

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Comparación de 2 poblaciones de mosquitos *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba con diferente conducta de reposo

Lic. Juan A Bisset,¹ Lic. Magdalena Rodríguez² y Lic. Yaxsier De Armas³

RESUMEN

Se separaron 2 poblaciones de *Aedes aegypti* que se colectaron en Santiago de Cuba durante la epidemia de 1997, por manifestar diferentes hábitos de reposo, unos mosquitos reposaban de forma natural en las paredes hasta 1 m de altura (Cepa Santiago de Cuba) y otros se encontraron reposando en los techos de las viviendas (Cepa Santiago de Cuba Techo). Ambas cepas no mostraron diferencias significativas en cuanto a sus características morfológicas. Los mosquitos pertenecientes a Santiago de Cuba Techo presentaron los mismos parches que los de Santiago de Cuba. La resistencia a los insecticidas organofosforados es muy similar en ambas poblaciones, sin embargo, difieren en la alta resistencia al piretroide deltametrina en Santiago de Cuba Techo en comparación con Santiago de Cuba. Desde el punto de vista bioquímico y mediante el uso del sinergista DEF se demostró que las esterasas están asociadas con la alta resistencia a clorpirifos en ambas cepas, no resultando así las MFO, lo cual se demostró con el sinergista piperonil butóxido. Sin embargo, la enzima GST parece ser la responsable de la alta resistencia detectada a deltametrina en Santiago de Cuba Techo por el valor elevado de frecuencia de ese gen en esta cepa. Se utilizó la técnica del ADN polimórfico amplificado a la azar para observar la variabilidad genética entre las 2 poblaciones; los resultados revelaron que existió polimorfismo genético entre las poblaciones en estudio, lo cual pudiera tener una implicación en la ecología y epidemiología del vector.

Palabras clave: *Aedes*, mosquitos, resistencia insecticida, conducta reposo, insecticida, RAPD, Santiago de Cuba.

El dengue y la fiebre hemorrágica del dengue (FHD) son consideradas como una de las enfermedades más importantes y diseminadas transmitidas por mosquitos, especialmente por *Aedes aegypti*. Este vector desempeña un papel muy importante en la transmisión de numerosas arbovirosis.¹ Un método muy útil como apoyo para la supresión de epidemias de dengue y FHD es el empleo de insecticidas en ultra bajo volumen (UBV),² lo cual en aplicaciones repetidas puede causar 100 % en el control de poblaciones de mosquitos adultos.³⁻⁵ La efectividad de este tratamiento puede disminuir por varias razones,

entre las que se encuentra la conducta de reposo de las poblaciones de *Aedes aegypti*.³

Recientemente, el uso de técnicas moleculares que detectan variación en el nivel de ADN ha permitido el análisis de marcadores genéticos con alto grado de polimorfismo en regiones diferentes del genoma.⁶ Fragmentos de ADN obtenidos por la técnica del RAPD han sido empleados para estudios de variabilidad genética entre las poblaciones de *Aedes aegypti*.^{7,8}

En 1997 ocurre la tercera epidemia de dengue en la ciudad de Santiago de Cuba, en la cual se reportaron un total de 3 012 casos clínicos, con

¹ Licenciado en Biología. Investigador Auxiliar.

² Licenciada en Bioquímica. Investigadora Auxiliar.

³ Licenciado en Bioquímica. Reserva Científica.

205 casos de FHD y 12 muertes, producidas por el serotipo 2.⁹ En esta epidemia se colectaron mosquitos *Aedes aegypti* que se encontraban reposando indistintamente, unos reposaban de forma normal en las paredes hasta 1 m de altura y otros se encontraron reposando en los techos de las viviendas, de ahí se criaron 2 poblaciones de *Aedes aegypti* separadas en el insectario, con el objetivo de determinar si estas diferencias en su comportamiento de reposo estaban asociadas con patrones de resistencia a insecticidas o si existía alguna característica genética que los diferenciara, lo cual pudiera tener una implicación en la ecología y epidemiología del vector. En este trabajo se analizaron las características morfológicas, bioquímicas y moleculares de ambas poblaciones de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba.

MÉTODOS

CEPAS A UTILIZAR

Para el trabajo se utilizaron 3 cepas:

Cepa ROCKEFELLER: cepa susceptible de referencia, suministrada por el Centro de Control de Enfermedades de San Juan, Puerto Rico.

Cepa Santiago de Cuba: colectada en 1997 en la misma ciudad y mantenida en condiciones de insectario en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Los mosquitos de esta cepa reposan en las paredes de las casas.

Cepa Santiago de Cuba Techo: colectada en 1997 en la misma ciudad y mantenida en condiciones de insectario en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Los mosquitos de esta cepa reposan en el techo de las casas.

INSECTICIDAS GRADO TÉCNICO UTILIZADOS

Organofosforados: malatión, clorpirifos, metilpirimifos, temefos y fentión.

Piretroides: deltametrina, cipermetrina.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Para el estudio morfológico fueron utilizados 20 mosquitos adultos de cada cepa y se analizaron la distribución, posición, tamaño y la intensidad del color de los parches de cada uno de los individuos.

BIOENSAYOS DE LARVAS

En los bioensayos de la OMS,¹⁰ se realizaron 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 lectura de las mortalidades se realizó a las 24 h, hallándose la CL_{50} y la CL_{90} mediante el programa Probit- logaritmo.¹¹

La acción de 2 sinergistas, S,S,S tributil fosforotritioato (DEF) y piperonil butóxido (PB) fueron investigados exponiendo las larvas de cuarto estadio a 0,008 mg/L de DEF o 5 mg/L de PB durante 4 h previo a la adición de la solución del insecticida y se determinó la mortalidad después de 24 h de exposición, hallándose las concentraciones letales 50 y 90 a través del programa Probit-logaritmo.¹¹ No existió mortalidad a estas concentraciones del sinergista solo.

Ensayos bioquímicos: Se determinó la actividad de esterasas en larvas de tercer estadio tardío o cuarto temprano, de acuerdo con el método estandarizado para *Aedes aegypti*.¹² Se homogeneizó cada larva en 200 μ L de *buffer* fosfato 0,01 M, pH 7,5. En una placa de microtitulación de ELISA, a 20 μ L del homogenato se le añadió 200 μ L del sustrato (0,7 mM de β -naftil acetato). Después de dejar transcurrir la reacción por 10 min. Se le añadió 40 μ L de *fast blue* y se leyó la densidad óptica (DO) a 570 nm en lector de placas de ELISA Labsystems iMS, manufacturado en Finlandia.

La actividad de glutatión-S-transferasa (GST) fue determinada de acuerdo con el método de *Booth* y otros,¹³ y modificado para *Aedes aegypti*.¹² A 20 μ L de cada homogenato de larva se le añadió 250 μ L de una mezcla de reacción de 1-cloro-2,4 dinitrobenceno 50 mM; y de glutatión reducido 20 mM. Se dejó transcurrir la reacción por 3 min y se leyó la DO a 340 nm. Se calculó la actividad específica de GST, después de calcular la concentración de proteínas en cada homogenato y se expresó como μ mol/ mg.min.

Se determinó la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) normal e inhibida con propoxur según el método de *Rodríguez* y otros.¹⁴ La pre-

paración de las muestras es similar a la descrita anteriormente, con la diferencia de que las muestras se homogeneizaron en 50 μL de *buffer* fosfato, que contenía tritón X-100 1 %. Se prepararon además 2 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 yodada (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 2 placas se adicionó en cada pocillo de ambas 20 μL del homogeneizado de las larvas. La reacción se dejó transcurrir durante 30 min y se leyó la DO a 405 nm.

Un estimado de la frecuencia de los mecanismos de esterasas, GST y AchE fue calculado a partir del número de individuos susceptibles para cada ensayo, asumiendo que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida (10 %). En tubos Eppendorf (1,5 mL), se adicionaron 10 μL de muestra más 10 μL del indicador Xilene cianol (0,02 % en sacarosa 15 %). Se aplicaron 20 μL de esta mezcla en el gel y se realizó la corrida a 150 V, durante 45 min. Para la tinción de las bandas de esterasas, se sumergieron los geles en 50 mL de *buffer* fosfato (0,1 M) que contenían 4 mL de cada uno de los sustratos inespecíficos de las esterasas (α y β -naftilacetato). Después se añadieron 0,5 g del colorante *Fast blue* RR, disuelto previamente en agua destilada y SDS (sodio duodecil sulfato) 5 %. Para fijar la coloración de las bandas se sumergió el gel en una solución de ácido acético 10 %. A cada una de las bandas se le determinó la movilidad relativa.

EXTRACCIÓN DEL ADN

Método Gaillard y Strauss¹⁵

Se maceraron los mosquitos de forma individual en nitrógeno líquido y se adicionaron 500 μL del tampón de extracción (20 % SDS; 1 M Tris-HCl pH 8,25; 0,5 M EDTA; 1 M sacarosa). El homogenizado se incubó a 65 °C por 10 min, se

añadieron 120 μL de acetato de potasio 5 M, se puso en hielo por 10 min y se centrifugó a 10 000 g por 10 min. El sobrenadante se recogió, se centrifugó nuevamente, se le adicionaron 35 μL de mezcla de acetato (acetato de sodio 4 M; 0,25 % acrilamida) y 1 200 μL de etanol absoluto, incubándose 10 min a temperatura ambiente. El homogenizado se centrifugó a 10 000 g por 20 min, el precipitado obtenido se lavó con etanol 70 %, se centrifugó a 10 000 g por 10 min, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 15 μL del tampón Tris-EDTA (TE 1x) (1 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0). Posteriormente, se adicionaron 2 μL de RNAsa (10 mg/mL), se incubó 1 h a 37 °C, se añadió igual volumen de la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 10 000 g por 10 min. El sobrenadante se conservó a 4 °C.

RAPD

La amplificación del ADN se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL , que contenía 2,5 U Taq ADN polimerasa (Promega, USA), 2,5 μL 10X tampón de reacción (100 mM Tris-HCl; pH 8,3; 15 mM MgCl_2 ; 500 mM KCl; 0,01 % gelatina; Promega, USA), 200 μM de cada deoxinucleótidos (dNTP) (Promega, USA), 5 pmol del cebador (OPA 7, Operon Technologies, California, USA) y 100 ng de ADN molde.

Se utilizó un control negativo para cada ensayo donde la mezcla de reacción contenía agua destilada estéril en lugar de ADN molde de *Aedes aegypti*, con el objetivo de descartar cualquier contaminación. La reacción fue realizada siguiendo los perfiles de amplificación: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 35 °C y 2 min a 72 °C. En el ciclo final, el paso de extensión fue de 15 min. El análisis de los fragmentos amplificados fue realizado en gel de agarosa 1,4 % en *buffer* TBE 0,5X que contenía bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y visualizados con luz UV en un transiluminador.

RESULTADOS

Los valores dosis-respuesta y los factores de resistencia de las cepas Santiago de Cuba y

Santiago de Cuba Techo frente a 7 insecticidas son reportados en la tabla 1. Los mosquitos de la población de Santiago de Cuba presentan altos niveles de resistencia al insecticida organofosforado clorpirifos (16,91), esta población muestra además, moderados niveles de resistencia a otros organofosforados como: pirimifos-metil (8,10), temefos (5,59) y fentiión (5,41), para el piretroide cipermetrina también existieron moderados niveles de resistencia (7,83). Sin embargo en estos estudios no se detectó resistencia a malatión (1,77), ni a la deltametrina (4,75). En cambio, Santiago de Cuba techo mostró una

elevada resistencia al piretroide deltametrina (114,38), alta resistencia a clorpirifos (21,32), pirimifos-metil (10) y a la cipermetrina (12,33), se indica además moderada resistencia a 2 organofosforados: temefos (5,51) y fentiión (5,41). Finalmente no se detectó resistencia a malatión (1,22), similar a lo ocurrido en la otra cepa.

El empleo del sinergista DEF indicó que las esterases desempeñan un papel significativo en la resistencia a clorpirifos en Santiago de Cuba y Santiago de Cuba Techo, los factores de sinergismos fueron: 16,91 y 24,57, respectivamente. Se observó, que este mecanismo se involucra

TABLA 1. Valores de CL_{50} y factor de resistencia correspondiente (FR_{50}) para diferentes grupos de insecticidas en las cepas de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba, Santiago de Cuba Techo y la cepa de referencia susceptible Rockefeller.

Insecticidas	Santiago de Cuba		Santiago de Cuba Techo		Rockefeller CL_{50} (ppm)
	CL_{50} (ppm)	FR_{50}	CL_{50} (ppm)	FR_{50}	
Clorpirifos	0,11500	16,91	0,14500	21,32	0,00680
Malation	0,78800	1,77	0,54400	1,22	0,44550
Pirimifos- metil	0,06400	8,10	0,07900	10,0	0,00790
Fentiión	0,05200	5,31	0,05300	5,41	0,00980
Temefos	0,07100	5,59	0,07000	5,51	0,01270
Cipermetrina	0,00940	7,83	0,014800	12,33	0,00120
Deltametrina	0,00038	4,75	0,00915	114,38	0,00008

TABLA 2. Valores de las CL_{50} y factor de sinergismo (FS), para insecticidas organofosforados y piretroides, utilizando al sinergista DEF, en *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba y Santiago de Cuba Techo

Insecticida	Santiago de Cuba		Santiago de Cuba Techo	
	CL_{50} (ppm)	FS	CL_{50} (ppm)	FS
Clorpirifos	0,00680	16,91	0,00590	24,57
Malatión	0,77900	1,01	0,62200	0,87
Pirimifos- metil	0,09800	0,65	0,09800	0,81
Fentiión	0,02900	1,79	0,02700	1,96
Temefos	0,01100	6,45	0,03670	1,91
Cipermetrina	0,00700	1,34	0,00430	3,44
Deltametrina	0,00055	0,69	0,00360	2,54

TABLA 3. Valores de CL_{50} y factor de sinergismo (FS), para insecticidas organofosforados y piretroides, utilizando al sinergista PB, en *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba y Santiago de Cuba Techo

Insecticidas	Santiago de Cuba		Santiago de Cuba Techo	
	CL_{50} (ppm)	FS	CL_{50} (ppm)	FS
Clorpirifos	0,08600	1,34	0,0860	1,69
Malatión	1,11500	0,71	0,6800	0,80
Pirimifos metil	0,18100	0,35	0,1450	0,54
Fentiión	0,05030	1,03	0,0350	1,51
Temefos	0,08800	0,81	0,0730	0,96
Cipermetrina	0,00789	1,19	0,0049	1,08
Deltametrina	0,00528	0,70	0,0054	1,69

también en la resistencia a temefos en la cepa de Santiago de Cuba (FS= 6,45) (tabla 2). De manera general, los resultados de los ensayos con el sinergista PB indicaron que la resistencia no depende de la actividad de la multifunción oxidasa (MFO) (tabla 3).

La frecuencia de los genes de esterasa de las poblaciones de *Aedes aegypti* analizadas se observan en la tabla 4. El rango de valores oscila desde 0,897 para Santiago de Cuba techo hasta 1,0 para la cepa de Santiago de Cuba.

Se observó una alta frecuencia de los genes de la GST en la cepa de Santiago de Cuba Techo (0,5725), en cambio, en Santiago de Cuba se obtuvo en baja frecuencia (0,065). Finalmente, la frecuencia de la acetilcolinesterasa alterada fue muy baja en ambas poblaciones.

Se empleó la electroforesis en geles de poliacrilamida para determinar los patrones de

esterasas elevadas en las poblaciones en estudio. Las bandas de esterasas fueron nombradas A o B, de acuerdo con la especificidad de la reacción con el reactivo 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 (Rm). El análisis de los patrones electroforéticos revela la elevación de la esterasa A4 con un Rm de 0,78. La intensidad de la banda de la esterasa A4 en ambas cepas de Santiago de Cuba fue muy similar, no así en la cepa de referencia Rockefeller, que no posee la elevación de esta (fig. 1).

La comparación entre los mosquitos adultos de las cepas Santiago de Cuba y Santiago de Cuba Techo no mostró diferencias significativas en cuanto a sus características morfológicas. Los

TABLA 4. Valores de frecuencia de los mecanismos de resistencia de esterasas, acetilcolinesterasa y glutatión-S-transferasa, observados en *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba y Santiago de Cuba Techo.

Frecuencia genotípica	Santiago de Cuba	Santiago de Cuba Techo
Esterasas	1,0	0,897
Acetilcolinesterasa	0,044	0,048
Glutatión-S-transferasa	0,065	0,573

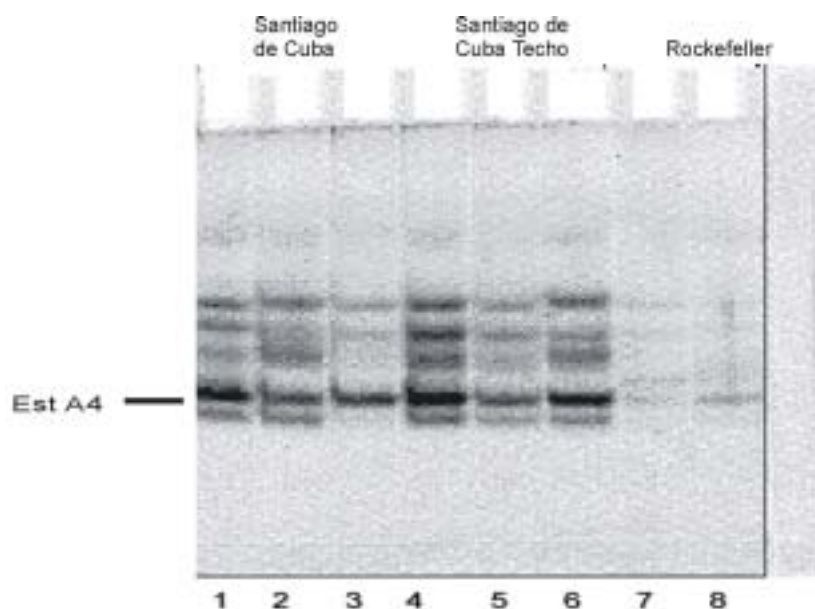


Fig 1. Patrones de electroforesis en gel de poliacrilamida para las cepas de *Aedes aegypti* Santiago de Cuba (líneas 1, 2, 3) y Santiago de Cuba Techo (líneas 4, 5, 6). Puede observarse la esterasa nombrada A4 teñida con mayor intensidad. Rockefeller (líneas 7, 8) es una cepa susceptible de referencia.

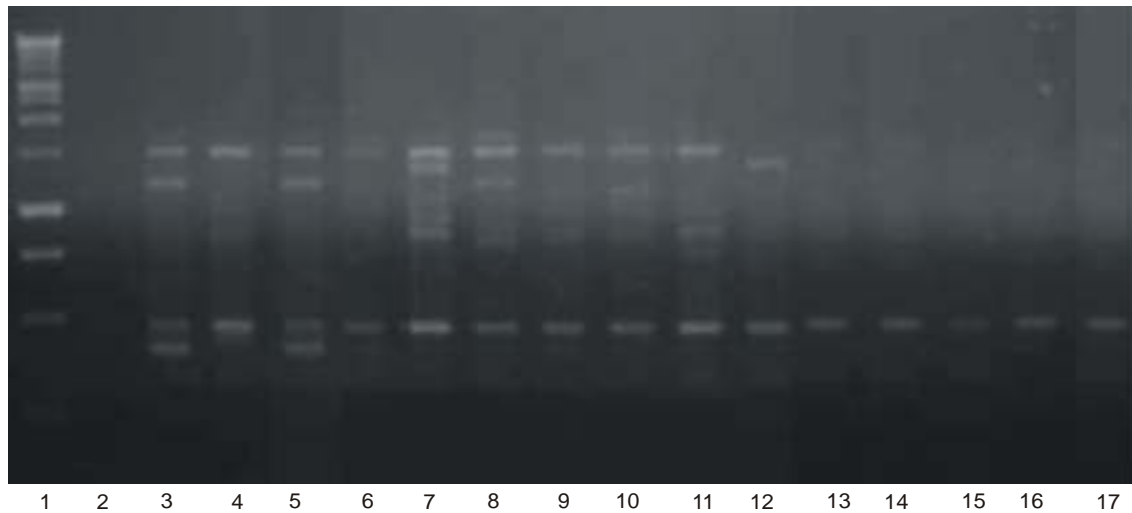


Fig 2. Patrones obtenidos por RAPD de mosquitos *Aedes aegypti* (línea 1: marcador de peso molecular 1 Kb, Promega, USA), (línea 2: control negativo), (líneas 3, 4, 5: Rockefeller), (líneas 6-11: Santiago de Cuba), (líneas 12-16: Santiago de Cuba Techo).

mosquitos pertenecientes a la población de Santiago de Cuba Techo presentan los mismos parches que los de la cepa de Santiago de Cuba.

Se utilizó la técnica del ADN polimórfico amplificado a la azar con el cebador OPA 7 para observar la variabilidad genética entre las 2 poblaciones analizadas, los resultados mostrados en la figura 2 revelan el polimorfismo genético existente entre las poblaciones en estudio y la poca variabilidad genética dentro de cada cepa.

DISCUSIÓN

Los resultados presentes en este trabajo son el primer reporte de la asociación que existe entre la variabilidad genética, el cambio de conducta de reposo y la resistencia a insecticidas en poblaciones de mosquitos *Aedes aegypti* de Cuba. La variación genética encontrada entre las 2 cepas analizadas es similar a lo descrito por otros autores en otras poblaciones de esta especie y de otras especies del género *Aedes*.^{16,17} Estudios de variabilidad genética en el nivel molecular han demostrado que diferentes regiones del genoma poseen diferentes niveles de cambio. Los genes de simple copia tienen un nivel relativamente bajo de sustitución, porque cualquier cambio en la región codificadora puede producir serios defectos en la codificación de la proteína. Efectos similares pueden ocurrir en

regiones no codificadoras del genoma. En cambio, el ADN repetitivo no está bajo tales restricciones funcionales y la variabilidad en esas regiones del genoma es mayor que los genes de simple copia.¹⁸ Cualquier mutación que modifica el comportamiento o la fisiología del insecto donde la secuencia blanco permanezca parcialmente funcional puede inducir resistencia.¹⁹

Cuando los patrones del RAPD son utilizados para analizar las variaciones genéticas entre las poblaciones, generalmente se encuentran altos niveles de polimorfismo.^{6,20,21} Los fragmentos de ADN obtenidos por la técnica del RAPD de las poblaciones analizadas indicaron variación genética entre las cepas de Santiago de Cuba, se observó además poco polimorfismo entre una misma población (fig. 2). La poca variabilidad detectada en estos estudios por análisis morfológico y en geles de electroforesis de proteína no parece estar asociada con la resistencia a insecticidas, ni con el cambio de conducta de reposo de los mosquitos implicados. Reportes de otros autores plantean que bandas de patrones electroforéticos iguales muestran diferentes espectros de resistencia.²² Sin embargo, en el presente trabajo se muestra una estrecha relación entre las variaciones genéticas de las cepas con la diferencia en los patrones de resistencia al piretroide deltametrina y con la diferencia de conducta de reposo.

Las 2 cepas analizadas presentan diferentes niveles de resistencia al piretroide deltametrina. Existen varios reportes de resistencia a piretroides en *Aedes aegypti*.²³⁻²⁵ Altos niveles de la enzima glutatión transferasa se han relacionado con la resistencia a piretroides.^{26,27} El incremento de la resistencia a deltametrina en la cepa de Santiago de Cuba Techo fue asociado con un incremento en la frecuencia de genes de la GST, similares resultados en poblaciones de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba fueron reportados por Rodríguez y otros.^{1,28} Estos apuntes coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo. A pesar de ser el malatión un insecticida usado por mucho tiempo en Cuba para el control del vector del dengue, no se presenta resistencia en estas poblaciones, esto se atribuye a que se ha dejado de manejar en los programas de control. La resistencia a cipermetrina se explica por la aplicación de este insecticida en sustitución del organofosforado malatión, a partir del año 1986 en la campaña contra el *Aedes aegypti*. La resistencia a este insecticida no mostró grandes variaciones entre las cepas en estudio. Los organofosforados temefos, fentión, pirimifos-metil y clorpirifos sufren poca variación en los factores de resistencia entre ambas cepas, resultado que puede argumentarse por el empleo de estos como larvicidas, llegando a convertirse en presión de selección para las poblaciones de Santiago de Cuba.

Poder entender la diferencia de conducta de reposo en las poblaciones de Santiago de Cuba sería un aspecto ecológico novedoso e importante. Su conocimiento resultaría de vital importancia en la confección de estrategias de control de los mosquitos *Aedes aegypti*, teniendo en cuenta los patrones de resistencia y los estudios relacionados en la epidemiología del vector del dengue.

Comparison of 2 populations of *Aedes aegypti* mosquitoes from Santiago de Cuba with different rest conduct

SUMMARY

Two populations of *Aedes aegypti* that were collected in Santiago de Cuba during the epidemics of 1971 were separated for having different rest habits, some of them rested naturally on the walls up to 1 m high (Santiago de Cuba strain) and the others were found resting in the roofs of the houses (Santiago de Cuba Techo strain). These strains did not show significant differences as regards their morphological characteristics. The mosquitoes

corresponding to Santiago de Cuba Techo strain presented the same patches that those of Santiago de Cuba. The resistance to organophosphate insecticides is very similar in both populations; however, the Santiago de Cuba Techo strain shows a higher resistance to pyrethroid deltamethrin than the Santiago de Cuba strain. From the biochemical point of view and by using the DEF synergist, it was proved that esterases are associated with the high resistance to clorpirifos in both strains. It was not so with the MFO, which was demonstrated by means of the piperomyl butoxide synergist. Nevertheless, the GST enzyme seems to be responsible for the high resistance to deltamethrin detected in the Santiago de Cuba Techo strain due to the elevated frequency value of that gene in this strain. The random amplified polymorphic DNA technique was used to observe the genetic variability between the 2 populations. The results revealed that there was genetic polymorphism between the populations under study, which could have an impact on the ecology and epidemiology of the vector.

Key words: *Aedes*, mosquitoes, resistance to insecticide, rest conduct, insecticide, RAPD, Santiago de Cuba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rodríguez MM, Bisset JA, Milá LH, Lauzán L, Soca LA. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. Rev Cubana Med Trop 1999;51:83-8.
- Rodríguez R. Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. Rev Cubana Med Trop 2000;54:189-201.
- Perich MJ, Davila G, Turner A, García A, Nelson M. Behavior of resting *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) and its relation to ultra-low volume adulticide efficacy. J Med Entomol 2000;37:541-6.
- Focks DA, Kloter KO, Carmichael GT. The impact of sequential ultra-low volume ground aerosols applications of malathion on the population dynamics of *Aedes aegypti* (L). Am J Trop Med Hyg 1987;36:639-47.
- Hudson JE. The emergency ultra-low-volume spray campaign against *Aedes aegypti* adults in Paramaribo, Suriname, 1982. Bull Pan Health Org 1986;20:292-301.
- De Souza GB, Dutari GP, Gardenal CN. Genetic structure of *Aedes albifasciatus* (Diptera:Culicidae) populations in Central Argentina determined by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction markers. J Med Entomol 1999;36:400-4.
- Antolin MF, Bosio CF, Cotton J. Intensive linkage mapping in a wasp (*Bracon hebetor*) and a mosquito (*Aedes aegypti*) with single-strand conformation polymorphism analysis of random amplified polymorphism DNA markers. Genetics 1996;143:1727-38.
- Hill SM, Crampton JM. DNA-based methods for the identification of insect vectors. Ann Trop Med Parasit 1994;88:227-50.
- Guzmán MG, Kourí G, Vázquez S, Rosario D, Bravo L, Valdés L. DHF Epidemics in Cuba 1981 and 1997. Some interesting observations. Dengue Bull 1999;23:39-43.
- OMS. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC/81.807; 1981.
- Raymond M. Presentation d'une programme d'analyse log-probit pour microordinateur cahiers Orstrom. Sér Ent Méd Parasitol 1985;23:117-21.
- Rodríguez MM, Bisset J, Milá L, Molina DF, Lauzan L. Detection of resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from Cuba and Venezuela. J Med Entomol 2001;38:623-8.

13. Booth J, Boyland E, Sims P. An enzyme from the rat liver catalyzing conjugation with glutathione. *Biochem J* 1961;79:516-23.
14. Rodríguez MM, Bisset JA, Díaz C, Ortiz E. Determinación de fenotipos de acetilcolinesterasa modificada en *Culex quinquefasciatus* por el Sistema Ultramicroanalítico (S. U. M. A). *Rev Cubana Med Trop* 1993;45:122-7.
15. Gaillard C, Strauss F. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acid Res* 1990;15:378.
16. Black IV WC, Ferrare JA, Rai KS, Sprenger D. Breeding structure of a colonizing species: *Aedes albopictus* (Skuse) in the United States. *Heredity* 1988a; 60:173-84.
17. Black IV WC, Hawley WA, Rai KS, Craig BGjr. Breeding structure of a colonizing species: *Aedes albopictus* (Skuse) in peninsular Malaya and Borneo. *Heredity* 1988b;61:439-46.
18. Li WH, Graur D. *Fundamentals of molecular evolution*. 4ta ed. New York: Sinaur, Sunderland, MA; 1991.
19. Pasteur N, Raymond M. Insecticide Resistance Genes in Mosquitoes: Their Mutations, Migration, and Selection in Field Populations. *J Heredity* 1996;87:444-9.
20. Ayres CFJ, Romao TPA, Melo-Santos MAV, Furtado AF. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:871-5.
21. Dos Santos VM, Macoris ML, Andrighetti MT. Analysis of genetic relatedness between populations of *Aedes aegypti* from different geographic regions of São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2003;45:99-101.
22. Quiao CL, Raymond M. A same esterase B1 haplotype is amplified in insecticide resistant mosquitoes of the *Culex pipiens* complex from the Americas and China. *Heredity* 1995;74:339-45.
23. Ziv M, Brown NJ, Brown AWA. Resistance potentialities of *Aedes aegypti* and *Culex fatigans* to organophosphorus and other insecticides. WHO/VBC/69.148. World Health Organization;1969.
24. Malcolm CA, Word RJ. The establishment of a laboratory strain of *Aedes aegypti* homogeneous for high resistance to permethrin. *Pesticide Science* 1982;13:104-8.
25. Mebrahtu YB, Norem, J, Taylor M. Inheritance of larval resistance to permethrin in *Aedes aegypti* and association with sex ratio distortion and life history variation. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56:456-65.
26. Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, McAllister JC, Brogdon WG, Roberts JM, et al. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenya villages using permethrin-impregnated nets. *Med Vet Entomol* 1999;13:329-44.
27. Vontas JG, Small GJ, Hemingway J. Glutathione S-transferase as antioxidant defense agents confer pyrethroids resistance in *Nilaparvata lugens*. *Bioch J* 2001;357:65-72.
28. Rodríguez MM, Bisset JA, Ruiz M, Soca A. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J Med Entomol* 2002;39:882-8.

Recibido: 20 de septiembre de 2004. Aprobado: 11 de enero de 2005.

Lic. Juan A. Bisset. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km 6 1/2, AP 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana. Teléf: 202-04-36 al 45. Correo electrónico: bisset@ipk.sld.cu