). Estas muestran una elevada actividad frente al naftil acetato, se clasifican en A ó B dependiendo de cuál sea su sustrato preferencial (α o β naftil acetato). Yébakima y cols., 1995, observaron en Europa y Martinica un tercer tipo de estas enzimas (esterasas C).

Las esterasas A, B y C son codificadas por distintos loci denominados Est-3, Est-2, Est-1. Actúan sobre el grupo R-CO-OR' de los insecticidas, como por ejemplo, el OF malation (O'Brien, 1960). Sin embargo, como paradoja no sólo hidrolizan ésteres carboxílicos, piretroides sintéticos y naturales (que presentan este grupo), sino que también lo hacen sobre los ésteres fosfatos y carbamatos, donde participan como importantes agentes defensivos. El incremento de estas enzimas puede producir resistencia mediante la hidrólisis o el secuestro del insecticida. Ellas se comportan como proteínas de enlace y son fosforiladas por el insecticida dentro del insecto. De esta forma estos son removidos de allí siendo incapaces de reaccionar con el sitio blanco de la enzima (AChE) (Motoyama y cols., 1984).

Las esterasas son enzimas que hidrolizan ésteres del ácido carboxílico. La clasificación de estas enzimas es difícil debido al solapamiento de las especificidades de sus sustratos. Sin embargo la clasificación de las esterasas realizadas por Aldrige (1953, 1993) es generalmente reconocida. De acuerdo a esta clasificación, las esterasas que son inhibidas por paraoxon de forma progresiva dependiendo de la temperatura, son clasificadas como esterasas B o serina hidrolasas ya que poseen un residuo de serina en su sitio activo (Reiner, 1993). Las esterasas que no son inhibidas por paraoxon son clasificadas como esterasas A, y no tienen serina en el sitio activo.

Han sido clasificadas en 4 clases: arylesterasas, acetylesterasas, carboxilesterasas y acetilcolinesterasas (Heymann, 1980). El término carboxilesterasa es atribuido principalmente a las esterasas B (Reiner 1993). Las funciones fisiológicas de la mayoría de las esterasas son desconocidas y por esta razón son llamadas esterasas no específicas, aunque se piensa que su función es principalmente detoxificación de xenobióticos.

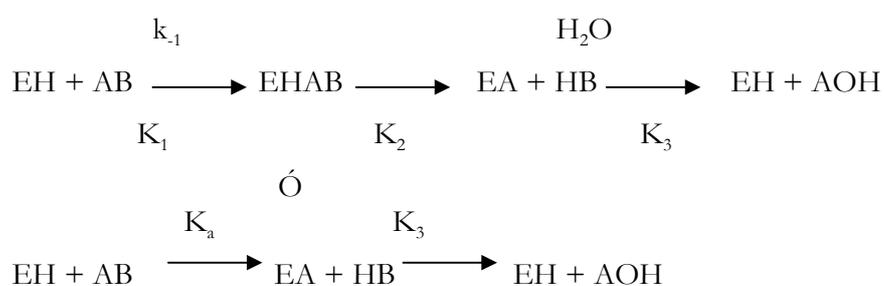
En mosquito *Culex* se clasificaron las esterasas de acuerdo a su preferencia por hidrolizar los ésteres sintéticos α ó β naftil acetato y por su movilidad electroforética (Georghiou y Pasteur, 1978; Raymond y cols., 1987).

Han sido reportadas tres fenotipos de esterasas en el complejo *Culex pipiens*: A1 en el sur de Francia e Italia (Pasteur y cols., 1981a), B1 en poblaciones de California, Cuba, América Central y Asia (Georghiou y Pasteur 1978; Bisset y cols., 1990); y las esterasas A2 y B2 han sido encontradas en poblaciones de varios países (Villani y cols., 1983; Raymond y cols. 1987).

La naturaleza multi alélica de las esterasas, con algunos alelos que comparten la misma movilidad electroforética, hacen que su clasificación sea difícil. Para superar estas dificultades surgió una nueva clasificación de las esterasas de *Culex*, que fue introducida en 1995 (Vaughan y cols., 1995), en la cual las esterasas de *Culex* son clasificadas como α ó β , en vez de A ó B. Una vez clasificadas a nivel de nucleótidos, las esterasas llevan un superíndice. De aquí que las dos esterasas B₁ amplificadas en *Culex quinquefasciatus*, una reportada en California (cepa TEM-R) y la otra en Cuba (cepa MRES). Estas esterasas tienen la misma movilidad electroforética, pero son diferentes a nivel molecular (Mouches y cols., 1990; Vaughan y cols., 1995) y se clasifican por esta nomenclatura como: Est β 1¹ y Est β 1² respectivamente y la cepa de Sri Lanka (Pel SS) que posee la esterasa B, pero de baja actividad, tiene la misma movilidad electroforética, pero difiere también a nivel de aminoácidos y se clasificó como Es β 1³ (Vaughan y cols., 1995).

Las carboxilesterasas tienen muy alta afinidad por los organofosforados y carbamatos. En presencia de grandes cantidades de estas enzimas los insecticidas son rápidamente secuestrados antes de que ellos alcancen su sitio activo o blanco: acetilcolinesterasa. Además son capaces de detoxificar catalizando la hidrólisis de carboxilester, ésteres carboxyamida, carboxyioester (Ahamad y Forgash, 1976) y ciertos ésteres de ácido fosfóricos.

La reacción general aceptada es:



Donde EH es la enzima, AB el inhibidor, EHAB el complejo de Michaelis, EA la enzima acetilada, HB el primer metabolito (ácido) y OH el segundo metabolito (alcohol).

El coeficiente de inhibición K_a (constante de velocidad bimolecular), mide la velocidad con que el insecticida se une a la enzima. Mientras que K₃ (constante de velocidad de reactivación), mide la velocidad a la cual la enzima regenera los productos liberados (Aldridge, 1953).

Para los sustratos la reacción completa es muy rápida, por esta razón la enzima libre se regenera y el sustrato es rápidamente hidrolizado. Para los inhibidores, la enzima acetilada se forma muy rápido (K_a es alta), pero puede que sea muy estable o que la velocidad de hidrólisis (K_3) sea lenta, lo cual hace más lenta la reacción en este paso.

Las esterasas Est β 1¹ y Est β 1², descritas previamente en *Culex* han sido purificadas y caracterizadas a partir de una cepa de *Culex quinquefasciatus* homocigótica resistente de Sri Lanka (PelRRR). Estimados de la constante de velocidad bimolecular (K_a) y la constante de velocidad de reactivación (K_3) indicaron que la resistencia a insecticidas organofosforados en *Culex quinquefasciatus* mediada por esterasas es a través de secuestro del insecticida y por la baja velocidad de transformación del insecticida (Ketterman y cols., 1993).

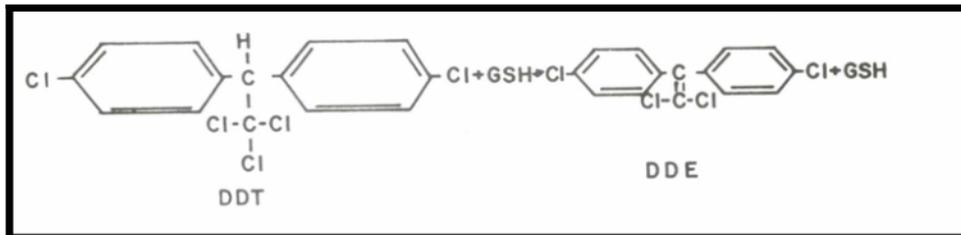
Las carboxilesterasas se comportan como proteínas de enlace y son fosforiladas por el insecticida dentro del insecto. De esta forma estos son removidos de allí siendo incapaces de reaccionar con el sitio blanco de la enzima acetilcolinesterasa (Motoyama y cols., 1984). Por consiguiente un factor importante que favorece la selección del mecanismo de resistencia de esterasas es su habilidad para secuestrar un amplio rango de insecticidas, lo cual brinda al insecto una gran protección.

La Genética Molecular ha demostrado que la resistencia a insecticidas puede ser debida a mutaciones puntuales en genes estructurales, cambios en genes reguladores o por amplificación de ADN (Besanky y cols., 1992). El incremento de la actividad de esterasas puede ser debido a varios aspectos: estabilización del ARNm que codifica para la proteína, incremento en la transcripción y/o traslación del gen y del ARNm respectivamente, o por amplificación genética.

2.2.4.2. *Glutathion transferasa (GSTs)*.

La glutathion-s-transferasa pertenece a una familia multigénica de proteínas diméricas multifuncionales. Cataliza el ataque nucleofílico del glutathion reducido (GSH) hacia los centros electrofílicos de compuestos lipofílicos. Tiene gran importancia en la detoxificación metabólica en todos los animales y se conoce que está involucrada en la resistencia de los insectos a los OFs a través de reacciones de desalquilación (Terriere, 1984).

El mecanismo de la GST constituye la forma más importante de resistencia metabólica al DDT catalizando su dehidroclorinación para producir un compuesto sin actividad insecticida denominado DDE (Lalah y cols., 1995).



Se clasifican de acuerdo a la reacción que catalizan como: alquil, aril y epoxittransferasas (Terriere, 1984).

La enzima glutathion transferasa constituye una gran familia de enzimas detoxificadoras, las cuales poseen un amplio rango de sustratos específicos, incluyendo sustratos endógenos, tales como carbonilos insaturados, aldehidos electrofilicos, epóxidos e hidroperóxidos orgánicos producidos in vivo como producto de la ruptura de macromoléculas durante el período de estrés oxidativo (Vontas y cols., 2002).

El interés por las investigaciones de las GSTs en insectos es debido a su papel en la resistencia a insecticidas. Estas enzimas están involucradas en la O-dealquilación u O-dearilación de insecticidas organofosforados (Vontas y cols., 2002), como un mecanismo secundario de detoxicación y en la dehidroclorinación de insecticidas organoclorados (Hemingway y cols., 1991).

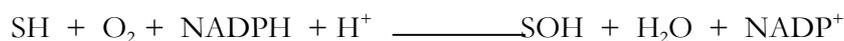
Las GSTs confieren resistencia a piretroides ya que actúan sobre los lípidos productos de la peroxidación inducida por los piretroides, de esta forma protegen los tejidos del daño oxidativo (Vontas y cols., 2001) y/o uniéndose a las moléculas del piretroide en un mecanismo de secuestro, y de esta manera ofrece un mecanismo de protección pasiva. (Kostaropoulos y cols., 2001).

El primer gen de la GST en insectos fue clonado en *Nilaparvata lugens*, del orden Hemiptera y se demostró que este gen estaba involucrado en la resistencia a piretroides (Vontas y cols., 2002). Estudios posteriores han identificado al menos seis clases de GSTs citosólicas en los insectos, cada una representada en *An. gambiae* y *Ae. aegypti*: Delta, Épsilon, Omega, Sigma, Theta y Zeta, no descartándose la posibilidad de encontrar clases nuevas y de cambios en su clasificación actual (Ding y cols., 2003; Tu y Akgul, 2005).

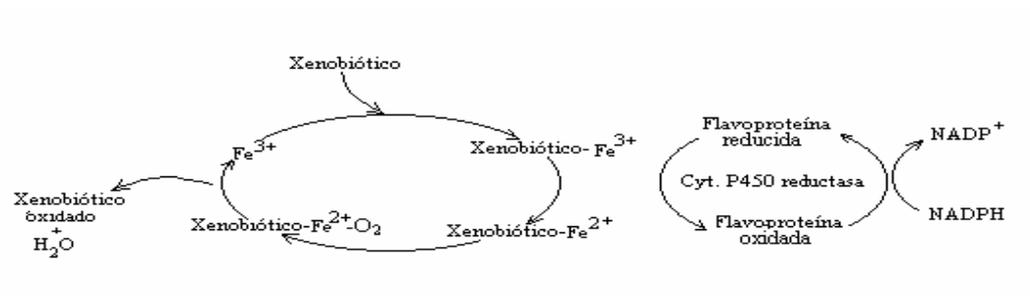
Las clases Delta y la Épsilon se presentan únicamente en los insectos (Ranson y cols., 2002; Ding y cols., 2003; Enayati y cols., 2005). Un grupo de GSTs citosólicas de *An. gambiae* se han designado como no clasificadas, denotadas por una “u”, e. g. GSTu (Ding y cols., 2003). La identificación de ortólogos de GSTu en *Ae. aegypti* y su ausencia en *D. melanogaster* sugiere que estas GSTs podrían ser específicas de mosquitos (Lumjuan y cols., 2005). Recientemente se reportó la presencia de ocho genes de GST en *Aedes aegypti*, cuatro de ellos pertenecen a las clases Delta y Épsilon y 3 de ellos están ambiguamente distribuidos en las clases Theta y Sigma y se identificó un gen ortólogo a *AgGSTe2* en *Ae. aegypti*, denominado *AaGSTe2*, designado por la nomenclatura actual de las GSTs en insectos, que consiste de tres partes, el nombre de la especie de la cual fueron aisladas, la clase a la que pertenecen y una tercera parte que termina en un número que puede reflejar el orden en que fueron descubiertas o su organización en el genoma. Este se sobre expresa en todos los estados de desarrollo en cepas de *Aedes aegypti* resistente a DDT y deltametrina (Lumjuan y cols., 2005). Utilizando la técnica de Microarreglos se demostró que las enzimas de acción metabólica, dentro de ellas la *GSTE2* se sobre expresó en una cepa resistente al piretroide permetrina en *Anopheles gambiae* (Jean-Philippe y cols. 2005).

2.2.4.3. Citocromo P-450 monooxigenasas (P450)

Este sistema se localiza en el retículo endoplasmático liso de la fracción microsomal de las células adiposas. Son enzimas inespecíficas y catalizan una reacción de oxidación dependiente de NADPH, de la flavo proteína NADPH-citocromo P₄₅₀ reductasa, de una ferro proteína y del citocromo P₄₅₀ (Oppenoorth, 1985).



Donde S: Insecticida.



Este es uno de los mecanismos más importantes en la detoxificación de los insecticidas debido fundamentalmente a la falta de especificidad, localización estratégica, inducibilidad y sincronización que han desarrollado los insectos (Saume, 1992).

Los metabolitos polares producidos por este mecanismo son a veces más tóxicos que los compuestos que le dieron origen. Las epoxidaciones casi siempre producen metabolitos más tóxicos, mientras que las desulfuraciones oxidativas de organotiofosforados siempre los producen. (Hernández y Bend, 1982). Hidroxilaciones de carbono, nitrógeno y oxígeno, y desalquilaciones, resultan en productos detoxificados.

Ensayos enzimáticos demostraron que insectos resistentes al DDT, carbamatos o fosforados presentaron una actividad oxidativa mucho mayor que la observada en individuos susceptibles. La mayor actividad oxidativa de estos organismos resistentes hacia un insecticida puede también facilitar el metabolismo de otros agentes no relacionados que utilizan una o varias rutas del metabolismo microsomal, lo que daría una explicación al fenómeno de resistencia cruzada (Saume, 1992).

2.3. Detección de la resistencia

EL primer paso en el manejo de la resistencia es formular estrategias para detectar y monitorear la resistencia en el terreno. Convencionalmente, las pruebas de susceptibilidad, tanto en larvas como en adultos colectados del terreno, se hacen exponiendo a los insectos a dosis diagnóstico o a una serie de diluciones del insecticida. La disminución de la susceptibilidad en el tiempo se toma como un indicador de resistencia. La resistencia a insecticidas puede ser además detectada a través del uso de sinergistas, estudios metabólicos y ensayos bioquímicos.

Los sinergistas son sustancias químicas que inhiben, de forma específica, enzimas que metabolizan insecticidas, potenciando la acción de los mismos, si estas representaran un mecanismo de resistencia importante en una especie determinada de insectos. Entre los sinergistas más utilizados para detectar mecanismos de resistencia en insectos se encuentran el S,S,S-tributilfosforotioato (DEF), inhibidor de esterasas, pero puede también inhibir la enzima GST, el trifenil fosfato (TFF), inhibidor específico de las esterasas, el piperonil butóxido (PB), inhibidor de las monooxigenasas, y el ácido etacrínico (AE), inhibidor específico de la enzima glutatión transferasa (GST).

El conocimiento de las bases bioquímicas de la resistencia ha permitido la formulación de ensayos bioquímicos para detectar la resistencia de forma simple, rápida y económica. Estos ensayos determinan el mecanismo de resistencia y la frecuencia de esos genes de resistencia en individuos de una población.

El ensayo de papel de filtro para la determinación de fenotipos de esterasas propuesto por Pasteur y Georghiou (1981b) es un ensayo simple y rápido. Este método ha sido utilizado para detectar la frecuencia de esterasa B2 en *Cx. quinquefasciatus* resistente en diferentes áreas de California (El Khatib y Georghiou, 1985).

Un método similar para la detección de actividad enzimática fue implementado en placas de microtitulación de ELISA, el cual nos permite determinar varias enzimas responsables de la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides como son las esterasas, glutatión transferasa y monooxigenasas. Estas técnicas fueron adaptadas para la detección de esterasas en *Culex pipiens* (Villani y cols., 1983), en *Culex quinquefasciatus* (Hemingway y cols., 1990), y en *Anopheles albimanus* (Brogdon y cols., 1983, 1988).

A través de estos ensayos se detectan cambios cualitativos de la enzima acetilcolinesterasa por ensayos de inhibición (Hemingway y cols., 1986). Estos autores reportan que estas técnicas permiten una diferenciación exacta entre individuos susceptibles y resistentes, basado en un cambio de color. Los métodos de detección de actividad de esterasas mencionados anteriormente fueron comparados por Bisset y cols., 1995 y se demostró que el método en placa de microtitulación era más exacto a la hora de diferenciar entre individuos susceptibles y resistentes.

Con el desarrollo de las técnicas de Biología Molecular, se han desarrollado sondas de ADN que nos permiten diferenciar genotipos resistentes de los susceptibles. Desde el punto de vista molecular se demostró que el gen de esterasa B1 en una cepa resistente (MRES) de *Cx. quinquefasciatus* de Cuba era diferente del reportado previamente por Mouches y cols., 1990 en una cepa resistente a temefos (TEM-R) de California. La esterasa B1 de Cuba presentó mayor homología con la Est. B2 de la cepa Pel RR de Sri. Lanka, que con la Est. B1 de la cepa TEM-R (Vaughan y cols., 1995).

En *Aedes aegypti*, según la literatura consultada no existe ningún estudio de Biología Molecular que nos permita diferenciar entre insectos susceptibles y resistentes a insecticidas basados en el mecanismo de esterasas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas de *Aedes aegypti* utilizadas para el trabajo.

(1) **ROCKEFELLER**: cepa de laboratorio susceptible a insecticidas, de origen caribeño, suministrada por el laboratorio del CDC de San Juan, Puerto Rico.

(2) **SANTIAGO DE CUBA (SC)**: población natural colectada en el Municipio de Santiago de Cuba en 1997.

(3) **SANTIAGO DE CUBA TECHO (SCT)**: una cepa que durante el brote epidémico de dengue ocurrido en 1997 fue creada colectando mosquitos que reposaban en los techos de las viviendas.

(4) **CIUDAD HABANA**: cepa colectada en el Municipio Playa durante la epidemia de dengue del 2002.

(5) **JAMAICA, PANAMÁ, COSTA RICA, NICARAGUA, PERÚ Y VENEZUELA**: cepas provenientes de diferentes países de América Latina, colectadas en áreas con alta incidencia del vector.

(6) **SANMAL-F1-SANMAL-F5**: cepas generadas durante el proceso de selección con malation.

(7) **SANTEM-F1-SANTEM-F6**: cepas generadas durante el proceso de selección con temefos.

(8) **SANDELTA-F1-SANDELTA-F12**: cepas generadas durante el proceso de selección con deltametrina.

(9) **SANPROP-F1-SANPROP-F13**: cepas generadas durante el proceso de selección con propoxur.

Cría y mantenimiento de las colonias de *Aedes aegypti*.

Las cepas de *Aedes aegypti* se mantuvieron en el insectario a una temperatura de 25 °C +/- 2°C y 75% +/- 2 % de humedad relativa. Las larvas se criaron en cubetas plásticas con aproximadamente 2.5 L de agua y 0.7g de harina de pescado como alimento. Al pasar a pupas (penúltimo estadio en el ciclo de vida del mosquito) se colocaron en un vaso de precipitado dentro de una doble jaula (30x30x30 cm.) hasta que emergieron los adultos, los machos fueron alimentados con solución azucarada y en el caso de las hembras se les colocó curieles enjaulados, para su alimentación y garantizar su posterior puesta de huevos.

3.2. Bioensayos

3.2.1. Insecticidas utilizados

Organofosforados:

Temefos: o, o-dimetil fosforotioato o, o-diéster con 4,4' tiodifenol; 93.3% de pureza, suministrado por American Cyanamid Co., Princeton, New Jersey.

Malation: Dietil mercaptosuccinato, éster con o,o-dimetil fosforoditioato; 97% de pureza, suministrado por American Cyanamid Co., Princeton, New Jersey.

Clorpirifos: o, o-dietil o-(3, 5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato; 94% de pureza, suministrado por Down Chemical Co., Midlan, Michigan.

Pirimifos metil: o-[2-(dietilamino)-6-metil-4-pirimidinil] o,o-dimetil fosforotioato; 99.8 % de pureza, suministrado por ZENECA Salud Pública.

Fention: 0,0-dimetil 0-(4-metiltio-m-tolyl) fosforotioato; 99.1% de pureza, suministrado por Mobay, Kansas City, Kansas.

Fenitrothion: 0,0-dimetil 0-(4-nitro-m-tolyl) fosforotioato; 97% de pureza, suministrado por Sumitomo Chemical Company.

Carbamato:

Propoxur: o-isopropoxifenil metilcarbamato; 99.8% de pureza, suministrado por Mobay, Kansas City, Kansas.

Piretroides:

Deltametrina: (96.8 %), suministrado por Roussel Uclaf, France.

Cipermetrina: (90,5%), suministrada por Chemotécnica S.A, Argentina.

Ciflutrina: (93 %), suministrada por Bayer S.A . Central America, Costa Rica.

Lambdacialotrina: (97,8 %), suministrada por Syngenta SA, Suecia.

Organoclorado:

DDT: (99 %), suministrado por Ralph N. Emanuel Ltd).

3.2.2. Bioensayos en larvas

Para determinar las concentraciones letales 50 y 90 (CL₅₀-CL₉₀) en larvas de *Aedes aegypti* para cada insecticida se utilizaron los bioensayos de susceptibilidad (WHO, 1981). Se colocaron 20 larvas de tercer estadio tardío o cuarto estadio temprano en vasos que contenían 99 ml de agua y se les aplicó a cada vaso 1 ml del insecticida.

Se evaluaron cinco o más concentraciones de cada insecticida, disueltos en acetona, y cinco réplicas por cada concentración, que causaron mortalidades entre 2 y 98%. La mortalidad se determinó 24 horas después del tratamiento con los insecticidas y los resultados se analizaron mediante el programa Probit-logaritmo de Raymond y cols., 1985. Se calculó el FR_{50} y FR_{90} (Factor de Resistencia), comparando los valores de las cepas de campo con la cepa ROCKEFELLER.

3.2.3. Bioensayos en adultos

Los bioensayos se realizaron siguiendo las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para mosquitos adultos (WHO, 1992). Las hembras fueron expuestas a papeles impregnados con insecticidas, a dosis diagnósticas y tiempo sugeridos por la OMS o por los fabricantes de los insecticidas, DDT (4% /0.5 h), Lambdacialotrina (0.1%/1h), Cipermetrina (0.1%/1h) Deltametrina (0.1%/1h) Ciflutrina (0.1%/1h) y Clorpirifos (1 %/1h). Cada uno de los insecticidas se evaluó a través de cuatro réplicas, cada una con 25 mosquitos y se expusieron los insectos al papel impregnado con insecticida, colocado en los cilindros plásticos de exposición (kits de la OMS). No se observó mortalidad en los controles, que consistían en papeles impregnados con silicona. Los resultados fueron analizados sobre la base de criterios de resistencia a insecticidas de la OMS: Susceptibilidad se considera (entre 98 y 100 % de mortalidad), Verificación de la resistencia (entre 80 y 97 %) y alta resistencia (menor de 80 % de mortalidad). (WHO, 1992).

3.3. Métodos para la detección de los mecanismos de resistencia.

3.3.1. Esterasas inespecíficas

Reactivos:

Tampón fosfato: Tampón 0,01 M, PH 7,5. Se preparó la forma ácida (NaH_2PO_4) y básica (Na_2HPO_4) a una molaridad de 0,01M. Se tomó la forma ácida y se llevó a PH 7,5 con la forma básica.

Sustrato (β naftil acetato): sustrato β -naftilacetato 70 mM, se preparó disolviendo 0,6517 gr de este sustrato en 50 ml de acetona, esta constituye la solución madre, que se almacena en refrigeración a 4°C por tres semanas y después se descarta. Para su uso se hace una dilución de 1:100 con tampón fosfato 0, 01 M, pH= 7,5.

Lauryl sulfato de sodio (SDS): Se preparó una solución al 5 %, disolviendo 5g de este reactivo en 100 ml de agua destilada.

Fast Blue B Sal (O-dianisidine tetrazotized): 30 mg de Fast Blue fueron disueltos en 3 ml de agua destilada y 7 ml de SDS 5 %.

Preparación de las muestras de larvas

- Colocar una larva o adulto en cada pocillo de la placa de microtitulación.
- Adicionar 50 μ l de tampón fosfato 0,01M, pH 7,5.
- Macerar los mosquitos en la placa.
- Completar el volumen de cada pocillo a 200 μ l con el tampón fosfato.

*3.4.1.1. Adaptación del método de esterasas inespecíficas para *Aedes aegypti*.*

Los métodos de detección de la actividad de esterasas inespecíficas y glutathion transferasa (GST) fueron modificados a partir de los métodos ya descritos para *Culex quinquefasciatus* por Peiris y Hemingway, 1990 y Booth, 1961 respectivamente. Los métodos se modificaron siguiendo la metodología de Fersht, 1985.

Esterasas: La concentración saturante de β -naftil acetato y el tiempo óptimo de reacción fueron determinados utilizando las cepas de *Aedes aegypti* de ROCKEFELLER y SANTIAGO DE CUBA. Las mediciones se realizaron en larvas individuales replicando el experimento 5 veces en cada placa para cada concentración de sustrato.

La densidad óptica de formación del producto para cada concentración de β -naftil acetato (100 mM, 66 mM, 44 mM, 29 mM, 19,5 mM y 13 mM) fue analizada a 1 min de intervalo (desde 1 hasta 25 min) para determinar el tiempo óptimo de la reacción.

Los valores medios de velocidad inicial (V_0) (pendiente de la curva de D.O vs tiempo de reacción) fueron ploteadas contra cada concentración de β -naftil acetato, mencionadas anteriormente (anexo 1), para obtener la concentración de sustrato saturante (el doble de la concentración de sustrato a la cual se obtiene la velocidad máxima), que resultó ser 70 mM y el tiempo óptimo de reacción de 10 min (anexo 2).

Descripción de la técnica: Las larvas de cuarto estadio temprano se homogenizaron en 200 μL de tampón fosfato 0.01 M, PH 7.5 a 4°C de temperatura. Se dispensaron 20 μL del homogenizado de cada larva por pocillo y se adicionaron 200 μL del sustrato β -naftilacetato 70 mM (diluido 1:3 en tampón fosfato). Se dejó transcurrir la reacción durante 10 minutos y posteriormente se adicionó 40 μL de Fast Blue. La densidad óptica (D.O.) se leyó a 570 nm en un lector de ELISA (Labsystems iEMS Reader MF).

3.4.2. Glutation transferasa.

Reactivos:

Glutation reducido (GSH) 20 mM: 0,13 gr en 20 ml de tampón fosfato 0,01 M, PH 7,5

1- cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 50 mM: 0,01 gr en 1 ml de metanol.

Mezcla de sustratos: Se preparó en una proporción de 1CDNB: 20 GSH. Para una placa de 96 pocillos se preparó una mezcla de 1 ml de CDNB en 20 ml de GSH.

3.4.2.1. Adaptación del método de GST para *Aedes aegypti*.

La concentración saturante de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) se determinó utilizando diferentes concentraciones del sustrato (15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM & 60 mM) y manteniendo constante la concentración de glutacion reducido (30 mM) (anexo 3). La concentración saturante de glutacion reducido se determinó variando su concentración (30 mM, 25 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM and 5mM) y manteniendo fija la concentración de CDNB, previamente establecida (anexo 4). La concentración saturante de glutacion reducido y CDNB resultó ser de 20 mM y 50 mM respectivamente. El tiempo óptimo de reacción fue de 10 min.

Descripción de la técnica: Se adicionó 20 μl de cada homogenato de larva a la placa de microtitulación y se le adicionó 200 μl de la mezcla [250 μl de 3,4 CDNB (50 mM) + 5ml de glutacion reducido (20mM)]. Se dejó transcurrir la reacción por 3 min. y se leyó la D.O a 340 nm. La actividad enzimática se determinó la para cada valor de D.O. obtenido mediante la ecuación:

$$A.E. = \frac{D.O. \times 1}{(3 \text{ min}) \times k (9.6)} \times \frac{V(\text{mezcla}) (20 \mu\text{l})}{V(\text{muestra}) (220 \mu\text{l})}$$

$$\frac{[1 - \frac{V(\text{mezcla})}{V(\text{muestra})}]}{t \times k} = 0.381$$

Donde: A.E. es Actividad enzimática (mM de sustrato transformado/ml.min.).

D.O. es la densidad óptica, medida a 340 nm para GST

K es el coeficiente de extinción (9,6 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Validación de las técnicas de detección de actividad de esterasas y glutathion transferasa (GST):

Los parámetros que se evaluaron fueron:

1. Precisión: determinado por el coeficiente de variación intra e inter determinación.

$CV (\%) = \frac{\text{Desviación Estándar}}{\text{Media}} \times 100$

Media

Para establecer la precisión intradeterminación de los métodos anteriormente descritos, cinco muestras de la cepa susceptible (ROCKEFELLER) y 5 muestras de la cepa resistente (SANTIAGO DE CUBA) fueron evaluadas cinco veces para la actividad de esterasas y GST. Para establecer la precisión interdeterminación se evaluó la actividad de las enzimas esterasas y GST en 5 muestras de cada una de las cepas antes mencionadas en 5 días diferentes en un intervalo de 15 días. Los valores de CV tanto intradeterminación como interdeterminación resultaron menores de 10 %, lo cual confirmó una adecuada precisión de ambas técnicas intra e interdeterminación.

2. Exactitud: se evaluó comprobando la linealidad bajo dilución. Para ello se diluyó de forma seriada una muestra que presentaba alta actividad de esterasas y GST de la cepa de SANTIAGO DE CUBA. Las diferentes diluciones se analizaron con los métodos antes descritos para la detección de estas enzimas. Mediante análisis de regresión lineal se comprobó la capacidad del método para determinar de forma lineal y proporcional la actividad enzimática presente en cada una de las diluciones. La dilución de la muestra de SANTIAGO DE CUBA resultó en una recta con una ecuación de regresión lineal y un coeficiente de correlación (r) de 0.98 y 0.99 para esterasas y GST respectivamente y el coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.99 para ambas técnicas. Lo cual nos confirmó que estas técnicas determinaron con buena exactitud la actividad de ambas enzimas.

3.4.3. Acetilcolinesterasa modificada (AChE)

Reactivos

Ácido 5,5-dithiobis 2- nitrobenzoico (DTNB): 0,0396 gr de DTNB en 10 ml de tampón fosfato 0,01M, PH 7,5.

Acetiltiocolina Iodada (ASChI) (0.01M): 0,0578 gr de ASChI en 20 ml de agua destilada.

Propoxur (0,1 M): 0,292 gr de propoxur en 10 ml de acetona.

Triton X-100 (1%) en tampón fosfato 0,01M, PH 7,5.

Descripción de la técnica: La preparación de las muestras fue similar a la descrita anteriormente, con la diferencia de que las muestras se homogenizaron en 50 µl de tampón fosfato, conteniendo tritón X-100 al 1%. Se prepararon además dos placas, una para la determinación de la actividad AchE normal y otra para la actividad AchE inhibida con propoxur. En ambas placas se adicionaron 20 µl de DTNB (ácido 5-5' ditiobis 2 nitrobenzoico) 0,07 M, pH 7,5 y 20 µl de acetiltiocolina iodada (AChI) 0,06 M. En la placa donde se midió la actividad AchE inhibida se adicionaron además 10 µl de propoxur 0.025 M. Después de preparadas estas dos placas se adicionó en cada pocillo 20 µl del homogenizado de las larvas. La reacción se dejó transcurrir durante 30 minutos y se leyó la D.O a 405 nm.

Para determinar si la AchE está actuando como mecanismo de resistencia, es decir, con modificaciones en su sitio activo (AchEr), se empleó la siguiente fórmula:

Actividad de la AchE Inhibida X 100% = % de la actividad AchE en presencia del inhibidor.

Actividad de la AchE normal

Los valores de actividad de AchE, en presencia del inhibidor, menores de 70 % correspondieron a individuos susceptibles, es decir sin la presencia del mecanismo de AchEr modificada.

3.5. Cálculo de la frecuencia de individuos resistentes

Para calcular la frecuencia de individuos resistentes en una población, basados en los mecanismo de esterasas, acetilcolinesterasa alterada o glutatión transferasa se utilizó la ecuación de Hardy Weinberg, asumiendo que la población estaba en equilibrio genético.

$p^2 + 2pq + q^2 = 1$ donde: p = SS pq = RS q = RR T = Total de mosquitos evaluados

$$\frac{(SS)^2 + 2(RS + (RR))^2}{T} = 1$$

SS: Mosquitos homocigóticos susceptibles

RS: Mosquitos heterocigóticos resistentes

RR: Mosquitos homocigóticos resistentes

$$\text{Frecuencia de mosquitos resistentes (RS+RR)} = 1 - \frac{\sqrt{(SS)}}{T}$$

Valores de corte o de actividad enzimática para insectos susceptibles (SS)

Esterasas: Valores de D.O ≤ 1.22

GST: = Valores de AE $\leq 0.6694 \mu\text{mol}/\text{min}$

AchE: SS = Valores de AEr $\leq 70 \%$

3.6. Determinación in vivo, a través del uso de sinergistas de los mecanismos de esterasas y monooxigenasas.

Sinergistas

DEF: S,S,S-tributilfosforotioato; 99% de pureza, suministrado por Mobay, Kansas City, Kansas.

PB: (a-[2-butoxi-etoxi] etoxi-4,5-metilenodioxi-2-propiltolueno); 96,8% de pureza, suministrado por McLaughlin Gormley King Co, Minneapolis, Minnesota.

TFF: Trifenil fosfato

ÁE: Ácido etacrínico

Método

La acción de cuatro sinergistas, S, S, S tributyl phosphorotrithioate (DEF), trifenilfosfato (TFF), inhibidores de esterasas; piperonil butóxido (PB), inhibidor de monooxigenasas y ácido etacrínico (ÁE), inhibidor de la glutathion transferasa (GST) fue investigada exponiendo las larvas de cuarto estadio a dosis subletales de 0.008 mg/L de DEF, 5 mg/L de PB, 2,5 mg/L de TFF y 5 mg/L de AE durante 4 horas previo a la adición de la solución del insecticida. Después de transcurrido este tiempo se le aplicaron las diferentes dosis de insecticidas y se determinó la mortalidad después de 24 horas de exposición, hallándose las concentraciones letales 50 (CL₅₀) y 90 (CL₉₀) a través del programa Probit-logaritmo de Raymond, 1985. Se calculó el factor de sinergismo (FS) con la siguiente fórmula:

$$FS = \frac{CL_{50} \text{ del insecticida sólo}}{CL_{50} \text{ del insecticida + sinergista}}$$

Se consideró que existió sinergismo para valores de FS > 5.

3.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida para la caracterización de esterasas.

Reactivos

Solución A: Acrilamida 30 %: 90 g. de acrilamida, 2,4 g. de bis acrilamida, Mezclar ambas con 300 ml de agua destilada.

Solución B: 25 g. de sacarosa, 250 ml de tampón del gel.

Solución C: 0,1 g. de persulfato de amonio en 25 ml de agua destilada.

Tampón del gel Tris-Borato-EDTA, PH 8.6: 12,11 g. de tris, 0,93 g. de EDTA, 2,47 g. de ácido bórico. Mezclarlos con 250 ml de agua destilada.

Tampón de corrida pH=8,0: 60,55 g. de tris, 3,98 g. de EDTA, 21,21 g. de ácido bórico. Mezclarlos con 5 litros de agua destilada y ajustar el pH a 8,0 con ácido bórico saturado. No enrasar hasta aplicar el ácido bórico, debido a la gran cantidad del mismo a utilizar.

Tampón 0,1 M fosfato pH= 7,5: 29,995 g. de NaH_2PO_4 (forma ácida) y diluirlo en 2500 ml de agua destilada. . 35,49 g. de Na_2HPO_4 (forma básica) y diluirlo en 2500 ml de agua destilada. A la forma ácida le añado la forma básica hasta que el pH se ajuste a 7,5.

Preparación del xilene cianol: Pesar 0,05 g. de xilene cianol en 5 ml de agua destilada (xilene cianol al 1%). Tomar 1,5 g. de sacarosa en 10 ml de agua destilada (sacarosa al 15 %). Después de estar preparadas ambas soluciones, tomar 200 μl de xilene cianol en 10 ml de sacarosa.

Preparación del duodecil sulfato de sodio (SDS) al 5 %: 5 ml de SDS en 100 ml de agua destilada.

Preparación del gel (10 %): 6,66 ml de Solución A, 4,32 ml de agua destilada, 5 ml de Solución B, 5 ml de Solución C, 20 μl de TEMED (N, N, N, N, tetramethyl etilendiamino).

Soluciones para la tinción del gel:

Sustratos: α y β naftil acetato 70 mM en acetona =0,6517 gr de cada uno de ellos en 100 ml de acetona.

Colorante: Fast Blue B Sal (O-dianisidine tetrazotized): 30 mg de Fast Blue fueron disueltos en 3 ml de agua destilada y 7 ml de SDS 5 %.

Descripción de la técnica: Para realizar la electroforesis se determinó la actividad enzimática de las esterasas en cada larva y se seleccionaron las muestras con mayor actividad. Posteriormente, en tubos Eppendorf (1,5 ml), se adicionaron 10 μL de muestra más 10 μL del indicador Xilene cianol (0,02 % en sacarosa al 15 %). Se aplicaron 20 μL de esta mezcla en el gel y se realizó la corrida a 150 volts, durante 45 min. Para la tinción de las bandas de esterasas, se sumergió cada gel en 50 ml de tampón fosfato (0,1M) conteniendo 4 ml de cada uno de los sustratos inespecíficos de las esterasas (α - y β -naftil acetato). Después se añadió el colorante Fast Blue B salt, disuelto previamente en agua destilada y SDS.

Para fijar la coloración de las bandas se sumergieron los geles en una solución de ácido acético al 10 %. A cada una de las bandas se le determinó la movilidad relativa calculándose la relación existente entre la distancia recorrida por la banda y el frente de corrida dado por el colorante xilen cianol.

$R_f = \text{distancia recorrida por la esterasa} / \text{distancia recorrida por el colorante}$

3.8. Selección de cepas de referencia de *Aedes aegypti* resistentes a insecticidas.

Una cepa de *Aedes aegypti* L. de Santiago de Cuba con altos niveles de resistencia a deltametrina (113.7x), temefos (19.58x) y propoxur (12.60x) y con baja resistencia a malation (2.22x), fue sometida a presión de selección con estos insecticidas, pertenecientes a diferentes grupos químicos. Se evaluó en cada proceso de selección la evolución de la resistencia al insecticida con que se realizó la selección, así como el fenómeno de resistencia cruzada y multiresistencia a otros químicos, a través de los bioensayos de la OMS (WHO, 1981). Se determinaron los mecanismos de resistencia a través de ensayos bioquímicos modificados para *Ae. Aegypti* en este trabajo y se determinó la frecuencia (%) de esterasas, glutatión transferasa (GST) y acetilcolinesterasa modificada (AChEr), en la cepa original y en las sucesivas generaciones de selección. Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida e inhibición en gel para determinar las esterasas en cada caso.

3.8.1. Selección de una cepa de *Aedes aegypti* resistente a temefos

3.8.1.1. Metodología

La cepa de SANTIAGO DE CUBA fue seleccionada con el insecticida organofosforado temefos por seis generaciones de selección, hasta obtener la cepa SANTEM-F6. Se colocaron 50 larvas de tercer estadio tardío o cuarto temprano en recipientes plásticos de 300 ml de capacidad, los cuales contenían 99 ml de agua común y se les añadió 1 ml de la dosis que causó el 90 % de mortalidad con este insecticida, la selección se hizo por 24 h. Los sobrevivientes en cada selección (10 %) fueron transferidos a agua limpia, se alimentaron y se utilizaron para desarrollar la colonia. De 2000 a 6000 larvas fueron seleccionadas en cada generación. Cada descendencia de la selección se designó como SANTEM-Fx (x corresponde a cada generación de selección).

3.8.1.2. Evolución de la resistencia a temefos durante el proceso de selección.

La evolución de la resistencia a temefos se determinó calculando los valores de Factor de Resistencia (FR_{50} y FR_{90}), calculados a partir de los valores de concentración de temefos que causaron el 50 y 90 % de mortalidad (CL_{50} y CL_{90}), en la cepa original de SANTIAGO DE CUBA, y cada tres generaciones de selección, correspondientes a las cepas SANTEM-F3 y SANTEM-F6. Los valores de CL_{50} y CL_{90} se determinaron a través de los bioensayos en larvas descritos en el capítulo 3.2.2.

3.8.1.3. Resistencia cruzada a otros insecticidas

Para determinar el efecto de resistencia cruzada a otros insecticidas durante el proceso de selección con temefos se determinó el valor de Factor de Resistencia (FR_{50} y FR_{90}), calculado a partir del valor de concentración del insecticida que causó el 50 y el 90 % de mortalidad (CL_{50} y CL_{90}), en la cepa original de SANTIAGO DE CUBA, y cada tres generaciones de selección, correspondientes a las cepas SANTEM-F3 y SANTEM-F6. En dichas cepas se evaluó la susceptibilidad a los insecticidas organofosforados malation, fention y fenitroton y a los insecticidas piretroides deltametrina, cipermetrina y ciflutrina a través de los bioensayos en larvas descritos en el capítulo 3.2.2.

3.8.1.4. Determinación de los mecanismos de resistencia in vivo, a través del uso de sinergistas.

Se realizaron bioensayos de susceptibilidad utilizando sinergistas. La acción sinérgica del S,S,S tributil fosforotritioato (DEF), inhibidor de esterasas y del piperonil butóxido (PB), inhibidor de las monooxigenasas, se determinó para los insecticidas a los cuales se detectó resistencia (temefos, fenitroton, fention, deltametrina y ciflutrina), en las cepas de SANTIAGO DE CUBA, SANTEM-F6 y ROCKEFELLER, siguiendo el método descrito en el capítulo 3.6.

3.8.1.5. Variación de la frecuencia de los mecanismos de resistencia

Se determinó la variación de la frecuencia de los mecanismos de resistencia de esterasas, GST, y AchE_r en las cepas de SANTIAGO DE CUBA, SANTEM-F3, SANTEM-F4, SANTEM-F5 Y SANTEM-F6. La actividad de estas enzimas se determinó a través de métodos bioquímicos, que se describen en el capítulo 3.3.

3.8.1.6. Ensayos de inhibición de esterasas en gel de poliacrilamida

Para el ensayo de inhibición se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 10 % en tampón Tris-Borato/EDTA, pH 8,6. El gel se corrió a 150 v hasta que el frente de corrida alcanzó las tres cuartas partes del gel. Se aplicaron muestras individuales de larvas de SANTIAGO DE CUBA y SANTEM-F6. Una vez terminada la corrida el gel se cortó en tiras y antes del proceso de tinción se incubaron por separado en tampón fosfato 0,01 M, pH 6,5, el cual contenía 10 μ l de los inhibidores (los piretroides lambda-cialotrina, cipermetrina y deltametrina y el organofosforado temefos) a una concentración final de 0,1 mM de los mismos. Para cada ensayo de inhibición se utilizó un control con acetona, donde se incubó la muestra con 10 μ l de este solvente y un control sin nada, sólo la muestra. Después del período de incubación las esterasas fueron visualizadas por la adición de 4 ml de los sustratos α -naftil acetato y β -naftil acetato, 10 ml de solución de Fast-blue (0,03 gr de fast blue + 3ml de agua + 7 ml de SDS 5 %) en 50 ml de tampón fosfato 0,01 M pH 6,5. Se fijó la tinción de las bandas reemplazando el colorante por ácido acético al 7 %.

3.8.2. Selección de una cepa de *Aedes aegypti* resistente a deltametrina.

La cepa de SANTIAGO DE CUBA TECHO fue seleccionada por doce generaciones consecutivas con el insecticida piretroide deltametrina, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el capítulo 3.8.1.1. Cada descendencia de la selección se designó como SANDELTA-Fx (x corresponde a cada generación de selección). Así se obtuvieron las cepas, SANDELTA-F1 hasta SANDELTA-F12.

3.8.2.1. Evolución de la resistencia a deltametrina

La evolución de la resistencia a deltametrina se determinó siguiendo la metodología del capítulo 3.8.1.2. Los valores de CL_{50} y CL_{90} se determinaron a través de los bioensayos en larvas descritos en el capítulo 3.2.2.

3.8.2.2. Resistencia cruzada a otros insecticidas

Para determinar el efecto de resistencia cruzada a otros insecticidas durante el proceso de selección con temefos se calculó el valor de Factor de Resistencia (FR_{50}), calculado a partir del valor de la CL_{50} , en la cepa original de SANTIAGO DE CUBA TECHO, SANDELTA-F3, SANDELTA-F6 Y SANDELTA-F12.

En dichas cepas se evaluaron los insecticidas organofosforados malation, fenitroion y fenitrotion y los insecticidas piretroides lambdacialotrina, cipermetrina y ciflutrina. El valor de CL_{50} se determinó a través de los bioensayos en larvas descritos en el capítulo 3.2.2.

3.8.2.3. Determinación in vivo de los mecanismos, a través del uso de sinergistas.

Se realizaron bioensayos de susceptibilidad utilizando sinergistas (método descrito en el capítulo 3.6). Se expusieron las larvas de *Aedes aegypti* de SANTIAGO DE CUBA TECHO y SANDELTA-F12 a dosis subletales de los sinergistas DEF, TFF, PB Y AE durante cuatro horas para conocer la acción sinérgica de estos compuestos frente a los insecticidas (lambdacialotrina, cipermetrina y ciflutrina).

3.8.2.4. Variación de la frecuencia de los mecanismos de resistencia

Se determinó la variación de la frecuencia de los mecanismos de resistencia de esterasas, GST, y AchE_r en las cepas de SANTIAGO DE CUBA TECHO, SANDELTA-F3, SANDELTA-F6, SANDELTA-F9, SANDELTA-F10 Y SANDELTA-F12. La actividad de estas enzimas se determinó a través de métodos bioquímicos, que se describen en el capítulo 3.3.

3.8.2.5. Ensayos de inhibición de esterasas en gel de poliacrilamida

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (Capítulo 3.7.1.6). Se aplicaron muestras individuales de larvas de SANTIAGO DE CUBA TECHO, SANDELTA-F12 Y ROCKEFELLER. Terminada la corrida, el gel se cortó en tiras y antes del proceso de tinción se incubaron por separado en tampón fosfato 0,01 M, pH 6,5, el cual contenía 10 µl de los inhibidores piretroides (lambdacialotrina, cipermetrina, ciflutrina y deltametrina) a una concentración final de 10^{-2} y 10^{-3} M de los mismos. Los controles son los mismos utilizados en el capítulo 3.8.1.6 y el proceso de tinción fue el mismo.

3.8.3. Selección de una cepa de *Aedes aegypti* resistente a propoxur.

La cepa de SANTIAGO DE CUBA fue seleccionada por trece generaciones consecutivas con el insecticida carbamato propoxur, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el capítulo 3.8.1.1. Cada descendencia de la selección se designó como SANPROP-F_x (x corresponde a cada generación de selección).

3.8.3.1. Evolución de la resistencia a propoxur durante el proceso de selección

La evolución de la resistencia a propoxur se determinó calculando la variación del Factor de Resistencia (FR_{90}), calculado a partir del valor de la concentración de propoxur que causó el 90 % de mortalidad (CL_{90}), en la cepa original de SANTIAGO DE CUBA y en, SANPROP-F1, SANPROP-F2, SANPROP-F3, SANPROP-F5, SANPROP-F7, SANPROP-F9 Y SANPROP-F13. Los valores de CL_{90} se determinaron a través de los bioensayos en larvas descritos en el capítulo 3.2.2.

3.8.3.2. Resistencia cruzada a otros insecticidas

Se calculó el valor de Factor de Resistencia (FR_{50}), calculado a partir del valor de la concentración del insecticida que causó el 50 % de mortalidad (CL_{50}), en la cepa original de SANTIAGO DE CUBA y en SANPROP-F1 a SANPROP-F5 y en SANPROP-F13. En dichas cepas se evaluaron los insecticidas organofosforados temefos, malation, clorpirifos, fenitroton, fention y pirimifos metil a través de los bioensayos en larvas descritos en el capítulo 3.2.2.

3.8.3.3. Determinación in vivo de los mecanismos, a través del uso de sinergistas.

Se realizaron bioensayos de susceptibilidad utilizando sinergistas (método descrito en el capítulo 3.6). Se expusieron las larvas de *Aedes aegypti* de SANTIAGO DE CUBA, de SANPROP-F1 a SANPROP-F5, SANPROP-F9 y SANPROP-F13 durante cuatro horas para conocer la acción sinérgica del DEF y PB frente al insecticida propoxur.

3.8.3.4. Variación de la frecuencia e los mecanismos de resistencia

Se determinó la variación de la frecuencia de los mecanismos de resistencia de esterasas y GST en las cepas de SANTIAGO DE CUBA, de SANPROP-F1 a SANPROP-F5, SANPROP-F9 y SANPROP-F13. La actividad de estas enzimas se determinó a través de métodos bioquímicos, que se describen en el capítulo 3.3.

3.9. Determinación de la frecuencia de una mutación del gen Kdr.

3.9.1. Purificación del ADN.

Se realizó por el método de Gaillard y Strauss, 1990: Se maceraron 30 mosquitos de cada cepa de forma individual en 500 μ l del tampón de extracción (Tris-HCl 1M pH 8.25, EDTA 0.5 M, Sacarosa 1M y SDS al 20 %). El homogenizado se incubó a 65 $^{\circ}$ C por 10 min, se añadió 120 μ l de acetato de potasio 5 M y se incubó a 4 $^{\circ}$ C por 10 min y se centrifugó a 10000 g por 10 min. Al sobrenadante se le adicionaron 35 μ l de mezcla de acetato (acetato de sodio 4 M y acrilamida al 0.25 %) y 1200 μ l de etanol absoluto, incubándose 10 min a temperatura ambiente. El homogenizado se centrifugó a 10000 g por 20 min, el precipitado obtenido se lavó con etanol al 70 %, se centrifugó a 10000 g por 10 min, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 25 μ l del tampón Tris-EDTA (TE 1X) (Tris-HCl 1mM pH 8.0, EDTA 0.1mM pH 8.0). Posteriormente, se adicionó 2 μ l de ARNasa (10 mg/ml), se incubó 1 h a 37 $^{\circ}$ C, se añadió igual volumen de la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 10000 g por 10 min. El sobrenadante se conservó a -20 $^{\circ}$ C. Se realizó la lectura de las muestras del ADN obtenido a las longitudes de onda de 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia, LKB, EUA). Se calculó el grado de pureza a través del cociente DO 260/280 y la concentración de ADN por la fórmula: $[C \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{DO } 260\text{nm} \times 50 \times \text{dilución}) / 1000]$.

3.9.2. Electroforesis del ADN extraído.

El resultado de la extracción del ADN en las muestras se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % preparado en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE 0,5X) (Tris-Borato 0,045 M y EDTA 0,001 M, pH 8,0) conteniendo bromuro de etidio (0,5 mg/ml). La corrida se realizó a 150 V durante 1 h (Fuente: Pharmacia LKB, Multidrive XL, EUA). La visualización se realizó en un transiluminador (Macroveu 2011, LKB, EUA) mediante luz ultravioleta.

3.9.3. PCR

Se amplificó el alelo Iso1,016 en las cepas seleccionadas con temefos, deltametrina y propoxur por la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), utilizando los siguientes cebadores específicos suministrados por La Universidad de Colorado, EUA.

Cebadores	Secuencia	Sentido
Va11,016	5' ACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG-3'	5'-3'
Iso1,016	5' -ACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA-3'	5'-3'
Met1,011	5' -TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC-3'	3'-5'

El ADN extraído (~100 ng) se amplificó en un volumen de reacción de 25 µL. Cada reacción contenía 12.5 µl de 2X IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) (concentración final = 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.2 mM de cada dNTP, 0.625 unidades de iTaq® DNA polimerasa, 3 mM MgCl₂, 1X SYBR Green I, 10 nM fluorescein), 25 pm de cada cebador, y se añadió agua bidestilada (ddH₂O) para completar un volumen final de 25 µl. Las condiciones de la corrida fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 12 min, seguido de 39 ciclos descritos de la siguiente forma: desnaturalización a 95°C por 20 seg., hibridación 60°C por 1 min, extensión a 72°C por 30 seg., extensión final después del último ciclo a 72°C por 5 min. Los resultados de la amplificación del ADN se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 4.0 %. La corrida se realizó a 80 V durante 90 min (Fuente: Pharmacia LKB, Multidrive XL, EUA). La visualización se realizó en un transiluminador (Macroveu 2011, LKB, EUA) mediante luz ultravioleta.

El codón 1,016 del gen "para" presente en las membranas nerviosas del mosquito *Aedes aegypti*, su triplete está formada por GTA y codifica para el aminoácido valina, y la mutación en este codón de G por A forma el triplete ATA que codifica para el aminoácido Isoleucina (Iso1,016), al parecer esta mutación está relacionada con el mecanismo de resistencia a piretroides tipo gen Kdr en *Ae. aegypti*.

La frecuencia del alelo A en cada cepa se calculó dividiendo las veces que se encontró el alelo A (tanto en su forma homocigótica (A/A ó Iso1,016/Iso1,016) como heterocigótica (A/G ó Iso1,016/Val1,016) entre el total de alelos de la colección. Fueron 29 individuos genotipificados en cada cepa y cada genotipo se compone de dos alelos (por la diploidia de los mosquitos $29 \times 2 = 58$ alelos), por lo tanto la fórmula sería: Presencia de alelos A en 29 mosquitos genotipados/58.

ANALISIS ESTADISTICO:

Programa probit-logaritmo de Raymond, 1985. Se utilizó para analizar si los datos se ajustaban a la recta de regresión % de Mortalidad vs Log. Dosis del insecticida. Con este programa se obtuvieron todos los datos de la recta y se conoció además el valor de concentración que causó el 50 y 90 % de mortalidad para cada insecticida y la pendiente de la recta de regresión, lo cual nos indicó el grado de homogeneidad de la población para la resistencia a insecticidas.

Programas informáticos Excell 2000. Prueba de correlación lineal (r) y Coeficiente de determinación (R²). Se utilizó para analizar si existía correlación entre el nivel de resistencia a insecticidas con la frecuencia de cada uno de los mecanismos de resistencia en cada proceso de selección.

Prueba de X². Para conocer si la variación del mecanismo de esterases fue significativa durante el proceso de selección con deltametrina.

Prueba exacta de Fisher (P). Para analizar los cambios en la frecuencia del alelo Iso1,016 comparando la cepa original con la sucesivas generaciones de selección con temefos, propoxur y deltametrina.

Programa SPSS v. 10. Para realizar el análisis de regresión lineal y el cálculo del coeficiente de correlación lineal (r) y de determinación R² para la validación de las técnicas.

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de resistencia en cepas de *Aedes aegypti* de Cuba y otros países de América Latina.

4.1.1 Bioensayos de susceptibilidad y/o resistencia en larvas

Se evaluó la susceptibilidad y/o resistencia a insecticidas organofosforados (OF): temefos, malation, fention, pirimifos metil, fenitroion y clorpirifos en larvas de *Aedes aegypti* colectadas de Cuba (cepas: SANTIAGO DE CUBA (SC) y CIUDAD HABANA) y de otros países de América Latina (cepas: JAMAICA, PANAMÁ, COSTA RICA, NICARAGUA, PERÚ Y VENEZUELA) (tabla 1). Como se muestra en la tabla, la más alta resistencia a temefos, expresada por el valor de factor de resistencia ($FR_{50} \geq 10x$), se encontró en CIUDAD HABANA ($FR_{50} = 91.60x$), seguido por COSTA RICA (68.33x), S. CUBA (59.16x), JAMAICA (42.50x), PANAMÁ (23.33x), PERÚ (22.50x) y VENEZUELA (12.50x), en la cepa NICARAGUA la resistencia fue moderada a este insecticida (FR_{50} entre 5 x y 10x). Todas las cepas resultaron susceptibles a malation ($FR \leq 5$). La mayoría de las cepas resultaron ser susceptible a fention, excepto CIUDAD HABANA, donde que mostró un alto valor de FR_{50} (13.26x) y moderada resistencia se detectó en SC (5.30x) y PERÚ (6.63x). A fenitroion, sólo la cepa de CIUDAD HABANA mostró resistencia, con un valor moderado de 9.78x. Con respecto al OF pirimifos metil, se detectó alta resistencia en las cepa de CIUDAD HABANA (47.43x), PANAMÁ (12.30x), COSTA RICA (10.76x) y VENEZUELA (10.10x), el resto de las cepas mostró valores de resistencia moderados a este insecticida, excepto la cepa NICARAGUA que resultó ser susceptible con un valor de FR_{50} de 2.69x. Alta resistencia se observó a clorpirifos en las cepas de SANTIAGO DE CUBA (15.94x), JAMAICA (10.86x) y COSTA RICA (15.94x), sin embargo, resultaron susceptible a este OF las cepas de CIUDAD HABANA (0.61x), PANAMÁ (2.17x), NICARAGUA (3.04x) y PERÚ (4.06x), mientras que la resistencia fue moderada en la cepa de VENEZUELA (6.95x).

Tabla 1. Valor de concentración letal media (CL_{50}) y Factor de Resistencia (FR_{50}) para insecticidas organofosforados en larvas de *Aedes aegypti* de Cuba y otros países de América Latina.

	Temefos	Malation	Fention	Pirimifos metil	Fenitroton	Clorpirifos
S. CUBA ^a CL_{50}	0.071 (0.07-0.08)	0.79 (0.7-0.8)	0.052 (0.05-0.06)	0.064 (0.06-0.07)	0.038 (0.03-0.04)	0.11 (0.1-0.2)
^b FR_{50}	59.16	1.79	5.30	8.20	4.04	15.94
^c b (\pm DE)	7.1 (\pm 0.7)	5.1 (\pm 0.6)	4.5 (\pm 0.4)	6.4 8 \pm 0.5)	10.1 (\pm 1.0)	6.7 (\pm 1.4)
C.HABANA CL_{50}	0.11 (0.08-0.1)	0.47 (0.4-0.5)	0.13 (0.1-0.2)	0.37 (0.3-0.4)	0.092 (0.08-0.1)	0.0042 (0.003-0.004)
FR_{50}	91.60	1.070	13.26	47.43	9.78	0.61
b (DE)	3.24 (\pm 0.4)	4.0 (\pm 0.5)	4.24 (\pm 0.4)	1.56 (\pm 0.2)	3.88 (\pm 0.5)	4.6 (\pm 0.5)
JAMAICA CL_{50}	0.051 (0.04-0.05)	0.58 (0.5-0.6)	0.034 (0.03-0.04)	0.059 (0.05-0.06)	0.038 (0.03-0.04)	0.075 (0.06-0.08)
FR_{50}	42.50	1.31	3.46	7.56	4.04	10.86
b (\pm DE)	6.5 (\pm 0.5)	6.3 (\pm 0.6)	5.2 (\pm 0.5)	6.2 (\pm 0.7)	6.0 (\pm 0.6)	5.1 (\pm 1.4)
PANAMÁ CL_{50}	0.028 (0.02-0.03)	0.88 (0.83-0.93)	0.021 (0.01-0.02)	0.096 (0.08-0.1)	0.045 (0.04-0.05)	0.015 (0.01-0.02)
FR_{50}	23.33	2.0	2.14	12.30	4.78	2.17
b (\pm DE)	5.2 (\pm 0.5)	8.3(\pm 1.1)	3.6 (\pm 0.2)	3.6 (\pm 0.4)	6.2 (\pm 0.5)	3.0 (\pm 0.2)

Tabla 1 (cont)

	Temefos	Malation	Fention	Pirimifos metil	Fenitroton	Clorpirifos
C. RICA ^a CL ₅₀	0.082 (0.07-0.08)	0.61 (0.57-0.65)	0.024 (0.02-0.03)	0.084 (0.08-0.09)	0.042 (0.04-0.05)	0.11 (0.09-0.1)
^b FR ₅₀	68.33	1.38	2.44	10.76	4.46	15.94
^c b (±DE)	5.9 (±0.7)	(6.7±0.7)	5.9 (±0.7)	6.1 (±0.7)	6.3 (±0.05)	5.2 (±0.5)
NICARAGUA CL ₅₀	0.011 (0.009-0.01)	0.096 (0.09-0.1)	0.029 (0.02-0.03)	0.021 (0.01-0.02)	0.0077 (0.007-0.008)	0.021 (0.01-0.02)
FR ₅₀	9.16	0.22	2.96	2.69	0.82	3.04
b(±DS)	4.9	4.7 (±0.5)	4.7(±0.7)	5.5 (±0.5)	8.2	4.1 (±0.8)
PERÚ CL ₅₀	0.027 (0.02-0.04)	0.57 (0.3-1.5)	0.065 (0.06-0.07)	0.077 (0.07-0.1)	0.012 (0.009-0.01)	0.028 (0.02-0.05)
FR ₅₀	22.50	1.29	6.63	9.87	1.27	4.06
b (±DE)	0.9 (±0.1)	0.8 (±0.1)	4.5 (±0.4)	1.8 (±0.2)	1.2 (± 0.1)	1.2 (±0.2)
VENEZUELA CL ₅₀	0.015 (0.01-0.02)	0.18 (0.2-0.3)	0.0087 (0.8-0.9)	0.08 (0.08-0.09)	0.036 (0.03-0.04)	0.048 (0.04-0.06)
FR ₅₀	12.50	0.44	0.89	10.10	3.82	6.95
b (± DE)	2.2 (±0.3)	2.1(±0.2)	3.3 (±0.3)	5.6 (±0.5)	2.5 (±0.3)	5.4(±0.4)
Rock CL ₅₀	0.0012 (0.001-0.002)	0.44 (0.4-0.5)	0.0098 (0.009-0.01)	0.0078 (0.007-0.009)	0.0094 (0.009-0.010)	0.0069 (0.006-.007)
b(±DE)	6.2 (±0.7)	2.1 (±0.2)	6.0 (±1.2)	3.6 (±0.5)	7.7 (±1.1)	5.1 (0.8)

Número de larvas evaluadas: 1000 por insecticida ^a Concentración letal media (CL₅₀) en mg/litro, 95%, límites de confianza (LC) están en paréntesis. ^bFactor de Resistencia (FR₅₀): CL₅₀ cepa a evaluar/ CL₅₀ cepa ROCKEFELLER. ^c b es la pendiente de la recta Probit-log, Desviación Estándar (± DE) está en paréntesis.

4.1.2. Bioensayos de susceptibilidad y/o resistencia en adultos.

De acuerdo al criterio de la OMS, susceptibilidad se considera (entre 98 y 100 % de mortalidad), verificación de la resistencia (entre 80 y 97 %) y alta resistencia (menor de 80 % de mortalidad). Los resultados se muestran en la tabla 2.

Organoclorado DDT: Todas las cepas resultaron ser resistentes al organoclorado DDT con el valor más bajo de porcentaje de mortalidad en la cepa de CIUDAD HABANA (17.0 %), seguido por la cepa de NICARAGUA (29.1 %), VENEZUELA (37.5 %), COSTA RICA (57.4 %), PERÚ (58.4 %), PANAMÁ (63.3 %), JAMAICA (65.6 %) y la cepa de SANTIAGO DE CUBA que mostró un valor de 70.2 % de mortalidad.

Piretroides: Susceptibles a lambdacialotrina resultaron ser las cepas S. CUBA (98.5 %), PANAMÁ (100 %), NICARAGUA (100 %) y VENEZUELA (98 %), en verificación las cepas de JAMAICA (96.4 %) Y COSTA RICA (83.5 %) y resistentes las cepas de C. HABANA (70 %) y PERÚ (56.3 %) . Con respecto a la cipermetrina resultaron ser susceptible las cepas: C. HABANA (98.5 %), COSTA RICA (100 %), NICARAGUA (100 %) y VENEZUELA (98 %), en verificación: S. CUBA (94.4%), JAMAICA (96.1%), PANAMÁ (95.6%) y PERÚ (95.2%) y ninguna mostró resistencia. En el caso de la deltametrina, la mayoría de las cepas resultaron estar en verificación de la resistencia, como fueron SC (93 %), C. HABANA (95%), COSTA RICA (97.3%), NICARAGUA (94.6%), PERÚ (95.2%) y VENEZUELA (93 %), sólo la cepa de PANAMÁ resultó susceptible a este insecticida con valor de 99.2 % de mortalidad y resistente resultó ser la cepa de JAMAICA (72.7%). Al piretroide ciflutrina resultaron susceptibles las cepas de S. CUBA, COSTA RICA Y VENEZUELA, con resultados de % de mortalidad de 98.8, 99.7 y 100 respectivamente, resistentes resultaron las cepas de C. HABANA (75 %) y PERÚ (66.7 %) y en verificación: JAMAICA (82.8 %), PANAMÁ (96.4 %) y NICARAGUA (96.9 %).

Organofosforado clorpirifos: Resultaron susceptibles a clorpirifos las cepas de S. CUBA, NICARAGUA y VENEZUELA, con un valor de 100 % de mortalidad en las tres cepas para este organofosforado, sin embargo fueron resistentes las cepas de C. HABANA (72 %), JAMAICA (77.5 %) y PERÚ (64.1 %) y en verificación PANAMÁ (96.2 %) y COSTA RICA (94.8 %).

Tabla 2. Nivel de susceptibilidad y/o resistencia a los insecticidas piretroides (lambdacialotrina, cipermetrina, deltametrina y ciflutrina), al organofosforado clorpirifos y al organoclorado DDT en adultos de las cepas de *Aedes aegypti* de Cuba (CIUDAD HABANA, SANTIAGO DE CUBA) y otros países de América Latina.

Insecticidas	Cepas							
	S. DE CUBA	C.HABANA	JAMAICA	PANAMÁ	COSTA RICA	NICARAGUA	PERÚ	VENEZUELA
	Mortalidad (%)							
DDT (4% /0.5 h) ^a	70.2	17.0	65.6	63.3	57.4	29.1	58.4	37.5
Lambdacialotrina (0.1%/1h)	98.5	70.0	96.4	100.0	83.5	100	56.3	98.0
Cipermetrina (0.1%/1h)	94.4	98.5	96.1	95.6	100	100	95.2	100.0
Deltametrina (0.1%/1h)	93.8	95.0	72.7	99.2	97.3	94.6	95.2	93.0
Ciflutrina (0.1%/1h)	98.8	75.0	82.8	96.4	99.7	95.9	66.7	100.0
Clorpirifos (1 %/1h)	100.0	72.0	77.5	96.2	94.8	100	64.1	100.0

^a La dosis del insecticida en % y el tiempo de exposición están en paréntesis. Número de larvas evaluadas: 1000 por insecticida

4.2. Determinación de los mecanismos de resistencia utilizando sinergistas.

Se determinó in vivo los mecanismos de resistencia de esterasas a través de los sinergistas DEF, inhibidor de esterasas y PB inhibidor de las monooxigenasas (MO). Como se puede observar en la tabla 3 el sinergista DEF potenció la acción del insecticida organofosforado temefos en todas las cepas evaluadas, lo cual se manifestó a través del alto valor del factor de sinergismo ($FS > 5$), corroborándose el papel de las esterasas en la resistencia a temefos en las cepas de estudio. El más alto valor de FS se observó en la cepa COSTA RICA (31.53), seguido de PERÚ (18.8), JAMAICA (18.21), PANAMÁ (13.33) y muy similar en S. CUBA (6.45) y CIUDAD HABANA (6.47), el resto de las cepas mostraron valores menores de 5, NICARAGUA (1.22), y VENEZUELA (2.63). El piperonil butóxido (PB) no potenció la acción del temefos en ninguna cepa, dado por el bajo valor del FS ($FS < 5$), lo que demostró que las MO no jugaron un papel importante en la resistencia a temefos. La resistencia a pirimifos metil estuvo dada por los mecanismos de esterasas en las cepas de PANAMÁ (120), PERÚ (17.54) y VENEZUELA (5.78) y por las MO en PANAMÁ (1200) y PERÚ (33.47). El DEF potenció la acción del clorpirifos, lo cual demostró el papel de las esterasas en la resistencia a este insecticida, el más alto valor se observó en JAMAICA (39.47), seguido de PERÚ (31.11), COSTA RICA (16.41), SC (16.17) Y VENEZUELA (10), Las monooxigenasas resultaron ser mecanismo de resistencia a clorpirifos con un valor de FS en las cepas de JAMAICA Y PERÚ, de 11.36 y 13.33 respectivamente.

Tabla 3. Valores de CL_{50} y factor de sinergismo (FS) para insecticidas organofosforados, utilizando los sinergistas DEF y PB, en larvas de *Aedes aegypti*, procedente de diferentes países de América.

	DEF			PB		
	Temefos	P. metil	Clorpirifos	Temefos	P. metil	Clorpirifos
S. CUBA ^a CL_{50}	0.011 (0.01-0.02)	0.098 (0.09-0.1)	0.0068 (0.006-0.007)	0.088 (0.08-0.09)	0.18 (0.1-0.2)	0.086 (0.07-0.09)
^b FS	6.45	0.65	16.17	0.81	0.35	1.27
C.HABANA CL_{50}	0.017 (0.01-0.02)	0.11 (0.09-0.02)	-	0.51 (0.4-0.5)	0.71 (0.7-0.8)	-
FS	6.47	3.36	-	0.21	0.52	-
JAMAICA CL_{50}	0.0028 (0.002-0.003)	0.015 (0.01-0.02)	0.0019 (0.01-0.02)	0.0089 (0.008-0.01)	0.040 (0.03-0.04)	0.0066 (0.006-0.007)
FS	18.21	3.93	39.47	5.73	1.47	11.36
PANAMÁ CL_{50}	0.0021 (0.001-0.002)	0.00080 (0.007-0.0008)	-	0.0032 (0.003-0.004)	0.00008 (0.00007-0.0008)	-
FS	13.33	120.0	-	8.75	1200.0	-
COSTA RICA CL_{50}	0.0026 (0.02-0.03)	0.041 (0.03-0.04)	0.0067 (0.006-0.007)	0.12 (0.09-0.1)	0.11 (0.09-0.1)	0.038 (0.03-0.04)
FS	31.53	2.05	16.41	0.68	0.76	2.89

Tabla 3 (Cont.)

	DEF			PB		
	Temefos	P. metil	Temefos	P. metil	P. metil	Clorpirifos
NICARAGUA ^a CL ₅₀	0.0090 (0.008-0.009)	-	-	0.088 (0.01-0.02)	-	-
^b FS	1.22	-	-	0.81	-	-
PERÚ CL ₅₀	0.0015 (0.001-0.002)	0.057 (0.05-0.06)	0.0009 (0.0005-0.0009)	0.0012 (0.001-0.002)	0.0023 (0.002-0.003)	0.0021 (0.002-0.003)
FS	18.0	17.54	31.11	2.25	33.47	13.33
VENEZUELA CL ₅₀	0.0057 (0.005-0.007)	0.014 (0.01-0.02)	0.0048 (0.004-0.005)	0.023 (0.02-0.03)	0.61 (0.6-0.7)	0.026 (0.02-0.03)
FS	2.63	5.78	10.0	0.65	0.13	1.84
ROCK CL ₅₀	0.012 (0.01-0.02)	0.012 (0.01-0.01)	0.0045 (0.004-0.005)	0.022 (0.02-0.02)	0.027 (0.02-0.03)	0.026 (0.01-0.02)
FS	0.10	0.65	1.53	0.054	0.29	0.43

Número de larvas evaluadas: 1000 por insecticida, ^a Concentración letal media (CL₅₀) en mg/litro, 95% Límites de confianza (LC) están en paréntesis, ^bFactor de sinergismo (FS): CL₅₀ insecticida sin sinergista/ CL₅₀ insecticida + sinergista (DEF ó PB).

Cepas donde no se realizaron ensayos con sinergistas ya que no hubo resistencia a los insecticidas temefos, p. metil o clorpirifos.

4.3. Modificación de las técnicas bioquímicas

Se realizó la adaptación de los ensayos bioquímicos para la detección de los mecanismos de resistencia de elevada actividad de esterasas y glutatión transferasa, que usualmente se utilizaban en *Culex quinquefasciatus*, para *Aedes aegypti*, para lo cual se utilizó la cepa de SANTIAGO DE CUBA, la cual poseía alta resistencia a temefos y clorpirifos, además se utilizó la cepa susceptible de referencia ROCKEFELLER.

4.3.1 Esterasas

Una vez incluida las nuevas variantes al método (concentración de sustrato saturante 70 mM y el tiempo óptimo de reacción de 10 min), se evaluaron las cepas ROCKEFELLER y SANTIAGO DE CUBA para establecer los valores de actividad enzimática que permitieron diagnosticar entre individuos con presencia o ausencia de estos mecanismos de resistencia, basados en la actividad de estas enzimas.

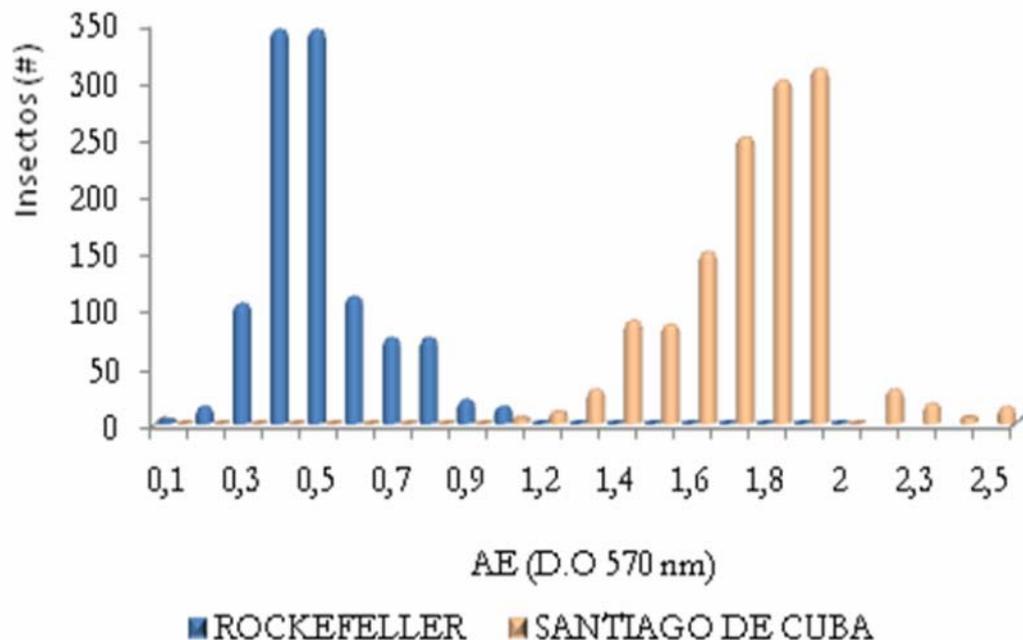


Fig. 1. Patrones de distribución de actividad de esterasas en la cepa susceptible ROCKEFELLER y de laboratorio de SANTIAGO DE CUBA de *Aedes aegypti*.

Esterasas: Para ello se evaluaron 1108 larvas individuales de la cepa de referencia susceptible ROCKEFELLER, para la detección de actividad de esterazas, resultando ser de un valor medio de 0.528 y la desviación estándar de ± 0.233 . Valores por encima de 1.227 (media + 3DE) fueron considerados valores de alta actividad enzimática.

4.3.2 Glutation transferasa (GST)

GST: En la detección de GST, se utilizaron las nuevas variantes introducidas al método (30 mM de glutation reducido y 50 mM de CDNB), concentraciones saturantes que lograron discriminar bien entre la cepa susceptible (ROCKEFELLER) y la resistente a insecticidas (SANTIAGO DE CUBA), y se tomó como tiempo óptimo de reacción de 3 min.

Se establecieron los rangos de baja actividad de GST, evaluando 288 larvas de la cepa ROCKEFELLER, cuyo valor medio de actividad enzimática, expresado como $\mu\text{mol}/\text{min}$ y la desviación estándar (DE) fue de 0.37 ± 0.0998 . Valores por encima de $0.6694 \mu\text{mol}/\text{min}$ (media + 3DE) fueron considerados como elevada actividad de GST.

En la Fig. 2 se muestra la distribución de actividad de GST en la cepa de ROCKEFELLER y SANTIAGO DE CUBA.

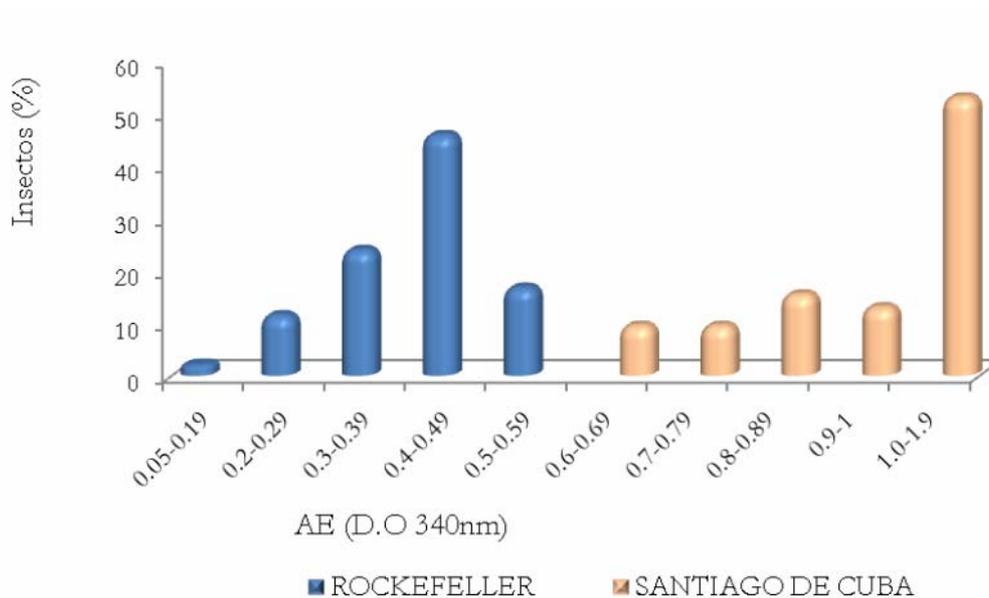


Fig. 2. Variación de la actividad de la enzima glutacion transferasa (GST), expresada en D.O/min en larvas de *Aedes aegypti*.

4.4. Determinación de los mecanismos de resistencia a través de pruebas bioquímicas.

Como se muestra en la tabla 4 la frecuencia en que se encontró incrementada la actividad de las enzimas estererasas y GST fue alta (>40%), sin embargo, el mecanismo de resistencia de la AchEr resultó estar presente a muy baja frecuencia, lo cual demostró que este no intervino en la resistencia detectada a los insecticidas evaluados. Los valores más altos de frecuencia de estererasas se observaron en C. HABANA y COSTA RICA con un valor del 100 % en ambas cepas, seguido de S. DE CUBA (93.0 %) y JAMAICA (87 %), PERÚ (52 %), VENEZUELA (42 %) y baja frecuencia se observó en NICARAGUA (31.0 %). Los valores de frecuencia de alta actividad de GST, aunque más bajos que las estererasas, resultaron también elevados en algunas cepas como en S. CUBA (57.0 %), C. HABANA (57.0 %) y PERÚ (45 %), baja frecuencia se detectó en JAMAICA (9%), PANAMÁ (12.0 %), COSTA RICA (19.0 %), NICARAGUA (14.0 %) y VENEZUELA (35.0 %).

Tabla 4. Frecuencia (%) en la que se encuentran elevadas la actividad de las enzimas estererasas, GST y la enzima acetilcolinesterasa modificada (AchEr) en las cepas evaluadas.

Cepa	Mecanismos de resistencia		
	Esteras	GST	AchEr
	Frecuencia (%)		
SANTIAGO DE CUBA	93.0	57.0	4.3
CIUDAD HABANA	100	57.0	1.1
JAMAICA	87.0	9.0	0.01
PANAMÁ	80.0	12.0	1.4
COSTA RICA	100	19.0	0.53
NICARAGUA	31.0	14.0	0.53
PERÚ	52.0	45.0	0.32
VENEZUELA	42.0	35.0	0.53
ROCKEFELLER	0.0	0.0	0.0

Número de larvas evaluadas = 352 larvas por cepa para cada mecanismo de resistencia.

4.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida para esterasas en cepas de *Aedes aegypti*

La electroforesis en gel de poliacrilamida para determinar los patrones de esterasas en las poblaciones en estudio reveló la presencia de bandas de esterasas que fueron nombradas A ó B, de acuerdo a la especificidad de la reacción con los sustratos inespecíficos de la enzima α o β naftil acetato. Estas esterasas fueron numeradas teniendo en cuenta la movilidad relativa, la cual fue calculada como la distancia del origen a la banda correspondiente, dividida por la distancia total de la banda que más migró en 45 min (R_m).

El análisis de los patrones electroforéticos reveló el incremento de actividad de una banda de esterasa, nombrada como A4 en SANTIAGO DE CUBA con un R_m de 0.78. En todas las cepas de estudio se observó alta intensidad de la banda de la esterasa A4, excepto en PANAMÁ y PERÚ y muy baja en la cepa de referencia ROCKEFELLER (Fig. 3).

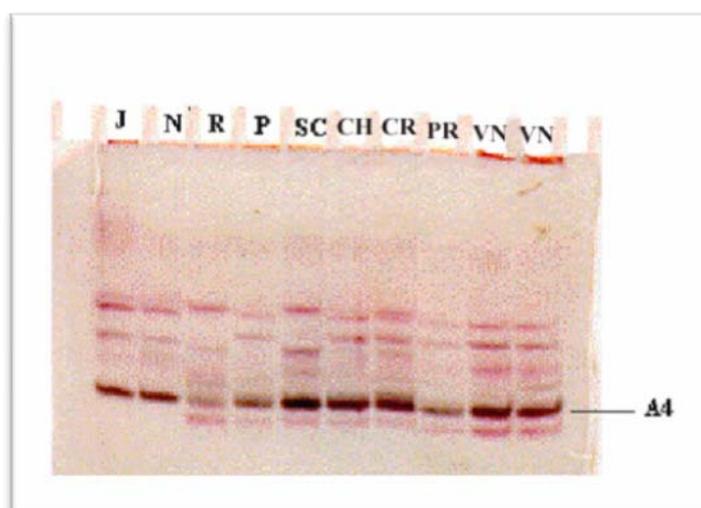
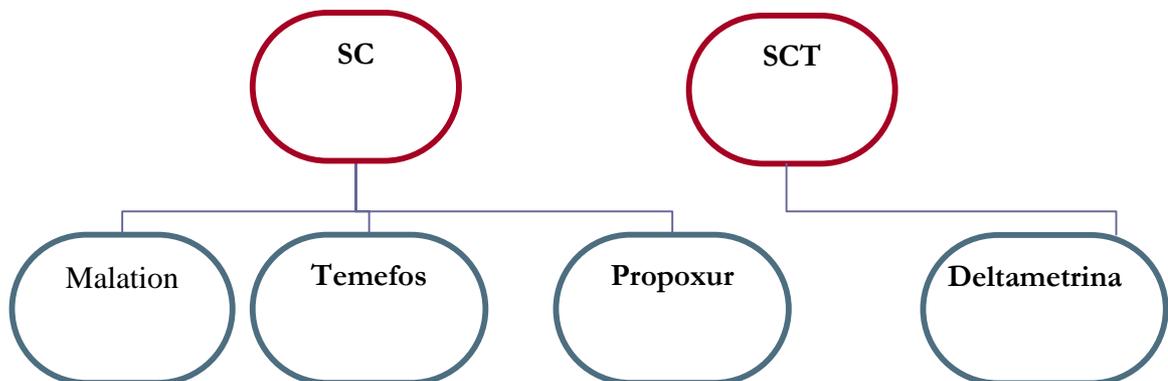


Fig. 3. Patrón electroforético de esterasas observadas en cepas de América Latina. De izquierda a derecha: J: JAMAICA, N: NICARAGUA, R: ROCKEFELLER, P: PANAMÁ, SC: SANTIAGO DE CUBA, C: CIUDAD HABANA, CR: COSTA RICA, PR: PERÚ Y VN: VENEZUELA.

4.6. Selección de cepas de referencia resistentes a insecticidas

Con la ocurrencia del brote de dengue ocurrido en 1997 en el municipio de Santiago de Cuba, se colectaron mosquitos adultos de *Aedes aegypti* que se encontraban reposando indistintamente, unos reposaban de forma normal en las paredes hasta 1m de altura y otros se encontraron reposando, de forma inusual, en los techos de las viviendas, de ahí se criaron dos cepas de *Aedes aegypti* en el insectario del IPK, nombradas SANTIAGO DE CUBA (SC) y SANTIAGO DE CUBA TECHO (SCT) respectivamente. Se evaluó en las dos cepas la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides. Estas cepas no mostraron diferencias morfológicas ni genéticas. Ambas cepas mostraron similares patrones de resistencia a los insecticidas organofosforados, sin embargo, SCT difirió de SC por la elevada resistencia al piretroide deltametrina (Bisset y cols, 2005).

Para llevar a cabo el proceso de selección con los diferentes insecticidas, se utilizó estas cepas colectadas en el Municipio de Santiago de Cuba. La cepa de SC fue utilizada para la selección con temefos, malation y propoxur y la cepa de SCT para la selección con deltametrina, por su alto valor de resistencia a este piretroide, como se ilustra en el diagrama.



4.6.1. Selección de una cepa de *Aedes aegypti* resistente a temefos.

4.6.1.1. Evolución de la resistencia a temefos

Los valores de Factor de Resistencia (FR_{50}) a temefos en la cepa de SANTIAGO DE CUBA (SC), así como en las sucesivas generaciones de selección con temefos (SANTEM-F1 a SANTEM-F6) se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Concentración letal que causó el 50 % (LC_{50}) y 90 % (LC_{90}) de mortalidad y factor de resistencia correspondiente (FR_{50} and FR_{90}) calculado para temefos en SANTIAGO DE CUBA y en las sucesivas generaciones de selección (SANTEM-F1-F6).

CEPA	^a CL_{50} (Límites de confianza)	^a CL_{90} (Límites de confianza)	^b FR_{50}	FR_{90}	^c b (± DE)
SANTIAGO DE CUBA	0.071 (0.07-0.08)	0.11 (0.1-0.117)	19.72	13.25	7.19 (±0.72)
SANTEM-F1	0.058 (0.05-0.06)	0.087 (0.08-0.1)	16.11	10.48	7.25 (±0.64)
SANTEM-F2	0.066 (0.06-0.07)	0.17 (0.1-0.2)	18.33	20.48	3.08 (±0.44)
SANTEM-F3	0.079 (0.07-0.09)	0.27 (0.2-0.4)	21.94	32.53	2.39 (±0.32)
SANTEM-F4	0.47 (0.4-0.5)	1.091 (0.9-1.3)	130.55	131.44	3.49 (±0.41)
SANTEM-F5	0.53 (0.5-0.6)	1.15 (1.0-1.4)	147.22	138.55	3.83 (±0.41)
SANTEM-F6	0.73 (0.7-0.8)	1.19 (1.1-1.3)	202.77	143.37	6.02 (±0.61)
ROCKEFELLER	0.0036 (0.00032-0.0040)	0.0083 (0.0073-0.098)	1.0	1.0	3.5 (± 0.3)

Número de larvas evaluadas: 500 por insecticida, ^a CL_{50} Concentración letal media y 90 en mg/litro; 95% Límite de confianza (CL) en paréntesis, ^b Factor de resistencia (FR_{50} ó 90): CL_{50} ó 90 cepa a evaluar/ CL_{50} cepa ROCKEFELLER. ^c Pendiente de la recta probit-log, Desviación estandar (± DE) está, en paréntesis.

4.6.1.2. Resistencia cruzada a insecticidas organofosforados

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 6, La selección con temefos no provocó incremento en la resistencia a otros insecticidas organofosforados.

Tabla 6. Resistencia cruzada a insecticidas organofosforados en *Aedes aegypti* de SANTIAGO DE CUBA, después de tres (SANTEM-F3) y seis (SANTEM-F6) generaciones de selección.

INSECTICIDAS	^a CL ₅₀ (LC)	^a CL ₉₀ (LC)	^b FR ₅₀	^b FR ₉₀	^c b (±DE)
MALATION					
ROCK	0.44 (0.38-0.53)	1.71 (1.24-2.82)	1.0	1.0	2.19 (±0.27)
S. DE CUBA	0.79 (0.73-0.85)	1.41 (1.22-1.76)	1.79	0.82	5.10 (±0.66)
SANTEM- F3	0.68 (0.61-0.75)	1.48 (1.26-1.93)	1.54	0.86	3.81 (±0.51)
SANTEM-F6	0.65 (0.60-0.69)	1.14 (1.01-1.03)	1.47	0.66	5.22 (±0.51)
FENTION					
ROCK	0.0098 (0.009-0.011)	0.016 (0.014-0.024)	-	-	6.04 (±1.29)
S. DE CUBA	0.052 (0.048-0.056)	0.099 (0.088-0.11)	5.30	6.18	4.59 (±0.44)
SANTEM- F3	0.064 (0.059-0.07)	0.11 (0.10-0.13)	6.53	6.87	5.25 (±0.50)
SANTEM-F6	0.12 (0.11-0.14)	0.33 (0.26-0.45)	12.24	20.62	3.08 (±0.32)
FENITROTION					
ROCK	0.0094 (0.0088-0.010)	0.014 (0.012-0.017)	-	-	7.75 (±1.16)
S. DE CUBA	0.038 (0.036-0.041)	0.051 (0.048-0.057)	4.1	3.7	10.17 (±1.09)
SANTEM- F3	0.046 (0.042-0.049)	0.076 (0.068-0.088)	4.9	5.5	5.93 (±0.63)
SANTEM-F6	0.096 (0.088-0.10)	0.096 (0.15-0.22)	10.2	12.8	4.89 (±0.58)

Número de larvas evaluadas: 500 por insecticida, ^a CL₅₀ C oncentración letal media y 90 en mg/litro, 95% Límite de confianza (CL) en paréntesis, ^bFactor de resistencia (FR₅₀ ó 90): CL₅₀ ó 90 cepa a evaluar/ CL₅₀ cepa ROCKEFELLER. ^c Pendiente de la recta probit-log, Desviación estandar (± DE) está, en paréntesis.

La resistencia a fenitrotion varió de un FR_{50} inicial de 5.30x en SC a 12.24x en SANTEM-F6, comparando los valores de CL_{50} , y varió a fenitrotion de un valor de 4.1x a 10.2x. Los valores de FR_{50} para malation tampoco fueron afectados después de seis generaciones de selección con temefos, variando de un valor de FR_{50} de 0.79x en SANTIAGO DE CUBA a 0.65x en SANTEM-F6.

4.6.1.3. Resistencia cruzada a insecticidas piretroides

Se incrementó la resistencia a piretroides durante el proceso de selección con temefos (tabla 7).

Tabla 7. Resistencia cruzada a piretroides en *Aedes aegypti* de SANTIAGO DE CUBA, después de tres (SANTEM-F3) y seis (SANTEM-F6) generaciones de selección con temefos.

	^a CL_{50}	^a CL_{90}	^b FR_{50}	^b FR_{90}	^c b (\pm DE)
DELTA METRINA					
ROCK	0.000080 (0.00007-0.00008)	0.00021 (0.00017-0.00028)	-	-	2.86 (\pm 0.28)
S. DE CUBA	0.00038 (0.0001-0.0006)	0.0016 (0.0012-0.0022)	4.75	7.61	2.07 (\pm 0.49)
SANTEM- F3	0.0081 (0.0071-0.0097)	0.027 (0.019-0.045)	101.2	128.57	2.47 (\pm 0.031)
SANTEM-F6	0.027 (0.022-0.032)	0.12 (0.091-0.19)	337.5	571.42	1.89 (\pm 0.18)
CIPERMETRINA					
ROCK	0.0013 (0.0008-0.002)	0.0088 (0.006-0.02)	-	-	1.53 (\pm 0.24)
S. DE CUBA	0.0094 (0.0087-0.010)	0.015 (0.013-0.019)	7.23	1.70	6.14 (\pm 0.93)
SANTEM- F3	0.018 (0.015-0.021)	0.038 (0.031-0.048)	13.84	4.32	3.91 (\pm 0.49)
SANTEM-F6	0.017 (0.015-0.020)	0.048 (0.041-0.062)	13.07	5.45	2.90 (\pm 0.25)
CIFLUTRINA					
ROCK	0.0013 (0.0011-0.0015)	0.0026 (0.0021-0.0037)	-	-	4.11 (\pm 0.52)
S. DE CUBA	0.0078 (0.0069-0.009)	0.021 (0.016-0.032)	6.0	8.07	2.91 (\pm 0.35)
SANTEM- F3	0.042 (0.032-0.049)	0.081 (0.073-0.097)	32.30	31.15	4.52 (\pm 0.82)
SANTEM-F6	0.045 (0.035-0.062)	0.25 (0.15-0.56)	34.61	96.15	1.72 (\pm 0.21)

Número de larvas evaluadas: 500 por insecticida, ^a CL_{50} Concentración letal media y 90 en mg/litro; 95% Límite de confianza (CL) en paréntesis, ^b Factor de resistencia (FR_{50} ó 90): CL_{50} ó 90 cepa a evaluar/ CL_{50} cepa ROCKEFELLER. ^c Pendiente de la recta probit-log. Desviación estandar (\pm DE) está, en paréntesis.

Se observó un valor alto de resistencia a deltametrina dado por el valor de FR_{50} (71.05x), calculado a partir de la CL_{50} , varió de un FR_{50} inicial de 4.75x en SANTIAGO DE CUBA a 337.50x en SANTEM-F6 después de la selección. También se observó incremento, pero menor, a ciflutrina (5.76x) y cipermetrina (1.80x).

4.6.1.4. Variación de la frecuencia de los mecanismos de resistencia

La frecuencia de los mecanismos de acción metabólica de esterasas y GST se incrementaron durante el proceso de selección con temefos, de un valor de frecuencia en SANTIAGO DE CUBA de 12 % hasta un valor de 55 % en SANTEM-F6. La enzima acetilcolinesterasa modificada se encontró a muy baja frecuencia, lo cual indicó que no estuvo asociada a la resistencia detectada a los insecticidas en estudio en SANTEM-F6. (Fig. 4). Existió una alta correlación ($p \leq 0.05$) entre el factor de resistencia a temefos en la cepa SANTEM-F6 y la frecuencia de los mecanismos de esterasas ($r=0.98$) y GST (0.92), sin embargo la correlación resultó baja para el mecanismo de AchEr (-0.62).

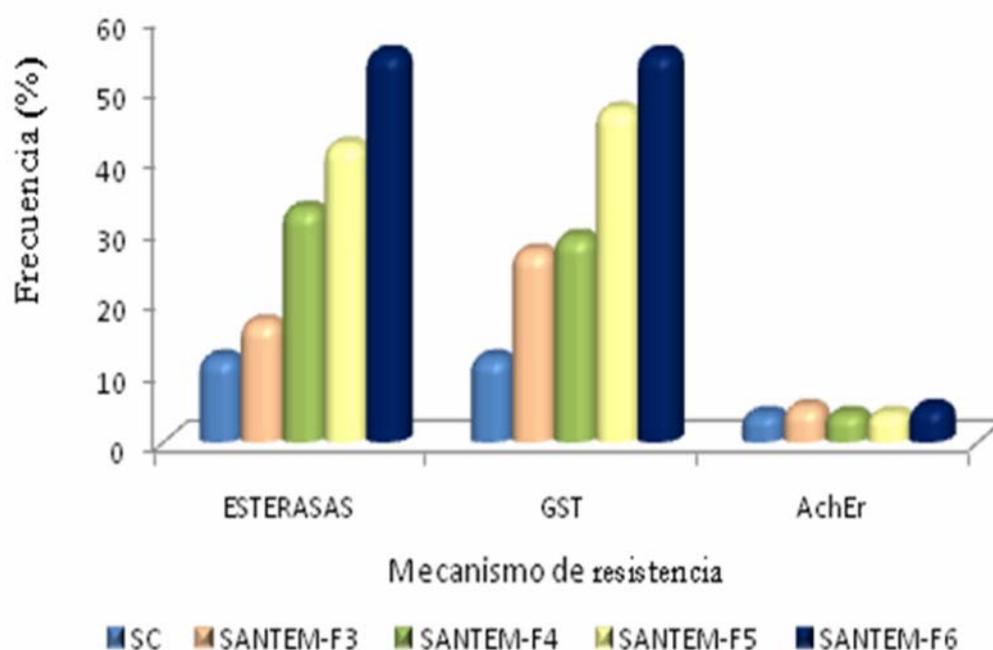


Fig. 4. Valores de frecuencia (%) de los mecanismos de esterasas, GST y acetilcolinesterasa modificada (AchE), observadas en cepas de *Aedes aegypti* después de tres (SANTEM-F3), cuatro (SANTEM-F4), cinco (SANTEM-F5) y seis (SANTEM-F6) generaciones de selección con temefos.

4.6.1.5. Estudios con sinergistas

Se realizaron estudios con los sinergistas DEF (S, S, S tributyl phosphorotrithioate) y TFF (Trifenilfosfato), ambos inhibidores de esterasas, PB (piperonil butóxido), inhibidor de las monooxigenasas (MO) y ácido etacrínico (AE), inhibidor de la enzima GST para determinar in vivo si estas enzimas, cuya frecuencia se incrementó en el proceso de selección con temefos, constituían mecanismos de resistencia a este organofosforado y cruzada a los piretroides. Los resultados indicaron que las esterasas jugaron un papel importante en la resistencia a temefos por su alto valor de sinergismo, tanto para el DEF (165.91), como para el TFF (869.04), sin embargo, los ensayos con el sinergista PB, indicaron que las enzimas MO no intervinieron en la resistencia detectada a temefos (FS=2.28). También intervino en la resistencia a temefos la enzima GST, con un valor de FS de 178.05 (Tabla 8). Los dos sinergistas DEF y TFF, potenciaron la acción de los tres piretroides, lo cual se evidenció por los valores de FS mayores de 5 (56.66, 23.68 y 5.29) para los insecticidas cipermetrina, ciflutrina y deltametrina respectivamente), utilizando DEF. El TFF potenció la acción de los tres piretroides con un valor de FS de 18.49 para cipermetrina, 4500.0 para ciflutrina, y 150.0 para deltametrina. También potenció la acción de estos piretroides el PB, con valores de 13.1, 77.6 y 69.2 y el AE con valores elevados de 54.83 para cipermetrina, 750.0 para ciflutrina y 27.0 para deltametrina. Estos resultados indicaron que la resistencia cruzada a piretroides encontrada durante el proceso de selección con temefos está dada por mecanismos de acción metabólica, dado por el incremento de actividad de las tres enzimas: esterasas, monooxigenasas y glutatión transferasa. Además que la resistencia a temefos estuvo dada por el incremento de las enzimas esterasas y GST, pero no de las MO.

Tabla 8. Evaluación de tres insecticidas piretroides (cipermetrina, ciflutrina y deltametrina) y del organofosforado temefos con los sinergistas DEF, PB, TFF y AE en las cepas de *Aedes aegypti* seleccionada con temefos por 6 generaciones (SANTEM-F6).

	Temefos	Cipermetrina	Ciflutrina	Deltametrina
SANTEM-F6 ^aCL₅₀	0.73 (0.71-0.76)	0.017 (0.015-0.020)	0.045 (0.035-0.062)	0.027 (0.0222-0.032)
SANTEM-F6 ^bCL₅₀ DEF	0.0044 (0.0041-0.0052)	0.00030 (0.0001-0.0009)	0.0019 (0.0005-0.0034)	0.0051 (0.00006-0.0010)
^c FS DEF	165.91	56.66	23.68	5.29
SANTEM-F6 CL₅₀ TFF	0.00084 (0.00078-0.00083)	0.00092 (0.00048-0.0014)	0.00001 (0.000001-0.00003)	0.00018 (0.00008-0.00028)
^c FS TFF	869.04	18.47	4500.0	150.0
SANTEM-F6 CL₅₀ PB	0.32 (0.30-0.44)	0.0013 (0.0007-0.0019)	0.00058 (0.00001-0.0018)	0.00039 (0.00002-0.00017)
^c FS PB	2.28	13.07	77.58	69.23
SANTEM-F6 CL₅₀ AE	0.0041 (0.0036-0.0046)	0.00031 (0.00006-0.00052)	0.00006 (0.00001-0.00013)	0.001 (0.00072-0.0016)
^c FS AE	178.05	54.83	750.0	27.0

Número de larvas evaluadas: 500 por insecticida. ^a Concentración letal media sin sinergista. 95% Límites de confianza en paréntesis. ^b Concentración letal media utilizando sinergistas (DEF, PB, TFF Ó AE). ^c Factor de sinergismo (FS): CL₅₀ sin sinergista/ **CL**₅₀ con sinergistas (DEF, PB, TFF Ó AE).

4.6.1.6. Detección de la actividad de esterasas en gel de poliacrilamida

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó para visualizar la actividad de esterasas en la cepa de origen (SANTIAGO DE CUBA) y después de seis generaciones de selección con temefos (cepa SANTEM-F6). La intensidad de la banda de esterasa nombrada previamente como Est. A4 fue mayor en SANTEM-F6, comparada con la cepa original SANTIAGO DE CUBA, y no se observó elevada en la cepa susceptible de referencia (ROCKEFELLER). (Fig. 5.)

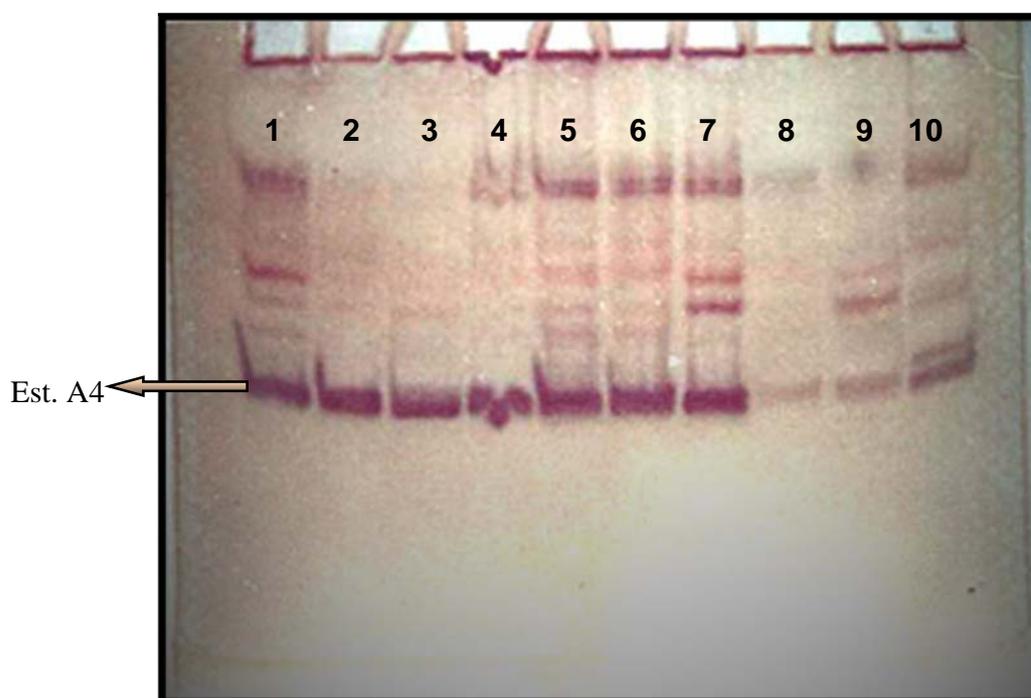


Fig. 5. Actividad de esterasa A4 observada en *Aedes aegypti* después de seis generaciones de selección con temefos. Las primeras 7 muestras de izquierda a derecha corresponden a larvas individuales de la cepa SANTEM-F6, las muestras 8 y 9 corresponden a la cepa ROCKEFELLER y la muestra 10 a la cepa original de SANTIAGO DE CUBA.

Los resultados de los estudios de inhibición en gel revelaron que la actividad de la esterasa A4 se inhibió con temefos, pero no con los piretroides (Fig. 6), lo cual indicó que las esterasas constituyen un mecanismo de resistencia a temefos a través del metabolismo del mismo, a diferencia de los piretroides que pudo ser a través de un mecanismo de secuestro del insecticida por estas enzimas, es decir que las esterasas se unen al insecticida, impidiendo que el insecticida actúe sobre el sitio blanco.

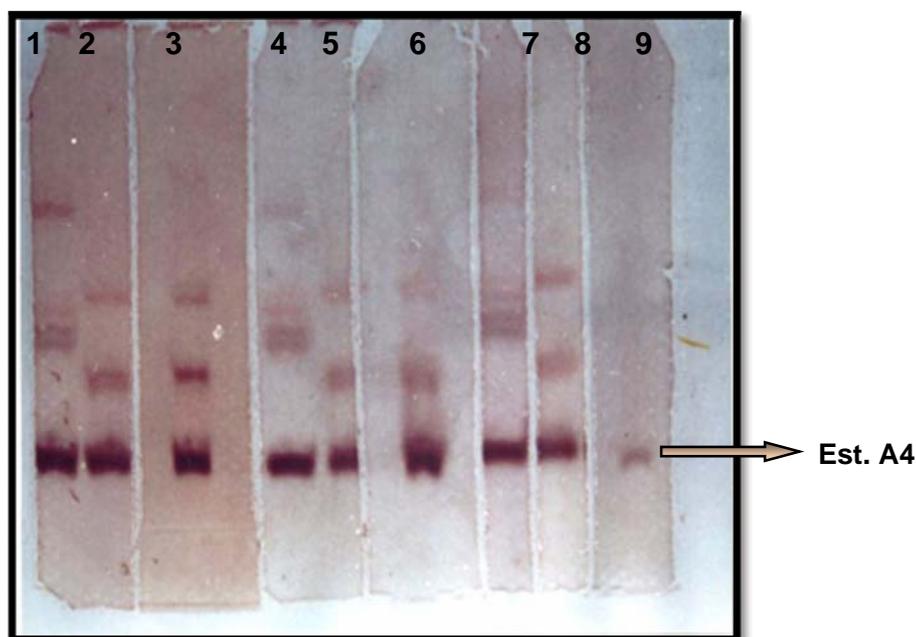


Fig. 6. Inhibición de la actividad de estera A4 con temefos, deltametrina y lambdacialotrina en larvas individuales de la cepa SANTEM-F6. Enumerando de izquierda a derecha, las muestras 1, 4 y 7, corresponden a la actividad normal de esterases, muestras 2, 5 y 8 al control con acetona, muestra 3, inhibición con lambdacialotrina (10^{-2} M), muestra 6: inhibición deltametrina (10^{-2} M), y la última muestra número 9: corresponde a la inhibición con temefos (10^{-2} M).

4.6.2. Selección de una cepa de *Aedes aegypti* resistente a malation.

4.6.2.1. Evolución de la resistencia a malation

Los valores de la recta de regresión dosis-respuesta para el insecticida malation y los factores de resistencia (FR_{50}) en las cepas de SANTIAGO DE CUBA y las sucesivas generaciones de selección se muestran en la tabla 9. Después de 5 generaciones de selección con este insecticida no se observó incremento en los valores de factor de resistencia, oscilando desde un valor de FR_{50} de 1.79x en SANTIAGO DE CUBA hasta 2.22x en SANMAL-F5. Los valores elevados de las pendientes en todas las cepas indicaron que estas resultaron ser homogéneas con respecto a la susceptibilidad a malation.

Tabla 9. Concentración letal media que causó el 50 % (CL_{50}) y 90 % (CL_{90}) de mortalidad y su correspondiente valor de factor de resistencia (FR_{50} y FR_{90}) calculado para las cepas de SANTIAGO DE CUBA y las sucesivas generaciones de selección con malation (SANMAL-F1-F5).

Cepa	^a CL_{50} (Límites de confianza)	^a CL_{90} (Límites de confianza)	^b FR_{50}	^b FR_{90}	^c b (± DE)
SANTIAGO DE CUBA	0.79 (0.73-0.85)	1.41 (1.22-1.76)	1.79	0.82	5.11 (±0.66)
SANMAL- F1	0.55 (0.55-0.59)	0.84 (0.78-0.84)	1.25	0.49	6.99 (±0.84)
SANMAL- F2	0.68 (0.63-0.73)	1.26 (1.11-1.49)	1.54	0.89	4.84 (±0.47)
SANMAL- F3	0.79 (0.73-0.75)	1.12 (1.0-1.25)	1.79	0.79	8.58 (±0.98)
SANMAL- F4	0.85 (0.77-1.042)	1.46 (1.15-2.52)	1.93	1.035	5.51 (±1.15)
SANMAL- F5	0.98 (0.79-1.14)	2.21 (1.92-2.66)	2.22	1.56	3.64 (±0.48)
ROCKEFELLER	0.44 (0.38-0.53)	1.71 (1.24-2.82)	-	-	2.19 (±0.27)

^a Concentración que causa el 50 y 90 % de mortalidad (CL_{50} ó CL_{90}) en mg/litro 95 %, Límites de confianza en paréntesis. ^b Factor de Resistencia (FR_{50} ó FR_{90}) = CL_{50} ó CL_{90} cepa a evaluar / CL_{50} ó CL_{90} de la cepa ROCKEFELLER ^c Pendiente de la recta de regresión probit-log, Desviación estándar (± DE) en paréntesis. Se evaluaron un total de 500 larvas por cepa.

4.6.2.2. Resistencia cruzada a insecticidas organofosforados

Tabla 10. Resistencia cruzada a organofosforados en *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba, después de tres (SANMAL-F3) y cinco (SANMAL-F5) generaciones de selección con malation.

Insecticida Cepa	^a CL ₅₀ (LC)	^a CL ₉₀ (LC)	^b FR ₅₀	^b FR ₉₀	^c b (±DE)
Temefos					
ROCK	0.0012 (0.00092-0.0015)	0.012 (0.0072-0.029)	-	-	1.27 (±0.18)
S. DE CUBA	0.071 (0.067-0.076)	0.11 (0.11-0.12)	59.16	9.16	7.19 (±0.72)
SANMAL- F3	0.077 (0.073-0.082)	0.11 (0.102-0.12)	64.16	9.16	8.25 (±0.93)
SANMAL-F5	0.079 (0.074-0.082)	0.12 (0.10-0.13)	65.83	10.0	7.99 (±0.88)
Fention					
ROCK	0.0098 (0.0091-0.011)	0.016 (0.014-0.024)	-	-	6.042 (±1.29)
S. DE CUBA	0.052 (0.048-0.056)	0.099 (0.09-0.1)	5.31	6.18	4.59 (±0.44)
SANMAL- F3	0.075 (0.071-0.077)	0.092 (0.088-0.097)	7.65	5.75	13.98 (±1.74)
SANMAL-F5	0.095 (0.088-0.099)	0.41 (0.38-0.51)	9.69	25.62	1.85 (±0.38)
Fenitrothion					
ROCK	0.0094 (0.0088-0.010)	0.014 (0.012-0.017)	-	-	7.75 (±1.16)
S. DE CUBA	0.038 (0.036-0.041)	0.051 (0.048-0.057)	4.04	3.64	10.17 (±1.09)
SANMAL- F3	0.049 (0.046-0.052)	0.065 (0.059-0.076)	5.21	4.64	13.98 (±1.74)
SANMAL-F5	0.051 (0.047-0.053)	0.067 (0.061-0.077)	5.42	4.78	10.57 (±1.72)

^a Concentración letal media o 90 (CL₅₀ ó 90) en mg/litro 95% Límites de confianza en paréntesis, ^b Factor de Resistencia (FR₅₀ ó 90): CL₅₀ ó 90 cepa a evaluar/CL₅₀ ó 90 de la cepa ROCKEFELLER. ^c Pendiente de la recta probit-log. Desviación estándar (± DE) en paréntesis, Se evaluaron un total de 500 larvas por insecticida.

La variación de la resistencia a los insecticidas organofosforados temefos, fention y fenitrothion durante el proceso de selección con malation se muestran en la tabla 10. La presión de selección con malation en la cepa de SANTIAGO DE CUBA no generó resistencia cruzada a insecticidas organofosforados. La cepa original de SANTIAGO DE CUBA mostró alta resistencia a temefos (59.16x) la cual varió poco hasta la F5 con un valor de 65.83x. La resistencia a fention y a fenitrothion tuvo también poca variación, se mantuvo moderada (FR_{50} entre 5 y 10 x) desde la cepa original hasta SANMAL-F5.

4.6.2.3. Resistencia cruzada a piretroides

El proceso de selección con malation en la cepa de *Aedes aegypti* de SANTIAGO DE CUBA generó resistencia cruzada a piretroides, muy marcada a deltametrina, con una variación de valor de FR_{50} de 4.75x en SANTIAGO de CUBA hasta 287.5x en SANMAL-F3 y 275.0x en SANMAL-F5 (tabla 11). La selección con malation incrementó también la resistencia a cipermetrina 4.57 veces, desde un valor de FR_{50} de 7.23x en SANTIAGO DE CUBA hasta 33.07x en la cepa SANMAL-F5, 4.1 veces se incrementó para ciflutrina, obteniéndose un valor de FR_{50} en SANMAL-F5 de 24.61x y solamente 2.34x a lambdacialotrina, desde un valor de FR_{50} en SC de 8.10x hasta 19.0x en SANMAL-F5.

Tabla 11. Resistencia cruzada a piretroides en *Aedes aegypti* de SANTIAGO DE CUBA, después de tres (SANMAL-F3) y cinco generaciones (SANMAL-F5) de selección con malation.

Insecticida	^a CL ₅₀ (LC)	^a CL ₉₀ (LC)	^b FR ₅₀	^b FR ₉₀	^c b (±DE)
Deltametrina					
ROCK	0.00008 (0.00007-0.00008)	0.00021 (0.00017-0.00028)	-	-	2.86 (±0.28)
S. DE CUBA	0.00038 (0.0001-0.0006)	0.0016 (0.0012-0.0022)	4.75	7.62	2.07 (±0.49)
SANMAL- F3	0.023 (0.019-0.026)	0.068 (0.054-0.092)	287.5	323.8	2.68 (±0.22)
SANMAL-F5	0.022 (0.017-0.027)	0.11 (0.079-0.16)	275.0	523.81	1.90 (±0.23)
Cipermetrina					
ROCK	0.0013 (0.00076-0.0018)	0.0088 (0.0060-0.016)	-	-	1.53 (±0.24)
S. DE CUBA	0.0094 (0.0087-0.011)	0.015 (0.013-0.019)	7.23	1.70	6.14 (±0.93)
SANMAL- F3	0.020 (0.017-0.024)	0.065 (0.052-0.088)	15.38	7.38	2.56 (±0.22)
SANMAL-F5	0.043 (0.0037-0.015)	0.088 (0.078-0.12)	33.07	10.0	3.13 (±0.31)

Tabla 11 (Cont)

	^a CL ₅₀ (LC)	^a CL ₉₀ (LC)	^b FR ₅₀	^b FR ₉₀	^c b (±DE)
Insecticida					
Ciflutrina					
ROCK	0.0013 (0.0011-0.0015)	0.0026 (0.0021-0.0037)	-	-	4.11(±0.52)
S. DE CUBA	0.0078 (0.0069-0.0091)	0.021 (0.016-0.032)	6.0	8.27	2.91 (±0.35)
SANMAL- F3	0.017 (0.015-0.021)	0.062 (0.048-0.087)	13.07	23.84	2.33 (±0.22)
SANMAL-F5	0.032 (0.029-0.045)	0.095 (0.087-1.071)	24.61	36.53	2.45 (±0.43)
Lambdacialotrina					
ROCK	0.0010 (0.00084-0.0012)	0.0013 (0.00076-0.0018)	-	-	2.26 (±0.23)
S. DE CUBA	0.0081 (0.0076-0.0091)	0.016 (0.013-0.019)	8.10	12.30	4.64 (±0.54)
SANMAL- F3	0.013 (0.0092-0.011)	0.032 (0.025-0.048)	13.0	24.61	2.58 (±0.34)
SANMAL-F5	0.019 (0.017-0.022)	0.044 (0.038-0.054)	19.0	33.84	3.66 (±0.35)

^a Concentración letal media ó 90 (CL₅₀ ó 90) en mg/litro 95% Límites de confianza en paréntesis, ^b Factor de Resistencia (FR₅₀ ó 90) = CL₅₀ ó 90 cepa a evaluar / CL₅₀ ó 90 de la cepa ROCKEFELLER. ^c Pendiente de la recta probit-log, Desviación estándar (± DE) en paréntesis, Se evaluaron un total de 500 larvas por insecticida.

4.6.2.4. Variación de la frecuencia de los mecanismos de resistencia

En la fig. 7 se observan los valores de frecuencia de los mecanismos de resistencia de esterasas, GST y AchEr, utilizando los métodos bioquímicos en placas de microtitulación de ELISA para la cepa de SANTIAGO DE CUBA y después de tres (SANMAL-F3) y cinco generaciones de selección (SANMAL-F5).



Fig. 7. Frecuencia (%) de los mecanismos de resistencia de acetilcolinesterasa modificada (AchE), GST y esterasas en SANTIAGO DE CUBA y después de tres (SANMAL-F3) y de cinco (SANMAL-F5) generaciones de selección con malation.

Se observó incremento de la frecuencia del mecanismo de GST desde un valor de frecuencia en larvas de SANTIAGO DE CUBA de 5 % a 42 % en SANMAL-F5, sin embargo no se observó un incremento apreciable en la frecuencia de esterasas y AchEr. No se obtuvo correlación entre el factor de resistencia a malation en las sucesivas generaciones de selección con este insecticida y los cambios en la frecuencia de esterasas ($r=0$), GST ($r=0.55$) y AchEr (0.35). Al parecer la resistencia cruzada que se observó a los piretroides está asociada con el incremento observado de la frecuencia de alta actividad de la enzima GST.

4.6.3. Selección de una cepa de *Aedes aegypti* resistente a deltametrina.

4.6.3.1. Evolución de la resistencia a deltametrina.

Los valores de dosis-respuesta de la línea probit y los valores de factor de resistencia (FR_{50}) observados en la cepa de SANTIAGO DE CUBA TECHO (SCT) y en las sucesivas generaciones de selección (SANDELTA-F1 a SANDELTA-F12) con deltametrina se muestran en la Tabla 12.

Table 12. Valores de concentración letal que causa el 50 % (CL_{50}) y 90 % (LC_{90}) de mortalidad y factor de resistencia correspondiente (FR_{50} y FR_{90}) calculado para deltametrina en SANTIAGO DE CUBA (SCT) y en las distintas generaciones de selección (SANDELTA-F1-F3-F6--F9 y SANDELTA-F12). Las pendientes de la línea probit indicaron el grado de homogeneidad de la resistencia.

CEPA	^a CL ₅₀ (LC)	^a CL ₉₀ (LC)	^b FR ₅₀	^b FR ₉₀	^c b (± DE)
SCT	0.0091 (0.0083-0.010)	0.020 (0.017-0.025)	113.75	95.23	3.75 (±0.35)
SANDELTA-F1	0.011 (0.0095-0.012)	0.029 (0.024-0.037)	137.50	138.09	3.036 (±0.32)
SANDELTA-F3	0.015 (0.013-0.018)	0.071 (0.055-0.11)	187.50	338.09	1.92 (±0.19)
SANDELTA-F6	0.057 (0.047-0.066)	0.23 (0.18-0.35)	712.25	1095.23	2.075 (±0.24)
SANDELTA-F9	0.091 (0.077-0.11)	0.36 (0.25-0.65)	1137.50	1714.28	2.12 (±0.25)
SANDELTA-F12	0.11 (0.089-0.17)	0.45 (0.27-1.065)	1375.0	2142.85	2.16 (±0.30)
ROCK	0.00008 (0.00007-0.00008)	0.00021 (0.00017-0.00028)	-	-	2.86 (±0.2)

^a Concentración letal media ó 90 (CL_{50} ó 90) en mg/litro 95% Límites de confianza en paréntesis, ^b Factor de Resistencia (FR_{50} ó 90)= CL_{50} ó 90 cepa a evaluar/ CL_{50} ó 90 de la cepa ROCKEFELLER. ^c Pendiente de la recta probit-log, Desviación estándar (± DE) en paréntesis, Se evaluaron un total de 500 larvas por insecticida.

Después de 12 generaciones de selección con deltametrina, la resistencia a este insecticida se incrementó 12.08x, de un FR_{50} inicial de 113.75x en SCT a 1375.0x en SANDELTA-F12 calculado a partir de la CL_{50} y 22.50x a partir de la CL_{90} .

4.6.3.2. Resistencia cruzada a insecticidas organofosforados

La selección con deltametrina por 12 generaciones no generó un incremento apreciable en la resistencia a insecticidas organofosforados (Tabla 13). La resistencia a malation no fue afectada por la selección con deltametrina, el FR_{50} varió de un valor de 1.22x en SANTIAGO DE CUBA a 1.43x en SANDELTA-F12. El valor de FR_{50} para fenitrothion se incrementó de un valor en SCT de 5.30x a 8.36x en SANDELTA-F3, poca variación ocurrió en las siguientes selecciones hasta SANDELTA-F12 (8.97x). La resistencia a fenitrothion se incrementó 1.65x, desde un FR_{50} inicial de 4.04x en SCT a 6.70x en SANDELTA-F12.

4.6.3.3. Resistencia cruzada a piretroides

La selección con deltametrina incrementó la resistencia a otros insecticidas piretroides (Tabla 14). Se incrementó la resistencia a lambda-cialotrina (27.11x) comparando los valores de CL_{50} , desde un valor inicial de FR_{50} de 5.90x en SANTIAGO DE CUBA a 160.0x en SANDELTA-F12. Se observó también incremento a cipermetrina, pero mucho menor (6.27x) y a ciflutrina (6.66x), comparando las cepas de SANTIAGO DE CUBA y SANDELTA-F12.

4.6.3.4. Variación de la frecuencia de los mecanismos de resistencia

La frecuencia del mecanismo de GST se incrementó durante la selección con deltametrina desde un valor de 43 % en SANTIAGO DE CUBA a 88 % en la cepa SANDELTA-F12. La actividad de esterasas tuvo una variación significativa durante las 12 generaciones de selección ($\chi^2 = 68.4912$ $p < 0.001$), pero hubo un incremento en la frecuencia de esterasas desde 12 % en la cepa original SCT hasta 63 % en SANDELTA-F6, pero disminuyó en las sucesivas generaciones de selección hasta 38 % en SANDELTA-F12. La acetilcolinesterasa modificada fue encontrada a muy baja frecuencia (Tabla 15). Existió correlación ($p \leq 0.05$) entre la resistencia a deltametrina y la frecuencia de GST ($r=0.87$), sin embargo no existió correlación con la frecuencia de esterasas ($r=0.067$), ni AchE ($r=-0.37$).

La baja correlación con las esterases es debido a la disminución de la frecuencia de estas enzimas a partir de la generación F6, lo cual puede ser debido a un efecto de saturación de este mecanismo y se continuó incrementando el de la GST.

Tabla 13. Resistencia cruzada a insecticidas organofosforados en *Aedes aegypti* de SANTIAGO DE CUBA TECHO (SCT), después de tres (SANDELTA-F3), seis (SANDELTA-F6) y doce (SANDELTA-F12) generaciones de selección con deltametrina.

Insecticida CEPA	^a CL ₅₀ (LC)	^a CL ₉₀ (LC)	^c FR ₅₀	^c FR ₉₀	b (±DE) ^b
Malation					
ROCK	0.44 (0.38-0.53)	1.71 (1.24-2.82)	-	-	2.19 (±0.27)
SCT	0.54 (0.43-0.64)	1.77 (1.46-2.4)	1.22	1.03	2.50 (±0.32)
SANDELTA- F3	0.68 (0.63-0.74)	1.22 (1.09-1.43)	1.54	0.71	5.09(±0.49)
SANDELTA-F6	1.22 (0.95-2.10)	6.081 (3.041-9.075)	2.77	3.55	1.84 (±0.39)
SANDELTA-F12	0.63 (0.47-0.97)	3.31 (1.84-8.72)	1.43	1.93	1.77 (±0.23)
Fention					
ROCK	0.0098 (0.0090-0.011)	0.016 (0.014-0.024)	-	-	6.04 (±1.29)
SCT	0.052 (0.048-0.056)	0.099 (0.088-0.11)	5.30	6.19	4.59 (±0.44)
SANDELTA- F3	0.082 (0.076-0.089)	0.14 (0.12-0.17)	8.36	8.75	5.41 (±0.63)
SANDELTA-F6	0.045 (0.040-0.051)	0.11 (0.092-0.15)	4.59	6.87	3.25 (±0.36)
SANDELTA-F12	0.088 (0.79-0.10)	0.19 (0.15-0.27)	8.97	11.87	3.86 (±0.49)
Fenitroton					
ROCK	0.0094 (0.0088-0.010)	0.014 (0.012-0.017)	-	-	7.75 (±1.16)
SCT	0.038 (0.036-0.041)	0.051 (0.048-0.057)	4.04	3.64	10.17 (±1.09)
SANDELTA- F3	0.057 (0.053-0.060)	0.086 (0.080-0.11)	6.06	6.14	7.02 (±0.61)
SANDELTA-F6	0.078 (0.073-0.090)	0.12 (0.0090-0.11)	8.29	8.57	7.89 (±0.57)
SANDELTA-F12	0.063 (0.058-0.067)	0.11 (0.096-0.12)	6.70	7.85	5.61 (±0.52)

^a Concentración letal media ó 90 (CL₅₀ ó 90) en mg/litro 95% Límites de confianza en paréntesis, ^b Factor de Resistencia (FR₅₀ ó 90) = CL₅₀ ó 90 cepa a evaluar / CL₅₀ ó 90 de la cepa ROCKEFELLER. ^c Pendiente de la recta probit-log, Desviación estándar (± DE) en paréntesis, Se evaluaron un total de 500 larvas por insecticida.

Tabla 14. Resistencia cruzada a piretroides en *Aedes aegypti* de SANTIAGO DE CUBA TECHO (SCT), después de tres (SANDELTA-F3) y doce (SANDELTA-F12) generaciones en presencia de selección con deltametrina.

Insecticida	^a CL ₅₀ (LC)	^a CL ₉₀ (LC)	^c FR ₅₀	^b b(±DE)
Lambdacialotrina				
ROCK	0.0010 (0.00084-0.0012)	0.0038 (0.0031-0.0049)	-	2.26 (±0.23)
SCT	0.0059 (0.0052-0.0068)	0.020 (0.015-0.029)	5.90	4.40 (±0.34)
SANDELTA- F3	0.081 (0.072-0.094)	0.21 (0.16-0.32)	81.0	3.10 (±0.42)
SANDELTA –F6	0.11 (0.084-0.17)	0.35 (0.21-1.042)	110.0	2.47 (±0.446)
SANDELTA –F12	0.16 (0.014-0.018)	0.043 (0.035-0.054)	160.0	2.99 (±0.24)
Cipermetrina				
ROCK	0.0013 (0.00076-0.0018)	0.0088 (0.0060-0.016)	-	1.53 (±0.24)
SCT	0.0094 (0.0087-0.010)	0.015 (0.013-0.019)	7.23	6.14 (±0.93)
SANDELTA – F3	0.021 (0.017-0.024)	0.056 (0.047-0.068)	16.15	3.015 (±0.27)
SANDELTA –F6	0.055 (0.046-0.064)	0.23 (0.17-0.35)	42.30	2.044 (±0.24)
SANDELTA –F12	0.059 (0.049-0.069)	0.25 (0.19-0.38)	45.38	1.99 (±0.17)
Ciflutrina				
ROCK	0.0013 (0.0011-0.0015)	0.0026 (0.0021-0.0037)	-	4.11(±0.52)
SCT	0.0078 (0.0069-0.0090)	0.021 (0.017-0.032)	6.0	2.91 (±0.35)
SANDELTA – F3	0.034 (0.029-0.039)	0.12 (0.099-0.16)	26.15	2.31 (±0.22)
SANDELTA –F6	0.049 (0.043-0.055)	0.14 (0.12-0.18)	37.69	2.83 (±0.31)
SANDELTA –F12	0.052 (0.034-0.79)	0.24 (0.101-0.62)	40.0	1.90 (±0.29)

^a CL₅₀ Concentración letal media en mg/litro, 95% LC en paréntesis. ^b Pendiente de la curva dosis-respuesta, desviación standar (± DE) están en paréntesis. ^cFactor de resistencia (FR₅₀)= CL₅₀ cepa a evaluar/ CL₅₀ cepa ROCKEFELLER. Número de larvas evaluadas: 1000 por insecticida

Tabla 15. Variación de las frecuencias (%) de elevada actividad de esterasas y GST, así como de la acetilcolinesterasa modificada (AcbEr) a través de 12 generaciones de selección con deltametrina (SANDELTA-F3, SANDELTA-F6, SANDELTA-F9, SANDELTA-F10, SANDELTA-F12) y la cepa original de SANTIAGO DE CUBTECHO (SCT).

CEPAS	ESTERASA	AchEr	GST
SCT	12	5	43
SANDELTA-F3	51	4	45
SANDELTA-F6	63	4	54
SANDELTA-F9	56	4	60
SANDELTA-F10	49	4	77
SANDELTA-F12	38	4	88

Número de larvas evaluadas = 396 larvas por cepa por cada mecanismo de resistencia.

4.6.3.5. Estudios con sinergistas

En la tabla 16 se muestran los valores de factor de sinergismo (FS) para todos los insecticidas piretroides, utilizando los dos sinergistas inhibidores de esterasas el DEF y TFF, el PB (inhibidor de la enzima monooxigenasa), y AE (inhibidor específico de la GST). La resistencia para todos los insecticidas piretroides disminuyó al aplicar los sinergistas DEF, TFF y PB, demostrando su acción sinérgica a través de la inhibición de las esterasas y monooxigenasas respectivamente. La resistencia a lambdacialotrina disminuyó 516.12 veces cuando se utilizó DEF y 55.17 veces cuando se aplicó PB, a cipermetrina disminuyó 190.32x con el DEF y 32.27x con el PB, a ciflutrina disminuyó 260.0x con DEF y 71.23x con PB y a deltametrina 30.55x y 84.61x respectivamente. La mayor potenciación de la acción de los insecticidas se logró con la acción sinérgica del sinergista TFF, se observó el mayor valor de FS con lambdacialotrina (1454.54), seguido por cipermetrina (327.77), ciflutrina (86.66) y deltametrina (61.11). En el caso del AE, el valor de FS mostró frente a todos los insecticidas un valor elevado, resultando el menor valor para lambdacialotrina (761.90), seguido por cipermetrina (842.85), ciflutrina (1040.0) y deltametrina (31.42).

Tabla 16. Evaluación de la toxicidad de cuatro insecticidas piretroides (lambdacialotrina, cipermetrina, ciflutrina y deltametrina) con los sinérgicos DEF, PB, TFF y AE en las cepas de *Aedes aegypti* seleccionada con deltametrina por 12 generaciones (SANDELTA-F12) y la cepa susceptible de referencia (ROCKEFELLER).

	Lambdacialotrina	Cipermetrina	Ciflutrina	Deltametrina
SANDELTA-F12^a CL₅₀	0.16 (0.014-0.018)	0.059 (0.049-0.069)	0.052 (0.034-0.79)	0.11 (0.089-0.17)
SANDELTA-F12^b CL₅₀ DEF	0.00031 (0.000030-0.00064)	0.00031 (0.00012-0.00053)	0.0002 (0.00011-0.00029)	0.0036 (0.00097-0.0063)
^c FS DEF	516.12	190.32	260.0	30.55
SANDELTA-F12^b CL₅₀ PB	0.0029 (0.0025-0.0038)	0.0018 (0.0013-0.0024)	0.00073 (0.00049-0.00097)	0.0013 (0.00070-0.0038)
^c FS PB	55.17	32.77	71.23	84.61
SANDELTA-F12^b CL₅₀ TFF	0.00011 (0.000010-0.00020)	0.00018 (0.000040-0.00030)	0.0006 (0.0001-0.001)	0.0018 (0.0012-0.0026)
^c FSTFF	1454.54	327.77	86.66	61.11
SANDELTA-F12^b CL₅₀ AE	0.00021 (0.000062-0.00041)	0.00007 (0.00001-0.00023)	0.00005 (0.000011-0.00021)	0.0035 (0.0025-0.0058)
^c FSAE	761.90	842.85	1040.0	31.42

Número de larvas evaluadas: 500 por insecticida. ^a Concentración letal media sin sinérgico. 95% Límites de confianza en paréntesis. ^b Concentración letal media utilizando sinérgicos (DEF, PB, TFF ó AE), Factor de sinérgico (FS): **CL₅₀ sin sinérgico** / **CL₅₀ con sinérgicos** (DEF, PB, TFF, AE).

Estos resultados indicaron que la resistencia a piretroides en esta cepa, tanto a deltametrina, como la resistencia cruzada a otros piretroides estuvo dada por los mecanismos de acción metabólica de esterasas, GST y oxidasas de función múltiple o monooxigenasas.

4.6.3.6. Detección de esterasas en gel de poliacrilamida

Se realizaron estudios de inhibición de esterasas en gel de poliacrilamida para analizar si los piretroides podían actuar inhibiendo estas enzimas. El patrón electroforético observado para SANDELTA –F12 (Fig. 8) demostró que las esterasas no se inhibieron por la acción de los piretroides deltametrina, lambdacialotrina, cipermetrina y ciflutrina.

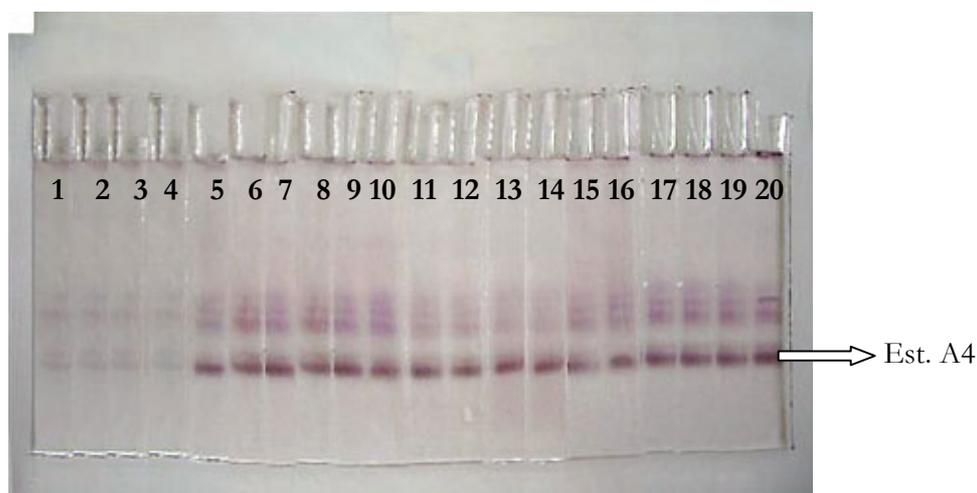


Fig. 8. Patrón de esterasas observados en larvas individuales de la cepa SANDELTA-F12 en presencia de insecticidas piretroides. De izquierda a derecha, Rock: 1,2; control con acetona: 3,4; actividad de esterasa normal de la cepa SANDELTA-F12: 5,6, 9,10,13,14,17,18; actividad de esterasas en presencia de deltametrina [(10⁻² M): 7, (10⁻³ M): 8], lambdacialotrina [(10⁻² M): 11, (10⁻³ M):12]; cipermetrina [(10⁻² M): 15, (10⁻³ M): 16, y ciflutrina [(10⁻² M): 19, (10⁻³ M): 20].

La esterasa A4 es amplificada en SANDELTA-F12, comparada con la cepa susceptible ROCK, pero no es inhibida por los piretroides. Al parecer la acción de las esterasas como mecanismo de resistencia a piretroides es por secuestro del insecticida y no por inhibición de la enzima.

4.6.3.7. Bioensayos de adultos

Los mosquitos adultos de la cepa seleccionada con deltametrina en (SANDELTA-F12) resultaron también ser resistentes a todos los insecticidas piretroides y al DDT (Tabla 17).

Tabla 17. Resultados de los bioensayos de adultos utilizando al organoclorado DDT, y los piretroides en la cepa seleccionada con deltametrina (SANDELTA-F12) y en la cepa susceptible de referencia (ROCKEFELLER).

CEPA	SANDELTA-F12	ROCKEFELLER
	% Mortalidad (24 h)	% Mortalidad (24 h)
Cipermetrina (0.1 %)	42	100
Ciflutrina (0.1 %)	73	100
Deltametrina (0.1 %)	46	100
Lambdacialotrina (0.1 %)	41	100
DDT	6.73	100
Control	0	0

De acuerdo al criterio de la OMS, (WHO, 1992) para la interpretación de los resultados sobre el criterio de resistencia: cuando la mortalidad es menor de 80 % (población resistente), entre 80 y 98 % (Vigilancia estrecha), y mayor de 98 % (Susceptible).

4.6.4. Selección de una cepa resistente al insecticida carbamato propoxur.

4.6.4.1. Evolución de la resistencia a propoxur

El nivel de resistencia a propoxur se incrementó 4.75x durante el proceso de selección con este insecticida, al comparar los valores de FR_{90} , variando desde un valor de 18.03x en SC a 85.92x en la cepa de SANPROP-F13. La frecuencia del mecanismo de acetilcolinesterasa modificada (AchEr) se incrementó en cada generación de selección, desde un valor de frecuencia de 4.3 % en SC a 57 % en la cepa SANPROP-F13 (Fig. 9).

Existió una significativa correlación ($r= 0.96$) entre la variación de la resistencia a propoxur y la frecuencia de la AchEr modificada ($p<0.05$) en cada generación de la selección con propoxur (SANPROP-F1_ SANPROP- F13). Sin embargo, no existió para esterasas ($r= 0.16$), ni para GST (0.02).

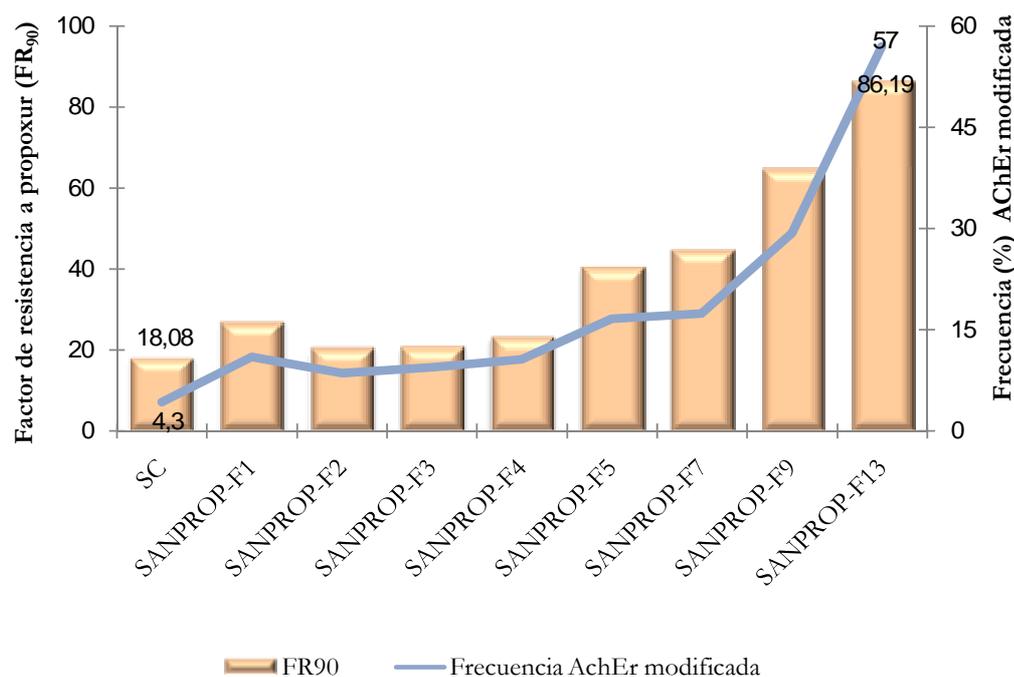


Fig. 9. Factor de resistencia (FR_{90}) a propoxur, calculado a partir de la CL_{90} , Frecuencia (%) del mecanismo de acetilcolinesterasa modificada (AchEr) en *Aedes aegypti* de SANTIAGO DE CUBA (SC) y en las sucesivas generaciones de selección con propoxur: SANPROP-F1 -F5, SANPROP-F7, SANPROP-F9 y SANPROP-F13.

4.6.4.2. Estudios con sinergistas para determinar in vivo los mecanismos de resistencia a propoxur.

Los resultados con los sinergistas DEF y PB indicaron que ninguna de las dos enzimas fueron responsables de la resistencia a propoxur en SC y en SANPROP-F13 ya que los valores de factor de sinergismo (FS) en ambas cepas fueron menores de 5 y muy similares a los valores de la cepa de referencia susceptible ROCKEFELLER (Tabla 18).

Tabla 18. Efecto de los sinergistas DEF y PB en la cepa original de SANTIAGO DE CUBA, la última generación de selección con propoxur (SANPROP-F13) y la cepa de *Ae. aegypti* susceptible a insecticidas (ROCKEFELLER).

Cepa	FS ^a DEF + Propoxur	FS ^a PB + Propoxur
ROCKEFELLER	0.5	0.6
SANTIAGO DE CUBA	1.2	1.8
SANPROP-F13	1.0	1.0

^aFactor de sinergismo (FS) = CL_{50} insecticida sin sinergista / CL_{50} insecticida + sinergista DEF ó PB.

Los resultados con los sinergistas se corresponden bien con la baja frecuencia en que se observó incrementada la actividad de esterases y GST. (tabla 19).

Tabla 19. Valores de frecuencia (%) de los mecanismos de esterases y GST observada en *Aedes aegypti* de SANTIAGO DE CUBA (SC) y en la generación 13 de selección con propoxur (SANPROP-F13).

Cepa	Esterasa (%) ^a (n)	GST (%) ^b (n)
SANTIAGO DE CUBA	12.0 (350)	13.0 (350)
SANPROP-F13	11.2 (186)	12.5 (186)

^a La actividad de esterasa fue medida como densidad óptica (DO).

^b La actividad de la glutatión transferasa fue medida como actividad enzimática.

(n) El número total de larvas evaluadas están en paréntesis.

4.6.4.3. Resistencia cruzada a insecticidas organofosforados

El nivel de resistencia cruzada a insecticidas organofosforados temefos, malation, clorpirifos, fention, fenitrotion y pirimifos-metil, durante el proceso de selección con propoxur se muestra en la Fig. 10.

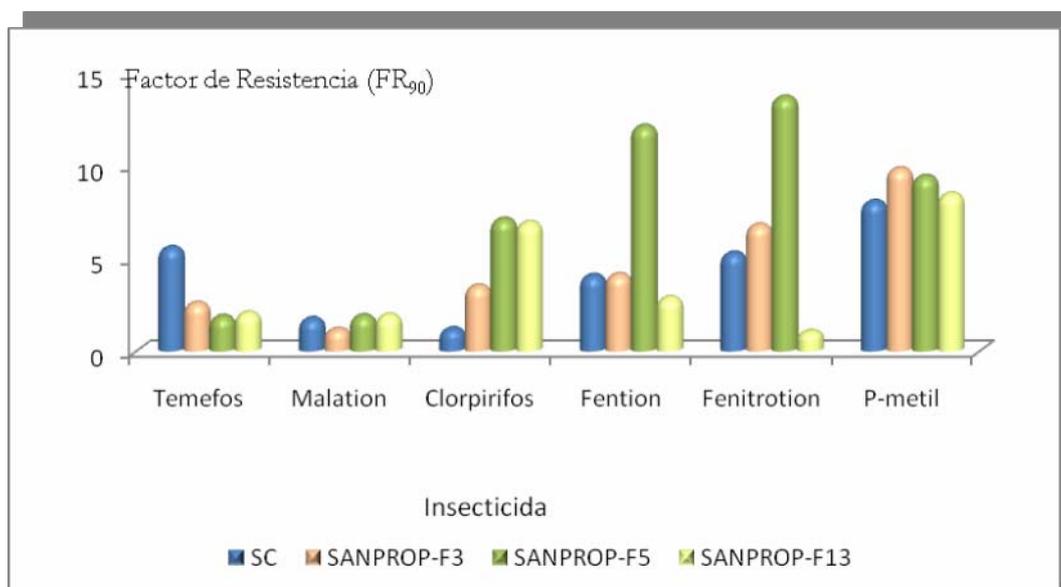


Fig. 10. Variación del factor de resistencia (FR_{50}) a temefos, malation, fenitrotion, fention y pirimifos metil en SANTIAGO DE CUBA (SC) y en las sucesivas generaciones de selección con propoxur: SANPROP-F1-F5 Y SANPROP-F13.

El FR_{50} disminuyó para temefos, pero todos los valores de FR_{50} fueron menores de 10x para este insecticida. Los valores de FR_{50} para malation y pirimifos-metil variaron muy poco, pero se observó un incremento para el clorpirifos, pero no resultó alta resistencia, la cual es considerada para valores de FR mayores de 10x. El FR_{50} para fenitrotion y fention no mostró mucha variación entre SC y SANPROP-F3, pero aumentó hasta SANPROP-F5 y declinó de SANPROP-F5 a SANPROP-F13, mostrando un efecto de resistencia cruzada negativa en la 13 generación de selección con propoxur.

4.7. Frecuencia de una mutación posiblemente asociada al gen *Kdr* en las cepas resistentes a insecticidas.

La mayoría de los mosquitos silvestres (o susceptibles a insecticidas) tienen el codón GTA en la posición 1,016 que codifica para el aminoácido valina (Val1,016) de un gen presente en los canales de sodio de la membrana nerviosa del insecto (blanco de insecticidas organoclorados y piretroides).

Se detectó una mutación en este alelo que posiblemente esté asociada en *Aedes aegypti* al mecanismo de resistencia tipo gen Kdr y consistió que en vez de ser GTA, ahora es ATA este último codifica para el aminoácido Isoleucina en el mismo residuo 1,016 (alelo Iso1,016). Para determinar la asociación entre esta mutación y la resistencia a insecticidas se determinó la frecuencia en que apareció el alelo A en los mosquitos de las diferentes cepas seleccionadas con deltametrina, propoxur y temefos.

El producto de amplificación del alelo Iso1,016 se observó en gel de agarosa. En el gel se pudo observar el genotipo homocigótico (Iso1,016/Iso1,016) con un tamaño de 75 pb, el genotipo presente en una población normal de mosquitos con ausencia de esta mutación (Val1,016/Val1,016), con un tamaño de 125 pb y el genotipo heterocigótico (Iso1,016/Val1,016), con presencia de las dos bandas (75 y 125 pb) (Fig. 11).

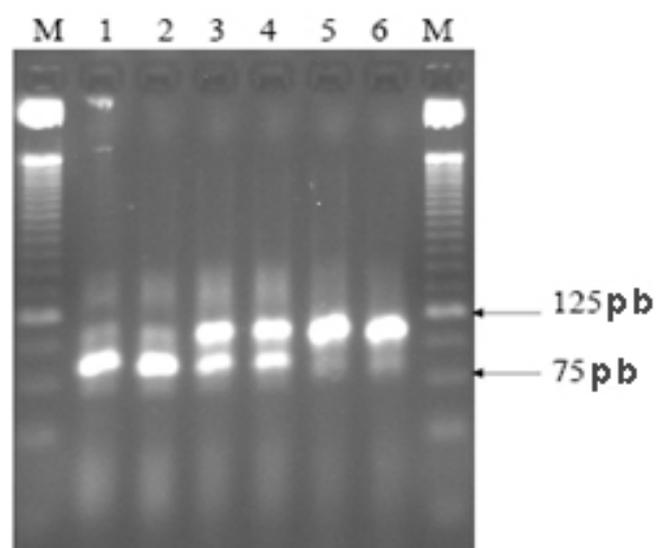


Figura 11. Patrones de amplificación observados para el alelo Iso1,016 (presenta mutación del gen) y Val1,016 (alelo normal), en gel de agarosa al 4 %. El genotipo homocigótico (Iso1,016/Iso1,016) aparece en las líneas 1 y 2, el genotipo heterocigótico (Val1,016/ Iso1,016) en las líneas 3 y 4 y el genotipo normal (Val1,016/ Val1,016) en las líneas 5 y 6. El marcador de peso molecular (25 pb, Sigma, EUA) se muestra en la línea M.

La frecuencia en que apareció el alelo Iso1, 016 aumentó significativamente de 0.033 en la cepa SANTIAGO DE CUBA a 0.567 (Prueba exacta de Fisher, $P = 4.68 \times 10^{-11}$) en la generación F12 y a 0.867 ($P = 2.20 \times 10^{-16}$) en la generación siguiente de selección con deltametrina (cepas SANDELTA-F12 y SANDELTA-F13). Sin embargo la frecuencia de Iso1,016 disminuyó significativamente desde 0.033 a 0.018 ($P = 1.000$) en la cepa seleccionada con temefos, pero se incrementó ($P = 8.78 \times 10^{-7}$) hasta 0.400 en la cepa seleccionada con propoxur (SANPROP-F14). (Fig. 12).

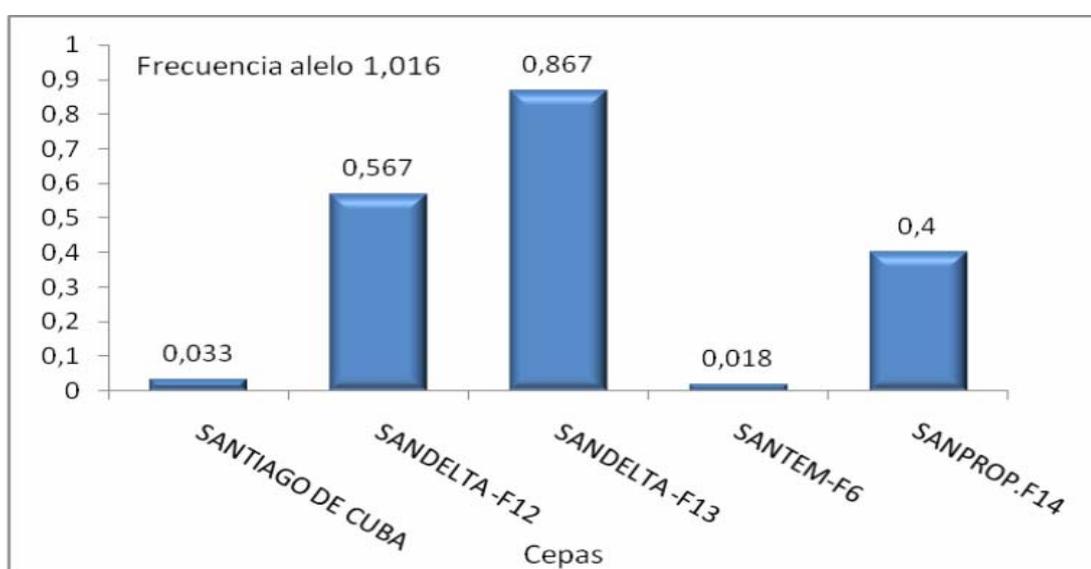


Figura 12. Frecuencia del alelo Iso1, 016 en la cepa de SANTIAGO DE CUBA, antes y después de la selección con el piretroide deltametrina (SANDELTA-F12 y SANDELTA-F13); con el organofosforado temefos (SANTEM-F6) y con el carbamato propoxur (SANPROP-F14).

5. DISCUSIÓN

Bioensayos de susceptibilidad y/o resistencia: Los insecticidas han jugado un importante papel en los programas de control de *Aedes aegypti* (L.) en los países de América, donde las epidemias de dengue, han sido básicamente controladas por el uso de insecticidas, tanto para el control de larvas, como de adultos. Dentro de los insecticidas organofosforados (OF) más utilizados para el control de *Aedes aegypti* se encuentran el temefos, utilizado como larvicida en tratamiento focal, fention, fenitrotion y malation, utilizados en tratamiento perifocal y en rociamiento intradomiciliario o espacial. En América Latina el organofosforado temefos ha sido el larvicida que más ampliamente se ha utilizado para el control de esta especie. Recientemente la OMS ha brindado otras alternativas aparte del temefos para el tratamiento focal en las aguas de consumo humano, como son el metopreno a dosis no superiores de 1 mg de ingrediente activo (ia) por litro (1 ppm), el pyriproxyfeno a dosis hasta 0.01 mg de ingrediente activo (ia) por litro (0.01 ppm) y *B. thuringiensis israelensis* (WHO, 2006). El pyriproxyfeno, un regulador del crecimiento, ha sido utilizado para el control larval de *Aedes aegypti* en tanques de almacenamiento de agua en Iquitos, Perú, este se aplicó a una dosis de ($CL_{50} = 0.012$ ppm) en el último estadio larval para evitar la emergencia del adulto), obteniendo alta mortalidad de larvas y pupas 5 meses después del tratamiento y con recambio de agua (Sihuincha y cols., 2005). En Trujillo, Venezuela y en Veracruz, Mexico también se utilizó este regulador del crecimiento en distintas formas de aplicación. En Venezuela se utilizó impregnando las cubiertas de los recipientes de almacenamiento de agua y en México se aplicó en forma de pastillas en los recipientes. Conjuntamente con el pyriproxyfeno en ambos países se utilizaron cortinas de las ventanas de las casas impregnadas con piretroides. Es de destacar que el pyriproxyfeno en pastillas no fue bien aceptado por la población, pues en Veracruz sólo el 29 % de los tanques mantuvieron las bolsas con este producto después de dos semanas de aplicado y sólo el 17 % después de 5 meses, pero a pesar de ello se logró con estas estrategias bajar las densidades del vector (Kroeger y cols., 2006).

Entre los insecticidas organofosforados evaluados, al que se observó mayor resistencia fue a temefos, seguido de clorpirifos y pirimifos metil. Sin embargo la mayoría de las cepas resultaron susceptibles a fention y todas mostraron susceptibilidad a fenitrotion y malation.

Rawlins y Ragoonansingh detectaron en 1990 resistencia a temefos en algunas poblaciones caribeñas, así como a malation, fenitroion y clorpirifos, pero no se encontró resistencia a fenitroion (Rawlins y Ragoonansingh, 1990).

Rawlins y Hing Wan en 1995 encontraron que de 34 cepas de *Aedes aegypti* evaluadas de 17 países caribeños, la mayoría mostraron resistencia a fenitroion y temefos y moderados niveles de resistencia a malation, fenitroion y clorpirifos (Rawlins y Hing Wan, 1995). Rawlins en 1998 evaluó 102 cepas de *Aedes aegypti* originarias de 16 países del Caribe y Suramérica con el larvicida temefos y el adulticida malation, ellos encontraron que la resistencia a ambos insecticidas en este vector varió en las poblaciones, dentro de un país y de un país a otro, pero en general la resistencia a malation en estado adulto no llegó al grado a la que mostraron las larvas a temefos y aumentó muy poco comparada con los grados de resistencia a estos insecticidas, determinada 4 años antes (Rawlins, 1998).

En un estudio llevado a cabo en La India se demostró que tanto *Aedes aegypti* como *Aedes albopictus* mostraron completa susceptibilidad a los organofosforados más utilizados por el Programa de Control de enfermedades transmitidas por vectores como fueron el temefos, fenitroion, malation y fenitroion (Sharma y cols., 2004). En 1999, la Fundación Nacional Brasileña para la Salud comenzó el primer Programa Nacional de Monitoreo de la resistencia a insecticidas, reportándose resistencia a temefos en varias municipalidades de Río de Janeiro y Espírito Santo (Lima y cols., 2003) y en 12 municipalidades de tres estados de Brasil (Braga y cols., 2004). Se ha demostrado una tendencia al incremento de la resistencia a temefos en países como Brasil (Braga y cols., 2005; Lima y cols., 2006) y en Tailandia (Jirakanjanakit y cols 2007a), indicando la necesidad de aplicarse otros métodos de control alternativos para poder preservar la efectividad de este larvicida. Sin embargo otros trabajos han demostrado que *Aedes aegypti* es aún susceptible a fenitroion en Brasil (Campos y Andrade 2001; Lima y cols., 2003; Sunaiyana y cols. 2006).

Todas las cepas en este estudio mostraron completa susceptibilidad a malation. Existen trabajos que han demostrado la alta susceptibilidad a este insecticida en *Aedes aegypti*, como ha sido en Texas, México (Sames y cols., 1996), La India (Sharma y cols., 2004) y en Tailandia (Ponlawat y cols., 2005). Sin embargo se ha demostrado que esta especie ha desarrollado resistencia a piretroides en Puerto Rico (Hemingway y cols., 1989); República Dominicana (Mekuria 1991) y Venezuela (Mazarri y Georghiou 1995).

Trabajos posteriores en Brasil demostraron la tendencia al incremento de la resistencia a cipermetrina en los años 2001 y 2003 (da-Cunha y cols 2005). En Tailandia varias investigaciones revelaron resistencia a los piretroides deltametrina y permetrina (Ponlawat y cols., 2005; Sunaiyana y cols., 2006; Jirakanjanakit y cols, 2007b).

En el estado adulto, todas las cepas mostraron alta resistencia a DDT. Con respecto a los piretroides, la cepa de SANTIAGO DE CUBA sólo resultó ser susceptible a lambdacialotrina y a ciflutrina. CIUDAD HABANA fue susceptible a cipermetrina a pesar de su uso en ciclos alternos con clorpirifos en la epidemia de Ciudad de La Habana ocurrida en los años 2001 y 2002. La estrategia de haber utilizado cipermetrina en esquemas de rotación con clorpirifos tanto en la epidemia ocurrida en 1997, como en la epidemia del 2001-2002, puede haber sido la causa de la no aparición de resistencia a cipermetrina, el cual, aún resultó eficaz para bajar los índices de infestación de este vector en Cuba en el año 2006 (Montada y cols. 2006), donde se utilizó sólo este piretroide en las acciones de control. En Costa Rica se logró entre el 97 y 100 % de mortalidad de *Aedes aegypti* con el piretroide lambdacialotrina tanto en tratamientos de Ultra bajo volumen (ULV), como en tratamientos térmicos (Perich y cols., 2003). En el año 2004 se reportó resistencia a deltametrina en el estado a adulto de una población de *Aedes aegypti* del distrito de Sullana, Perú y susceptibilidad en el distrito El Porvenir con % de mortalidad de 70 y 98% respectivamente (Chávez y cols. 2005).

Modificación de las técnicas bioquímicas de detección de esterasas y glutathion transferasa (GST) para su uso en *Aedes aegypti*: La incorporación de técnicas apropiadas para monitorear los cambios en la frecuencia de los mecanismos de resistencia a insecticidas en los programas de control de *Aedes aegypti* es un factor esencial para realizar un uso correcto de insecticidas ya que es el medio más efectivo para evitar o retardar la aparición de la resistencia a los mismos. Los ensayos bioquímicos se han ido adaptando, en la medida que ha aumentado la frecuencia de los mecanismos de resistencia específicos en las diferentes especies vectores. En 1990, Peiris y Hemingway establecieron un micrométodo para la detección de esterasas elevadas en *Cx. quinquefasciatus* (Peiris y Hemingway, 1990).

Brogdon y Dickinson en 1983, reportaron micrométodos para determinar la actividad de las enzimas estererasas en *Anopheles albimanus* (Brogdon y Dickinson, 1983), pero el procedimiento y la concentración de β -naftil acetato saturante y los reactivos utilizados distinguen mucho de los utilizados para *Cx. quinquefasciatus* (Peiris y Hemingway, 1990). Mazarri en 1994, también utilizó un método diferente para evaluar la actividad de estas enzimas en adultos de *Aedes aegypti* (Mazarri, Tesis MSC, 1994). Díaz y cols. 2004 modificaron la técnica de detección de GST para cepas cubanas de *Cx. quinquefasciatus* (Díaz y cols. 2004), la cual resultó completamente diferente en cuanto a los parámetros establecidos para *Aedes aegypti* en este trabajo. Además la técnica descrita por Booth en 1961 para determinar la actividad de esta enzima en *Culex pipiens* también resultó diferente de las descritas previamente (Booth, 1961). Por primera vez en nuestro país se adaptaron estos métodos para cepas de *Aedes aegypti*, permitiéndonos diferenciar entre insectos con la presencia o no de estos mecanismos de resistencia. Estos métodos no sólo pueden ser aplicados en nuestro país, sino que pueden ser extendidos a otras regiones para la detección de estos mecanismos en la especie *Aedes aegypti*.

Determinación de los mecanismos de resistencia utilizando sinergistas y frecuencia de los mismos: El uso de los sinergistas S, S, S,-tributil phosphorotrithioate (DEF) y piperonil butóxido (PB) demostraron que las estererasas y monooxigenasas jugaron un papel importante en la resistencia detectada a temefos, clorpirifos y pirimifos metil en las cepas de Cuba y América Latina en este estudio. La actividad incrementada de las enzimas estererasas ha sido previamente asociada con la resistencia a temefos en *Aedes aegypti* de Venezuela (Mazarri y Georghiou 1995), Trinidad (Vaugan y cols., 1998), Tailandia (Paeporn y cols., 2003 y Saelim y cols., 2005) y Brasil (Marcoris y cols., 2003). Otros autores asociaron la resistencia a temefos con un incremento de las enzimas de acción metabólica: estererasas, monooxigenasas y GST (Braga y cols., 2005; Boyer y cols., 2006).

En el estado adulto se detectó alta resistencia a DDT y a algunos piretroides, pero principalmente a deltametrina, cuya resistencia, se correlacionó con ambos mecanismos de acción metabólica (esterasas y GST), pero principalmente con la alta frecuencia en que se detectó incrementada la actividad de la enzima GST. Existen trabajos que han demostrado resistencia cruzada entre DDT y piretroides en *Aedes aegypti* debido al mecanismo de insensibilidad nerviosa (gen Kdr) (Chadwick y cols., 1977; McDonald y Wood 1979; Brengues y cols., 2003).

Electroforesis en gel de poliacrilamida para la visualización de las esterasas en cepas de *Aedes aegypti*: El examen visual de los geles reveló la presencia de una elevada actividad de esterasa A4, con un valor de movilidad relativa (R_m) de 0.78. Utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida, se reportó la presencia de una banda de esterasa amplificada (Est A6) en una cepa tolerante a malation (10x) Villa Palmeras (VP), la cual no se observó en la cepa *Aedes aegypti* no seleccionada, ni en la cepa de referencia susceptible (Field y cols., 1984). Resultados posteriores en una cepa de *A. aegypti* encontraron una banda de esterasas cuya movilidad relativa fue de 0.61, la cual se observó en el 91% de los individuos, y esta fue clasificada como esterasa A5 y no se observó incrementada en la cepa susceptible (Mazarri, 1994, tesis MSc). En trabajos posteriores, en Brasil, se asoció la resistencia a insecticidas con la aparición de nuevas bandas de esterasas y variación de su frecuencia entre los años 2000 y 2005 (Souza-Polezzi y Bicudo, 2005).

Selección de cepas de referencia resistentes a insecticidas: *Aedes aegypti* de Cuba es capaz de desarrollar altos niveles de resistencia a temefos (200 x) bajo presión de selección en el laboratorio. Wirth y cols, 1999, realizaron una selección para incrementar la resistencia a temefos en una cepa de *Aedes aegypti* de Tortola, Islas Vírgenes Británicas, utilizando la CL_{95} y obtuvieron un valor de $FR_{95}=46.8$, en el laboratorio, es decir después de 13 generaciones la resistencia a temefos se incrementó a 180.6 (CL_{95}), comparado con la cepa susceptible de referencia de *Aedes aegypti*. Se demostró a través de ensayos bioquímicos, ensayos con sinergistas y electroforesis en gel de poliacrilamida, que la actividad incrementada de la esterasa A4 fue la responsable de la resistencia a temefos en la cepa seleccionada con este insecticida por 6 generaciones de selección.

Se observó poco incremento (2.22x) de la resistencia a malation en la cepa SANTIAGO DE CUBA, después de haber sido sometida a presión de selección con este insecticida durante 5 generaciones. Similares resultados obtuvieron Madhukar y Pillai en 1970, ellos obtuvieron un incremento de la resistencia a malation de 3x, después de sucesivas generaciones de selección con este insecticida (Madhukar y Pillai, 1970). Sin embargo existen notables diferencias en cuanto a los niveles de resistencia a este insecticida y sus mecanismos en *Culex quinquefasciatus*, especie que ha sido sometida a la misma presión de selección con malation en ambiente urbano. Hay investigaciones que ya han demostrado que especies deferentes de insectos desarrollan diferentes niveles de resistencia a insecticidas (Pridgeón y cols., 2008). En Tailandia se evaluaron las dos especies con los cuatro tipos de insecticidas (organoclorado DDT, organofosforados, carbamatos y piretroides) y la especie *Culex quinquefasciatus* resultó resistente a todos los insecticidas, menos al organofosforado malation y *Aedes aegypti* mostró resistencia a deltametrina y permetrina y susceptibilidad a fenitrotion (Sunaiyana y cols., 2006). Hamdan y cols., en el año 2005 en Malasia sometieron a presión de selección con malation una cepa de *Culex quinquefasciatus* durante 40 generaciones y una de *Aedes aegypti* por 32 generaciones y demostraron que la primera especie desarrolló mas alta resistencia a este insecticida que la segunda especie mencionada. La selección con malation en *Cx. quinquefasciatus* de Cuba por 22 generaciones incrementó la resistencia al mismo 1208x, dada por un incremento de la frecuencia de esterasas y AchEr (Díaz y cols., 1993). Durante el proceso de selección con malation se obtuvo un incremento en la frecuencia en que se observó elevada la actividad de la GST, pero no de esterasas ni AchEr. Existe algún mecanismo tanto en condiciones de laboratorio, como en el terreno que impide la evolución de la resistencia a este insecticida en *Aedes aegypti*, pero su uso sí pudiera generar resistencia a otros insecticidas, los cuales son esenciales para el control de poblaciones adultas de *Aedes aegypti*, como son los piretroides. Durante el proceso de selección con malation no se observaron cambios apreciables en la resistencia a los organofosforados, temefos, fention y fenitrotion lo cual coincide con que no hubo variación en la frecuencia del mecanismo de esterasas.

Se demostró que *Aedes aegypti* de Cuba es capaz de desarrollar altos niveles de resistencia a deltametrina bajo presión de selección en el laboratorio tanto en el estado larval como en el estado adulto.

Sin embargo Kumar y cols., 2002, sometieron una cepa de *Aedes aegypti* en el laboratorio a presión de selección con deltametrina por 40 generaciones y obtuvieron un incremento de la resistencia en larvas de 703x, y el factor de resistencia en el estado adulto fue solamente de 1.3x comparado con la cepa susceptible a insecticidas.

Durante el proceso de selección con deltametrina, no se observó resistencia cruzada a insecticidas organofosforados, pero sí a los piretroides lambda-cialotrina, cipermetrina y ciflutrina, tanto en larvas como en adultos. Urmila y cols., 2001 seleccionaron una población de *Aedes aegypti* del campo por 16 generaciones con deltametrina y encontraron resistencia cruzada a permetrina.

Al someter la cepa de SANTIAGO DE CUBA a presión de selección con los insecticidas organofosforados malation y temefos se observó el fenómeno de resistencia cruzada a insecticidas piretroides, fundamentalmente a deltametrina. Los resultados de las técnicas bioquímicas mostraron en ambos procesos de selección un incremento en la frecuencia de los mecanismos de esterases y GST. De acuerdo a los resultados con sinergistas, las tres enzimas de acción metabólica (esterasas, GST y monooxigenasa) resultaron estar asociada con la resistencia a deltametrina en la cepa de *Aedes aegypti* seleccionada con este insecticida por 12 generaciones (SANDELTA-F12), así como en la resistencia cruzada a piretroides en la cepa seleccionada con temefos (SANTEM-F6).

Trabajos previos, utilizando el sinergista piperonil butóxido (PB) indicaron el papel de las enzimas monooxigenasas como mecanismo de resistencia a deltametrina en larvas de *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* y *Anopheles stephensi* (Kumar y cols., 1991). Kumar y cols., 2002 confirmaron el papel de estas enzimas como mecanismo primario en el desarrollo de resistencia a deltametrina en larvas de *Aedes aegypti* a través de sucesivas selecciones en larvas con deltametrina más el sinergista PB. Existen trabajos que relacionan la resistencia a piretroides con mecanismos de acción metabólica, basados en cambios en la actividad de algunas enzimas como las monooxigenasas en *Drosophila melanogaster* (Berge y cols., 1998), y también de las enzimas esterases y monooxigenasas asociada a la resistencia a permetrina en *Anopheles gambiae* (Vulule y cols., 1999; Ding y cols., 2005) y recientemente en *Aedes aegypti* de Tailandia (Pethuan y cols., 2007).

Se ha demostrado el papel de la enzima GST como mecanismo de resistencia a DDT en *Nilaparvata lugens*, una especie de insecto plaga del arroz, resistente a piretroides, en la cual se observó una sobre expresión de la enzima GST, específicamente de la clase épsilon 2 (GSTe2) (Vontas y cols., 2001; 2002). En *Anopheles gambiae* se demostró que la enzima GSTe2 es la responsable del metabolismo del DDT (Ortelli y cols., 2003). Estudios posteriores demostraron que las enzimas GSTe2 y monooxigenasas se sobre expresaron en una cepa de *Anopheles gambiae* resistente a piretroides a través de la técnica de microarreglos (Jean-philipe y cols., 2005). En *Aedes aegypti* se encontró que la GSTe2 (AgGSTe2) se sobreexpresó en una cepa resistente a DDT y permetrina (Lumjuan y cols., 2005), sin embargo en estudios realizados, a través de ensayos bioquímicos, en esta especie en Tailandia no se encontró una asociación consistente entre la resistencia a piretroides y la actividad de la enzima GST (Pethuan y cols., 2007).

La existencia de resistencia tanto a DDT como a los piretroides cipermetrina, ciflutrina y lambdacialotrina en la cepa seleccionada con deltametrina (SANDELTA-F12) podría indicar la presencia del mecanismo de resistencia de knock-down (gen kdr), responsable de la resistencia cruzada entre DDT y piretroides. En los resultados utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se demostró que la mutación (sustitución de valina por isoleucina) del alelo Iso1, 016 del gen "para" de *Aedes aegypti* podría estar asociada con la resistencia a deltametrina, pero no con temefos. Este resultado indica que la resistencia cruzada a piretroides en la cepa seleccionada con temefos está determinada por los mecanismos de acción metabólica de esterasas y GST y no por el gen Kdr. En el caso de la cepa seleccionada con deltametrina, no sólo están actuando estos mecanismos, sino también esta mutación detectada en los canales de sodio de la membrana nerviosa del mosquito, que pudiera ser responsable del mecanismo de resistencia tipo gen Kdr en esta especie en Cuba. Brenges y cols. 2003, utilizando una cepa de *Aedes aegypti* resistente a piretroides de Brasil, asoció esta resistencia con la mutación del alelo Gly1,016, (sustitución de valina por glicina) del gen "para" de *Aedes aegypti*, sugiriendo la posibilidad de que esta mutación confiriera resistencia tipo Kdr.

Existen estudios que han revelado mutaciones en un único amino ácido del gen homólogo que al parecer, también causan resistencia Knock down (kdr) al DDT (Severson, y cols., 1997).

También se ha identificado en *Cx. quinquefasciatus* (Amin y Hemingway, 1989), *An stephensi* (Omer y cols., 1980), y en *Aedes aegypti* (Bregues y cols., 2003). Es importante conocer de forma precisa la mutación del gen Kdr asociada con la resistencia a DDT y piretroides para poder desarrollar métodos más específicos de detección de la misma, como ya ha sido desarrollado en *Anopheles gambiae* la técnica HOLA (Hot Ligation Oligonucleotide Assays), una técnica de ELISA sencilla y no costosa, que permite identificar mutaciones puntuales específicas del gen Kdr en esta especie (Lynd y cols., 2005).

La selección con propoxur incrementó la resistencia en la cepa SANTIAGO DE CUBA alrededor de 41.72x, cuando se comparó la resistencia en la generación 13 de selección con propoxur (SANPROP-F13) con la cepa susceptible de referencia (ROCKEFELLER). El incremento de la resistencia a propoxur se correlacionó con el incremento de la frecuencia del mecanismo de AchEr modificada y no con las enzimas esterasas y GST.

En *Aedes aegypti* de Cuba, colectados durante la epidemia ocurrida en Cuba en el 2001-2002 en Ciudad de La Habana, el Municipio Playa mantuvo altos índices de infestación de *Aedes aegypti*. En este municipio el mecanismo de AchEr fue observado en larvas a alta frecuencia, y la resistencia a propoxur fue alta también, los estudios con los sinergistas DEF y PB corroboraron la no participación de las enzimas esterasas ni monooxigenasas en la resistencia a propoxur (Bisset y cols., 2004).

Este es el primer trabajo que notifica la presencia del mecanismo de resistencia de AchEr modificada en *Aedes aegypti*. Aunque el gen de AchEr ha sido clonado en esta especie, no se han detectado mutaciones en este gen asociada con la resistencia a insecticidas (Weill y cols., 2002). Sin embargo, en *Cx. pipiens* y *An. gambiae* ya se demostró la presencia de una mutación asociada con la resistencia a insecticidas en estas especies (Weill y cols., 2004a). Está establecido que una base silente de un simple codón representa el mayor freno en la evolución del mecanismo de resistencia a insecticidas de la AchEr en *Aedes aegypti* (Weill y cols., 2004b).

6. CONCLUSIONES

1. El desarrollo de resistencia a temefos constituye una limitante en las operaciones de control de *Aedes aegypti*. Los organofosforados fenitrothion, fenitrothion continúan siendo buenos candidatos para el control de *Aedes aegypti*, así como los piretroides cipermetrina, lambdacialotrina y ciflutrina.
2. La modificación realizada a las técnicas bioquímicas para la determinación de los mecanismos de resistencia en *Aedes aegypti* conforman una base sólida para la detección rápida y temprana de la resistencia en esta especie.
3. La resistencia detectada a los organofosforados temefos, clorpirifos y pirimifos metil en las cepas evaluadas estuvo asociada con los mecanismos de esterasas, MO y GST, pero no con el de la AchEr.
4. La resistencia en *Aedes aegypti* evolucionó más rápido bajo presión de selección con el piretroide deltametrina, seguido por el organofosforado temefos, el carbamato propoxur y en el caso de malation no se incrementó la resistencia.
5. Los mecanismos de acción metabólicas basados en las enzimas esterasas, GST y MO, cuya frecuencia se incrementó en los procesos de selección con los organofosforados malation y temefos y el piretroide deltametrina, generaron resistencia cruzada a piretroides.
6. Se encontró por primera vez en Cuba la AchEr modificada como mecanismo de resistencia a insecticidas, hallazgo que tiene impacto en la evolución de la resistencia a insecticidas en este importante vector.
7. El laboratorio dispone de cepas de *Aedes aegypti* de referencias para estudios de resistencia a insecticidas. Estas cepas no solo pueden ser utilizadas en nuestro país, sino también a nivel internacional.
8. La mutación asociada al gen Kdr estuvo relacionada con la resistencia a deltametrina y constituye un mecanismo de resistencia de tipo Kdr determinado por primera vez en *Aedes aegypti* de Cuba.

7. RECOMENDACIONES

1. Establecer estrategias de control integrado con la utilización de otros productos, aprobados por la OMS en el 2006 con vistas a preservar la efectividad del temefos. Tener actualizada la situación de la resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *Aedes aegypti*, tanto con pruebas de laboratorio como de terreno.
2. Monitorear la frecuencia de los mecanismos metabólicos basados en la alta actividad de esterasas, MO y GST como un indicador de la resistencia a los OF temefos, pirimifos metil, clorpirifos y al piretroide deltametrina en *Aedes aegypti*.
3. Caracterizar desde el punto de vista molecular los genes que codifican para la actividad de las enzimas esterasas, monooxigenasas y GST, utilizando las cepas de referencia resistentes a insecticidas obtenidas en este trabajo, para poder crear métodos más específicos de detección temprana de la resistencia.
4. Caracterizar desde el punto de vista molecular el mecanismo de resistencia basado en la insensibilidad del sitio blanco, en este caso la acetilcolinesterasa (AChE), para poder dilucidar las mutaciones asociadas a la resistencia a insecticidas, aún no reportadas para esta especie y que pueden implicar serios problemas en las operaciones de control.
5. Utilizar la técnica de Hot ligation oligonucleotide assay (HOLA) para identificar mutaciones en el gen asociada al mecanismo de knockdown (Kdr) en *Aedes aegypti* de Cuba.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahamad S and Forgash AJ. Non-oxidative enzymes in the metabolism of insecticide. Drug metabolism. 1976; 5: 141-164.
2. Aldridge WN. Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing dirthyl p-nitrophenyl phosphate (E6000) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. Biochem. J. 1953; 53:117-124.
3. Aldrige WN. The esterases-perspectives and problems. Chem. Biol. Interactions. 1993; 87: 5-13.
4. Amin AM, Hemingway J. Preliminary investigations of the mechanisms of DDT and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from Saudi Arabia. Bull. Entomol. Res. 1989; 79: 361-366.
5. Apperson CS, Georghiou GP. Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticide in *Culex tarsalis*. J. Econ. Entom. 1975; 68: 153-157.
6. Bang YH. Implication of the control of malaria vectors with insecticides in Tropical countries of South East Asia region. Part 11. Consequence of insecticide use. J. Com. Dis. 1985; 17: 300-310.
7. Berge JB, Feyereisen R, Amichot M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1998; 353: 1701-1705. Review.
8. Besanky NJ, Finnerty V, Collins FH. Molecular perspectives on the genetics of mosquitoes. Adv. Genetics. 1992; 30: 123-184.
9. Bisset JA, Rodríguez MM, Díaz C, Ortiz E, Marquetti MC, Hemingway J. The mechanism of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Cuba. Bull. Entomol. Res. 1990a; 80: 245-250.
10. Bisset, JA, Díaz C, Rodríguez M M, Marquetti MC, Navarro A. Modo de herencia de la resistencia al malation en *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. Rev. Cub. Med. Trop. 1990b; 42: 84-89.
11. Bisset JA, Rodríguez MM, Hemingway J, Díaz C, Small GJ, y Ortiz E. Malathion and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba : efficacy of pirimiphos methyl in the presence of at least three resistance mechanisms. Med. Vet. Entomol. 1991a; 5: 223-228.

12. Bisset JA, Rodríguez MM, Díaz C, Marquetti MC, Navarro A. Patrones de esterasa en *Culex quinquefasciatus* y su relación con la resistencia al insecticida malation. Rev. Cub. Med. Trop. 1991b; 43: 181-185.
13. Bisset JA, Rodríguez MM, Dayamí L. Determinación de los mecanismos de resistencia en *Culex quinquefasciatus*, Say 1823 y su implicación operacional en el uso correcto de insecticidas para el control. Rev. Cub. Med. Trop. 1994; 46: 2.
14. Bisset JA, Ortíz E, Rodríguez MM, Hemingway J. Comparison of microtitre plate and filter paper assays for analysis of changes in elevated esterase-based resistance frequencies in field and laboratory populations of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Med. Vet. Ent. 1995; 9, 94-97.
15. Bisset JA, Rodríguez MM, Soca A. Cross-Resistance to malathion in Cuban *Culex quinquefasciatus* induced by larval selection with deltamethrin. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1998; 12: 109-112.
16. Bisset JA, Rodríguez MM, Díaz C, Soca A. Evolución de la resistencia a insecticidas en *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en un área de Ciudad de la Habana. Rev. Cub. Med. Trop. 2000; 52: 180-185.
17. Bisset JA, Rodríguez MM, Fernández D, Pérez O. Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en larvas del Municipio Playa, colectadas durante la etapa intensiva contra el *Aedes aegypti* en Ciudad de la Habana, 2001-2002. Rev. Cub. Med. Trop. 2004; 56: 61-66.
18. Bisset JA, Rodríguez MM, De Armas Y. Comparación de dos poblaciones de mosquitos *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba con diferentes comportamiento de reposo. Revista Cubana de Medicina Tropical 2005; 57: 143-150.
19. Bourguet D, Capela R, Raymond M. An insensitive acetylcholinesterase in *Culex pipiens* (Diptera Culicidae). J. Neurochem. 1996; 67: 2115-2123.
20. Booth JE, Boyland E, Sims P. An enzyme from the rat liver catalyzing conjugation with glutathione. Biochem. J. 1961; 79: 516-523.
21. Boyer S, David JP, Rev D, Lemperiere G, Ravanel P. Response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae to three xenobiotic exposures: larval tolerance and detoxifying activities. Environ. Toxicol. Chem. 2006; 25: 470-476.

22. Braga IA, Lima JB, Soares Sda, Valle D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the state of Río de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. . Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2004; 99: 199-203.
23. Braga IA, Mello CB, Montella IR, Lima JB, Martins Ade, Medeiros PF, Valle D. Effectiveness of methoprene, and insect growth regulator, against temephos resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions. J. Med. Entomol. 2005; 42: 830-837.
24. Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, Mccarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. Med. Vet. Entomol. 2003; 17: 87-94.
25. Brogdon WG, Dickinson CM. A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in a high pressure liquid chromatography eluate fraction. Anal. Biochem. 1983; 131: 499-503.
26. Brogdon, W. Microassay of acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. Comp. Biochem. Physiol. 1988; 90: 145-150.
27. Callaghan A. Genetic and biochemical studies of elevated esterases electromorph in *Culex pipiens*. 1989. Ph. Dr. Thesis. Dept. of Medical Parasitology, University of London.
28. Campos J, Andrade CF. Larval susceptibility to chemical insecticides of two *Aedes aegypti* populations. Rev. Saude Pub. 2001; 35: 232-236.
29. Castella C, Castells-Brooke N, Bergé J-B, Pauron D. Expression and distribution of voltage-sensitive sodium channels in pyrethroid-resistant *Musca domestica*. Invertebrate Neuroscience. 1997; 3: 41-47.
30. Chadwick PR, Invest JF, Bowron MJ. An example of cross-resistance to pyrethroids in DDT-resistant *Aedes aegypti*. Pestic. Sci. 1977; 15: 112-120.
31. Chávez J, Vargas J, Vargas F. Resistencia a deltametrina en dos poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del Perú. Rev. Perú. Biol. 2005; 12: 161-164.
32. Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabate A, Carnevale P, Guillet P. Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. Parasitol. 1999; 41(1-3): 319-22.

33. Chen YP, Sudderuddin KI. Toxicological studies of insecticides on *Culex quinquefasciatus* Say y *Aedes aegypti* (L.). Southeast Asia J. Trop. Med. Public Health 1978; 9: 378-383.
34. Clark AG, Shamaan NA. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the *House fly* is a Glutathione S- transferase. Pest. Biochem. Physiol. 1984; 5: 249-261
35. Curtis CF. Theoretical models of the use of insecticide mixtures for the management of resistance. Bull. Entomol. Research. 1985; 75: 259-265.
36. Curtis CF, Hill N, Kasin SH. Are there effective resistance management strategies for vectors of human diseases?. Biol. J. Linn. Soc. 1993; 48: 3-18.
37. Díaz C, Bisset JA, Rodríguez MM. Selección de una cepa de *Culex quinquefasciatus* homocigótica para la resistencia al insecticida organofosforado malation. Rev. Cub. Med.Trop. 1993; 45: 193-196.
38. Díaz C, Calvo E, Rodríguez MM, Bisset JA, Fresneda M. Determinación de la actividad glutatión-S-transferasa en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Cuba y otros países de América Latina. Rev Cubana Med Trop. 2004; 56: 111-116.
39. Ding Y, Ortellì F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. BMC Genomics 2003; 4: 1-16.
40. Ding Y, Hawkes N, Meredith J, Eggleston P, Hemingway J, Ranson H. Characterization of the promoters of Epsilon glutathione transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* and their response to oxidative stress. Biochem. J. 2005; 1: 879-888.
41. El Khatib ZI, Georghiou GP. Comparative fitness of temephos resistant and susceptible and hybrid phenotypes of the southern house mosquito. J. Econ. Entomol. 1985; 78: 1023-1029.
42. Enayati AA, Ranson H, Hemingway J. Mini Review: Insect glutathione transferases and insecticide resistance. Insect. Mol. Biol. 2005; 14: 3-8.
43. FAO. 1970. Pest resistance to pesticide in agriculture. Importance, recognition y countermeasures. FAO Rome. 32pp.
44. Fersht A. Measurement and Magnitude of enzymatic rate constants chapter, In: Enzyme Structure and mechanism. Copyright: W. H. Freeman and company, New York. 1985; 2nd edition: 121-124.

45. French-Constant RH, Aronstein K, Roush RT. Use of P-element mediated germline transformation to study the effect of gene dosage in cyclodiene insecticide resistant strain of House fly, *Musca domestica*. Biochem. Physiol. 1992; 43: 78-84.
46. French-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan A, Anthony N. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1998; 29: 1685-1693
47. Field WN, Hitchen JM, Rees AT. Esterases activity in strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) tolerant and susceptible to the organophosphate insecticide malathion. J. Med. Entomol. 1984; 21: 412-18.
48. Fournier D, Bride J-M, Poire M, Berge J-B, Plapp FW. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristic of the major forms from house flies susceptible and resistant to insecticides. J. Biol. Chem. 1992; 267: 1840-1845.
49. Georghiou GP, Taylor CE. Pesticide resistance as an evolutionary phenomenon. 1976, Pages 759-785 in Proc. XVth Int. Congr. Entomol. Washington DC.
50. Georghiou GP, Pasteur N. Electrophoretic esterase patterns in insecticide resistant and susceptible mosquitoes. J. Econ. Entomol. 1978; 71: 201-205.
51. Georghiou GP, Pasteur N, Hawley MK. Linkage relationship between organophosphate resistance and highly active esterase-B in *Culex quinquefasciatus* from California. J. Econ. Entomol. 1980, 73: 301-305.
52. Georghiou GP, Wirth M, Tran H, Saume F, Knudsen AB. Potential for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* in the Caribbean area and neighbouring countries. J. Med. Entomol. 1987; 24: 290-294.
53. Gepner JI, Hall LM, Sattelle DB. Insect acetylcholine receptors as a site of insecticide action. Nature. 1978; 70: 188-190.
54. Gratz NG. Emergency control of *Aedes aegypti* as a disease vector in urban areas. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1991; 7: 353-365.
55. Halliday RW, Burnham K. Choosing the optimal diagnostic dose for monitoring insecticide resistance. J. Econ. Entomol. 1990; 83: 1151-1159.
56. Hamdan H, Sofian-Azirun M, Nazni WA, Lee HL. Insecticide resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Say), *Aedes aegypti* (L) larvae against malathion, permethrin and temephos. Trop. Biomed. 2005; 22: 45-52.

57. Hemingway J, Smith C, Jayawardena KGI, Herath PRJ. Field and laboratory detection of altered acetylcholinesterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae). Bull. Ent. Res. 1986; 559-565.
58. Hemingway J, Boddington RG, Harris J. Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. Bull. Entomol. Res. 1989; 79: 123-130.
59. Hemingway J, Callaghan a, Amin AM. Mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Saudi Arabia. Med. Vet. Entomol. 1990; 4: 275-282.
60. Hemingway J, Miyamoto J, Herath PRJ. A possible novel link between organophosphorus and DDT insecticide resistance genes in *Anopheles*: supporting evidence from fenitrothion metabolism studies. Pest. Biochem. Physiol. 1991; 39: 49-56.
61. Hemingway J, Penilla RP, Rodríguez AD, James BM, Edje W. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. A large scale trial in southern Mexico. 1997; Pestic. Sci. 51: 375-382.
62. Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annu. Rev. Entomol. 2000; 45: 371-391.
63. Hemingway J, Hawkes NJ, Mc Carroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitos. Insect Biochem. Mol. Biol. 2004; 34: 653-665.
64. Hernández O, Bend JR. Metabolic Basis of Detoxification, W. B. Jakoby Bend, J. Caldwell, eds. Academy Press, New York, 1982, pp 207-228.
65. Herve J. El modo de acción de los piretroides y el problema de la resistencia a estos compuestos. En: Deltametrina (monografía), ed. Roussel Uclaf, 1983; cap 3, pp67-107.
66. Heymann E. Carboxylesterases and amidases. In "Enzymatic basis of detoxication, Volume II" 8W.B.Jakoby Ed), 1980; Academic press.
67. Jean-Philippe D, Strode C, Vontas J, Nikou D, Vaughan A, Pignatelli PM, Louis C, Hemingway J, Ranson H. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005; 102: 4080-4084.

68. Jirakanjanakit N, Saentharatip S, Rongnoparut P, Duchon S, Bellec C, Yoksan S. Trend of temephos resistance in *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes in Thailand during 2003-2005. *Environ. Entomol.* 2007a; 36: 506-511.
69. Jirakanjanakit N, Rongnoparut P, Saentharatip S, Chareonvirivaphap T, Duchon S, Bellec C, Yoksan S. Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005. *J. Econ. Entomol.* 2007b; 100: 545-550.
70. Ketterman AJ, Karunaratne SHPP, Jayawardena KGI, Hemingway J. Qualitative differences between populations of *Culex quinquefasciatus* in both the esterase A2 and B2 which are involved in insecticide resistance. *Pest. Biochem. Physiol.* 1993; 47: 142-148.
71. Kostaropoulos I, Papadopoulos AI, Metaxakis A, Boukouvala E, Papadopoulou-Mourkidou E. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 2001; 31: 313-319.
72. Kozaki T, Shono T, Kono Y. Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 2001; 31: 991-997.
73. Kroeger A, Lenhart A, Ochoa M, Villegas E, Levy M, Alexander N, McCall PJ. Effective control of dengue vectors with curtains and water container covers treated with insecticide in Mexico and Venezuela: cluster randomized trials. *B. M. J.* 2006; 332: 1247-1252.
74. Kumar S, Thomas A, Pillai MK. Involvement of mono-oxygenases as a major mechanism of deltamethrin-resistance in larvae of three species of mosquitoes. *Indian. J. Exp. Biol.* 1991; 29(4): 379-384.
75. Kumar S, Thomas A, Sahgal A, Verma A, Samuel T, Pillai MK. Effect of the synergist, piperonyl butoxide, on the development of deltamethrin resistance in yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 2002; 50(1): 1-8.
76. Lalah JO, Chien CI, Motoyama N, Dauterman WC. Glutathione S-transferases: alpha-naphthyl acetate activity and possible role in insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 1995; 88: 768-770.

77. Lehane M J. Biology of blood-sucking insects. Harper Collins Academic (Eds.) Hammersmith. London. UK. 1991; 288pp.
78. Lima JB, Da-Cunha MO, Da Silva RC, Galardo AK, Soares Sda, Braga IA, Ramos RP, Valle D. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Río de Janeiro and Espíritu Santo, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2003; 68: 329-333.
79. Lima EP, De Oliveira Filho AM, de Oliveira Lima JW, Ramos Júnior AN, de Góes Cavalcanti LP, Pontes RJ. *Aedes aegypti* resistance to temephos of Ceará State. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006; 39: 259-263.
80. Lumjuan N, McCarrol L, Prapanthadara L, Hemingway J, Ranson H. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol Biol. 2005; 35:861-871.
81. Lynd A, Ranson H, McCall PJ, Randle NP, Black WC, Walker ED, Donnelly MJ. A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (Kdr) detection in *Anopheles gambiae*. Malaria J. 2005; 14: 16-20.
82. Madhukar BVR, Pillai MKK. Development of organophosphorus resistance in Indian strains of *Aedes aegypti* (L.). Bull. WHO, 1970; 43: 735-742.
83. Marcoris M de L, Andrrighetti MT, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Braco JE. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of Sao Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2003; 98: 703-708.
84. Martínez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (Kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.d. Insect. Molec. Biology. 1998; 7: 179-184.
85. Mazarri MB. Insecticide resistance in two field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Venezuela. Tesis de Masters. University of Riverside, California. 1994; 119 pp.
86. Mazarri MB, Georgiou GP. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1995; 11: 315-322.
87. McDonald AE, Wood RJ. Mechanisms of DDT resistance in larvae of the mosquito *Aedes aegypti* L. Pestic. Sci. 1979; 10: 375-382.

88. Mekuria Y, Gwinn TA, Williams DC, Tidwell MA. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* from Santo Domingo, Dominican Republic. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1991; 7: 69-72.
89. Miller TA. Mechanisms of Resistance to Pyrethroid insecticides. Parasitology Today. 1988; 7: 8-12.
90. Montada D, Zaldivar J, Sánchez F, Daisy. Eficacia de los tratamientos intradomiciliarios con los insecticidas cipermetrina, lambdacialotrina y clorpirifos en una cepa de *Aedes aegypti*. Rev. Cub. Med. Trop. 2006; 58 (2).
91. Motoyama N, Kao LR, Dauterman WC. Dual role of esterases in insecticide resistance in green rice leafhopper. Pestic. Biochem. Physiol. 1984; 21: 139-147.
92. Mouches C, Pauplinl Y, Agarwall M, Lemieux L, Herzogl M, Avadonl M, Beyssat-Arnaouty V, Hyrien O, de Sain Vicent BR, Georghiou GP, Pasteur N. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. Proc. Nat. Acad. Sci. 1990 ; 87 : 2574-2578.
93. O'Brien RD. Toxic Phosphorus Ester, Academic Press, New York. 1960.
94. Omer SM, Georghiou GP, Irving SN. DDT/pyrethroid resistance interrelationships in *Anopheles stephensi*. Mosq. News. 1980; 40: 200-209.
95. Oppenoorth FJ, Welling W. Biochemistry and physiology of resistance. In "Insecticide Biochemistry and Physiology" (C.F. Wilkinson ed.) Plenum Press. 1985.
96. OPS. Resurgimiento del dengue en las América. Boletín. 1997; 18(2): 404-409.
97. Ortelli F, Rossiter LC, Vontas J, Ranson H, Hemingway J. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. Biochem. J. 2003; 373: 957-963.
98. Paeporn P, Komalamisra N, Deesin V, Rongsrivam Y, Eshita Y, Thongrungrat S. Temephos resistance in two forms of *Aedes aegypti* and its significance for the resistance mechanisms. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 2003; 34: 786-792.
99. Pasteur N, Sinrgre G, Gabinaud A. Est-2 and Est-3 polymorphisms in *Culex pipiens* L. from Southern France in relation to organophosphate resistance. Biochem. Genet. 1981a; 19: 499-508.

100. Pasteur N, Georghiou GP. Filter paper test for rapid determination of phenotypes with high esterase activity in organophosphate resistant mosquitoes. *Mosq. News.* 1981b; 41: 181-183.
101. Pasteur N, Marquine M, Ben Cheikh H, Bernard C, Bourguet D. A new mechanism conferring unprecedented high resistance to chlorpyrifos in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 1999; 36: 794-802.
102. Pauron D. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 1998(2): 179-84
103. Peiris HTR, Hemingway J. Mechanism of insecticide resistance in a temephos selected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) strain from Sri Lanka. *Bull. Entomol. Res.* 1990; 80: 453-457.
104. Perich MJ, Rocha NO, Castro AL, Alfaro AW, Platt KB, Solano T, Rowley WA. Evaluation of the efficacy of lambda-cyhalothrin applied three spray application methods for emergency control of *Aedes aegypti* in Costa Rica. *J. Am. Mosq. Control Asso.* 2003; 19: 58-62.
105. Pethuan S, Jirakanjanakit N, Saengtharapit S, Chareonviriyaphap T, Kaewpa D, Rongnoparut P. Biochemical studies of insecticide resistance in *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* and *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Trop. Biomed.* 2007; 24: 7-15.
106. Ponlawat A, Scott JG, Harrington LC. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. *J. Med. Entomol.* 2005; 42: 821-5.
107. Prapanthadara L, Hemingway J, Ketterman AJ. Partial purification and characterization of glutathione s-transferase involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pest. Biochem. Physiol.* 1993; 47: 119-133.
108. Pridgeon JW, Pereira RM, Becnel JJ, Allan SA, Clark GG, Linthicum KJ. Susceptibility of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* Say, and *Anopheles quadrimaculatus* Say to 19 pesticides with different mode of action. *J. Med. Entomol.* 2008; 45: 82-87.
109. Ranson H, Jensen B, Wang X, Hemingway J, Collins FH. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect. Mol. Biol.* 2000; 9: 499-507.

110. Ranson H, Rossiter L, Orтели F, Jensen B, Wang X, Roth CH, Collins FH, Hemingway J. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J.* 2001; 359: 295-304.
111. Ranson H, Claudianos C, Orтели F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV. Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance. *Science* 2002; 298: 179-181.
112. Rawlins SC, Ragoonansingh R. Comparative organophosphorous insecticide susceptibility in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and *Toxorynchites moctezuma*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1990; 6: 315-317.
113. Rawlins SC and Ou Hing Wan J. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1995; 11: 59-65.
114. Rawlins SC. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Pan Am. J. Public Health.* 1998; 4: 243-251.
115. Raymond M. Present d' un programme d' analyse log-probit pour microordinateur *Cahiers Orstrom Sér. Ent. Med., et. Parasitol.* 1985; 23: 117-21.
116. Raymond M, Pasteur N, Georghiou GP, Mellon RB, Wirth MC, Hawley M. Detoxification esterases new to California, USA, in organophosphate resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 1987; 24: 24-27.
117. Reiner E. Spontaneous reactivation of phosphorylated y carbamylated cholinesterases. *Bull. Entomol. Res.* 1971; 44: 109-112.
118. Reiner E. Recomendations of the IUBMB nomenclatura comité-comments concerning classification and nomenclatura of esterases hydrolyzing organophosphorus compounds. *Chem. Bio. Interactions.* 1993; 87: 15-16.
119. Saelim V, Brogdon WG, Rojanapremsuk J, Suvannadaba S, Pandii W, Jones JW, Sithiprasasna R. Bottle and biochemical assays on temephos resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health.* 2005; 36 : 417-25.
120. Sames WJ 4th, Bueno R Jr, Hayes J, Olson JK. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Lower Río Grande Valley of Texas and Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1996; 12: 487-490.
121. Saume F. Introducción a la química y toxicología de insecticidas. *Industria Gráfica Integral c. a. Maracay Edo. Aragua.* Pp 212. 1992.

122. Severson DW, Anthony NM, Andrew O, ffrench-Constant RH. Molecular mapping of insecticide resistance genes in the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). The Journal of Heredity. 1997, 88: 520-24.
123. Sharma SN, Saxena VK, Lai S. Study on susceptibility status in aquatic and adult stages of *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* against insecticides at international airports of South India. J. Commun. Dis. 2004; 36: 177-181.
124. Sihuincha M, Zamora-Perea E, Orellana-Rios W, Stancil JD, López-Sifuentes V, Vidal-Ore C, Devine GJ Potential use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Perú. J. Med. Entomol. 2005; 42: 620-630.
125. Souza-Polezzi RC Bicudo HE. , Genetic variation along time in a Brazilian population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), detected by change in the esterase patterns. Genetica. 2005; 125: 43-53.
126. Sunaiyana S, Pungasem P, Kasin S. Detection of insecticide resistance status in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* to major groups of insecticides. Trop. Biomed. 2006; 23: 97-101.
127. Tabashnik BE. Managing resistance with multiple pesticides: theory: evidence and recommendations. J. Econ. Entomol. 1989; 82: 1263-1269.
128. Terriere CL. Induction of detoxification enzymes in insects. Ann. Rev. Entomol. 1984; 29: 71-78.
129. Thompson M, Shotkoski F, ffrench-Constant RH. Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. FEBS. 1993; 325: 187-190.
130. Toutant JP. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. Progress in Neurobiology. 1989; 32: 423-446.
131. Tu C-PD, Akgul B. *Drosophila* Glutathione S-Transferases. Methods Enzymol. 2005; 401: 204-226.
132. Urmila J, Vijayan VA, Ganesh KN, Gopalan N, Prakass S. Deltamethrin tolerante & associated cross resistance in *Aedes aegypti* from Mysore. Indian J. Med. Res. 2001; 113: 103-107.
133. Vontas JG, Small G, Hemingway J. Glutathione s transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. Biochem. J. 2001; 357: 65-72.

134. Vaughan A, Chadee DD, French-Constant, R. Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. *Med. Vet. Entomol.* 1998; 12: 318-321.
135. Vaughan A, Rodríguez M, Hemingway J. The independent gene amplification of indistinguishable esterase Belectromorphs from the insecticide resistant mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem. J.* 1995; 305: 651-658.
136. Villani F, White GB, Curtis CF, Miles SJ. Inheritance and activity of some esterases associated with organophosphate resistance in mosquitoes of the complex of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Bull. Ent. Res.* 1983; 73: 153-170.
137. Villani F, Hemingway J. The detection and interaction of multiple organophosphorous and carbamate insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* from Italy. *Pestic. Biochem. Physiol.* 1987; 27: 218-28.
138. Vontas JG, Small G, Hemingway J. Glutathione S transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.* 2001; 357: 65-72.
139. Vontas JG, Small GJ, Nikou DC, Ranson H, Hemingway J. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochem J.* 2002; 362: 329-37.
140. Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, McAllister JC, Brogdon WG, Roberts JM, Mwangi RW, Hawley WA. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin – impregnate nets. *Med. Vet. Entomol.* 1999; 13: 239-244.
141. Weill MPH, Fort A, Berthomieu M, Pierre D, Pasteur N, Raymond M. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the *ace* gene in *Drosophila*. *The Royal Society.* 2002; 2007-2016.
142. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mongensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol. Biol.* 2004a; 13: 1-7.

143. Weill M, Berthomieu A, Berticat C, Lutfalla G, Negre V, Pasteur N, Philips A, Leonetti JP, Fort P, Raymond M. Insecticide resistance: a silent base prediction. *Current Biology*. 2004b; 14: 552-553.
144. Williamson MS, Martínez-Torres D, Hick CA, Devonshire AL. Identification of mutations in the *House fly* para-type sodium channel gene associated with Knockdown resistance (Kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet*. 1996; 252: 51-60.
145. Wirth MC, Georgiou GP. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. *J. Am. Mosq. Control Assoc*. 1999; 15: 315-320.
146. Wood RJ. Insecticide resistance: genes and mechanisms. In: Genetic consequences of man made change. (Bishop, J. A. and Cook, L. M. eds.) Ac. Press, London and New York. 1981.
147. World Health Organization (WHO) Committee on Insecticides. Technical Report Series N° 125, 1957.
148. World health Organization. Resistance of vectors of disease to pesticides. Fifth report of the WHO Expert Committee in Vector Biology and Control. W. H. O. 1980; 655:1-82.
149. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. 1981. WHO/VBC/81.80. 6 pp.
150. World health Organization. Resistance of vectors and reservoirs of disease to pesticides. W. H. O. 1986; Tech. Rep. Ser. 737.
151. World health Organization. Geographical distribution of arthropod-borne diseases y their principal vector. OMS/VBC/89.967, 1989; 134 PP.
152. World health Organization. Lymphatic filariasis: The disease and its control. 1992. WHO technical Report series 821.
153. World health Organization. Pesticides and Their application. 2006. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/. Sixth edition.
154. Yébakima A., Raymond, M., Marquine, M. and Pasteur, N. Resistance to organophosphorous insecticides in *Culex pipiens quinquefasciatus* from Martinique. *J. Med. Entomol*. 1995; 32: 77-82.

155. Zaim M, Guillet P. Strategy Development and Monitoring for Parasitic Diseases and Vector Control, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland. Trends Parasitol. 2002; 18: 161-163.
156. Zerva E. Insecticidal activity of pyrethroids in insect of medical importance. Parasitol. Today 1988; 4:53-57

8.1. Bibliografía del autor relacionada con el tema

1. Rodríguez MM, Bisset JA, Milá L, Lauzán L Soca A. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. *Rev. Cub. Med. Trop.* 1999; 51: 83-88.
2. Rodríguez MM, Bisset JA, Molina D, Soca A. Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* as a result of their use by the *Aedes aegypti* control programs. *Journal of American Mosquito Control Association.* 2000; 16 (4): 324-330.
3. Bisset JA, Rodríguez MM, Molina DF, Díaz C, Soca A. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev. Cub. Med. Trop.* . 2001, 53:37-43.
4. Rodriguez MM, Juan Bisset, Milá, Darjaniva Molina, Liatsy Lauzan. 2001. Detection of resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from Cuba and Venezuela. *J. Med. Entomol.* 38 (5): 623-8.
5. Rodríguez MM, Bisset JA, Molina DF, Soca A. Adaptación de los métodos en placas de microtitulación para la cuantificación de la actividad de esterazas y glutatión-s-transferasa en *Aedes aegypti* (L.) *Rev. Cub. Med. Trop.* 2001; 53 (1):32-6.
6. Bisset JA, Rodríguez MM, Molina DF, Díaz C, Soca A. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev. Cub. Med. Trop.* . 2001; 53: 37-43.
7. Rodríguez MM. Bisset JA Ruiz MI, Soca A. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from cuba. *Journal of Medical Entomology.* 2002; 39(6): 882-8.
8. Bisset JA, Rodríguez MM, Cáceres. L. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en dos cepas de *Aedes aegypti* de Panamá. *Rev. Cub. Med. Trop.* 2003; 55 (3): 191-5.
9. Rodríguez MM, Bisset JA, Soca A. Determinación de la resistencia y sus mecanismos en *Aedes aegypti* de los Municipios Playa y Guanabacoa. *Revista latinoamericana de Microbiología.* 2002; Vol. 44 (4).

10. Rodríguez MM, Bisset JA, Díaz C, Soca A. Resistencia cruzada a piretroides en *Aedes aegypti* de Cuba inducido por la selección con el insecticida organofosforado malation. **Rev. Cub. Med. Trop.** 2003; 55 (2): 105-11.
11. Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D, Pérez O. Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. **Rev. Cub. Med. Trop.** 2004; 56 (1): 54-60.
12. Rodríguez MM, Bisset JA, De Armas Y, Ramos F. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 2005; 21 (4): 437-45.
13. Bisset JA, Rodríguez MM, González I, Soca A. Selection of modified acetylcholinesterase as a resistance mechanism in a strain of *Aedes aegypti* from Santiago de Cuba. **J. Med. Entomol.** 2006; 43 (6): 1185-9.
14. Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from some latin-american countries. **J Am Mosq Control Assoc.** 2007; 24 (3).
15. Saavedra K, Urdaneta L, Rajatileka S., Moulton M, Flores AE, Fernandez I, Bisset JA, Rodríguez MM, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, and Black WC1 Mutations in the voltage gated sodium channel gene associated with permethrin resistance in Latin American *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology.** 2007; 16: 785-798.
16. Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D. Determinación in vivo del papel de las enzimas estererasas y glutatión transferasa en la resistencia a piretroides en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Rev. Cub. Med. Trop.** 2007; 58 (3).
17. Bisset JA, Rodríguez MM, Fernández D. resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de dos provincias del Perú. **Rev. Cub. Med. Trop.** 2007; 58 (3).

8.2. Bibliografía del autor no relacionada con el tema

1. Bisset JA, Díaz C, Rodríguez MM, Marquetti MC, Navarro A. Modo de herencia de la resistencia al malation en *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. **Rev. Cub. Med. Trop.** 1990; 42 (1): 84-89.
2. Bisset JA, Rodríguez MM, Díaz C, Ortíz E, Marquetti MC. The mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Cuba. **Bull. Entomol. Research.** 1990; 80: 245-250.
3. Bisset JA, Rodríguez MM, Hemingway J, Díaz C, Smal G, Ortíz E. Malathion and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba: efficacy of pirimiphos-methyl in the presence of at least three resistance mechanisms. **Med. Vet. Entomol.** 1991; 5: 223-228.
4. Bisset JA, Rodríguez MM, Díaz C, Marquetti MC, Navarro A. Patrones de esterasa en *Culex quinquefasciatus* y su relación con la resistencia al insecticida malation. **Rev. Cub. Med. Trop.** 1991; 43 (3): 181-185.
5. Díaz C, Bisset JA, Rodríguez MM. Selección de una cepa de *Culex quinquefasciatus* homocigótica para la resistencia al insecticida organofosforado malation. **Rev. Cub. Med. Trop.** 1993; 45 (3).
6. Rodríguez MM, Ortíz E, Bisset JA, Hemingway J, Salcedo E. Changes in malathion and pyrethroid resistance after cypermethrin selection of field populations of *Culex quinquefasciatus* from Cuba. **Med. Vet. Entomol.** 1993; 7: 117-121.
7. Rodríguez MM, Bisset JA, Díaz C, Ortíz E. Determinación de fenotipos de acetilcolinesterasa modificada en *Culex quinquefasciatus* por el Sistema Ultramicroanalítico (S. U. M. A). **Rev. Cub. Med. Trop.** 1993; 45 (2): 122-127
8. Álvez de Oca DM, Ortíz E, Bisset JA, Rodríguez MM. Mecanismos de resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en poblaciones de *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Rev. Cub. Med. Trop.** 1994.
9. Bisset JA, Rodríguez MM, Dayamí L. Determinación de los mecanismos de resistencia en *Culex quinquefasciatus*, Say 1823 y su implicación operacional en el uso correcto de insecticidas para el control. **Rev. Cub. Med. Trop.** 1994; 46: 2.

10. Díaz C, Bisset JA, González T, Rodríguez MM. Resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) de los municipios de Ciudad Habana, Cuba. **Rev. Cub. Med. Trop.** 1994; 46:2.
11. Molina DF, Bisset JA, Rodríguez MM, Saume F. Susceptibility of *Aedes aegypti* from different regions of Venezuela to organophosphorus and pyrethroid insecticides. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 11(3): 343-347.
12. Bisset JA, Ortíz E, Rodríguez MM, Hemingway J. Comparison of microtitre plate and filter paper assays for analysis of changes in elevated esterase-based resistance frequencies in field and laboratory populations of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Med. Vet. Ent.** 1995; 9: 94-97.
13. Ashley V, Rodríguez MM, Hemingway J. The independent gene amplification of electroforetically indistinguishable B esterases from the insecticide-resistant mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Biochem. J.** 1995; 305: 61-658.
14. Bisset JA, Dieguez L, Rodríguez MM, Díaz C, González T, Vázquez R. Tres combinaciones de estereras y su relación con la resistencia a insecticidas, carbamatos y piretroides en *Culex quinquefasciatus* de Cuba. **Rev. Cub. Med. Trop.** 1996; 48 (3): 5-11.
15. Molina DF, Bisset JA, Rodríguez MM, Saume F. 1996. Estudio de la susceptibilidad a insecticidas organofosforados y piretroides en cepas de *Aedes aegypti* (Linneaus) de cinco estados de Venezuela. **Boletín de la Dirección de malariología y Saneamiento Ambiental. Vol XXXV. #2.**
16. González T, Díaz C, Rodríguez MM, Bisset JA. Evaluación de la resistencia de una cepa de *Culex quinquefasciatus* partir de la selección con el insecticida piretroide lambdacialotrina. **Rev. Cub. Med. Trop.** 1996; 48 (3).
17. González T, Díaz C, Bisset JA, Rodríguez MM. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro. **Memorias Oswaldo Cruz.** 1996; 43(3): 234-239.

18. Rodríguez MM, Bisset JA, Mastrapa L, Díaz C. Asociación de la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides con los mecanismos de resistencia observados en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Ciudad de la Habana. **Rev. Cub. Med. Trop.** 1996; 47: 154–159.
19. Bisset JA, Rodríguez MM, Recio L, Hemingway J, Lines D, Small G, Karunaratne P and Ketterman AJ. Linkage disequilibrium in elevated esterases of *Culex quinquefasciatus* in the presence and absence of insecticide selection pressure. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 1997; 11(3)
20. Bisset JA, Rodríguez MM, Soca A. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides in the southern house mosquito (Diptera: Culicidae) from Cuba. **J. med. Entomol.** 1997; 34 (2): 244-246.
21. Molina DF, Bisset JA, Rodríguez MM, Soca A. Identification of resistance mechanisms in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Venezuela: detoxifying multifunction oxidase. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 1997; 13 (2): 113-126.
22. Rodríguez MM, Bisset JA, Rodríguez I, Díaz C. Determinación de la resistencia a insecticidas y sus mecanismos bioquímicos en dos cepas de *Culex quinquefasciatus* procedentes de Santiago de Cuba. **Rev. Cub. Med. Trop.** 1997; Vol 3.
23. Bisset JA, Rodríguez MM, Díaz C, González T. Estudio de la resistencia en una cepa de *Culex quinquefasciatus* procedente de Medellín, Colombia. **Rev. Cub. Med. Trop.** 1998; (2).
24. Bisset JA, Rodríguez MM, Soca A. Cross-Resistance to malathion in Cuban *Culex quinquefasciatus* induced by larval selection with deltamethrin. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 1998; 109-112.
25. Díaz C, Calvo E, Rodríguez MM, Bisset JA, Fresneda M. Niveles de resistencia a insecticidas en uso y alternativos en *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). **Rev. Cub. Med. Vet.** 1998.
26. Rodríguez MM, Bisset JA, Díaz C, Soca A. Selección de una cepa de *Culex quinquefasciatus* resistente a lambdacialotrina y su espectro de resistencia cruzada a otros insecticidas. **Rev. Cub. Med. Trop.** 1998; 50 (2): 129-32.

27. Bisset JA, Rodríguez MM, Díaz C, Hemingway J Raymond M, Soca A. Impacto del uso de insecticidas, alternativas para el control de mosquitos. ***Boletín Epidemiológico del IPK.***
28. Rodríguez MM, Bisset J A, Milá LH, Lauzán L, Soca A. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. ***Rev. Cub. Med. Trop.*** 1999; 51: 83-88.
29. Bisset JA, Rodríguez MM, Díaz C, Soca A. Caracterización de la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en *Culex quinquefasciatus* del estado Miranda, Venezuela. ***Rev. Cub. Med. Trop.*** 1999; 51 (2): 89-94.
30. Diéguez L, Bisset JA, Rodríguez MM, González T, Díaz C, Soca A. Análisis comparativo de la resistencia a insecticidas en cepas de *Culex quinquefasciatus* provenientes de Camagüey. ***Rev. Cub. Med. Trop.*** 1999; 51 (1): 26-32.
31. Bisset JA, Rodríguez MM, Díaz C, Soca A. Evolución de la resistencia a insecticidas en *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en un área de Ciudad de la Habana. ***Rev. Cub. Med. Trop.*** 2000; 52: (3): 180-185.
32. Bisset JA, Rodríguez MM, Fernández D, Pérez O. Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en larvas del Municipio Playa, colectadas durante la etapa intensiva contra el *Aedes aegypti* en Ciudad de la Habana, 2001-2002. ***Rev. Cub. Med. Trop.*** 2004; 56 (1): 61-6.
33. Díaz C, Pérez M, Rodríguez MM, Calvo E, Bisset JA, Fresneda M. Resistencia a insecticidas en cepas de terreno de la especie *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) procedentes de Santiago de Cuba. ***Rev. Cub. Med. Trop.*** 2000; 52 (1):24-30.

8.3. Presentación en eventos científicos

1. XV Annual Meeting of American Mosquito Control Association (AMCA). USA. 1999.
2. Jornada Provincial de Veterinaria. Cuba. 1999.
3. I SIMPOSIO INTERNACIONAL DE VIGILANCIA Y LUCHA ANTIVECTORIAL. Cuba. 1999.
4. Fifth Biennial Conference Society for Tropical Veterinary Medicine. USA. 1999.
5. XVI Annual Meeting of American Mosquito Control Association (AMCA). USA. 2000.
6. V Simposio Internacional de Zoología. Cuba. 2000.
7. AMCA 2001. USA. 2001.
8. II Simposio Internacional de Vigilancia y Lucha Antivectorial, titulados. Cuba. 2001.
9. EXPOSICIÓN NACIONAL DE CIENCIA Y TÉCNICA, Cuba. 2001.
10. XIV FORUM DE CIENCIA Y TÉCNICA, a nivel municipal. Cuba 2001.
11. XIV FORUM DE CIENCIA Y TÉCNICA a NIVEL PROVINCIAL. Diciembre. 2001.
12. XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología, VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, III Congreso Cubano de Medicina Tropical. Cuba. 2002.
13. II CONGRESO INTERNACIONAL DE DENGUE Y FIEBRE AMARILLA. Cuba. 2004.
14. VI SIMPOSIO DE ZOOLOGÍA. Cuba. 2004.
15. Congress International Medicine and Health in the Tropics. Francia 2005.
16. SEGUNDO CONGRESO INTERNACIONAL DE DENGUE Y FIEBRE AMARILLA. Cuba. 2005.
17. XVI Forum de Ciencia y Técnica. IPK. Cuba. 2006
18. III Simposio internacional de vigilancia y lucha antivectorial. Cuba. 2006.
19. XVIII CONGRESO DE LA FEDERACIÓN LATINOAMERICANA DE PARASITOLOGÍA. 2007.
20. CONGRESO CENTROAMERICANO DE PARASITOLOGÍA Y MEDICINA TROPICAL. 2007.
21. FORUM MUNICIPAL DE CIENCIA Y TÉCNICA. 2007.
22. FORUM PROVINCIAL DE CIENCIA Y TÉCNICA. 2007.

8.4. Resultados relevantes

Año 2000. Autor del trabajo titulado "Niveles de resistencia a malation en *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*, como resultado de su uso en la campaña de control de *Aedes aegypti*." que obtuvo el reconocimiento de **Resultado Relevante Institucional** y resultó **Destacado** en el XIV Forum Provincial de Ciencia y Técnica.

Año 2001. Autor del trabajo titulado "Modificación de los métodos en placas de microtitulación para la detección de los mecanismos de resistencia a insecticidas, basados en la alta actividad de esterasas y glutation-s-transferasa en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)" que recibió la categoría de **Resultado Relevante Institucional** y fue propuesto para presentarse como logro de la Academia de Ciencias.

Año 2002. Autor del trabajo titulado "Selección y caracterización de la resistencia a temefos en una población de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba" que obtuvo el reconocimiento de **Resultado Relevante Institucional** y fue propuesto para presentarse como logro de la Academia de Ciencias.

Año. 2006. Autor del trabajo titulado "Obtención cepas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de referencia para estudios de resistencia a insecticidas, que obtuvo la categoría de **Resultado Relevante Institucional** y obtuvo recientemente la categoría de **Relevante** en el Forum Municipal de Ciencia y Técnica.

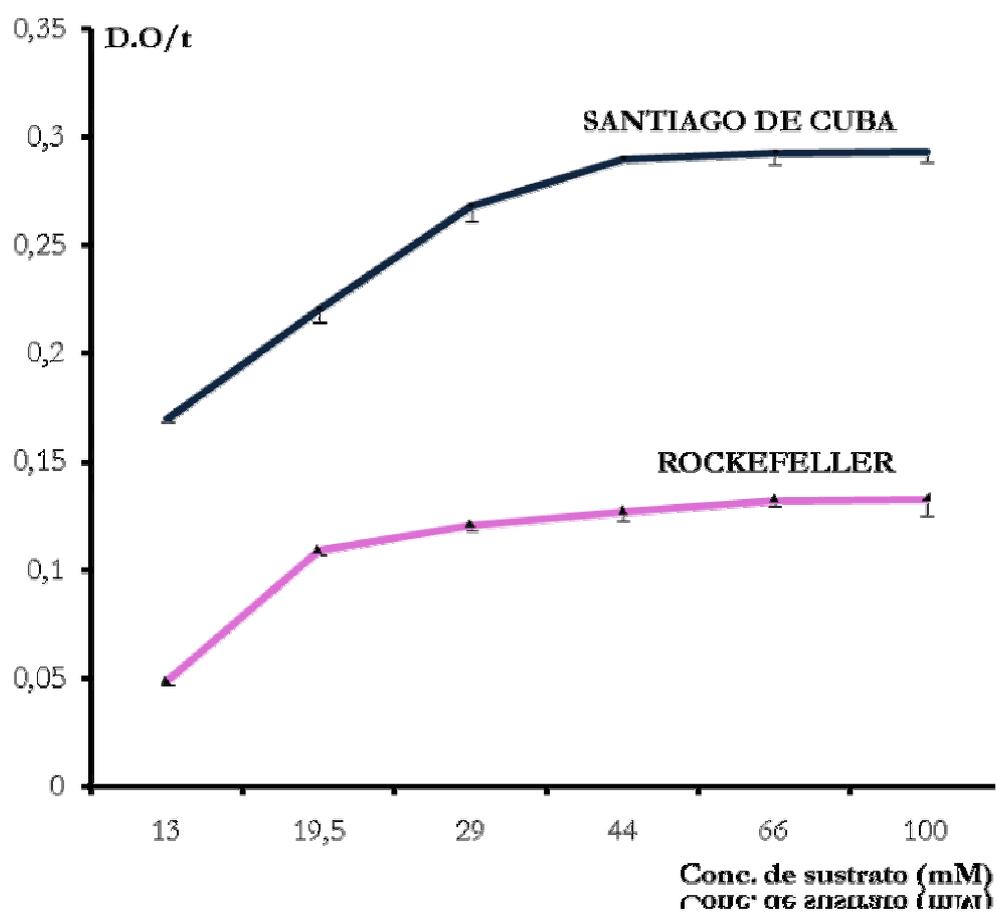
Año 2007. Autor de un trabajo titulado: Obtención de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de referencia para estudios de resistencia a insecticidas, que obtuvo la categoría de **PONENCIA DESTACADA PROVINCIAL** en el XVI Forum de Ciencia y Técnica.

Año 2007. Coautor de un trabajo que resultó Logro de la Academia de Ciencias de Cuba titulado: Estudios Entomológicos dirigidos al Fortalecimiento del Programa de Erradicación de *Aedes aegypti* en Cuba. Este resultado recibió también la categoría de **PONENCIA DESTACADA PROVINCIAL** en el XVI Forum de Ciencia y Técnica.

Año 2007. Coautor de un trabajo que obtuvo la categoría de **PONENCIA DESTACADA PROVINCIAL** en el XVI Forum de Ciencia y Técnica. El trabajo se titula: "Nuevos aportes del muestreo pupal de *Aedes aegypti* para el mejoramiento de las estrategias de control sobre el vector y el riesgo de transmisión." **Año 2008:** Coautor de un Logro de la Academia de Ciencias de Cuba titulado: Nuevos indicadores entomológicos dirigidos al mejoramiento de las estrategias de control del vector y a la reducción en la transmisión del dengue.

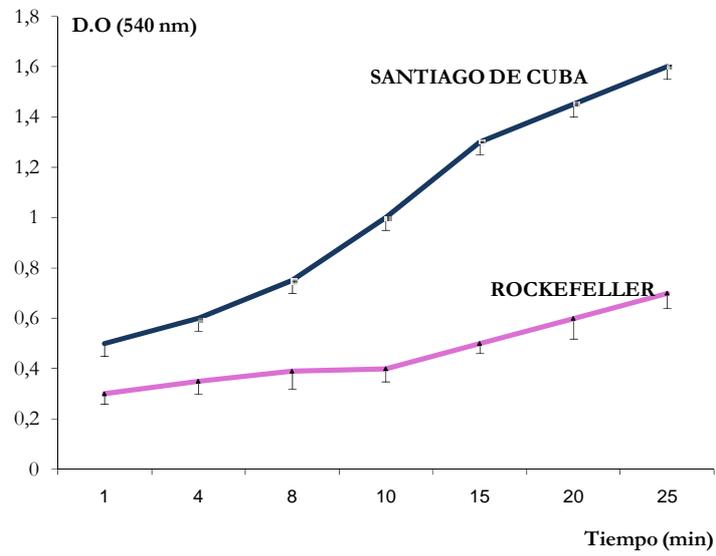
9. ANEXOS

Anexo 1.



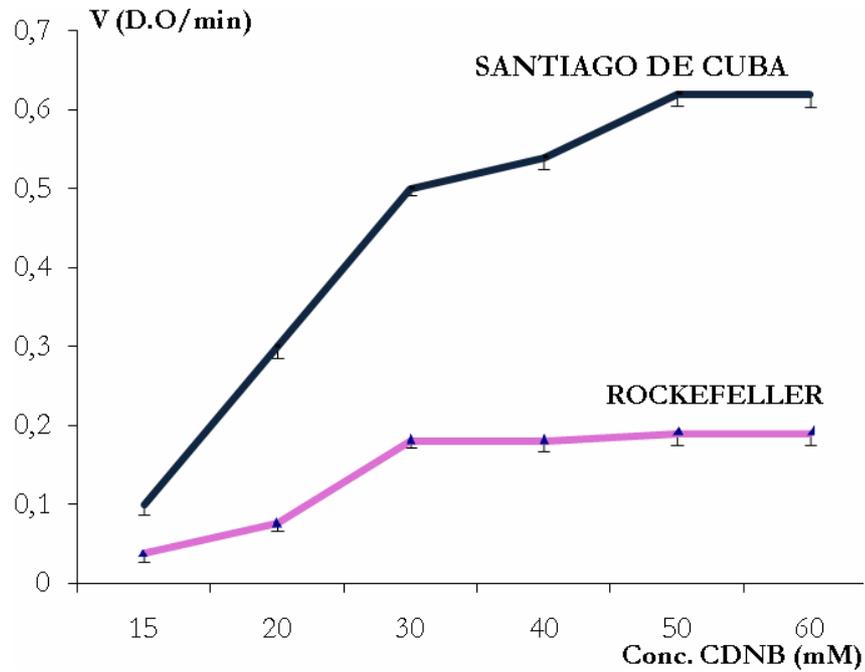
Actividad de esterases (D.O/t) a diferentes concentraciones del sustrato β naftil acetato.

Anexo 2



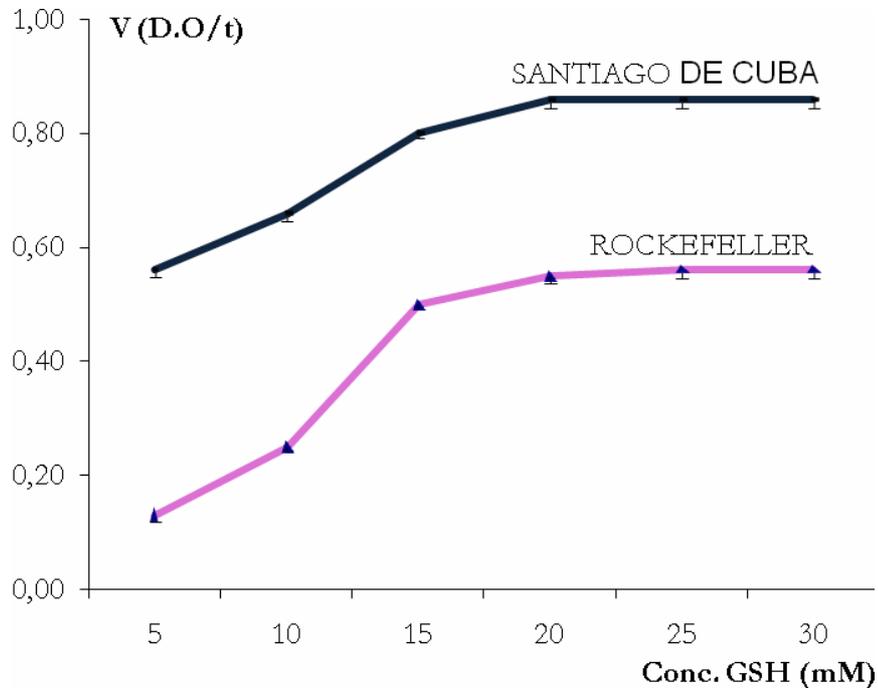
Variación de la actividad de esterasas (D.O) en el tiempo, utilizando la concentración saturante del sustrato β naftil acetato.

Anexo 3



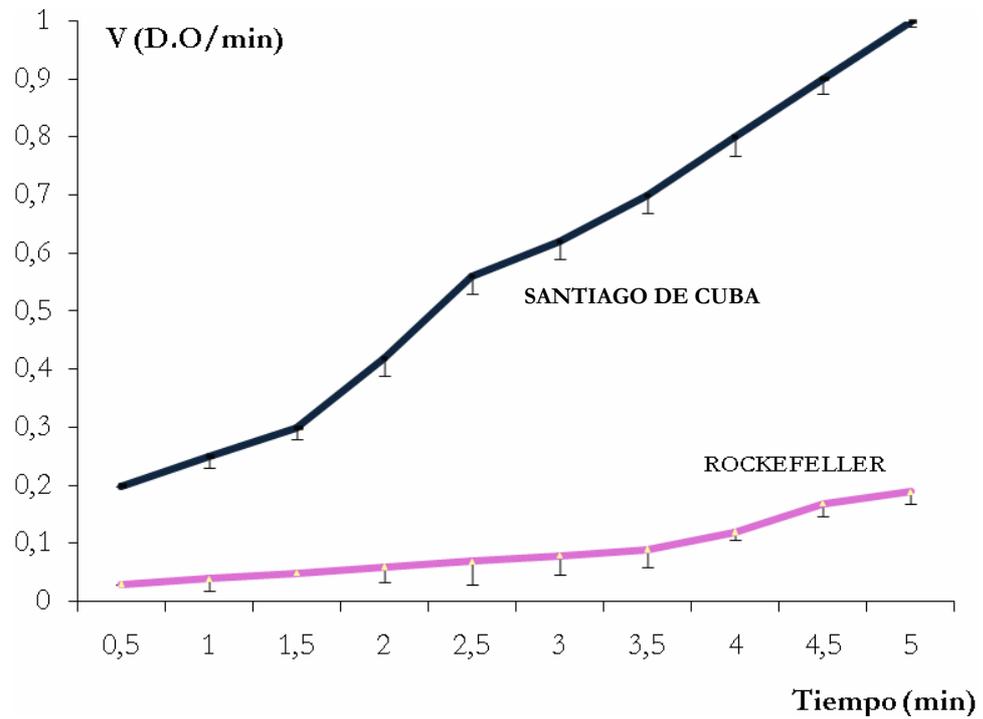
Variación de la actividad de la enzima glutation transferasa (GST) variando la concentración del sustrato 1- cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) y manteniendo fija la concentración de glutation reducido (GSH).

Anexo 4



Variación de la actividad de la enzima glutathione transferasa (GST), variando la concentración del sustrato glutathione reducido (GSH) y manteniendo fija la concentración de 1- cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB).

Anexo 5



Variación de la actividad de la enzima glutathione transferasa (GST), expresada en D.O/min en el tiempo, utilizando la concentración saturante de los sustratos glutathione reducido (GSH) y 1- cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB).