

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Determinación *in vivo* del papel de las enzimas esterasas y glutatión transferasa en la resistencia a piretroides en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Lic. María Magdalena Rodríguez,¹ Lic. Juan A. Bisset,² y Téc. Ditter Fernández³

RESUMEN

Se realizó un estudio *in vivo* a través del uso de 2 sinergistas, el trifenil fosfato (TFF) inhibidor específico de esterasas y el ácido etacrínico (AE), inhibidor específico de la enzima glutatión transferasa (GST), para determinar si estas enzimas eran responsables de la resistencia a piretroides en *Aedes aegypti*. Para el trabajo se utilizaron 2 cepas de *Aedes aegypti* resistentes a insecticidas, una cepa que fue seleccionada con temefos por 6 generaciones de selección (SAN-F6) y otra con deltametrina por 12 generaciones de selección con este insecticida (SAN-F12), ambas resultaron ser resistentes a insecticidas piretroides. Se demostró a través del uso de los sinergistas TFF y AE que las enzimas esterasas y GST son responsables de la resistencia a los piretroides en estas cepas. Estos resultados demuestran la existencia de un fenómeno de resistencia cruzada y multiresistencia, lo cual debe tenerse en cuenta en las estrategias de uso de insecticidas para el control de este vector.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, sinergistas, esterasas, acetilcolinesterasa, glutatión transferasa.

El mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector de fiebre amarilla, dengue y fiebre hemorrágica del dengue (FHD). Globalmente existe un estimado de 50 000 000 de casos de dengue al año, con 500 000 casos de FHD y más de 24 000 defunciones.¹

Un control efectivo del vector es esencial para reducir la transmisión de dengue, pero *Aedes aegypti* ha desarrollado resistencia a una amplia variedad de insecticidas,² lo que constituye el principal problema operacional que afecta su control.

La resistencia a piretroides en *Aedes aegypti* se ha asociado a un fenómeno de resistencia cruzada entre DDT y piretroides³ y se ha demostrado que este fenómeno está dado por el mecanismo de resistencia de *knockdown*, tipo gen Kdr.⁴ Más recientemente se ha asociado también la resistencia a piretroides con los mecanismos de acción metabólica, basado en el incremento de la actividad de algunas

enzimas como son las esterasas y la GST.^{5,6} En Cuba se han seleccionado cepas de *Aedes aegypti* con genes para la resistencia a temefos⁷ y a deltametrina,⁸ ambas cepas muestran alta resistencia a piretroides.

El objetivo de este trabajo fue conocer, a través de estudios con sinergistas, el papel de los mecanismos de resistencia de acción metabólica, basado en la alta actividad de las enzimas esterasas y GST en la resistencia a piretroides en cepas de referencia de *Aedes aegypti* resistentes a piretroides.

MÉTODOS

CEPAS

Se utilizaron 3 cepas.

San-F6: una cepa de *Aedes aegypti* seleccionada con temefos por 6 generaciones de selección con este insecticida.

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

² Doctor en Ciencias. Licenciado en Ciencias Biológicas. Investigador Titular. IPK.

³ Técnica en Química. IPK.

SAN-F12: una cepa seleccionada con deltametrina por 12 generaciones de selección con este insecticida.

ROCKEFELLER: una cepa de referencia de *Aedes aegypti* susceptible a insecticidas, suministrada por el CDC, San Juan, Puerto Rico.

INSECTICIDAS GRADO TÉCNICO UTILIZADOS

Piretroides: lambdacialotrina, cipermetrina, ciflutrina y deltametrina.

BIOENSAYOS DELARVAS

En los bioensayos de la OMS,⁹ se realizaron 5 réplicas de cada concentración del insecticida (20 larvas por réplica), y se registró 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, se halló la CL₅₀ y la CL₉₀ con el programa probit-log.¹⁰

La acción de 2 sinergistas, trifenil fosfato (TFF) y ácido etacrínico (AE), fueron investigados mediante la exposición de las larvas de cuarto estadio a 2,5 mg/L de TFF y 5 mg/L de AE durante 4 h, previo a la adición de la solución del insecticida y se determinó la mortalidad después de 24 h de exposición; las concentraciones letales 50 (CL₅₀) y 90 (CL₉₀) se hallaron mediante el programa Probit-logaritmo.¹⁰ No existió mortalidad del sinergista solo a estas concentraciones. Se calculó el factor de sinergismo (FS), por la fórmula siguiente:

$$FS = \frac{CL_{50} \text{ insecticida sin sinergista}}{CL_{50} \text{ insecticida más sinergista TFF o AE}}$$

RESULTADOS

Se determinó *in vivo*, la intervención de las enzimas esterasas o glutatión transferasa (GST) en la resistencia a los piretroides lambdacialotrina, cipermetrina, ciflutrina y deltametrina, se utilizaron los sinergistas trifenil fosfato (TFF) y ácido etacrínico (AE). Estos sinergistas potencian la acción del insecticida inhibiendo de forma específica la actividad de esterasas (TFF) o de la GST (AE). El efecto de los sinergistas se expresó como factor de sinergismo (FS), el cual significa cuántas veces disminuye la concentración letal media (CL₅₀) al aplicar el sinergista.

En la tabla 1 se observó que la cepa SAN-F6, la cual fue seleccionada con el insecticida temefos por 6 generaciones de selección, mostró resistencia a todos los piretroides (FR₅₀ mayor que 10x), excepto para lambdacialotrina, al cual se observó un valor de FR₅₀ menor que 5x (0,19x). Esta cepa mostró el valor mayor de FR₅₀ para deltametrina (337,5 x), seguido por ciflutrina (34,61x) y cipermetrina (13,07x).

El valor de FS para lambdacialotrina resultó bajo (FS= 5) para TFF (1,35x) y para el AE (1,08x); esto demuestra que esas enzimas no intervinieron en la resistencia al piretroide. Sin embargo, al aplicar el TFF la resistencia a cipermetrina disminuyó 18,47x, a ciflutrina 4 500x y a deltametrina 150x, estos son los valores correspondientes al FS ma-

TABLA 1. Toxicidad de 4 insecticidas piretroides (lambdacialotrina, cipermetrina, ciflutrina y deltametrina) con el sinergista TFF (trifenil fosfato), y ácido etacrínico (AE) en la cepa seleccionada con temefos por 6 generaciones de selección (SAN-F6)

	Lambdacialotrina	Cipermetrina	Ciflutrina	Deltametrina
^a CL ₅₀ (ppm)	0,0002	0,017	0,045	0,027
^b FR ₅₀	0,194	13,07	34,61	337,5
^c CL ₅₀ TTP	0,0002	0,00092	0,00001	0,00018
^d FS TPP	1,35	18,47	4500	150
^e CL ₅₀ AE (ppm)	0,00025	0,00031	0,00006	0,001
^f FS EA	1,08	3225	750	27
ROCKEFELLER	0,00103	0,00129	0,00126	0,00008

^a: valor de concentración letal media (CL₅₀), expresada en ppm, calculada para cada insecticida sin sinergista; ^b: factor de resistencia FR₅₀= CL₅₀ cepa SAN-F12 /CL₅₀ cepa ROCKEFELLER; ^{c,e}: valor de CL₅₀, calculada para cada insecticida en presencia de los sinergistas TFF o AE; ^{d,f}: factor de sinergismo FS= CL₅₀ insecticida sin sinergista/CL₅₀ más sinergista TFF o AE.

iores que 5x. Al aplicar el AE, se observó un efecto similar, el valor del FS resultó ser mayor que 5x para todos los piretroides, es decir disminuyó la resistencia a cipermetrina 3 225x, a ciflutrina 750x y a deltametrina 27x. Estos resultados indicaron que las enzimas esterasas y GST fueron responsables de la resistencia a piretroides en la cepa SAN-F6, porque al inhibir estas enzimas se potenció la acción de estos piretroides, lo cual se evidenció por la disminución de la CL_{50} para cada insecticida, cuando se aplicaron estos sinergistas, que incrementó el FS.

Este mismo análisis se realizó en otra cepa de *Aedes aegypti* que fue seleccionada con el piretroide deltametrina por 12 generaciones (SAN-F12). Esta cepa fue resistente a todos los piretroides (tabla 2), dado por el valor de FR_{50} mayor que 10x, se observó el mayor valor de FR_{50} para deltametrina (1 375x), seguido por lambda-cialotrina (155,33x), cipermetrina (45,38x) y ciflutrina (40x). Para todos los piretroides, excepto para lambda-cialotrina, se observó mayor valor de FS al aplicar el AE que al aplicar TFF, pero para ambos se observaron valores muy elevados. Al aplicar el TFF (inhibidor de esterasas), la resistencia disminuyó a lambda-cialotrina 1 454x, a cipermetrina 327,77x, a ciflutrina (86,66x) y a deltametrina (61,11x). Al aplicar AE (inhibidor de la GST), la resistencia a lambda-cialotrina disminuyó 761,90x, a cipermetrina 842,85x, a ciflutrina 1 040x y a deltametrina 31,42x. Estos resultados confirmaron que ambas enzimas, las esterasas y la GST intervinieron en la resistencia a piretroides en esta cepa.

DISCUSIÓN

Los resultados indicaron que la resistencia a piretroides observada tanto en la cepa SAN-F6 como en la cepa SAN-F12, se asoció a la incrementada actividad de las enzimas esterasas y glutatión transferasa (GST). Durante el proceso de selección con temefos para la obtención de la cepa SAN-F6 aumentó la frecuencia de la actividad acrecentada de ambas enzimas y se infirió que la resistencia cruzada a piretroides podría estar asociada con el incremento de la actividad de la GST.⁷

En este trabajo se demostró a través de sinergistas, inhibidores específicos de esterasas (TFF) y de GST (AE), que ambas enzimas fueron responsables de la resistencia generada a los piretroides durante el proceso de selección con temefos. En la cepa SAN-F12 seleccionada con deltametrina por 12 generaciones de selección con este insecticida,⁸ también se demostró el fenómeno de multirresistencia, donde el incremento de la actividad de estas enzimas generó resistencia no solo a deltametrina, sino también a los otros piretroides evaluados, lambda-cialotrina, cipermetrina y ciflutrina. De acuerdo con los resultados de Rodríguez y otros,⁸ la cepa SAN-F12 mostró resistencia a DDT, por lo que un mecanismo que también generó resistencia a los piretroides fue el gen Kdr, aunque este se encontró en esta cepa a baja frecuencia.

La resistencia cruzada entre DDT y piretroides está demostrada que existe en *Aedes aegypti* a través del mecanismo de *knockdown* o gen Kdr.^{4,11}

TABLA 2. Toxicidad de cuatro insecticidas piretroides (lambda-cialotrina, cipermetrina, ciflutrina y deltametrina) con el sinergista TFF (trifenil fosfato), ácido etacrinico (AE) en la cepa seleccionada con deltametrina por 12 generaciones de selección (SAN-F12)

	Lambda-cialotrina	Cipermetrina	Ciflutrina	Deltametrina
^a CL_{50} (ppm)	0,16	0,059	0,052	0,11
^b FR_{50}	155,33	45,38	40	1375
^c CL_{50} TTP	0,00011	0,00018	0,0006	0,0018
^d FS TPP	1454	327,77	86,66	61,11
^e CL_{50} AE (ppm)	0,00021	0,00007	0,00005	0,0035
^f FS EA	761,90	842,85	1040	31,42
ROCKEFELLER	0,00103	0,00129	0,00126	0,00008

^a Valor de concentración letal media (CL_{50}), expresada en ppm, calculada para cada insecticida sin sinergista.

^b Factor de resistencia $FR_{50} = CL_{50}$ cepa SAN-F12 / CL_{50} cepa ROCKEFELLER.

^{c,e} Valor de CL_{50} , calculada para cada insecticida en presencia de los sinergistas TFF o AE.

^{d,f} Factor de sinergismo. $FS = CL_{50}$ insecticida sin sinergista / CL_{50} más sinergista TFF o AE.

Un segundo grupo de mecanismos de resistencia que existe con alta prevalencia, está basado en el incremento del metabolismo de los insecticidas. Existen 3 grupos de enzimas envueltas en el metabolismo de insecticidas, las esterasas, las mono-oxigenasas y la GST.⁵ La elevada actividad de estas enzimas ha sido asociada con la resistencia cruzada entre DDT y piretroides en algunas especies de insectos.^{5,6,12,13} Lumjuan y otros¹⁴ demostraron la presencia de 8 clases diferentes de GST en *Aedes aegypti*, el tipo GST epsilon 2 (GSTe2) en *Aedes aegypti* (AeGSTe2) se sobre-expresó en mosquitos resistentes a DDT y al piretroides permethrina. Existen reportes en la literatura donde implican las esterasas como mecanismo principal de resistencia a temefos.^{6,15-18}

Se identificó en este trabajo cómo los mecanismos de acción metabólica basados en el incremento de la actividad de esterasas y GST intervienen tanto en la resistencia a temefos como a piretroides, lo cual hay que tener muy en cuenta porque se pueden generar fenómenos de resistencia cruzada y multiresistencia que afectan la efectividad de un producto químico, aun cuando se haya aplicado poco o no se haya aplicado nunca.

Determination *in vivo* of the role of esterase and glutathione transferase enzymes in pyrethroid resistance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

SUMMARY

An *in vivo* study of two synergists, that is, Triphenil phosphate -specific esterase inhibitor- and ethacrynic acid -specific glutathione transferase inhibitor- was performed to determine if these enzymes were responsible for pyrethroid resistance of *Aedes aegypti*. To this end, two insecticide resistant *Aedes aegypti* strains were used, one strain selected with temephos by six selection generations (SAN-F6) and the other strain with deltamethrin by 12 selection generations (SAN-F12), being both strains resistant to pyrethroid insecticides. Through the use of TPP and EA synergists, it was proved that esterase and glutathione-S-transferase (GST) enzymes were responsible for pyrethroid resistance of these strains. These results showed the existence of cross-resistance and multidrug resistance, which should be taken into account for insecticide use strategies aimed at vector control.

Key words: *Aedes aegypti*, synergists, esterases, acetylcholinesterase, glutathione transferase.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet No. 117. Geneva: World Health Organization; 2002.
2. ———. Resistance of vectors and reservoirs of disease to pesticides. Geneva: World Health Organization; 1986. (Tech. Rep. Ser. 737)

3. Chadwick PR, Invest JF, Bowron MJ. An example of cross-resistance to pyrethroids in DDT-resistant *Aedes aegypti*. Pestic Sci. 1977;15:112-20.
4. Soderlund DM, Knipple DC. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insecticide Biochem Mol Biol. 2003;33:563-77.
5. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol. 2004;34:653-6.
6. Prapanthadara L, Promtet N, Kootathap S, Somboon P, Suwonkerd W, McCarroll L, et al. Mechanisms of DDT and permethrin resistance in *Aedes aegypti* from Chiang Mai, Thailand. Dengue Bull. 2002;26:185-9.
7. Rodríguez MM, Bisset JA, Ruiz M, Soca A. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphate insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. J Med Entomol. 2002;39:882-8.
8. Rodríguez MM, Bisset JA, De Armas Y, Ramos F. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. J Am Mosq Control Assoc. 2005;21:437-45.
9. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva:WHO/VBC/81.80; 1981. p. 6.
10. Raymond M. Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour microordinateur cahiers. Orstrom Sér Ent Méd Parasitol. 1985;23:117-21.
11. Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, et al. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. Med Vet Entomol. 2003;17:87-94.
12. Kasai S, Weerasinghe IS, Shono T, Yamagawa M. Molecular cloning, nucleotide sequence and gene expression of a cytochrome P⁴⁵⁰ (CYP6F1) from the pyrethroids resistance mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. Insect Biochem Mol Biol. 2000;30:163-71.
13. Vaughan A, Hemingway J. Mosquito carboxylesterases Est alpha 2 (1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. J Biol Chem. 1995;270:17044-9.
14. Lumjuan N, McCarroll L, Prapanthadara L, Hemingway J, Ranson H. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol. 2005;35:861-71.
15. 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.
16. 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.
17. Bisset JA, Rodríguez MM, Fernández D, Pérez O. Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en larvas del municipio Playa, colectadas durante la etapa intensiva contra el *Ae. aegypti* en Ciudad de La Habana, 2001-2002. Rev Cubana Med Trop. 2004;56:61-6.
18. Braga IA, Lima JB, Soares S, Valle D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the state of Río de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99:199-203.

Recibido: 27 de noviembre de 2006. Aprobado: 12 de febrero de 2003.

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