

Caracterización parcial de la actividad de esterasas en una cepa de *Aedes aegypti* resistente a temefos

Partial characterization of esterase activity in a temephos-resistant *Aedes aegypti* strain

Dra. C. María Magdalena Rodríguez, Dr. C. Juan A. Bisset, Dra. C. Hilda Hernández, MSc. Yanelys Ricardo, Lic. Leidys French, Dra. Omayda Pérez, Lic. Ilario Fuentes

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: las enzimas esterasas han sido identificadas como mecanismo de resistencia a temefos en *Aedes aegypti* de Cuba, larvicida más utilizado en el mundo.

Objetivo: caracterizar parcialmente la actividad de esterasas en larvas expuestas y no expuestas a dosis subletales de temefos en una cepa de *Aedes aegypti* resistente a este insecticida.

Métodos: se utilizó una cepa de *Aedes aegypti* de referencia susceptible (Rockefeller) y otra resistente a temefos (SANtemF11). Se expusieron las larvas de la cepa SANtemF11 a la concentración letal 90 (CL₉₀) de temefos (1 ppm), 10 % de larvas sobrevivientes a las 24 h (SANtem [24 h]) se transfirieron a agua limpia y sin exposición a insecticidas por otras 24 h (SANtem [48 h]). Se caracterizó de modo parcial, en estas larvas, la actividad de esterasas a través de ensayos bioquímicos y electroforesis en gel de poliacrilamida. Se estimó por duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) el peso molecular de la esterasa (Est. A4).

Resultados: la actividad de esterasas en la cepa SANtemF11 resultó significativamente mayor que en Rockefeller. Se observó una disminución significativa de la actividad de esterasas en las larvas sobrevivientes (SANtemF11 [24 h]), la cual se recuperó 24 h después sin exposición a temefos. En el zimograma se observó que en 10 % de las larvas sobrevivientes a temefos, solo apareció incrementada la banda de esterasa A4, en comparación con las observadas en SANtemF11. El peso molecular estimado de la esterasa A4 fue de 58 kDa.

Conclusiones: la presencia de una banda específica de esterasa (58 kDa), en las larvas sobrevivientes a la selección con temefos, confirma su papel en la resistencia a este insecticida. Diagnosticar la función de las esterases en la resistencia a temefos, a través de ensayos bioquímicos, no debe realizarse en larvas expuestas a dosis subletales de este insecticida, para evitar falsos negativos.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, resistencia a insecticidas, esterases, peso molecular.

ABSTRACT

Introduction: the esterase enzymes have been defined as the mechanism of resistance to temephos in *Aedes aegypti* in Cuba, which is the most used larvacide worldwide.

Objective: to partially characterize the activity of esterases in exposed and non-exposed larvae at sublethal doses of temephos in an *Aedes aegypti* strain that is resistant to this product.

Methods: a susceptible reference *Aedes aegypti* strain (Rockefeller) and another temephos-resistant strain (SANtemF11) were used. The larvae from SANtemF11 strain were exposed to lethal concentration 90 (LC₉₀) of temephos (1 ppm); 10 % of the surviving larvae after 24 hours (SANtem[24 h]) was moved to clean water, with no exposure to insecticide for 24 hours (SANtem [48 h]). The activity of esterases was partially characterized in these larvae through biochemical assays and gel-polyacrylamide electrophoresis. The molecular weight of esterase A 4 (Est. A4) was estimated with the support of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE).

Results: the activity of esterases in SANtemF11 was significantly higher than in Rockefeller strain. Significant reduction of the activity of esterases in surviving larvae was observed (SANtemF11 [24 h]), but it increased 24 h later without exposure to temephos. The zymogram showed that 10% of larvae that survived from temephos action, just the esterase A4 band increased if compared with those of SANtemF11. The estimated molecular weight of esterase A4 was 58 kDa.

Conclusions: the presence of a specific band of esterase (58 kDa) in surviving larvae confirmed the role of these enzymes in insecticidal resistance. The diagnosis of the function of the esterases in resistance to temephos through biochemical tests should not be made in larvae exposed to sublethal doses of this insecticide, in order to avoid false negatives.

Key words: *Aedes aegypti*, insecticidal resistance, esterases, molecular weight.

INTRODUCCIÓN

El mosquito *Aedes aegypti* es el vector de mayor importancia en ambiente urbano, debido a su gran adaptabilidad a estas condiciones¹ y a su eficiente capacidad vectorial para ciertas arbovirosis, como el dengue.²

El enfoque para el control de *Ae. aegypti* en las últimas décadas se ha basado principalmente en el saneamiento ambiental, a través de la participación de la

comunidad, y la aplicación de insecticidas químicos debido a la presencia de estadios larvarios en una variedad de recipientes naturales y artificiales.³

La efectividad del control químico se ve amenazada por la resistencia que *Ae. aegypti* ha desarrollado frente a los insecticidas más utilizados para su control.⁴⁻⁹

Existen dos tipos de mecanismos de resistencia importantes en insectos. Uno es el incremento del metabolismo del insecticida, antes de que llegue a su sitio de acción, por enzimas de acción metabólica, destacándose las esterasas, monooxigenasas y glutatión transferasas. El otro está basado en cambios en la sensibilidad del sitio de acción o diana, que impide la acción inhibitoria de los insecticidas.⁸

El insecticida organofosforado temefos ha sido el más utilizado como larvicida para el control de *Ae. aegypti*.^{4,10-13} En los países donde existen investigaciones encaminadas a evaluar y monitorear la resistencia a insecticidas, como en Malasia,¹⁴ Brasil,¹⁵ Islas Martinica, ya se ha detectado resistencia a temefos,¹⁶ asociada con las tres enzimas de acción metabólica. El primer reporte de resistencia a temefos en Cuba fue en 1997, con la ocurrencia del brote de dengue en Santiago de Cuba.¹⁷ La resistencia se relacionó a un incremento de la actividad de enzimas esterasas, específicamente una banda que fue clasificada, a través de electroforesis en gel de poliacrilamida, como esterasa A4. En cepas de *Ae. aegypti* de otros países de América Latina también se ha identificado esta esterasa, asociada con la resistencia a temefos.¹⁸⁻²⁰

La resistencia a temefos es un fenómeno que evoluciona rápidamente,^{8,14} lo cual constituye una amenaza para el control de vectores, por lo tanto se considera que es un tema que necesita un enfoque proactivo. El estudio de las enzimas esterasas, responsables de la resistencia a temefos en Cuba, es esencial para la comprensión de este fenómeno *in situ*. El objetivo de este trabajo fue caracterizar parcialmente la actividad de esterasas en larvas, expuestas y no expuestas a dosis subletales de temefos, en una cepa de *Ae. aegypti* de referencia, resistente a este insecticida.

MÉTODOS

Cepas utilizadas

Rockefeller: cepa de referencia de *Ae. aegypti* susceptible a insecticidas, suministrada por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), San Juan, Puerto Rico.

SANtemF11: cepa de referencia de *Ae. aegypti* resistente a temefos, procedente de Santiago de Cuba, Cuba, colectada en 1997 y seleccionada por 11 generaciones hasta alcanzar una resistencia al temefos 191,21 veces superior que la cepa susceptible de referencia Rockefeller.

Cría y mantenimiento de las colonias de *Aedes aegypti*

El insectario del Departamento de Control de Vectores del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK) sirvió de sitio de cría de las cepas de *Ae. aegypti* utilizadas en este trabajo. El mantenimiento de las cepas de *Ae. aegypti* se realizó

siguiendo la metodología del *Manual de Indicaciones Técnicas del Insectario*.²¹ La temperatura durante el período de estudio se mantuvo de 25 °C ± 2 y una humedad relativa de 75 ± 2.

Insecticida utilizado

Temefos: o,o-dimetil fosforotioato odiéster con 4,42 tiodifenol; con 93,3 % de pureza, suministrado por *American Cyanamid Co.* (Princeton, NJ, EE. UU.). Se utilizó a una concentración de 1 % en acetona y se hicieron diluciones de 1:10 para las evaluaciones de las diferentes dosis.

Selección con temefos: las larvas de la cepa SANtemF11 se expusieron por 24 h a la concentración letal que causó 90 % de mortalidad (CL₉₀) con temefos, previamente determinada en esta cepa (1 ppm). El correspondiente 10 % de las larvas sobrevivientes a la exposición (SANtemF11 [24 h]) se transfirieron a agua limpia con alimentación y sin exposición a temefos por 24 h más (SANtemF11 [48 h]).

Actividad de esterasas: para cada ensayo se utilizaron 79 larvas de cada cepa de referencia (Rockefeller y SANtemF11), de SANtemF11 (24 h) y SANtemF11 (48 h). Se realizaron tres réplicas de cada ensayo. La actividad de las esterasas se determinó en larvas del tercer estadio tardío o cuarto estadio temprano, según el método adaptado para *Ae. aegypti*.²² Para ello se homogeneizó una larva en 200 µL de tampón de fosfato 0,01 M (pH 7,5). En una placa de microtitulación de poliestireno se colocaron 20 µL del homogenizado, se añadieron 200 µL del sustrato (acetato de beta-naftilo 0,7 mM) y se dejó transcurrir la reacción por 10 min. Después se añadieron 40 µL del indicador *fast blue B* y se leyó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas de ELISA VersaMax™ (*Molecular Devices Corporation*, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Se compararon los valores medios de absorbancia utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Se consideró que hubo diferencias significativas para valores de p < 0,05. La prueba de Tukey se realizó para determinar qué medias diferían una de otra.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE nativa): la actividad esterasa se detectó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida a 10 %. La muestra (larvas individuales) fue diluida en la mezcla de xilene cianol 1 % y sacarosa 15 % (0,2:10 v/v), y aplicada en un gel preparativo con un espesor de 0,5 mm. El tampón de corrida empleado fue Tris borato/EDTA 0,1 M pH, 8,0. La corrida se efectuó a 200 V durante 1 h, aproximadamente. Para la tinción de las bandas de esterasas, los geles se sumergieron en tampón fosfato 0,01 M (50 mL), que contenía 4 mL de cada uno de los sustratos de las esterasas (alfa-naftil acetato y de beta-naftil acetato) y se le adicionó el colorante (0,03 g de *fast-blue B salt* + 3 mL de agua destilada + 7 mL de duodecil sulfato de sodio [SDS] 5 %). Se sumergieron los geles en ácido acético 10 % por 10 min, para fijar la coloración de las bandas.

Determinación del peso molecular de la esterasa A4

Muestra: se preparó mediante el macerado de 100 larvas de *Ae. aegypti* en 200 µL de tampón fosfato 0,01 M, pH 6,5. Seguidamente, el extracto se centrifugó a 5 000 rpm y el sobrenadante se utilizó para los estudios de caracterización bioquímica.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE): una vez finalizada la corrida de PAGE nativa, se procedió a cortar el gel en dos partes. Una sección se usó para detectar la actividad de las esterasas mediante tinción específica del gel, como se describió antes. La otra parte se utilizó para determinar el peso molecular a través

de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).²³ Para ello, se procedió a cortar el fragmento del gel, que fue identificado por la distancia en que se visualizó la banda de esterasa en la otra parte del gel, y teñido para esterasas. La fracción de gel, correspondiente a la esterasa A4, se colocó en un vial con 100 µL de tampón muestra (Tris-HCl 0,5 mol/L, pH 6,8; bromofenol azul; SDS 0,1 % y glicerol 1,5 %). Esta fracción y el patrón en un rango de peso molecular (PM) entre 29 y 205 kDa fueron aplicados al gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con un espesor de 0,75 mm. La corrida se efectuó bajo condiciones desnaturalizantes en mini-cámaras (BioRAD, EE. UU.) a razón de 15 mA/gel con tampón Tris (0,5 mol/L), glicina (0,192 mol/L), SDS (0,1 %), pH 8,3. Al finalizar la corrida electroforética, se cortó el gel que contenía los patrones, se realizó la tinción con azul de Coomassie 0,25 % disuelto en una mezcla de metanol-ácido acético-agua (5:1:5 v/v/v), durante 30 min; se decoloró después en esta mezcla. La otra parte del gel se colocó en una solución de Tritón X-100 a 2,5 % por 4 h. Por último, se procedió a determinar la actividad esterasa según se describió antes. El PM de la esterasa se estimó mediante el uso de una curva de calibración previamente confeccionada, a partir de las movilidades relativas de cada proteína patrón con respecto al logaritmo de su peso molecular (Comunicación personal, Lila Castellano).

RESULTADOS

Las larvas sobrevivientes a la exposición con temefos por 24 h (SANtemF11 [24 h]) mostraron una actividad de esterasas que difirió significativamente ($p= 0,00001$) de la actividad observada en las larvas de SANtemF11 sin previa exposición, sin embargo, no existió diferencia significativa entre la actividad de esterasas de las larvas sobrevivientes a la exposición con temefos y las de la cepa susceptible Rockefeller.

Cuando las larvas de SANtemF11 (24 h) son transferidas a agua limpia y alimentadas para su recuperación por 24 h (SANtemF11 [48 h]), estas manifestaron un incremento rápido de la actividad de esterasas, que difirió de modo significativo ($p= 0,00001$), tanto de SANtemF11 como de Rockefeller (Fig. 1).

En el zimograma en gel de poliacrilamida se observaron varias bandas de esterasas que mostraron alta actividad en SANtemF11 sin exponer a temefos, las cuales no se mostraron incrementadas en la cepa susceptible Rockefeller, sin embargo, las larvas que sobrevivieron a la selección con temefos por 24 h (SANtemF11 [24 h]), mostraron un zimograma en el cual se observó una sola banda con alta actividad de esterasas. El resto de las bandas mostraron un patrón de actividad muy similar al de la cepa Rockefeller. La actividad de todas las bandas de esterasas comienza a incrementarse nuevamente cuando estas larvas sobrevivientes son transferidas a agua limpia por 24 h (SANtemF11 [48 h]). La banda con incrementada actividad de esterasas (Est. A4), que apareció en las larvas sobrevivientes, no se observó así en la cepa Rockefeller (Fig. 2). El peso molecular estimado de la esterasa A4 fue de 58 kDa (Fig. 3).

Actividad de esterasas (DO media)(570 nm)

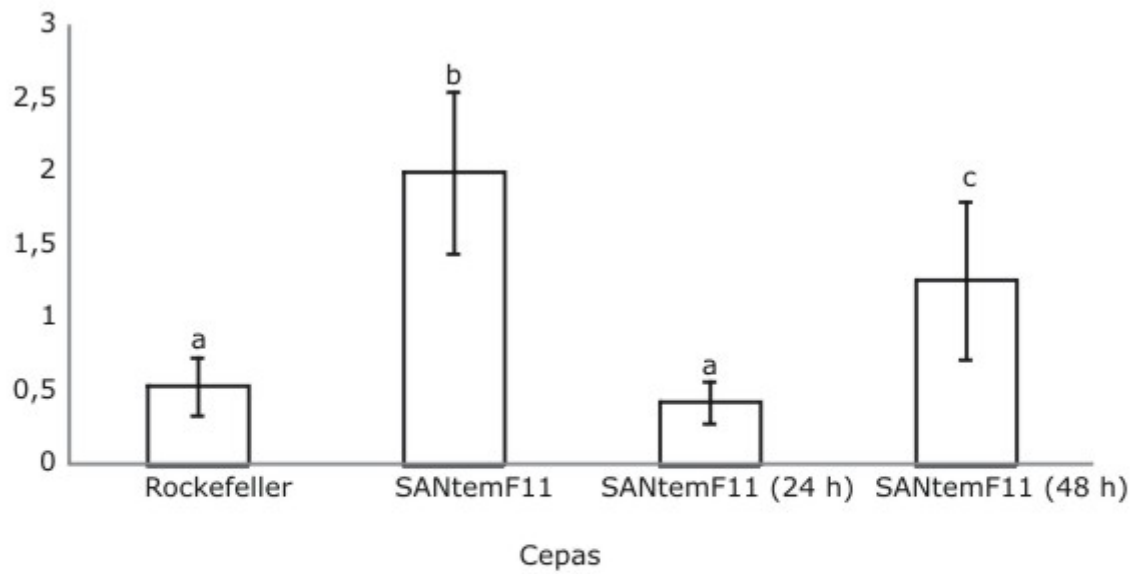


Fig. 1. Actividad de esterasas, expresada como el valor medio de densidad óptica (570 nm) en larvas de *Aedes aegypti* de la cepa de referencia susceptible a temefos (Rockefeller), de la cepa resistente (SANtemF11) y de las larvas de SANtemF11 (24 h) y de SANtemF11 (48 h). Se utilizó ANOVA para la comparación de los valores medios de actividad de esterasas [$F(3,312) = 253,07$; $p = 0,00001$]. Letras desiguales denotan diferencias entre las medias, de acuerdo con la prueba de Tukey.

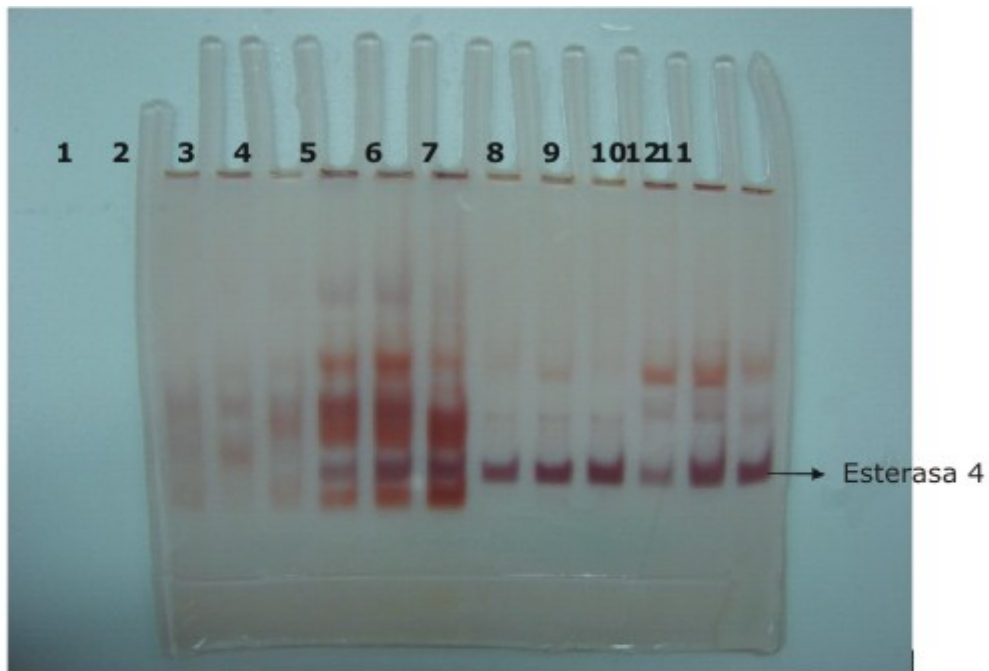


Fig. 2. Zimograma de esterases obtenido por electroforesis en gel de poliacrilamida en *Aedes aegypti* de la cepa de referencia susceptible a temefos, Rockefeller (muestras 1-3); de la cepa de referencia resistente, SANtemF11 (muestras 4-6), de las larvas de SANtemF11 sobrevivientes a la exposición con temefos por 24 h, SANtemF11 (24 h) (muestras 7-9), y de estas sobrevivientes, 24 h después, sin exposición a temefos, SANtemF11 (48 h) (muestras 10-12).

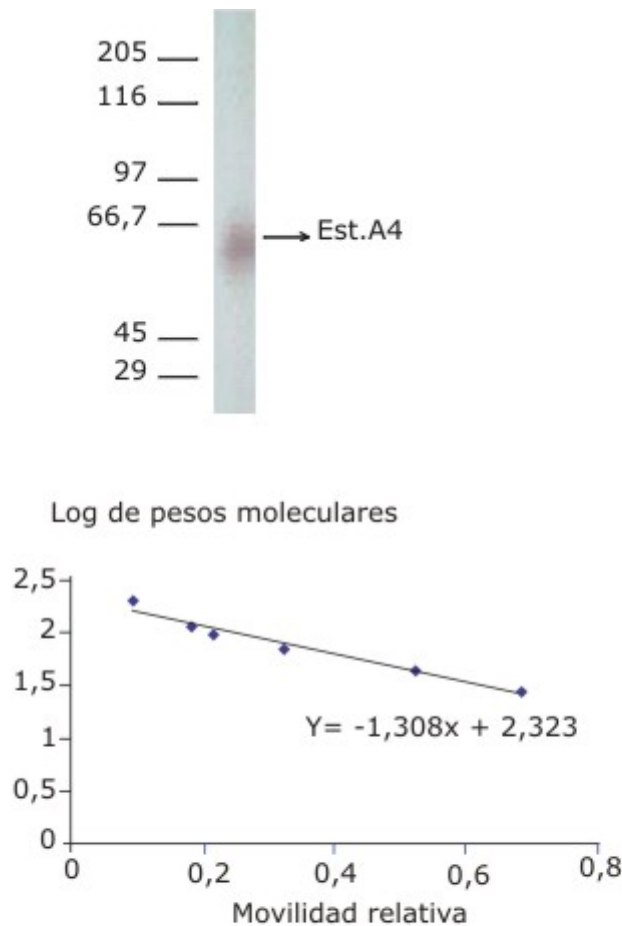


Fig. 3. Peso molecular por SDS-PAGE de una banda de esterasa específica (Est-A4), observada con alta actividad en larvas de *Aedes aegypti*, sobrevivientes a la exposición con temefos por 24 h (SANtemF11 24 h). Se utilizó un patrón de peso molecular entre 29 y 205 kDa.

DISCUSIÓN

La resistencia a temefos en *Ae. aegypti* de Cuba se caracterizó por primera vez a través de la selección de una cepa de referencia resistente a temefos y se demostró que el mecanismo de acción metabólica, basado en la actividad de tres familias de enzimas, esterasas, monoxigenasas y glutatión transferasa, fue el responsable de la resistencia a este insecticida; aunque el mayor nivel de correlación de la resistencia a temefos resultó con las esterasas.²⁴ Recientemente, en un estudio realizado en La Habana, se demostró que solo las enzimas esterasas desempeñan un papel importante en la resistencia a temefos.⁸

Algunos trabajos diagnostican la presencia o ausencia de los mecanismos de resistencia de acción metabólica, comparando los mecanismos de resistencia en mosquitos que sobreviven a dosis subletales de un insecticida con una cepa de referencia susceptible. Si difieren significativamente, se asume que esa familia de enzimas está asociada con la resistencia al insecticida evaluado.^{15,25} Los resultados obtenidos en esta investigación pudieran ofrecer un falso diagnóstico del papel de las esterasas en la resistencia a temefos, si se hubiera analizado la actividad de estas enzimas a través de ensayos bioquímicos, sin análisis del zimograma.

De acuerdo con los resultados del zimograma en gel de poliacrilamida, existió un proceso de inhibición de las bandas con actividad de esterasas, cuando estas fueron expuestas a temefos, expresando actividad solo la banda de Est. A4, generando una actividad enzimática que no difirió significativamente de la cepa susceptible, cuando se realizaron las determinaciones por ensayos bioquímicos. Este fenómeno resultó reversible, porque al ser transferidas las larvas sobrevivientes a la exposición con temefos a agua limpia y alimento por 24 h, estas bandas volvieron a manifestar actividad en el gel. Las enzimas esterasas que se inhiben durante la exposición a temefos, pudieran desempeñar un papel importante en otras funciones metabólicas del insecto, pero no en la resistencia a este insecticida. Las enzimas de acción metabólica constituyen la primera defensa enzimática ante los insecticidas, son responsables de eliminar muchos productos del metabolismo desempeñan un papel esencial en múltiples procesos de biosíntesis.²⁶

La banda de esterasa que aparece en los sobrevivientes de un Rf de 0,78 fue previamente clasificada como Est. A4 en Cuba en una cepa de *Ae. aegypti* de Santiago de Cuba, colectada en 1997.¹⁷ Después se ha observado asociada a la resistencia a temefos, no solo en cepas de *Ae. aegypti* de Cuba,^{8,24,27,28} sino de otros países de América Latina.^{7,19,20}

Existen estudios que caracterizan los mecanismos de resistencia de acción metabólica en *Ae. aegypti* a nivel molecular,^{16,29} pero a nivel proteico son escasos en esta especie. Por ello, caracterizar las enzimas responsables de la resistencia es muy importante. La determinación del peso molecular (58 kDa) de la esterasas A4 es un resultado preliminar para continuar caracterizando esta enzima a nivel proteico.

En conclusión, la presencia de una banda específica de esterasa (58 kDa) en las larvas sobrevivientes a la selección con temefos, confirma su papel en la resistencia a este insecticida. Diagnosticar el papel de las esterasas en la resistencia a temefos, a través de ensayos bioquímicos, no debe realizarse en larvas expuestas a dosis subletales de este insecticida, para evitar a falsos negativos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Regis L, Monteiro AM, Melo-Santos MA, Silveira JC, Furtado AF, Acioli RV, et al. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103: 50-9.

2. Anderson JR, Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75:886-92.
3. Marquetti MC, Suárez S, Bisset JA, Leyva M. Reporte de hábitats utilizados por *Aedes aegypti* en Ciudad de La Habana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2005;57(2):159-61.
4. Rawlins SC. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Rev Panam Salud Pública.* 1998;4:243-51.
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. Lima JB, Da-Cunha MO, Da Silva RC, Galardo AK, Soares Sda, Braga IA, et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68:329-33.
7. Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from some Latin-American countries. *J Am Mosq Control Assoc.* 2007;24(3):420-9.
8. Bisset JA, Rodríguez MM, Ricardo Y, Ranson H, Pérez O. Temephos resistance and esterase activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Havana city increased dramatically between 2006 and 2008. *Med Vet Entomol.* 2011;25:233-9.
9. Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Ann Review Entomol.* 2000;45:371-91.
10. Flores AE, Grajales JS, Salas IF, Garcia GP, Becerra MHL, Lozano S, et al. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. *J Am Mosq Control Assoc.* 2006;22:672-77.
11. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: history of control in Brazil. *Epidemiol Serv Saúde.* 2007;16:113-8.
12. Jirakanjanakit N, Rongnoparut P, Saengtharatip S, Chareonviriyaphap T, Duchon S, Bellec C, et al. Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005. *J Econ Entomol.* 2007;100:545-50.
13. Tikar SN, Kumar A, Prasad GB, Prakash S. Temephos-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India. *Parasitol Res.* 2009;105:57-63.
14. Chen CD, Nazni WA, Lee HL, Sofian-Azirun M. Weekly variation on susceptibility status of *Aedes* mosquitoes against temephos in Selangor, Malaysia. *Trop Biomed.* 2005;22(2):195-206.
15. Melo-Santos MAV, Varjal-Melo JJM, Araújo AP, Gomesa TCS, Paivaa MHS, Regis LN, et al. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Trop.* 2010;113:180-9.

16. Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, et al. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). BMC Genomics. 2009;10:494.
17. 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(2):83-8.
18. Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from some Latin-American countries. J Am Mosq Control Assoc. 2007;24 (3):420-9.
19. Bisset JA, Rodríguez MM, Fernández D, Palomino M. Resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de 2 provincias del Perú. Rev Cubana Med Trop. 2007;59(3):202-8.
20. Bisset JA, Rodríguez MM, San Martín JL, Romero JE, Montoya R. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. Rev Panam Salud Pub. 2009;61(3):229-34.
21. Pérez O, Bisset JA, Leyva M, Rodríguez J, Fuentes O, García I, et al. Manual de Indicaciones Técnicas para Insectarios; 2004. p. 16-53.
22. Rodríguez MM, Bisset JA, Milá L, Molina D, Lauzan L. Detection of resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from Cuba and Venezuela. J Med Entomol. 2001;38(5):623-8.
23. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-5.
24. 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(6):882-8.
25. Muhammad AR, Poupardina R, Reynauda S, Strode C, Ranson H, Jean-Philippe D. Impact of glyphosate and benzopyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. Aquatic Toxicol. 2009;93:61-9.
26. Feyereisen R. Insect cytochrome P450. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill S, editors. Comprehensive Molecular Insect Science. Oxford: Elsevier; 2005. p.1-77.
27. 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(1):54-60.
28. 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 *Aedes aegypti* en Ciudad de la Habana, 2001-2002. Rev Cubana Med Trop. 2004;56(1):61-6.

29. Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, et al. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2008; 38: 113-23.

Recibido: 26 de marzo de 2012.

Aprobado: 28 de junio de 2012.

María Magdalena Rodríguez Coto. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½. AP 601. Marianao 13, La Habana, Cuba. Correo electrónico: mrodriguez@ipk.sld.cu