

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba

Lic. María Magdalena Rodríguez,¹ Dr. Juan A. Bisset,² Lic. Lorely H. Milá,³ Lic. Eric Calvo,⁴ Lic. Cristina Díaz¹ y Téc. Lázaro Alain Soca⁵

RESUMEN

Producto del más reciente brote de dengue en el municipio Santiago de Cuba, se estudió una cepa de este vector para determinar sus niveles de susceptibilidad y/o resistencia a insecticidas organofosforados y piretroides. Los resultados de los bioensayos mostraron bajos niveles de resistencia a fentión, malatión y deltametrina, se obtuvieron moderados para temefos, metilpirimifos y cipermetrina, y altos para clorpirifos. Según los resultados obtenidos, en el uso del sinergista S,S,S tributil fosfotriado, se demostró que las enzimas esterasas juegan una función importante en la resistencia a temefos y clorpirifos. Utilizando el sinergista piperonil butóxido se demostró que las enzimas oxidadas de función múltiple no intervienen en la resistencia a ninguno de los insecticidas evaluados. Se realizaron las técnicas bioquímicas para la detección de los mecanismos de resistencia mediado por enzimas esterasas, glutatión-s-transferasa (GST) y acetilcolinesterasas, (AChE) en *Aedes aegypti* y quedó demostrado, de acuerdo con los altos valores de frecuencia observados para cada uno de los mecanismos, que las enzimas esterasas y GST intervienen en la resistencia a insecticidas, no resultando así para la AChE. Sin embargo, por primera vez en *Aedes aegypti*, se encontró la presencia del gen de la AChE, aunque a baja frecuencia. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se observó una banda fuertemente teñida con un valor de movilidad relativa de 0,779; la cual se nombró A4, que no se observó en la cepa de referencia, y que pudiera estar asociada con la resistencia a organofosforados, hecho que queda por demostrar en futuros trabajos.

Descriptor DeCS: RESISTENCIA A INSECTICIDA; AEDES; INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS; PIRETRINAS; SINERGISTAS DE PLAGUICIDAS.

Dentro del gran número de especies de mosquitos resistentes a la acción de los insecticidas encontramos al género *Aedes* que desempeña una importante función en la transmisión de enfermedades virales. El dengue, fiebre del dengue hemorrágico (FDH) y la fiebre amarilla, son enfermedades víricas, transmitidas por esta especie, que causan grandes impactos en la salud pública.¹ Dichas enfermedades están diseminadas en áreas urbanas y van aparejadas con la distribución

geográfica de su principal vector: *Aedes aegypti* Linnaeus.^{2,3}

En 1960, se reportaron los primeros casos de resistencia a insecticidas organofosforados y carbamatos en *Aedes aegypti*. Fox⁴ reportó una cepa en Puerto Rico resistente 10X a malatión y diazinón. La capacidad de resistir a malatión se asoció con la detoxificación mediada por enzimas de actividad específica carboxilesterasas. La posible función de las enzimas específicas en el proceso de

¹ Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada.

² Licenciado en Biología. Investigador Auxiliar.

³ Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Reserva Científica.

⁴ Licenciado en Bioquímica. Aspirante a Investigador.

⁵ Técnico en Farmacia Industrial.

detoxificación de insecticidas, en *Aedes aegypti*, fue observada en larvas de la especie.⁵ Estos estudios sugieren la presencia de enzimas detoxificadoras específicas que cumplen un papel importante en el mecanismo de resistencia a organofosforados. Otro grupo de insecticidas, piretroides, también sufre los efectos del desarrollo de mecanismos de resistencia por los vectores. Estos compuestos presentan grandes problemas con la resistencia cruzada que existe con el organoclorado DDT.⁶⁻⁸ Muchas cepas analizadas que muestran resistencia a DDT, evidencian resistencia a permetrina, lo que sugiere la presencia de un mecanismo similar.⁶

En Cuba, comenzó en 1981 una campaña intensiva de control contra el mosquito *Aedes aegypti* donde se usó, por 7 años consecutivos, el insecticida organofosforado malatión; hecho que produjo la aparición de resistencia a este compuesto de *Culex quinquefasciatus*, y fue sustituido en 1986 por piretroides.

Este trabajo se propone determinar los niveles de resistencia a insecticidas en la cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba, determinar *in vivo* los mecanismos de resistencia, mediante el uso de sinergistas, la frecuencia génica y el tipo de esterasa que pudiera estar involucrada en la resistencia.

MÉTODOS

Para el trabajo se utilizaron 2 cepas de *Aedes aegypti*: ROCKEFELLER, cepa de referencia susceptible, que fue suministrada por el laboratorio del CDC de San Juan de Puerto Rico; y SANTIAGO DE CUBA, cepa de campo colectada en el municipio Santiago de Cuba, durante el más reciente brote de dengue.

Las colonias fueron establecidas y mantenidas en el insectario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", con temperatura de 25 EC y 65 % de humedad relativa.

Se emplearon los insecticidas siguientes:

- Organofosforado:
 - Temefos: 93,3 % de pureza, suministrado por *American Cyanamid Co.*, Princeton, New Jersey.

- Malatión: 97 % de pureza, suministrado por *American Cyanamid Co.*, Princeton, New Jersey.
- Clorpirifos: 94 % de pureza, suministrado por *Dow Chemical Co.*, Midlan, Michigan.
- Metil-pirimifos: 99,8 % de pureza, suministrado por ZENECA, Salud Pública.
- Piretroides
- Deltametrina: 98,3 % de pureza, suministrado por AGREVO.
- Cipermetrina: 90,5 % de pureza, suministrado por ZENECA, Salud Pública.
- Sinergistas:
 - S,S,S tributil fosfotritiado (DEF): 99 % de pureza, suministrado por *Mobay*, Kansas City, Kansas.
 - Piperonil butóxico (PB): (α -[2-butoxi-etoxi-4,5-metileno-dioxi-2-propitolueno]); 96,8 % de pureza, suministrado por *McLaughlin Gormley King Co.*, Minneapolis, Minnesota.

En los bioensayos se emplearon 5 réplicas de cada concentración del insecticida (20 larvas por réplica), registrándose entre 2 y 98 % de mortalidad. Todas las soluciones se ajustaron a un volumen final de 1 mL con acetona. Esta concentración de acetona no causó mortalidad en los controles.

La acción de los sinergistas se determinó exponiendo las larvas a concentraciones subletales de DEF (0,4 mL de 0,01 %) y de PB (0,8 mL de 0,001 %) durante 4 h previas a la adicción de los insecticidas. La lectura de las mortalidades se realizó a las 24 h, hallándose la CL_{50} y la CL_{90} mediante el programa probit-log.⁹

Las pruebas bioquímicas se realizaron en larvas de cuarto estadio temprano. Se determinó la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) normal e inhibida con propoxur según el método de Hemingway y otros.¹⁰ La actividad de las esterasas se determinó individualmente en larvas según el método de Peiris & Hemingway.¹¹ La actividad específica de la enzima glutatión-s-transferasa se determinó mediante la técnica de Booth y otros.¹² Todas estas técnicas fueron estandarizadas por *Rodríguez* y otros, para *Aedes aegypti*.¹³ Se determinó en los 3 casos la frecuencia génica según la fórmula de equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para realizar la electroforesis se determinó la actividad enzimática de las esterasas y se

TABLA 1. Rangos de la concentración letal 50 (CL_{50}), pendiente de la recta (b) y factor de resistencia (FR) para diferentes grupos de insecticidas en las cepas SANTIAGO DE CUBA y ROCKEFELLER, de *Aedes aegypti*

	SANTIAGO DE CUBA						
	Temefos	Malatión	Fentión	Metil-pirimifos	Clorpirifos	Deltametrina	Cipermetrina
CL_{50}	0,0713	0,7888	0,05213	0,064415	0,11456	0,0037	0,00941
(rango)	0,067 - 0,076	0,729 - 0,855	0,048 - 0,056	0,06 - 0,068	0,104 - 0,0141	0,0033 - 0,0041	0,00877 - 0,0104
b	$7,19 \pm 0,72$	$5,1 \pm 0,66$	$4,59 \pm 0,44$	$6,47 \pm 1,42$	$6,72 \pm 1,42$	$1,77 \pm 0,28$	$6,14 \pm 0,93$
FR	5,96	1,77	0,247	8,101	16,18	4,35	7,23
ROCKEFELLER							
CL_{50}	0,01274	0,4455	0,00981	0,00797	0,00687	0,00085	0,00129
(rango)	0,012 - 0,014	0,38 - 0,53	0,009-0,011	0,007 - 0,009	0,0062 - 0,007	0,00066 - 0,0012	0,0008 - 0,002
b	$6,27 \pm 0,73$	$2,19 \pm 0,27$	$6,04 \pm 1,28$	$3,62 \pm 0,52$	$5,1 \pm 0,825$	$1,51 \pm 0,25$	$1,53 \pm 0,24$
FR	-	-	-	-	-	-	-

seleccionaron las muestras con mayor actividad. Luego, en tubos Eppendorf (1,5 mL), se adicionaron 10 mL de muestra más 10 mL del indicador Xilene cianol (0,02 % en sacarosa al 15 %). Se aplicaron 20 mL de esta mezcla en el gel y se realiza la corrida a 150 V, durante 45 min. Para la coloración de las bandas de esterases, se sumergieron los geles en 50 mL de *buffer* fosfato (0,1 M) que contenía 4 mL de cada uno de los sustratos inespecíficos de las esterases (α y β -naftilacetato). Después se añadieron 0,5 g del colorante Fast blue RR, disuelto previamente en agua destilada y SDS (sodio dodecil sulfato) al 5 %. Para fijar la coloración de las bandas se sumerge el gel en una solución de ácido acético al 10 %. A cada una de las bandas se le determinó la movilidad relativa.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los rangos de la concentración letal 50 (CL_{50}), la pendiente de la recta (b) y el factor de resistencia para diferentes grupos de insecticidas en las cepas SANTIAGO DE CUBA y ROCKEFELLER de *Aedes aegypti*.

La cepa cubana SANTIAGO DE CUBA, colectada durante el reciente brote de dengue, fue probada para determinar su susceptibilidad y/o resistencia a insecticidas organofosforados (temefos, malatión, clorpirifos, fentión y metil-pirimifos) y a los piretroides (deltametrina y cipermetrina).

Como se muestra en la tabla 1, esta cepa resultó susceptible a los insecticidas organofosforados

malatión y fentión, y al piretroide deltametrina. Los individuos de esta población mostraron moderados niveles a temefos, metil-pirimifos y cipermetrina, y se evidenciaron altos valores de resistencia para clorpirifos.

De los ensayos realizados con sinergistas, resultó ser el DEF el de mayor actividad sobre la cepa SANTIAGO DE CUBA, lo cual se observó a través del factor de sinergismo (PS), en especial para clorpirifos (16,17 x), seguido por temefos (6,45 x). La resistencia a clorpirifos para esta cepa, sinergiada por DEF, se reduce desde un valor de CL_{50} de 0,11 hasta 0,0068 mg/mL. Esta reducción en los niveles de resistencia confirma que las esterases desempeñan una función de verdadera importancia en la detoxificación enzimática del clorpirifos en la cepa SANTIAGO DE CUBA. Los valores bajos del factor de sinergismo con DEF para metil-pirimifos y cipermetrina, demostraron que la resistencia a estos insecticidas no está mediada por el mecanismo de esterases (tabla 2).

Los resultados del FS obtenidos con el sinergista PB, indicaron que las oxidasas de función múltiple (OFM) no desempeñan una función importante en la resistencia a temefos, cipermetrina, clorpirifos y metil-pirimifos (tabla 3). A la luz de los resultados obtenidos con ambos sinergistas es sugerente que en la resistencia a metil-pirimifos y cipermetrina estén interviniendo otros mecanismos de acción tan importantes en *Aedes aegypti* como GST glutatión-s-transferasa y gen Kdr.

Se demostró que la actividad de las esterases elevadas y el mecanismo mediado por la enzima GST

TABLA 2. Valores de las CL₅₀ y CL₉₀ y factor de sinergismo (FS), para insecticidas organofosforados y piretroides, mediante el sinergista DEF, en *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba

Insecticida	CL ₅₀ (ppm)	CL ₉₀ (ppm)	b	FS
Temefos	0,011	0,016	7,67	6,45
Clorpirifos	0,0068	0,01	7,43	16,17
Malatión	0,779	1,69	3,81	1,01
Metil-pirimifos	0,098	0,15	6,57	0,653
Fentión	0,029	0,04	9,54	1,79
Cipermetrina	0,007	0,011	6,31	1,34
Deltametrina	0,0055	0,013	3,29	0,673

TABLA 3. Valores de las CL₅₀ y CL₉₀ y factor de sinergismo (FS), para insecticidas organofosforados y piretroides, mediante el sinergista PB, en *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba

Insecticida	CL ₅₀ (ppm)	CL ₉₀ (ppm)	b	FS
Temefos	0,088	0,13	7,91	0,81
Clorpirifos	0,086	0,175	4,16	1,28
Malatión	1,115	2,437	3,77	1,013
Metil-pirimifos	0,181	0,346	4,56	0,353
Fentión	0,0503	0,074	7,58	1,03
Cipermetrina	0,00789	0,01276	6,14	1,191
Deltametrina	0,00528	0,01296	3,29	0,701

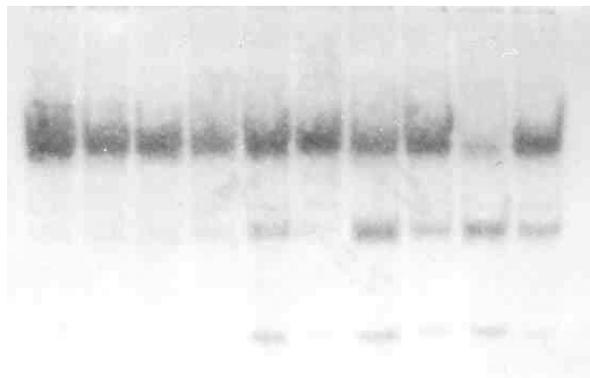


Fig. Patrones de electroforesis en gel de poliacrilamida para la población de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. Obsérvese la esterasa nombrada A4 teñida con mayor intensidad.

desempeñan un papel muy importante en la resistencia a insecticidas de la cepa SANTIAGO DE CUBA, encontrándose a alta frecuencia ambos mecanismos (1,0 y 0,5725; respectivamente). El mecanismo mediado por acetilcolinesterasas no interviene en la resistencia de esta cepa y se observa a baja frecuencia en la población (0,0435).

El examen visual de los geles reveló un gran número de bandas de esterases A y B para esta

cepa (fig.). Por su movilidad electroforética, las bandas fueron enumeradas desde 1 hasta 5, con el correspondiente cálculo de su movilidad relativa. Es de destacar que en la cepa SANTIAGO DE CUBA se observó una banda de esterasa nombrada como A4, con una movilidad relativa de 0,779, que apareció con una alta frecuencia (99 a 100 %), y no se observó en la cepa ROCKEFELLER. Fueron observadas otras bandas, su intensidad fue menor.

DISCUSIÓN

Con los presentes estudios se determinaron los niveles de resistencia en una población de *Aedes aegypti* del municipio Santiago de Cuba, mediante diferentes técnicas para su monitoreo. El nivel de susceptibilidad de la cepa SANTIAGO DE CUBA se demostró a través de los bajos y moderados niveles de resistencia. Se mostraron niveles bajos a fentión, malatión y deltametrina. Los valores moderados se obtuvieron para temefos, pirimifos metil y cipermetrina.

Identificamos, con la utilización del PB, que el mecanismo mediado por MFO no desempeñó un papel importante en la resistencia a los insecticidas temefos, clorpirifos metil-pirimifos y cipermetrina. Por otra parte, el estudio con el sinergista DEF permitió concluir que el mecanismo de esterases no está involucrado en la resistencia metil-pirimifos y cipermetrina, pero desempeña una función importante en los altos niveles de resistencia a clorpirifos en la cepa SANTIAGO DE CUBA.

La resistencia a clorpirifos está muy bien documentada en cepas de *Aedes aegypti* para la región del Caribe. *Rawlins* y *Ragoonansingh*¹⁴ reportaron altos niveles de resistencia a clorpirifos, en poblaciones de *Aedes aegypti* de Puerto Rico (5,86 x), Santa Lucía (7,29 x) y Trinidad (9,14 x). Estos resultados fueron argumentados con los niveles de resistencia de clorpirifos reportados en esta investigación.

Según *Mazarri* en su tesis de maestría, el hecho de que existían altos niveles de resistencia cruzada entre clorpirifos y temefos, sugiere que el mecanismo de resistencia a temefos es el que le confiere protección a clorpirifos. En el presente estudio, el mecanismo de resistencia a clorpirifos y a temefos

se investigó a través del uso de sinergistas, por los métodos bioquímicos y mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Los datos obtenidos con el sinergista DEF para ambos insecticidas, nos sugieren que el mecanismo mediado por esterasas de actividad inespecífica pudiera ser responsable de esta resistencia.

En la electroforesis se observó una banda fuertemente teñida, que de acuerdo con su movilidad relativa y su coloración se clasificó como esterasa A4 y cuya movilidad relativa fue de 0,779. Mazarri en 1994, en su tesis de Maestría (*Insecticide resistance in two field populations of Aedes aegypti (L) from Venezuela*), encontró que en una cepa de *A. aegypti* se mostraba una banda cuya movilidad relativa era de 0,61; que estaba presente en el 91 % de los individuos, y que fue nombrada esterasa A6. También se clasificó como esterasa A6 la encontrada en adultos de *Aedes aegypti* procedentes de San Juan de Puerto Rico, con un valor de movilidad relativa de 1,00.¹⁴ Producto de la nomenclatura de estas esterasas se dificulta la comparación entre ellas.

La correlación entre la actividad de las esterasas y la resistencia a los compuestos organofosforados, está documentada en un gran número de insectos.¹⁵⁻²¹

Con el uso de ensayos en placa de microtitulación para esterasas, estandarizados por Rodríguez y otros, para *Aedes aegypti*, se calculó la frecuencia de este mecanismo para la población de Santiago de Cuba que resultó ser igual a 1. Este resultado reafirma que el mecanismo de esterasas elevadas está fuertemente involucrado en la resistencia a insecticidas. Los niveles de resistencia a metil-pirimifos y cipermetrina, en la cepa SANTIAGO DE CUBA, pueden estar asociados con otros mecanismos de acción como gen Kdr y GST.

En la determinación de la actividad de GST en insectos individuales, se encontró que en la población de Santiago de Cuba, existió una frecuencia de 0,5725 para este mecanismo, hecho que sugiere su intervención en la resistencia a metil-pirimifos y cipermetrina. Para el mecanismo mediado por enzimas acetilcolinesterasas se obtuvo una frecuencia muy baja (0,0435), valor que indica que este mecanismo no está relacionado con los altos niveles de resistencia a insecticidas, obtenidos para esta cepa. Es de destacar que nunca ha sido reportada la presencia del mecanismo de AchE, ni a baja frecuencia, en *Aedes aegypti*.

SUMMARY

As a result of the most recent dengue outbreak in Santiago de Cuba province, a strain of this vector was studied to determine the levels of sensitivity and/or resistance to organophosphate and pyrethroid insecticides. The results of bioassays showed low levels of resistance to fenitrothion, malathion and deltamethrin, moderate levels of resistance to temephos, methyl-pirimifos and cipermetrin and high levels of resistance to chlorpyrifos. According to the results obtained from the use of S.S.S. phosphotriethylate trybutyl synergist, it was shown that esterases play an important role in resistance to temephos and chlorpyrifos. Piperonyl butoxide synergist disclosed that multifunction oxidases were not involved in the resistance to any of the evaluated insecticides. Biochemical techniques were applied to detect esterase-, glutathione-S-transferase- and acetylcholinesterase-mediated resistance mechanisms of *Aedes aegypti*. In accordance with the high frequency values observed in each of the mechanisms, it was proved that esterases and glutathione-S-transferase were involved in the insecticide resistance but acetylcholinesterases were not. However, acetylcholinesterase gene was found in *Aedes aegypti* for the first time though at low frequency. The polyacrylamide-gel electrophoresis made it possible to observe a well-stained band with a relative mobility value of 0,779; this band was called A4 it was not observed in the reference strain and may be associated to organophosphate resistance which remains to be proved in future research.

Subject headings: INSECTICIDE RESISTANCE; AEDES; INSECTICIDES; ORGANO PHOSPHATE; PYRETHRINS; PESTICIDE SYNERGISTS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lehane MJ. Biology of blood-sucking insects. London: Harper Collins Academic. 1991:288.
2. OMS. Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vector. OMS/VBC/89.967, 134 PP.
3. Gubler D. Dengue/dengue hemorrhagic fever in the America: prospects for the year 2000. En: Dengue, a worldwide problem, a common strategy. Mexico DF Halstead and Gómez, 1992:329.
4. Fox I, García-Mola I. Multi-resistant *Aedes aegypti* in Puerto Rico and Virgin islands. Science 1961;233:646.
5. Chen YP, Sudderuddin KI. Toxicological studies of insecticides on *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* (L). Southeast Asia. J Trop Med Public Health 1978;9:378-83.
6. Prasittisuk C, Busvine JR. DDT-resistant mosquito strains with cross resistance to pyrethroids. Pestic Sci 1977;8:527-33.
7. Omer SM, Georghiou GP, Irving SN. DDT/pyrethroid resistance interrelationships in *Anopheles stephensi*. Mosq News 1980;40:200-9.
8. Malcom CA. Current status of pyrethroid resistance in Anophelines. Parasitol Today 1988;4:13-5.
9. Raymond M. Presentation d'une programme d'analyse log-probit pour microordinateur cahiers Orstrom Sér Ent Méd Parasitol 1985;23:117-21.
10. Hemingway J, Smith C, Jayawardena KGI, Heath PRJ. Field and laboratory detection of the altered acetylcholinesterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae). Bull Entomol Res 1986;76:359-65.

11. 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.
 12. Rodríguez MM, Bisset JA, Milá L, Darjaniva MF, Lauzan L, and Raymond M. Detection of resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from Cuba and Venezuela: standardization of the methods. J Am Mosq Control Assoc:1998;14:227.
 13. Booth J, Boyland E, Sims P. An enzyme from the rat liver catalyzing conjugation with glutathione. Biochem J 1961;79:516-23.
 14. Rawlins SC, Ragoonansingh R. Comparative organophosphorous insecticide susceptibility in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and *Toxorhynchites mocteuma*. J Am Mosq Control Assoc 1990;6:315-17.
 15. Field WN, Hitchen JM, Rees AT. Esterase activity in strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) tolerant and susceptible to the organophosphate insecticide malathion. J Med Entomol 1984;21:412-8.
 16. Georghiou GP, Pasteur N. Electrophoretic esterase patterns in insecticide resistant and susceptible mosquitoes. J Econ Entomol 1978;71:201-5.
 17. Devonshire AL, Sawcki RM. Insecticide-resistant *Myzus persicae* as an example of evolution by gene duplication. Nature 1979;280:140-1.
 18. 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;73:301-5.
 19. 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 Entomol Res 1983;73:153-70.
 20. 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 1990;80:245-50.
 21. Boning BC, Hemingway J, Romi R, Majori G. Interaction of insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Italy in response to changing insecticide selection pressure. Bull Entomol Res 1991;81:51-60.
- Recibido: 6 de mayo de 1998. Aprobado: 18 de octubre de 1998.
Lic. *María Magdalena Rodríguez*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. E.mail: ciipk@infomed.sld.cu