

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Adaptación de los métodos para la cuantificación de la actividad de esterasa, acetilcolinesterasa y glutathion-S-transferasa en *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae)

Lic. Cristina Díaz¹, Lic. Yudelmis Álvarez², Lic. Yaxier de Armas³ y Lic. Juan A. Bisset⁴

RESUMEN

Se estudiaron los mecanismos de resistencia de la cucaracha *Blattella germanica*, considerada una de las plagas urbanas más importantes al nivel mundial, por ser un vector mecánico que aloja diversos virus, hongos, helmintos y bacterias, sumamente dañinos para el hombre. Existen diferentes métodos de control empleados contra *Blattella germanica*, dentro de los cuales tiene un papel esencial el uso de insecticidas. Su aplicación indiscriminada ha provocado el desarrollo de resistencia en esta especie. En este trabajo se adaptaron los métodos bioquímicos que permiten detectar las enzimas esterasas, acetilcolinesterasa y glutathion-S-transferasa como posibles mecanismos de resistencia, para ello se determinaron todos los parámetros que permiten establecer si una cepa es susceptible o resistente dado cada mecanismo.

Palabras clave: *Blattella germanica*, adaptación, mecanismos, resistencia, insecticidas.

La especie *Blattella germanica* (Linnaeus, 1767) es la cucaracha de mayor contacto con el hombre, prolifera rápidamente llegando a ser una de las plagas urbanas más importantes al nivel mundial.

Este insecto ocasiona grandes molestias, afecta la economía y tiene gran importancia médica por la enorme cantidad de organismos patógenos que puede transmitir, a los cuales puede albergar en su tegumento, en su tubo digestivo, en sus patas o en sus heces. Dentro de estos patógenos se encuentran virus, hongos, helmintos y bacterias.¹

Para el control de esta plaga se han empleado diversos métodos, dentro de los cuales el más utilizado ha sido el uso de insecticidas; su uso

indiscriminado ha provocado la aparición de resistencia a estos, desarrollándose altos niveles en pocos años. El desarrollo de resistencia en *Blattella germanica* es considerado como un serio problema, por lo que ha sido necesario identificar los mecanismos de resistencia a los insecticidas para trazar estrategias de trabajo apropiadas para su control.²

En Cuba existen muy pocos estudios sobre los mecanismos de resistencia a insecticidas que desarrolla esta especie, por lo que es importante profundizar en el tema. Los métodos de detección de mecanismos de resistencia a insecticidas basados en pruebas bioquímicas, donde se puede determinar la actividad catalítica de enzimas

¹ Licenciada en Bioquímica. Investigadora Auxiliar.

² Licenciada en Biología.

³ Licenciada en Bioquímica.

⁴ Doctor en Ciencias. Licenciado en Biología. Investigador Titular.

capaces de conferir resistencia a insecticidas en los individuos con una actividad enzimática elevada, permiten conocer los fenotipos multirresistentes mediante el uso de ensayos replicados; además proveen más información por insecto sobre el estado de la resistencia a insecticidas en una población de cucarachas y sus patrones de resistencia cruzada, y detectan con precisión el nivel genotípico.

Ante la necesidad de conocer los mecanismos bioquímicos responsables de esa resistencia para llevar a cabo un control adecuado de la especie, el propósito en este trabajo fue adaptar métodos bioquímicos en poblaciones susceptibles de referencia y resistentes de *Blattella germanica*.

MÉTODOS

CEPAS

CSMA: cepa susceptible de referencia mantenida fuera de presión de selección de insecticida por más de 20 años, donada por el doctor Jeffrey Scott de la Universidad de Cornell, EE. UU.

COMODORO: cepa colectada en el hotel del mismo nombre, multirresistente y utilizada en este estudio como cepa resistente de referencia.

Las cepas de referencia se mantienen en el insectario a una temperatura aproximada de 27 ± 2 °C y una humedad relativa de 77 ± 3 %, son alimentadas con pienso de ratón y agua *ad libitum*.

ADAPTACIÓN DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS PARA DETECTAR MECANISMOS DE RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN *BLATELLA GERMANICA*

Los métodos de detección de la actividad de esterasas inespecíficas, la acetilcolinesterasa modificada, y glutatión-S-transferasa fueron modificados a partir de las técnicas descritas en la literatura científica.^{3,4} Estos métodos fueron adaptados mediante la metodología de Fersht (1985).⁵

PROCEDIMIENTO PARA LA ADAPTACIÓN DE LOS MÉTODOS

Para determinar los parámetros a emplear en el ensayo bioquímico, que permite diferenciar la

cepa susceptible de una cepa resistente, se determinó: la concentración saturante de cada reactivo empleado (sustrato, colorante e inhibidor para acetilcolinesterasa modificada) para cada enzima, así como el tiempo óptimo de la reacción. Se realizaron 10 ensayos para determinar cada uno de estos parámetros, las réplicas se hicieron el mismo día y en días diferentes, propiciando así que el experimento sea repetible y reproducible.

CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (AE)

Para cada experimento que involucra a las enzimas estudiadas, se calculó la AE con las condiciones previamente adaptadas. Para establecer valores de corte entre una cepa susceptible (actividad enzimática normal) y una cepa resistente (actividad enzimática elevada) se emplearon los valores de actividad enzimática de la cepa susceptible de referencia CSMA, para cada una de las enzimas estudiadas y se le sumó a cada valor 3 veces su desviación estándar.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los valores de DO obtenidos de las ninfas susceptibles y resistentes en cada experimento se compararon mediante la prueba de Kruskal Wallis (H) usando el programa estadístico STATISTICA for Windows (computer program manual). Tulsa, Ok. Versión 5.5. Se comprobó que todos los datos seguían una distribución normal al emplear la prueba de Kolmogorov-Smirnov, se realizó un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) (StatSoft, Inc. 1999. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, Ok. Versión 5.5).

Los valores de actividad enzimática de cada una de las enzimas estudiadas, calculados para las cepas, se probaron para la normalidad empleando nuevamente el test Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre las actividades enzimáticas se determinaron mediante una prueba de comparación múltiple de medias denominada prueba de Tukey, usando el programa STATISTICA for Windows (computer program manual). Tulsa, Ok. Versión 5.5.

DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS DIFERENTES MECANISMOS DE RESISTENCIA

Para calcular la frecuencia de individuos resistentes en una población basados en el mecanismo de esterasas, glutation-S-transferasa elevada, o acetilcolinesterasa alterada, se utiliza la ecuación de Hardy-Weinberg, asumiendo que la población está en equilibrio genético. Se utilizaron 352 ejemplares para cada enzima.

RESULTADOS

Adaptación de métodos bioquímicos para detectar mecanismos de resistencia a insecticidas en *Blattella germanica*.

Se adaptaron los métodos bioquímicos para detectar los mecanismos de resistencia a los 4 insecticidas evaluados en las 4 poblaciones estudiadas.

En la tabla 1 se muestran los valores óptimos para cada concentración de sustrato que participan en cada reacción, también se pudo observar el tiempo óptimo obtenido en cada ensayo enzimático por mecanismo de resistencia involucrado; las concentraciones saturantes de cada reactivo fueron escogidas según la relación de los valores

de DO, contra los valores de concentración de sustrato para cada caso, y para la obtención del tiempo óptimo de cada reacción se analiza DO contra tiempo.

Nótese que al aplicar la prueba de clasificación simple (ANOVA) a los valores de concentraciones saturantes de cada reactivo utilizado en los diferentes ensayos, para cada una de las enzimas analizadas, se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre la cepa susceptible de referencia y la cepa resistente COMODORO. Se escogió la concentración saturante de cada sustrato atendiendo al análisis estadístico realizado para cada mecanismo de resistencia, sustentado por el criterio bioquímico obtenido a partir de los gráficos antes mencionados.

En la tabla 1 aparecen resumidos los valores de los parámetros para cada uno de los ensayos bioquímicos.

CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (AE)

Con los valores de los parámetros analizados de las pruebas bioquímicas adaptadas en las cepas de terreno, se calculó la actividad enzimática (AE) para las cepas de referencia utilizadas en este estudio. Los resultados de los valores de AE para cada mecanismo en las cepas analizadas se muestran en la tabla 2.

TABLA 1. Parámetros estandarizados para cada una de las enzimas responsables de diferentes mecanismos de resistencia en cepas de *Blattella germanica*

Enzimas	Tiempo óptimo (minutos)	Reactivos	Concentraciones saturantes
a-esterasas	10	α -naftilacetato	50 mM
		Fast-blue	4 mg/mL
β -esterasas	10	β - Naftilacetato	60 mM
		Fast-blue	5 mg/mL
GST	5	CDNB	50 mM
		GSH	25 mM
Ache	30	Acetilcolina iodada	40 mM
		DTNB	50 mM
		Propoxur	25 mM

TABLA 2. Actividad de las tres enzimas estudiadas en las cepas de referencia de *Blattella germanica*

Cepas	Enzimas				
	Esterasas (sustrato α NA)	Esterasas (sustrato β NA)	AchE (sin inhibidor)	AchE (con inhibidor)	Glutation S- -transferasa
CSMA (\pm DE)	0,761 ^a \pm 0,004	0,204 ^a \pm 0,001	0,181 ^a \pm 0,008	0,059 ^a \pm 0,002	0,261 ^a \pm 0,007
COMODORO (\pm DE)	1,176 ^b \pm 0,035	1,607 ^b \pm 0,03	0,304 ^b \pm 0,014	0,153 ^a \pm 0,004	0,3234 ^b \pm 0,015

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de actividad enzimática mostrados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los valores de AE se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Tukey. Comparando los valores obtenidos en la cepa resistente con los valores de la cepa susceptible, se demostró que la cepa COMODORO resultó resistente con actividad enzimática elevada para ambas esterasas y GST; el valor de AE de la acetilcolinesterasa en esta cepa fue más elevado con respecto al resto de las cepas estudiadas y a la susceptible de referencia.

DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS DIFERENTES MECANISMOS DE RESISTENCIA

En la tabla 3 se muestran los valores de frecuencia génica para los 3 mecanismos estudiados en la cepa resistente de referencia de *Blattella germanica*. Los valores de frecuencia para β -esterasa (0,81) y para α -esterasa (0,44) están elevados, sin embargo, el valor de frecuencia para β -esterasa es casi el doble que para α -esterasa.

TABLA 3. Valor de frecuencia génica para los mecanismos mediados por esterasas, glutatión-S-transferasa y acetilcolinesterasa en la cepa resistente de referencia de *Blattella germanica*

Frecuencia génica	Cepa COMODORO
Esterasas (α NA)	0,44
Esterasas (β NA)	0,81
AchE	0,1
GST	0,54

Por otra parte, la frecuencia del mecanismo de la GST en la cepa COMODORO presenta un valor de 0,54, lo que representa un valor que difiere de la cepa susceptible de referencia.

Finalmente, el valor de frecuencia de la enzima acetilcolinesterasa en la cepa COMODORO fue bajo (0,1), y no difiere significativamente de la cepa susceptible CSMA.

DISCUSIÓN

Contar con técnicas apropiadas para dilucidar los mecanismos de resistencia a insecticidas y desarrollar con ello estrategias más sensibles y prácticas de control en las poblaciones de los insectos vectores, se ha convertido en un reto permanente para los científicos que trabajan en la rama de control de vectores.

En este trabajo se reporta por primera vez en Cuba la adaptación de métodos bioquímicos para detectar mecanismos de resistencia a insecticidas en cepas de *Blattella germanica*. Para realizar todos los experimentos se tomó como referencia un estudio realizado por *Hemingway* y otros en 1993 en cepas de *Blattella germanica*.⁶

En el ensayo para determinar la participación de esterasas inespecíficas como posible mecanismo de resistencia a insecticidas, *Hemingway* trabajó con la misma concentración de sustrato ya sea α o β -naftilacetato, la cual fue 30 mM.⁴ En el actual estudio la concentración saturante del sustrato α -naftilacetato fue de 50 mM, valor superior, que podría indicar una mayor cantidad de esterasas inespecíficas en nuestra cepa, o que en este u otros trabajos anteriores donde también se trabaja con menores concentraciones del sustrato no se haya empleado la concentración de sustrato saturante.⁷ Lo mismo podría ocurrir con β -naftilacetato, cuya concentración saturante determinada resultó ser el doble de la concentración empleada por *Hemingway* en 1993,⁴ y 10 mM mayor que la concentración saturante de α -naftilacetato; esto demuestra una diferencia entre ambos sustratos, lo que impide trabajar indistintamente con uno u otro en los diversos ensayos. Un factor importante a tener en cuenta son los recursos de laboratorio disponibles para el trabajo, tal es el caso del VMAX, para realizar las lecturas de densidad óptica con programas asociados para el cálculo de la cinética de la reacción con las diferentes enzimas.

Esto evidencia que en la cepa empleada en este estudio predominan las β -esterasas por encima de las α -esterasas. Los resultados de concentración saturante de β -naftilacetato obtenidos por *Rodríguez* y otros en *Aedes aegypti* fueron 10 mM mayor que los obtenidos en este estudio,⁸ sugiriendo una mayor cantidad de esterasas en esta especie de mosquitos que en las ninfas de cucaracha utilizadas.

La cantidad de fast-blue necesaria para detener la reacción fue el doble de la empleada por Hemingway en 1993,³ que fue necesario aplicar para obtener los mejores resultados; sin embargo, el análisis estadístico demostró que sí se podían diferenciar significativamente la cepa susceptible y resistente de referencia a cualquiera de las cantidades de colorante empleadas.

El tiempo óptimo de reacción para las esterasas empleando indistintamente α -naftilacetato o β -naftilacetato, fue de 10 min; coincidiendo con reportes anteriores tanto en *Blattella germanica* como en otros insectos.^{4,7}

En el ensayo para determinar la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, la concentración saturante de acetiltiocolina iodada, DTNB y propoxur fue mayor que las empleadas por Hemingway en 1993,⁴ coincidiendo con las empleadas por Siegfried en 1990.⁹ No existieron diferencias entre el tiempo óptimo de reacción determinado por otros autores.^{4,9} Sin embargo, es muy importante aclarar que, la acetilcolinesterasa modificada no constituyó un mecanismo de resistencia para las cepas estudiadas, por lo que es recomendable adaptar este método en una cepa que presente este mecanismo de resistencia a insecticidas, para descartar la posibilidad de cambios en los valores de concentraciones saturantes y tiempo óptimo resultantes.

El micrométodo para detectar la actividad de GST incrementada, necesitó una concentración de GSH y CDNB, 5 mM mayor y 2 min más del tiempo óptimo de reacción reportado que es de 3 min.³

Los micrométodos adaptados y descritos en este trabajo logran diferenciar significativamente las actividades enzimáticas de la cepa susceptible y resistente, por lo que resultan muy útiles para comparar poblaciones de cucarachas y determinar qué mecanismos de resistencia a insecticidas están presentes en individuos resistentes, a partir de pequeñas fracciones de homogenato de ninfas. Al analizar los resultados del valor de actividad enzimática obtenido a partir de los ensayos de la cepa resistente COMODORO y teniendo en cuenta los valores de factores de resistencia frente a los 4 insecticidas probados, se puede decir que la actividad de la enzima acetilcolinesterasa inhibida fue menor que 60 % de la actividad de la acetilcolinesterasa normal. Esto indica que esa enzima no está involucrada en los mecanismos de

resistencia de esta cepa, lo cual podría ser un factor influyente en la moderada resistencia mostrada frente al carbamato propoxur, o que solo constituye un mecanismo incipiente. Según la literatura la modificación de esta enzima está asociada con la resistencia a este carbamato.¹⁰

En ausencia de inhibidor, esta cepa mostró una actividad enzimática mayor que la mostrada en la cepa susceptible, eso confirma que podría deberse a la existencia de algún mecanismo incipiente de acetilcolinesterasa modificada. Sin embargo, pensamos que este posible mecanismo, no es lo suficientemente efectivo como para permitir una actividad de la enzima mayor que 60 % con el inhibidor presente. Estos resultados sugieren que esa enzima es de menor importancia como mecanismo de resistencia en las cepas de *Blattella germanica* estudiadas, donde su frecuencia de aparición es muy baja. En la literatura científica se reporta que la alteración de la acetilcolinesterasa es rara en esta especie,¹¹ lo que no ocurre en otros insectos.^{9,12} Por lo tanto, la modificación de esta enzima como posible mecanismo de resistencia a organofosforados y carbamatos es aún incierta, y la limitada información que existe, sugiere que es probablemente de poca importancia en esta especie.

Alteraciones dentro del sistema nervioso central (SNC) han sido asociadas con la resistencia en esta especie, ejemplo de ello es la resistencia kdr a piretroides y a insecticidas ciclodienos, viéndose modificaciones de sitios blancos del SNC, cuya expresión resulta de la presión de selección con un insecticida. Sin embargo, al parecer, *Blattella germanica* no posee la plasticidad genética necesaria para modificar la acetilcolinesterasa.¹³

La resistencia moderada de la cepa COMODORO a propoxur podría deberse a la acción de enzimas hidrolíticas y oxidativas, como son las esterasas y la monoxigenasa P-450. En este estudio se observó, que en esta cepa se obtienen los mayores valores de actividad enzimática para las β -esterasas y este es el mecanismo más frecuentemente reportado.

La cepa COMODORO es resistente al organofosforado malation y los valores de actividad enzimática de la enzima glutatión-S-transferasa están elevados, lo que sugiere su contribución a la resistencia catalizando la conjugación de glutatión endógeno con el insecticida, de forma tal que se incrementa la solubilidad del tóxico, facilitando así su excreción del organismo antes que este contacte con su sitio de acción.

En otros trabajos desarrollados se demostró que existe una relación entre la actividad incrementada de la enzima glutatión-S-transferasa y la presencia de elevados niveles de resistencia a organofosforados; se explica que la GST epsilon confiere resistencia a insecticidas a varias especies,¹⁴ a diferencia de los resultados encontrados por Díaz y otros en 2004 en *Culex quinquefasciatus*, donde su frecuencia fue baja.¹⁵

Se ha señalado que en la resistencia a piretroides pueden actuar diversos mecanismos como la resistencia tipo kdr o el incremento de la destoxificación metabólica;^{12,16} este último mecanismo también puede conferir resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides. Dentro de los principales sistemas enzimáticos comúnmente implicados en la destoxificación metabólica, se encuentra el citocromo P-450 monooxigenasa dependiente y enzimas hidrolíticas.¹⁷

En este estudio se observó que la cepa COMODORO, resistente a cipermetrina presenta un elevado valor de actividad enzimática de las β -esterasas y en la cepa susceptible CSMA la actividad enzimática de las α -esterasas resultó mayor; lo que sugiere como posible mecanismo de resistencia el aumento en la actividad de β -esterasas y la sobreproducción de estas enzimas. El aumento de la actividad también puede estar ocasionado por el incremento de la afinidad de la enzima por el sustrato.

Se plantea que estos altos valores de actividad de α y β esterazas pueden conferir resistencia a piretroides, organofosforados y carbamatos,¹⁸ por tanto, se podría considerar en la cepa COMODORO a la destoxificación metabólica incrementada por sobreproducción de β -esterasas, como el principal mecanismo de resistencia a piretroides y el más frecuente entre los estudiados.

Es necesario continuar las investigaciones para dilucidar la contribución de otros mecanismos a la resistencia a insecticidas, como la sobreproducción de las enzimas citocromo P-450 monooxigenasa dependiente y la resistencia tipo kdr,¹⁹ realizar pruebas in vivo utilizando sinergistas para corroborar la existencia de los mecanismos de resistencia, así como realizar estos estudios de resistencia a insecticidas en cepas de terreno de la especie *Blattella germanica*.

Adaptation of methods for quantification of the effect of esterase, acetylcholinesterase and glutathione-S-transferase in *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae)

SUMMARY

The resistance mechanisms of *Blattella germanica*, one of the most important urban plagues worldwide since it is a mechanical vector that houses a number of highly harmful viruses, fungi, helminths and bacteria were studied. There are different control methods used against *Blattella germanica*, with insecticides playing the leading role. Their uncontrolled application has caused the development of insecticide resistance in this species. This paper adapted biochemical methods to detect the enzymes esterase, acetylcholinesterase and glutathione-S-transferase as possible resistance mechanisms. To this end, all the parameters that allow finding out if a strain is susceptible or resistant to each mechanism were set.

Key words: *Blattella germanica*, adaptation, mechanisms, resistance, insecticides.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fotedar BD, Shrinivas UV, Verma A. Cockroaches *Blattella germanica* as carrier of microorganisms of importance in hospitals. *Epidemiol Infect* 1991;107:181-7.
2. Shono T. Pyrethroid resistance: importance of kdr – type mechanism. *J Pestic Sci* 1985;10:141-6.
3. Hemingway J, Dursbar JJ, Monro AG, Snall GJ. Pyrethroid resistance in German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). Resistance levels and underlying mechanisms. *J Econ Entomol* 1993;86:1631-8.
4. Hemingway J, Small GJ, Monro AG. Possibility mechanisms of organophosphorus and carbamate insecticides resistance in German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) from different geographical areas. *J Econ Entomol* 1993;86:1623-30.
5. Fersht A. Measurement and magnitude of enzymatic rate constants chapter. En: *Enzyme structure and mechanism*. 2ed. New York:W.H.Freeman; 1985. p.121-4.
6. Hemingway J, Small GJ. Resistance mechanisms in cockroach- The key to control strategies. *Proc Int Conf Insect Pests Urban Environ* 1993;141-52.
7. Cochran DG. Extended selections for pyrethroid resistance in German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J Econ Entomol* 1991;84:1412-6.
8. Rodríguez MM, Bisset JA, Molina D, Díaz C, Soca LA. Adaptación de los métodos en placas de microtitulación para la cuantificación de la actividad de esterazas y Glutatión-S- transferasa en *Aedes aegypti*. *Rev Cubana Med Trop* 2001;53(1):32-6.
9. Siegfried BD, Scott SC. Biochemical characterization of hydrolytic and oxidative enzyme in insecticide resistant and susceptible strain of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J Econ Entomol* 1990;85:1092-8.
10. Lee CY, Hemingway J, Yap HH, Chong NL. Biochemical characterization of insecticide resistance in the German cockroach, *Blattella germanica*, from Malaysia. *Med Vet Entomol* 2000;14:11-8.

11. Díaz C, Pérez M, Rodríguez MM, Calvo E, Bisset JA, Fresneda M. Resistencia a insecticidas en cepas de terreno de la especie *Blattella germanica* (Dyctioptera: Blattellidae) procedentes de Santiago de Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 1999;52(1):24-30.
12. Bull DL, Wadleigh RW, Patterson RS. Pharmacodynamics of malathion and carbaryl in susceptible and multiresistant German cockroaches (Dyctioptera: Blattellidae). *J Econ Entomol* 1989;82:1512-9.
13. Siegfried BD, Scott JG. Mechanisms responsible for Propoxur resistance in the German cockroach, *B. germanica* (L.). *Pestic Sci* 1991;33:133-46.
14. Ding Y, Orтели F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics* 2003;4(1):35
15. Díaz C, Rodríguez MM, Fresneda M, Bisset JA. Determinación de la actividad Glutathion-S-transferasa en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Cuba y otros países de Latinoamérica. *Rev Cubana Med Trop* 2004;56(2):111-6.
16. Díaz C, Pérez MG, Calvo E, Rodríguez MM, Bisset JA. Insecticide resistance studies on *Blattella germanica* (Dyctioptera: Blattellidae) from Cuba. *Ann N Y Acad Sci* 2000;916:628-34.
17. Prabhakaran SK, Kamble ST. Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of German cockroach *Blattella germanica* (L.). *Insect Biochem Mol Biol* 1995;25(40):519-24.
18. Park NJ, Kamble ST. Decapitation impacting effect of topically applied chlorpyrifos on acetylcholinesterase and general esterases in susceptible and resistant German cockroaches (Dyctioptera: Blattellidae). *J Econ Entomol* 2001;94:499-505.
19. Brown D, Zhang L, Went Z, Scott JG. Induction of monooxygenasa in the German cockroach, *Blattella germanica* L. *Arch Insect Biochem Physiol* 2003;53:119-24.

Recibido: 2 de octubre de 2006. Aprobado: 7 de noviembre de 2006.

Lic. *Cristina Díaz*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". AP 601, CP 11300, Ciudad de La Habana. Teléf.: 2020652. Fax: 2046051. Correo electrónico: cristina.diaz@infomed.sld.cu; c.diaz@ipk.sld.cu