

## Actividad incrementada de las enzimas citocromo P450 monooxigenasas en cepas cubanas de *Aedes aegypti* de referencia, resistentes a insecticidas

### Increased activity of cytochrome P450 monooxygenase enzymes in reference insecticide-resistant *Aedes aegypti* strains from Cuba

MSc. Leidys French Pacheco, Dr. C. María Magdalena Rodríguez Coto, Dr. C. Juan Andrés Bisset Lazcano, MSc. Yanelys Ricardo Leyva, Lic. Gladys Gutiérrez Bugallo, Lic. Ilario Fuentes López

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

---

#### RESUMEN

**Introducción:** las enzimas desintoxicadoras citocromo P450 monooxigenasas (MFO) constituyen uno de los principales mecanismos de resistencia de *Aedes aegypti* a insecticidas. En Cuba, aunque la presencia de estas enzimas se ha estudiado *in vivo* mediante el uso de sinergistas, su actividad no se ha determinado cuantitativamente *in vitro*, elemento que resulta imprescindible para abordar estudios de resistencia metabólica en los insectos.

**Objetivo:** estandarizar un método para detectar la actividad de las citocromo P450 monooxigenasas *in vitro*, y determinarla entonces, en larvas y adultos de cepas de referencia de *Aedes aegypti*.

**Métodos:** se utilizaron 3 cepas de laboratorio de *Aedes aegypti* seleccionadas por 14 o 15 generaciones con temefos, deltametrina o propoxur, respectivamente, y una cepa susceptible a los insecticidas.

**Resultados:** se establecieron las condiciones para los ensayos de actividad enzimática (concentración de proteínas y de sustrato, 0,4 mg/mL y 12 mmol/L, respectivamente; y tiempo de reacción de 10 min). Hubo un incremento significativo de la actividad de las citocromo P450 monooxigenasas en las cepas resistentes, con una mayor frecuencia fenotípica de este carácter en el estadio larva.

**Conclusiones:** las modificaciones a la técnica para la determinación de la actividad enzimática permitieron discriminar entre mosquitos de cepas susceptibles y resistentes en los estadios larva y adulto, por lo que se cuenta con otra herramienta para la detección de la resistencia metabólica en Cuba.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*, resistencia a insecticidas, citocromo P450 monooxigenasas.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** cytochrome P450 monooxygenase detoxifying enzymes (MFO) are one of the main resistance mechanisms of *Aedes aegypti* to insecticides. *In vivo* studies of the presence of these enzymes have been conducted in Cuba with the use of synergists. However, their activity has not been quantitatively determined *in vitro*, an indispensable step in studies about metabolic resistance in insects.

**Objective:** standardize a method to detect the activity of cytochrome P450 monooxygenase *in vitro*, and then determine such activity in larvae and adults of *Aedes aegypti* reference strains.

**Methods:** the study was based on three laboratory strains of *Aedes aegypti* selected for 14 or 15 generations with temephos, deltamethrin or propoxur, respectively, and a strain susceptible to insecticides.

**Results:** the conditions for enzyme activity assays were established (protein and substrate concentration: 0.4 mg/mL and 12 mmol/L, respectively, and reaction time: 10 min). There was a significant increase in cytochrome P450 monooxygenase activity in resistant strains, with a higher phenotypic frequency in the larval stage.

**Conclusions:** modifications to the technique used for determination of enzymatic activity made it possible to distinguish between mosquitoes from susceptible and resistant strains in larval and adult stages, providing a new tool for the detection of metabolic resistance in Cuba.

**Key words:** *Aedes aegypti*, insecticide resistance, cytochrome P450 monooxygenases.

---

## INTRODUCCIÓN

La aplicación de insecticidas ha sido fundamental en el control de *Aedes aegypti* (Linneaus, 1762), principal agente transmisor de virosis en América.<sup>1</sup> Sin embargo, el uso intensivo de los insecticidas ha propiciado el desarrollo de resistencia a estos compuestos sintéticos en los insectos.<sup>2</sup>

De los cuatro mecanismos que median la resistencia, la insensibilidad del sitio de acción de los insecticidas y el aumento de las enzimas desintoxicadoras son los más encontrados en los artrópodos.<sup>3</sup> La resistencia metabólica en insectos está mediada principalmente por las citocromo P450 monooxigenasas (MFO), las glutatión-S-transferasas (GTS) y las carboxilesterasas (EST).<sup>3</sup>

---

En Cuba se han estandarizado pruebas bioquímicas para estudiar *in vitro* el mecanismo de resistencia metabólica, a través de la detección del incremento de la actividad de las enzimas EST y GTS en cepas resistentes.<sup>4</sup> La presencia de las MFO como mecanismo responsable de la resistencia a insecticidas en cepas de *Ae. aegypti* se ha estudiado *in vivo* a través del uso de sinergistas, sin embargo, su actividad enzimática no se ha determinado *in vitro*.<sup>5</sup> En estos trabajos la resistencia a piretroides y organofosforados se asoció a la función de las MFO en la desintoxicación de insecticidas.<sup>5,6</sup> Estas dos clases de compuestos químicos han sido los más utilizados en el control de *Ae. aegypti* en Cuba,<sup>7</sup> por lo que conocer los mecanismos que favorecen el desarrollo de resistencia a insecticidas en *A. aegypti* permitirá un mejor diseño de las estrategias de control vectorial.

La determinación de la actividad de las MFO es un factor importante para abordar los estudios de resistencia metabólica. A partir de la técnica propuesta por Brogdon y otros<sup>8</sup> para la detección de la actividad de las MFO en *Ae. aegypti*, se realizó una adaptación de esta, para determinar los niveles de las MFO en cepas cubanas de referencia.

## MÉTODOS

### *Cepas*

- Rockefeller: cepa de referencia de laboratorio susceptible a insecticidas, suministrada por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), San Juan, Puerto Rico, 1896.
- SANtem-F14: cepa de referencia colectada en 1997 en Santiago de Cuba y sometida a presión de selección con temefos desde el año 1999.
- SAN-F14: cepa de referencia colectada en 1997 en Santiago de Cuba y sometida a presión de selección con deltametrina desde 1999.
- SAN-F15: cepa de referencia colectada en 1997 en Santiago de Cuba y sometida a presión de selección con propoxur desde 1999.

### **Estandarización y ensayo de actividad de las citocromo P450 monooxigenasas**

#### *Preparación del homogenato de larvas de Ae. aegypti*

Se preparó un homogenato, macerando 20 larvas de cuarto estadio temprano de la cepa Rockefeller en 6 mL de tampón Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 mol/L, pH 7,5 (tampón fosfato). Se centrifugó a 5 800 g durante 5 min. El sobrenadante se colectó y se conservó a - 80 °C hasta su uso posterior.

#### *Estudio del efecto de la concentración de la enzima y del sustrato sobre la actividad citocromo P450 monooxigenasas*

La determinación de la actividad enzimática (AE) se calculó según la ecuación siguiente:

$$AE = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\xi} \cdot \frac{V_{ensayo}}{V_{muestra}} \cdot V_{Total}$$

Donde:  $\Delta\text{Abs}/\Delta t$ : variación de absorbancia en el tiempo;  $\epsilon$ : coeficiente de extinción molecular del sustrato 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMBZ),  $5,9 \times 10^4$  L/mol/cm;  $V_{\text{ensayo}}$ : volumen utilizado en el ensayo;  $V_{\text{muestra}}$ : volumen de homogenato utilizado el ensayo;  $V_{\text{total}}$ : volumen del homogenato.

Los ensayos se realizaron a una absorbancia de 620 nm, en un espectrofotómetro (*Versa Max*, EE. UU.) con un programa cinético acoplado. Como control negativo se utilizó una mezcla de tampón fosfato, TMBZ y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

El establecimiento del parámetro cinético, concentración de enzima a utilizar en el ensayo, se llevó a cabo a partir de la determinación de la AE de las MFO utilizando diferentes concentraciones del extracto (0; 0,05; 1; 1,5; 2 mg/mL), 200  $\mu\text{L}$  de sustrato 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMBZ) (8 mmol/L) y 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3%). Cada reacción se siguió por 30 min cada 50 s. La concentración de proteínas totales se determinó mediante el método de *Bradford*.<sup>9</sup> La actividad enzimática se expresó en términos de actividad específica, porque no se utilizaron enzimas purificadas. Se obtuvo a partir de la relación AE/mg de proteínas totales.

En el estudio del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática se utilizaron diferentes concentraciones de TMBZ (0,8; 1; 2; 5; 10; 12; 14; 17 y 20 mmol/L). Los ensayos se siguieron durante 30 min, manteniendo las mismas condiciones descritas anteriormente.

#### *Efecto del tiempo sobre la actividad enzimática*

Los ensayos de actividad se realizaron utilizando la concentración de enzima y sustrato seleccionados. Se varió el tiempo de lectura (3, 5, 10, 12, 15, 20, y 30 min).

#### *Determinación de la actividad citocromo P450 monooxigenasas en larvas y adultos de Aedes aegypti*

Una vez estandarizadas las condiciones de ensayo se determinó la actividad de las enzimas MFO en cada una de las cepas, en los estadios larva y adulto. Se utilizaron larvas de cuarto estadio temprano y adultos hembras de 1 a 3 días de nacidos, y sin alimentar. Los insectos ( $n > 100$ ) se colocaron individualmente en placas de microtitulación y fueron macerados en 50  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato, con el empleo de un homogenizador de placas, sobre una bolsa de hielo. Se completó a un volumen de 300  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato.

El procesamiento de los datos se realizó en el programa estadístico *Statistica* (StatSoft, versión 7,0), y se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para la comparación de los valores de actividad de las MFO correspondientes a cada cepa estudiada ( $p < 0,05$ ).

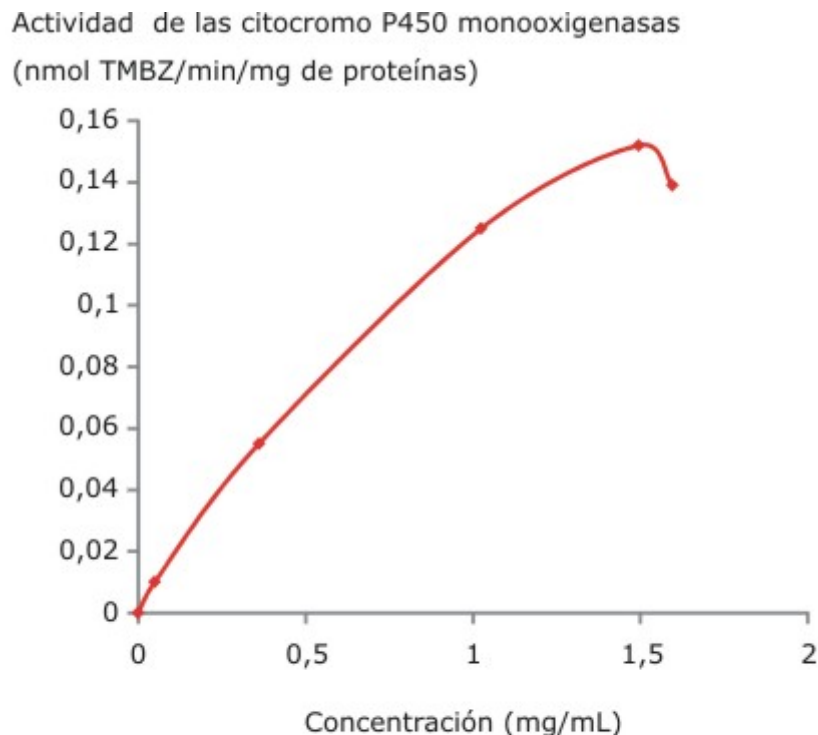
#### *Determinación de la frecuencia fenotípica de la alta actividad de las citocromo P450 monooxigenasas en larvas y adultos de cepas de Aedes aegypti*

La frecuencia fenotípica de aparición de la alta actividad de las MFO en los individuos resistentes se determinó a partir de un valor de corte, que permitió diferenciar los individuos fenotípicamente resistentes de los susceptibles. El valor de corte se definió como la media de la actividad de las MFO de la cepa Rockefeller más 3 desviaciones estándar. Se calculó la frecuencia como el porcentaje de los individuos resistentes entre el total de los evaluados.

## RESULTADOS

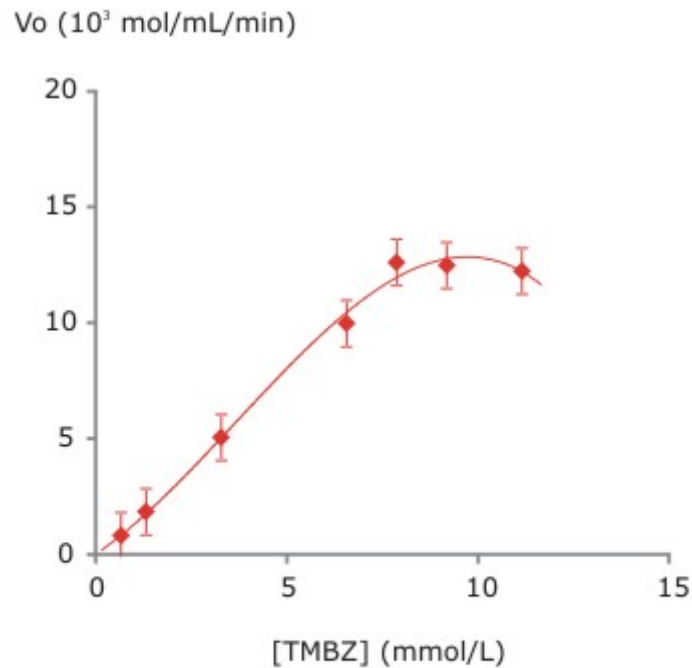
Se estudiaron las citocromo P450 monooxigenasas, a través de la determinación de su actividad específica, para lo cual se diseñó un ensayo que permitió diferenciar entre las cepas resistentes y la susceptible a insecticidas.

Como se observa en la figura 1, en el ensayo pueden emplearse concentraciones de homogenato de larva entre 0,4 y 1 mg/mL (zona lineal del ensayo de AE). Se seleccionó un volumen de homogenato de 80  $\mu$ L para los ensayos, porque se corresponde con el intervalo de concentraciones óptimas determinadas. La concentración de proteínas de larvas individuales en una población del mismo estadio y de tamaño homogéneo es similar.



**Fig. 1.** Variación de la actividad enzimática de las citocromo P450 monooxigenasas (MFO) en función de la concentración del homogenato, en larvas de *Aedes aegypti* de la cepa Rockefeller.

En los estudios realizados sobre el efecto de la concentración de TMBZ sobre la AE de las MFO se encontró que a partir de una concentración de 12 mmol/L los valores de AE no varían al aumentar la concentración de sustrato (Fig. 2). Se seleccionó este valor para los ensayos enzimáticos, por ser la cantidad mínima a la cual el sustrato no es limitante en la reacción.

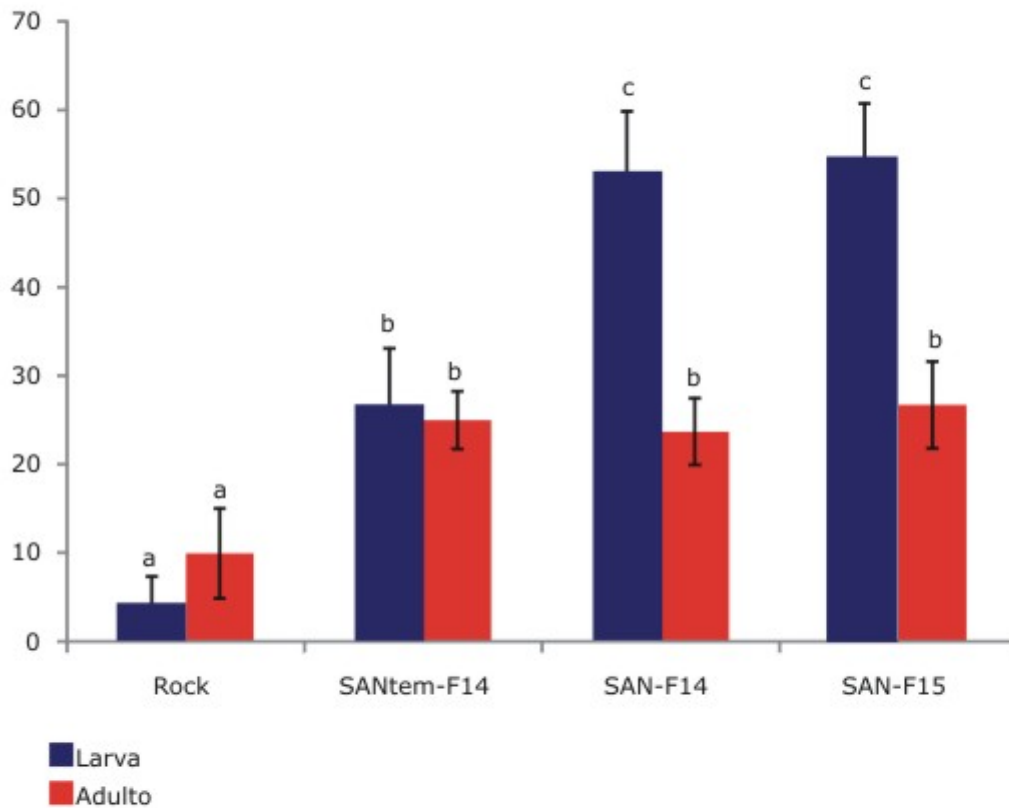


**Fig. 2.** Variación de la actividad enzimática de las citocromo P450 monooxigenasas (medida como velocidad inicial: Vo) en función de la concentración de sustrato (TMBZ), en larvas de *Aedes aegypti* de la cepa Rockefeller.

Por otra parte, en los estudios acerca del efecto del tiempo sobre los valores de actividad de las MFO, no se encontraron diferencias significativas entre la media de la AE determinada para cada tiempo evaluado a partir de los 8 min. Se seleccionó un tiempo de reacción de 10 min, para garantizar que no hubiera variaciones entre los valores de AE.

Con las modificaciones introducidas a la técnica, se determinó la actividad de las citocromo P450 monooxigenasas, en cada cepa (Fig. 3). En la figura 3 se observa que entre los valores medios de actividad específica de los estadios larva y adulto de la cepa Rockefeller no hubo diferencias significativas. Sin embargo, los valores de actividad en ambos estadios de las 3 cepas de referencia (SANtem-F14, SAN-F14 y SAN-F15) fueron mayores ( $p= 0,0001$ ) que los de la cepa susceptible. La actividad de las MFO en las larvas de las cepas SAN-F14 y SAN-F15 resultó mayor que la de los adultos correspondientes.

Actividad específica de las citocromo P450 monooxigenasas  
(nmol TMBZ/min/mg de proteínas totales)



**Fig. 3.** Valores medios de actividad específica de las citocromo P450 monooxigenasas (nmol TMBZ/min/mg de proteínas totales) determinados en los estadios larva y adulto de cepas de *Aedes aegypti*. Se realizó una prueba de comparación múltiple Kruskal-Wallis ( $H(3)=221,4$ ,  $p= 0,0001$ ) utilizando el programa estadístico STATISTICA 7 (las letras distintas denotan diferencias entre las medias).

El comportamiento de la frecuencia fenotípica del carácter incremento de la actividad de las MFO fue diferente en las 3 cepas. En la cepa SANtem-F14 apenas varió la frecuencia entre larvas y adultos. La mayor frecuencia fenotípica se encontró en el estadio larva de la cepa SAN-F14. En el estadio adulto de las cepas SAN-F14 y SAN-F15 hubo una disminución de la frecuencia fenotípica de 3 y 8 veces con respecto al estadio larva correspondiente (tabla).

**Tabla.** Frecuencia fenotípica de la alta actividad citocromo P450 monooxigenasas en larvas y adultos de las cepas estudiadas

Cepas	SANtem-F14		SAN-F14		SAN-F15	
	Larvas	Adultos	Larvas	Adultos	Larvas	Adultos
Citocromo P450 monooxigenasas	30,6 %	25,9 %	58,4 %	18,1 %	48,8 %	6,7 %

## DISCUSIÓN

La superfamilia de las citocromo P450 monooxigenasas, debido a su diversidad genética, versatilidad catalítica y su amplia especificidad de sustrato,<sup>10</sup> está implicada como el factor principal en muchos casos de resistencia metabólica a carbamatos, aunque también desintoxican organofosforados y piretroides.<sup>11</sup> La actividad incrementada de las MFO se ha asociado a la sobreexpresión genética de las enzimas, lo cual se ha explicado a través de mutaciones, inserciones y deleciones en las secuencias de los elementos reguladores.<sup>10</sup>

Los parámetros cinéticos establecidos (volumen de homogenato, concentración de sustrato y tiempo de reacción), a partir de las modificaciones realizadas a la metodología de *Brogdon* y otros, difieren de los informados en los trabajos de este autor<sup>6</sup> y los de *Penilla* y otros.<sup>12</sup> Esto pudiera estar relacionado con que las cepas utilizadas para la estandarización en cada trabajo son diferentes. Sin embargo, con las nuevas modificaciones introducidas se logró detectar la actividad *in vitro* de las MFO y discriminar entre cepas resistentes y susceptibles. Aunque los estudios de estandarización se han realizado en larvas,<sup>8,12</sup> los resultados se han aplicado en el estadio adulto.<sup>13</sup> Los valores medios de la actividad específica de las MFO determinados tanto en el estadio larva como en el adulto son similares a los encontrados en poblaciones de *Ae. aegypti* de diferentes regiones como Tailandia,<sup>13</sup> Costa Rica,<sup>14</sup> Trinidad,<sup>15</sup> y México,<sup>16</sup> entre otros.

La mayor actividad de las enzimas citocromo P450 monooxigenasas se encontró en las larvas de las cepas seleccionadas con deltametrina (SAN-F14) o con propoxur (SAN-F15), aunque la cepa seleccionada con temefos (SANtem-F14) también tuvo mayor actividad de las MFO con respecto a Rockefeller. La actividad de estas enzimas se ha asociado fuertemente a la resistencia a los insecticidas piretroides.<sup>17,18</sup> En varios trabajos se ha justificado y asociado la resistencia cruzada encontrada entre piretroides<sup>5</sup> y entre organofosforados y piretroides,<sup>19</sup> con el aumento de las enzimas desintoxicadoras. El incremento de la actividad de las MFO en las cepas resistentes estudiadas, pudiera estar involucrado en la resistencia detectada en estas cepas frente a compuestos químicos de clases distintas.<sup>5,20</sup>

Al comparar la actividad de las MFO entre los estadios larva y adulto, la actividad en este último es menor en dos de las cepas resistentes estudiadas (SAN-F14 y SAN-F15). El proceso de selección con insecticidas al que se han sometido las cepas en estudio ha sido en el estado larva, por lo que es en este estadio donde el insecto requiere de más protección contra los xenobióticos. La variación en la actividad de las MFO de un estadio a otro pudiera estar relacionada con que a pesar de que las enzimas desintoxicadoras son expresadas de forma constitutiva, la regulación de su región promotora permite que los insectos respondan a las variaciones de factores ambientales.<sup>21</sup>

En estudios realizados en larvas de la cepa SAN-F14, utilizando la técnica de microarreglos, se encontró que de los genes sobrerregulados, alrededor de 13 % se correspondió con las MFO.<sup>22</sup> La sobreexpresión de las MFO y el incremento de su actividad enzimática en cepas resistentes a varios insecticidas, valida la necesidad de la obtención de un método para la detección de estas enzimas desintoxicadoras en poblaciones de *Ae. aegypti* cubanas, objetivo que se cumplió en el trabajo.

Con respecto a la frecuencia fenotípica de aparición de la alta actividad de las MFO, en las cepas estudiadas se encontró que los valores difieren de los encontrados en poblaciones de *Ae. aegypti* capturadas en sitios de intensa aplicación de insecticidas (temefos y piretroides), aunque el intervalo de valores es similar.<sup>15,16</sup> Este resultado pudiera relacionarse con varios factores. En la literatura no existe un consenso en



cuanto al valor de corte que se utiliza para discriminar entre individuos resistentes y susceptibles. Existen autores que utilizan la media de la actividad específica de la cepa susceptible más una, dos, o tres desviaciones estándar. En el trabajo se utilizó la última opción y entonces pudiera ser relativo a esta variación, que se obtienen valores de frecuencia del fenotipo resistente diferentes y en ocasiones menores que los encontrados en otros estudios. Por otra parte, los sustratos que actualmente están disponibles solo permiten detectar un conjunto de las numerosas enzimas que median la desintoxicación de los plaguicidas en los insectos.<sup>23</sup> Se han diseñado nuevos compuestos para la detección de estas proteínas,<sup>18</sup> sin embargo al igual que el método convencional, solo detectan una población de las MFO. Existen múltiples estudios que demuestran que la actividad monooxigenasa está elevada en mosquitos resistentes, frecuentemente en combinación con otras enzimas.<sup>15</sup> Esto justificaría entonces que en los insectos la acción combinada de las MFO, EST y GTS quizá es más efectiva que el incremento de una familia de enzimas en particular.

La técnica adaptada para la detección de la actividad de las MFO constituye otra herramienta para la detección de la resistencia metabólica en Cuba.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Report of the Scientific Working Group on dengue. Document WHO/TDR/SWG/08 Geneva, Switzerland, WHO; 2006.
2. van den Berg H, Zaim M, Yadav RS, Soares A, Ameneshewa B, Mnzava A, et al. Global trends in the use of insecticides to control vector-borne diseases. *Environ Health perspect.* 2012;120(4):577-82.
3. 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(1):113-23.
4. Rodríguez M, Bisset J, Díaz C, Soca A. Adaptación de los métodos en placas de microtitulación para la cuantificación de la actividad de estererasas y glutation-s-transferasas en *Aedes aegypti*. *Rev Cubana Med Trop.* 2001;53:32-6.
5. 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(4):437-45.
6. Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. *J Am Mosq Control Assoc.* 2007;23: 420-9.
7. Bisset J, Rodríguez M, Moya M, Ricardo R, Montada D, Gato R, et al. Efectividad de formulaciones de insecticidas para el control de adultos de *Aedes aegypti* en La Habana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2011;63:166-70.
8. Brogdon WG, McAllister JC, Vulule J. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *J Am Mosq Control Assoc.* 1997;13(3):233-7.

9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem.* 1976;72:248-54.
10. Feyereisen R. Evolution of insect P450. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(6):1252-5.
11. Urmila J, Vijayan VA, Ganesh KN, Gopalan N, Prakash S. Deltamethrin tolerance and associated cross resistance in *Aedes aegypti* from Mysore. *Indian J Med Res.* 2001;113:103-7.
12. Penilla RP, Rodriguez AD, Hemingway J, Torres JL, Arredondo-Jimenez JI, Rodriguez MH. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in Mexico. *Med Vet Entomol.* 1998;12(3):217-33.
13. Pethuan S, Jirakanjanakit N, Saengtharatip S, Chareonviriyaphap T, Kaewpa D, Rongnoparut P. Biochemical studies of insecticide resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand Trop Biomed. 2007;24(1):7-15.
14. Bisset JA, Marín R, Rodríguez MM, Severson DW, Ricardo Y, French L, et al. Insecticide resistance in two *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains from Costa Rica. *J Med Entomol.* 2013;50(2):352-61.
15. Polson KA, Brogdon WG, Rawlins SC, Chadee DD. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Trop.* 2010;117(1):31-8.
16. Flores AE, Grajales JS, Salas IF, Garcia GP, Becerra MH, 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;22:672-7.
17. Zhao L, Pridgeon JW, Becnel JJ, Clark GG, Linthicum KJ. Cytochrome c gene and protein expression: developmental regulation, environmental response, and pesticide sensitivity in *Aedes aegypti*. *J Med Entomol.* 2008;45(3):401-8.
18. Stevenson BJ, Pignatelli P, Nikou D, Paine MJ. Pinpointing P450s associated with pyrethroid metabolism in the dengue vector, *Aedes aegypti*: developing new tools to combat insecticide resistance. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(3):e1595.
19. Martins AJ, Lins RA, Linss JGB, Peixoto AA, Valle D. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(1):108-15.
20. Rodríguez MM, Bisset J, 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.
21. Liu N, Li T, Reid WR, Yang T, Zhang L. Multiple Cytochrome P450 genes: their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes *Culex quinquefasciatus*. *PLoS One.* 2011;6(8):e23403.
22. Bariami V, Jones CM, Poupardin R, Vontas J, Ranson H. Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: Unraveling the molecular basis of pyrethroid

resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(6):e1692.

23. Montella IR, Schama R, Valle D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107(4):437-49.

Recibido: 7 de marzo de 2013.

Aprobado: 3 de junio de 2013.

*Leidys French Pacheco*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km. 6 <sup>1</sup>/<sub>2</sub>. AP 601. Marianao 13. La Habana, Cuba. Correo electrónico: french@ipk.sld.cu