

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Modo de herencia de la resistencia a temefos (abate) en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Cuba

Lic. María Magdalena Rodríguez,¹ Lic. Juan A. Bisset,² Dra. Omayda Pérez,³ Téc. Francisco Ramos⁴ y Dra. Grisel E. Risco⁵

RESUMEN

Se realizó el estudio sobre el modo de herencia de la resistencia al insecticida organofosforado temefos, a partir de una cepa de *Aedes aegypti* de referencia (SAN-F6), resistente, con un valor de factor de resistencia de 200x, comparado con la cepa de *Aedes aegypti* susceptible a insecticidas (ROCKEFELLER). Se llevaron a cabo cruces genéticos entre la cepa resistente y la susceptible a temefos, obteniéndose una F1 (cruce). Las hembras de esta F1 del cruzamiento se cruzaron con machos de la cepa ROCKEFELLER (retrocruce) y como resultado se obtuvo que la resistencia a temefos se heredó de forma semidominante, mediada por un solo factor. La actividad de Est-A4, observada en la electroforesis en gel de poliacrilamida y medida mediante ensayos bioquímicos, fue mayor en la cepa resistente a temefos (SAN-F6), menor en la cepa susceptible (ROCKEFELLER) e intermedia en el cruce de estas 2 cepas. Un menor efecto del parental resistente fue observado en el retrocruce tanto en la mortalidad con temefos, como en la actividad de la Est. A4. Estos resultados sugieren que la actividad de esterasas pudiera heredarse también, al igual que la resistencia a temefos, como un carácter semidominante.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, resistencia, modo de herencia, temefos, esterasa, y glutatión transferasa.

El mosquito urbano *Aedes aegypti* (L.) (Díptera: Culicidae) transmite la fiebre amarilla, el dengue y la fiebre hemorrágica del dengue (FDH) en muchos países tropicales. Estas patologías causan grandes impactos en la salud pública y están distribuidas en áreas de Asia, el Pacífico, África, América Latina y el Caribe.¹

Hasta el momento no hay una solución para controlar el dengue/FDH y todavía no se dispone de una vacuna tetravalente efectiva y segura contra esta enfermedad, por lo que el control del vector continúa siendo la única opción para prevenir o reducir su transmisión. El control de *Aedes aegypti* se lleva a cabo a través de la participación de la comunidad en la eliminación de los criaderos del

vector; sin embargo, solo estas acciones de la comunidad no son suficientes. En Cuba, el insecticida organofosforado temefos (1 % granulado) es de manera rutinaria aplicado directo en los criaderos para el control larval, y para el control de adultos se utilizan sobre todo piretroides en caso de epidemia o en períodos de alta prevalencia del vector.

Ya existen reportes de resistencia a temefos en Cuba^{2,3} y previamente se había reportado que las enzimas esterasas desempeñan un papel importante en la resistencia a este insecticida.⁴ En *Aedes aegypti* de Venezuela se demostró que la resistencia a temefos se hereda de forma monofactorial.⁵ Este estudio fue llevado a cabo para

¹ Licenciada en Bioquímica. Investigadora Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Licenciado en Biología. Investigador Titular. IPK.

³ Médica Veterinaria. IPK.

⁴ Técnico en Química Analítica. IPK.

⁵ Especialista en Epidemiología. Centro Municipal de Higiene y Epidemiología de Guanabacoa.

determinar el modo de herencia de la resistencia a temefos en *Aedes aegypti* de Cuba, así como analizar la variación de la frecuencia de los mecanismos de elevada actividad de esterasas glutatión transferasa en los cruces genéticos.

MÉTODOS

Cepas de *Aedes aegypti* a utilizar:

ROCKEFELLER: cepa susceptible de referencia, suministrada por CDC, de San Juan, Puerto Rico.

SANTIAGO DE CUBA: una cepa de *Aedes aegypti* colectada en Santiago de Cuba (Cuba) en 1997.

SAN-F6: una cepa de *Aedes aegypti* seleccionada con temefos a 90 % de mortalidad por 6 generaciones consecutivas y con un nivel de resistencia a este insecticida de 200x.⁴

Herencia de la resistencia a temefos: 100 hembras de la cepa resistente a temefos (SAN-F6) fueron cruzadas con 100 machos de la cepa susceptible ROCKEFELLER. Fueron separadas 50 hembras resultantes de la F1 antes que se aparearan y se retrocruzaron con 50 machos de la cepa ROCKEFELLER para conocer el modo de herencia de la resistencia a temefos

Bioensayos en larvas: se determinó la resistencia a temefos mediante los bioensayos de la OMS, 1981,⁶ en la cepa susceptible ROCKEFELLER, la cepa resistente a temefos (SAN-F6) y en la generación resultante del cruce y retrocruce. 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} con el programa probit-log de Raymond, 1985.⁷

Ensayos bioquímicos:

La actividad de esterasas en larvas de tercer estadio tardío o cuarto temprano se determinó de

acuerdo con el método estandarizado para *Aedes aegypti*.⁸ Se homogenizó cada larva en 200 mL de *buffer* fosfato 0,01 M, pH 7,5. En una placa de microtitulación de ELISA, a 20 mmL del homogenato se le añadió 200 mmL del sustrato (0,7-mM de bb-naftil acetato). Después de dejar transcurrir la reacción por 10 min, se le añadió 40 mmL 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 transferasa (GST) fue determinada de acuerdo con el método de Booth y otros, 1961,⁹ y modificado para *Aedes aegypti*.⁸ A 20 mmL de cada homogenato de larva se le añadió 250 mmL de una mezcla de reacción de 1-cloro-2, 4 dinitrobenzeno 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 mmmol/mg.min.

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

Electroforesis: se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida (10 %) para analizar la variación de la intensidad de las bandas de esterasa A4. 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 realiza 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 contenía 4 mL de cada uno de los sustratos inespecíficos de las esterasas (y b-naftilacetato). Después se añadieron 0,5 g del colorante *fast blue* RR, disuelto previamente en agua destilada y SDS (duodecil sulfato de sodio) 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.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestran los resultados del análisis probit de la línea de regresión, Log. de la

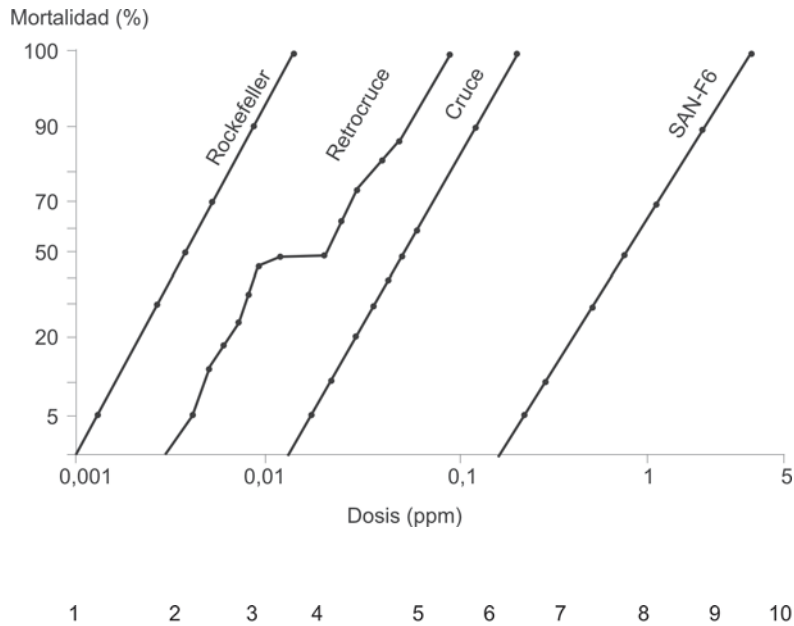


Fig 1. Probit-log realizado para las cepas de *Aedes aegypti* resistentes a temefos (SAN-F6), CRUCE, RETROCRUCE y la cepa susceptible de referencia ROCKEFELLER para el análisis del modo de herencia de la resistencia a temefos.

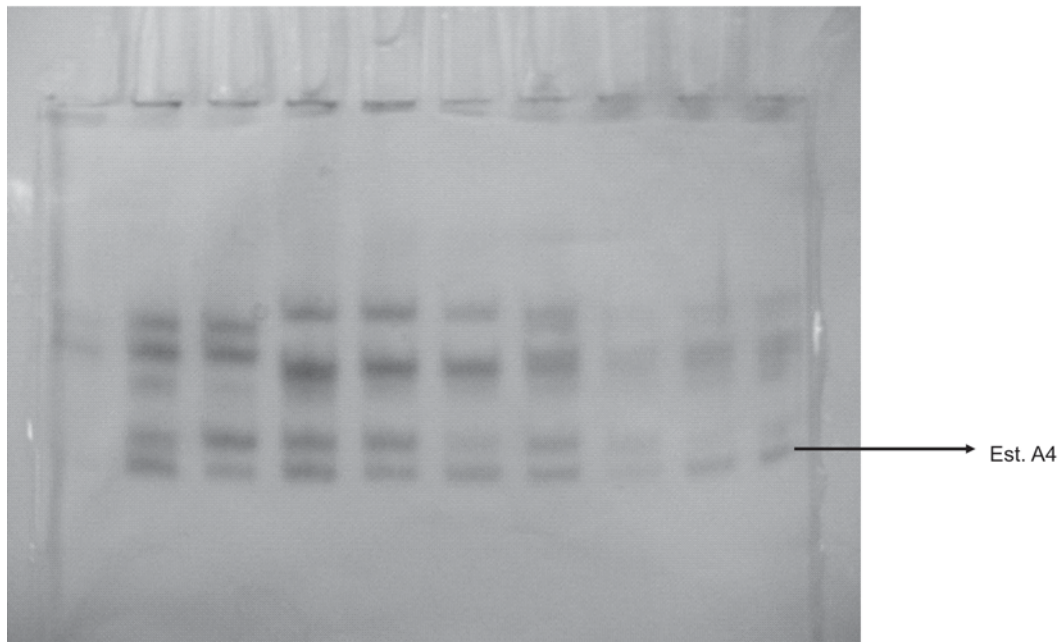


Fig. 2. Patrones de esterases observadas en electroforesis en gel de poliacrilamida en la cepa de referencia ROCKEFELLER (1), SAN-F6 (2,3,4,5), Cruce SAN-F6 x ROCKEFELLER (6,7) y retrocruce de la F1 resultante del cruce x Rockefeller (8,9,10).

dosis vs. % de mortalidad para la cepa susceptible (ROCKEFELLER), la cepa resistente a temefos (SAN-F6), la F1 resultante del cruce (ROCKEFELLER X SAN-F6), y para el retrocruce entre las hembras de la F1 resultantes del cruce y machos de ROCKEFELLER. La línea de la cepa heterocigótica RS (F1) está casi intermedia, pero más pegada a la línea de la cepa

resistente (SAN-F6), que a la línea de la cepa susceptible (ROCKEFELLER). Estos resultados indican que la resistencia a temefos en *Aedes aegypti* de Cuba es heredada de forma semi-dominante.

Para las larvas resultantes de los retrocruces (hembra F1 x macho de ROCKEFELLER), las líneas de dosis-mortalidad (d-m), presentan una

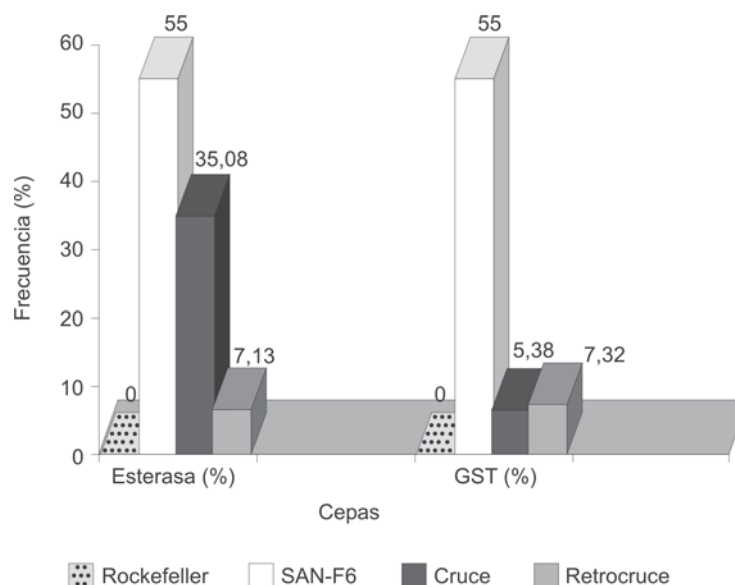


Fig. 3. Frecuencia (%) de los mecanismos de resistencia de estererasas y glutatión transferasa (GST), en las cepas parenteles (Rockefeller y SAN-F6) y en las cepas resultantes del cruce y retrocruce.

inflexión aproximadamente en el valor correspondiente a 50 % de mortalidad, exhibiendo una meseta a partir de la concentración de temefos de 0,01 ppm. Esto indica que la resistencia a temefos fue monofactorial.

El examen visual de los geles reveló que la esterasa A4 con un valor de R_m de 0,7 se encontró amplificada excepto para la cepa susceptible ROCKEFELER (fig. 2). En esta misma figura se observó que la banda de Est- A4 fue más intensa en la cepa resistente SAN-F6 e intermedia en la F1 resultante del cruce de SAN-F6 y ROCK, para el retrocruce la intensidad de las bandas de Est. A4 fue muy baja.

Se determinó la frecuencia en que se encontraba elevada la actividad de las enzimas estererasas y glutatión transferasa en las cepas estudiadas. Como se observa en la figura 3, la frecuencia de estererasas en SAN-F6 es de 55 %, asociada con la resistencia a temefos, como ya fue demostrado en trabajos previos. Esta frecuencia tuvo un valor de 35,08 en la F1 resultante del cruce y muy baja resultó para el retrocruce (7,13). Estos resultados se relacionan muy bien con la variación de la resistencia a temefos mostrada en la figura 1.

La frecuencia en que se encontró elevada la actividad de la GST fue igual que las estererasas con un valor de 55 % en SAN-F6. Sin embargo hubo una disminución de la frecuencia durante el

cruce y retrocruce realizados, lo cual confirma aún más que esta enzima no está asociada con la resistencia a temefos y que las estererasas continúan siendo el principal mecanismo de resistencia a temefos en *Aedes aegypti* de Cuba.

DISCUSIÓN

Aedes aegypti es capaz de desarrollar altos niveles de resistencia a temefos después de una intensa presión de selección en condiciones de laboratorio. Así se colectó una cepa de SANTIAGO DE CUBA durante la epidemia de 1997 y se sometió a presión de selección con temefos durante 6 generaciones y se obtuvo una variación del factor de resistencia desde 19,59x hasta 200x, la cual fue utilizada para esta investigación.⁴ Sin embargo, en otro estudio similar donde una población de *Ae. aegypti* fue seleccionada por 19 generaciones se obtuvo solamente una variación del factor de resistencia de 4x a 16,92x.¹⁰ También una cepa de *Aedes aegypti* de Venezuela fue seleccionada con temefos durante 13 generaciones con un incremento del factor de resistencia de 180,6 al nivel de la CL95.⁵

Existen reportes de resistencia a temefos en cepas de *Aedes aegypti* colectadas en la región del Caribe.¹¹⁻¹³ Esto se debe a que durante más de

20 años ha sido intenso su uso en esta región, aunque en muchas localidades ha sido utilizado solo ocasionalmente. En Venezuela observaron moderados niveles de resistencia a temefos en 2 cepas colectadas en las localidades de Coro y Maracay, con poca variación durante los años anteriores.¹⁴ En Cuba durante la epidemia de dengue de 2002 se reportó resistencia a temefos en 2 municipios con alta incidencia del vector, en Playa¹⁵ y en Guanabacoa.¹⁶ En este mismo año se reportó resistencia a temefos en un estudio realizado en 10 municipalidades de Río de Janeiro, Brazil,¹⁷ también se observó una disminución de la susceptibilidad a este insecticida en un estudio realizado desde 1992 hasta 2002 en 15 poblaciones de *Aedes aegypti* del norte y centro de Italia.¹⁸

En Cuba no se había realizado previamente ningún estudio sobre el modo de herencia de la resistencia a temefos en *Aedes aegypti*. En este trabajo se determinó que la resistencia a este insecticida se hereda de forma semidominante y monofactorial. Resultados similares obtuvieron Wirth y Georghiou, 1999,⁵ donde se determinó que la resistencia a temefos de Venezuela se heredaba en forma monofactorial. Sí se sabe que en Cuba la resistencia a malation en *Culex quinquefasciatus* se hereda de forma dominante y monofactorial.¹⁹

Desde 1984 se encontró una asociación entre el nivel de resistencia a temefos y el incremento en la actividad de esterases en cepas de *Aedes aegypti* de Puerto Rico.²⁰ Otros estudios también han demostrado que las esterases desempeñan un papel importante en la resistencia a temefos,^{4,5,8,14,21,22} esta asociación fue demostrada mediante el uso de sinergistas y ensayos bioquímicos. En Cuba se demostró además esta asociación, por estudios de inhibición de la Est-A4 en gel de poliacrilamida.

El desarrollo de resistencia a temefos podría ser un serio problema en las operaciones de control de *Aedes aegypti*, y conociendo que esta resistencia se hereda de forma semidominante y monofactorial y que son las esterases el factor responsable, se sugiere monitorear la frecuencia de este mecanismo de resistencia en poblaciones de *Aedes aegypti* que aparezcan en el campo, para crear estrategias de uso de este insecticida que permitan dilatar la aparición de resistencia.

Mode of inheritance of temephos (Abate) resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba

SUMMARY

A study on the mode of inheritance of temephos resistance was conducted using a temephos resistant *Aedes aegypti* reference strain (SAN-F6) with a value of resistance factor of 200x, compared with the insecticide susceptible *Aedes aegypti* strain (ROCKEFELLER). Genetic crossings were performed between temephos resistant and susceptible strains. An F1 crossing was attained. The females of this F1 crossing were crossed with males from the ROCKEFELLER strain (retrocrossing), and it was found that the temephos resistance was inherited in a semidominant way and as a monofactorial trait. The activity of Est-A4 observed in the polyacrylamide gel electrophoresis and measured by biochemical assays was higher in the strain resistant to temephos (SAN-F6), lower in the susceptible strain (ROCKEFELLER), and intermediate in the crossing of these two strains. A lower effect of the resistant parental strain was observed in the retrocrossing, both in the mortality with temephos and in the activity of Est. A4. These results suggest that the esterase activity may also be inherited, as well as the resistance to temephos, as a semidominant character.

Key words: *Aedes aegypti*, resistance, inheritance mode, temephos, esterase, and glutathione transferase.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lehane MJ. Biology of blood-sucking insects. Hammersmith, London, UK: Harper Collins Academic Eds.; 1991. p. 288.
2. 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 Cubana Med Trop 2004;56:61-6.
3. 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 Cubana Med Trop 2004;56:54-60.
4. 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.
5. Wirth MC, Georghiou GP. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. J Am Mosq Control Assoc 1999;15:315-20.
6. Organización Mundial de la Salud. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides; 1981. WHO/VBC/81.807.
7. Raymond M. Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cah.O.R.S.T.O.M., Ser Entomol Med Parasitol 1985;22:117-21.
8. Rodríguez MM, Bisset JA, Cáceres L, Molina D, Lauzan L. Detection of resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from Cuba and Venezuela. J Med Entomol 2001;38:623-8.
9. Booth JE, Boyland E, Sims P. An enzyme from the rat liver catalyzing conjugation with glutathione. Biochem J 1961;79:516-23.
10. Paeporn P, Komalamisra N, Deesin V, Rongsriyan Y, Eshita Y, Thongrungrat S. Temephos resistance in two forms of *Aedes aegypti* and its significance for the resistance mechanism. Southeast Asian. J Trop Med Public Health 2003; 34:786-92.

11. Rawlins SC. Comparative organophosphorus insecticide susceptibility in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and *Toxorhynchites moctezuma*. J Am Mosq Control Assoc 1990;6:315-7.
 12. Rawlins SC, Ou Hing Wan J. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. J Am Mosq Control Assoc 1995;11:59-65.
 13. Rawlins SC. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. Pan Am J Public Health 1998;4:243-51.
 14. Mazarri MB, Georghiou GP. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. J Am Mosq Control Assoc 1995;11:315-22.
 15. Bisset JA, Rodríguez MM, Lorenzo Cáceres. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en dos cepas de *Aedes aegypti* de Panamá. Rev Cubana Med Trop 2003;55(3):191-2.
 16. 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 Cubana Med Trop 2003;55:105-11.
 17. Lima JB, Da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AK, Soares S, Braga IA, et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Río de Janeiro and Spirito Santo, Brazil. Am J Trop Med Hyg 2003;68:329-33.
 18. Romi R, Toma L, Severino F, Di Luca M. Susceptibility of Italian populations of *Aedes albopictus* to temephos and to other insecticidas. J Am Mosq Control Assoc 2003;19:419-23.
 19. Bisset JA, Díaz C, Rodríguez MM, Marquetti MC, Navarro A. Modo de herencia de la resistencia al malation en *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. Rev Cubana Med Trop 1990;42(1):84-9.
 20. Field WN, Hitchen JM, Rees AT. Esterase activity in strains of *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) tolerant and susceptible to the organophosphate insecticide malathion. J Med Entomol 1984;21:412-8.
 21. Vaughan A, Chadee DD, Ffrench-Constant R. Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. Med Vet Entomol 1998;12:318-21.
 22. 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 Cubana Med Trop 1999;51:83-8.
- Recibido: 15 de julio de 2005. Aprobado: 26 de abril de 2006.
 Lic. *María Magdalena Rodríguez*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", AP 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: mrodriguez@ipk.sld.cu