

USO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS COMO INDICADORES DE
RESISTENCIA A PIRETROIDES EN *Anopheles albimanus*

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica

USO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS COMO INDICADORES DE
RESISTENCIA A PIRETROIDES EN *Anopheles albimanus*



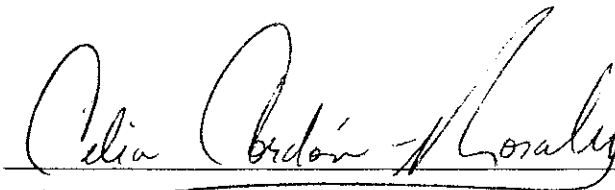
AURA NOEMI LOPEZ VILLANUEVA

Trabajo de graduación presentado para optar
al grado académico de Licenciada en Bioquímica

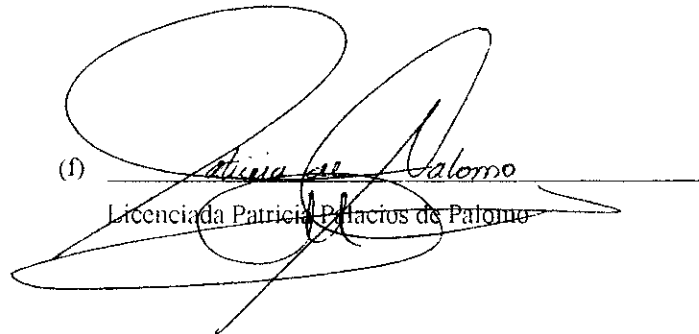
Guatemala

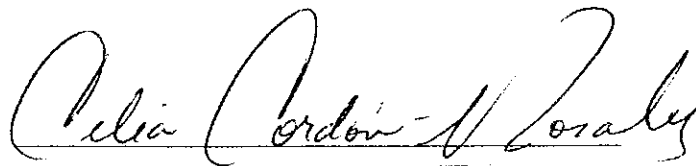
1997

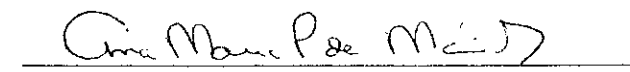
Vo. Bo. :

(f) 
Licenciada Celia Cerdón de Rosales
Asesora

Tribunal:

(f) 
Licenciada Patricia Palacios de Palomo

(f) 
Licenciada Celia Cerdón de Rosales

(f) 
Licenciada Ana María de Mérida

Fecha de aprobación: 15 de Octubre de 1997.

A mis papás.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	5
III. ANTECEDENTES	7
A. <i>Anopheles albimanus</i>	7
1. Descripción	7
2. Importancia del mosquito como vector de malaria y su control	9
B. Ciclo de <i>Plasmodium</i>	10
1. Esporozoito	10
2. Fase exoeritrocítica	12
3. Etapa eritrocítica	12
4. Gametocitos	13
5. Desarrollo en el mosquito	13
6. Papel del hospedero	14
C. Insecticidas	15
1. Clasificación según OMS	15

	Página
2. Clasificación de algunos piretroides	17
3. Penetración y distribución de insecticidas	18
4. Piretroides	19
D. Resistencia a insecticidas en <i>Anopheles albimanus</i>	22
1. Mecanismos de acción en la resistencia a insecticidas	23
a. Principales mecanismos de detoxificación metabólica de piretroides y otros insecticidas	26
a. Oxidasas de función mixta	27
i. Citocromo P450 b	30
ii. NADPH Citocromo C reductasa	31
b. Peroxidasas	33
E. Métodos de determinación de resistencia a insecticidas	34
1. Electroforesis	35
2. Pruebas inmunoquímicas	35
3. Técnicas moleculares	35
4. Actividad enzimática asociada con resistencia a insecticidas	36
IV. JUSTIFICACIÓN	41
V. METODOLOGÍA	43

	Página
A. Materiales	43
1. Poblaciones de <i>Anopheles albimanus</i>	43
2. Aparatos	43
3. Cristalería, recipientes y otros	44
4. Reactivos	44
a. Ensayo de peroxidasas	44
b. Ensayo de NADPH-citocromo c reductasa	45
B. Diseño experimental	45
VI. RESULTADOS	51
VII. DISCUSIÓN	85
VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	93
IX. LITERATURA CITADA	95

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página.
3.1 Clasificación de los insecticidas de acuerdo a su toxicidad	16
3.2 Tipos de plaguicidas de acuerdo su estructura química	16
3.3 Clasificación de algunos piretroides de acuerdo a la OMS	17
3.4 Mecanismos de resistencia a insecticidas	23
6.5 Susceptibilidad de las poblaciones de <i>A. Albimanus</i> de acuerdo con los resultados en los bioensayos estandarizados de la OMS en mosquitos adultos para permetrina, deltametrina y fenitrotión	55
6.6 Dilución del extracto en cepas del insectario	56
6.7 Ampliación del rango de tiempo para la obtención de datos usados en el cálculo de actividad de NADPH citocromo c reductasa. Cinética enzimática dual.	57
6.8 Actividad enzimática de NADPH citocromo c reductasa con la adición del doble de volumen de muestra y rango de tiempo ampliado	58
6.9 Actividad de la NADPH citocromo c reductasa con el doble de volumen de muestra, rango de tiempo prolongado y concentración aumentada de citocromo c	59
6.10 Promedio de actividad enzimática encontrada en los mosquitos de las poblaciones de <i>Anopheles albimanus</i> analizadas	60
6.11 Promedio de actividad enzimática encontrada en los mosquitos de las poblaciones de <i>Anopheles albimanus</i> analizadas	61
6.12 Datos asociados con resistencia a permetrina	63
6.13 Datos asociados con resistencia a deltametrina	63

6.14 Datos asociados con resistencia a fenitrotión

64

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página.
6.1 Actividad enzimática de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa por mosquito en <i>Anopheles albimanus</i> de la población Semillero (A)	65
6.2 Actividad enzimática de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa por mosquito en <i>Anopheles albimanus</i> de la población Semillero (B)	66
6.3 Actividad enzimática de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa por mosquito en <i>Anopheles albimanus</i> de la población Puente Blanco (A)	67
6.4 Actividad enzimática de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa por mosquito en <i>Anopheles albimanus</i> de la población Nahuá Amates	68
6.5 Actividad enzimática de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa por mosquito en <i>Anopheles albimanus</i> de la población Puente Blanco (B)	69
6.6 Distribución de frecuencias de actividad de peroxidasas en las poblaciones con diferente resistencia a permetrina	70
6.7 Distribución de frecuencias de actividad de peroxidasas en las poblaciones con diferente resistencia a deltametrina	71
6.8 Distribución de frecuencias de actividad de peroxidasas en las poblaciones con diferente resistencia a fenitrotión	72
6.9 Distribución de frecuencias de actividad de NADPH citocromo c reductasa en las poblaciones con diferente resistencia a permetrina	73
6.10 Distribución de frecuencias de actividad de NADPH citocromo c reductasa en las poblaciones con diferente resistencia a deltametrina	74
6.11 Distribución de frecuencias de actividad de NADPH citocromo c reductasa en las poblaciones con diferente resistencia a fenitrotión	75

Gráfica	Página.
6.12 Actividad de peroxidasas en poblaciones resistentes a permetrina	76
6.13 Actividad de peroxidasas en poblaciones resistentes a deltametrina	76
6.14 Actividad de peroxidasas en poblaciones resistentes a fenitrotión	76
6.15 Actividad de NADPH citocromo c reductasa en poblaciones resistentes a permetrina	77
6.16 Actividad de NADPH citocromo c reductasa en poblaciones resistentes a deltametrina	77
6.17 Actividad de NADPH citocromo c reductasa en poblaciones resistentes a fenitrotión	77
6.18 Asociacion de resistencia a permetrina con actividad de peroxidasas	78
6.19 Asociacion de resistencia a deltametrina con actividad de peroxidasas	79
6.20 Asociacion de resistencia a fenitrotión con actividad de peroxidasas	80
6.21 Asociacion de resistencia a permetrina con actividad de NADPH citocromo c reductasa	81
6.22 Asociacion de resistencia a deltametrina con actividad de NADPH citocromo c reductasa	64
6.23 Asociacion de resistencia a fenitrotión con actividad de NADPH citocromo c reductasa	65

I. INTRODUCCIÓN

Los piretroides son insecticidas que han sido usados ampliamente para el control de plagas. Una de las plagas controladas con este tipo de insecticidas es la de los mosquitos. De especial interés son aquellos que tienen la función de vectores de enfermedades que atacan al hombre. Un ejemplo de éstos es la subfamilia Anophelinae, género *Anopheles*, responsables de la transmisión de la malaria. Las repercusiones de la malaria en países de América Central han sido de importancia social, especialmente si se toma en consideración que en 1993 se reportaron 41,868 casos solamente en Guatemala, 34.4% de los 162,107 reportados para Centro América para esta fecha (WHO, 1996). Es una especie de *Anopheles* la que se reconoce como el vector principal en esta región (Breeland, 1972), y ésta es *Anopheles albimanus*.

La variabilidad de la epidemiología de malaria y los problemas asociados con su control, enfatizan la necesidad de promover el entendimiento de las determinantes epidemiológicas locales. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la investigación para el desarrollo de nuevas herramientas para el control o diagnóstico puede ser dividida en tres categorías: quimioterapia, inmunología y control de vectores. (WHO, 1986 b). En el caso del control vectorial, la evolución de resistencia a los principales insecticidas ha representado uno de los mayores obstáculos. Por consiguiente, la evolución de la resistencia a los insecticidas en diferentes regiones debe vigilarse. El objetivo de establecer un método de vigilancia para la resistencia en los vectores es determinar la posibilidad de ganar y mantener control de la malaria a través de medidas antivectoriales donde el vector muestra un grado de resistencia a un insecticida particular. (WHO, 1986 b).

El rociamiento intradomiciliar con insecticidas residuales ha sido una de las herramientas principales para eliminar la transmisión de la malaria, pero actualmente la selección de mosquitos resistentes a estos compuestos representa un obstáculo. Usualmente la evaluación de resistencia a insecticidas se ha llevado a cabo con bioensayos estandarizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en los que se expone al mosquito a una cantidad determinada de insecticida durante un tiempo conocido, y luego a un ambiente libre del agente tóxico. Esta práctica tiene como consecuencia que la evaluación de varias poblaciones sea larga y laboriosa. Además de estos problemas prácticos, la información que se obtiene de los bioensayos es limitada al insecticida a prueba y no predice la respuesta a otros insecticidas. Las aplicaciones de métodos bioquímicos para detección de resistencia en los vectores prometen más exactitud en la caracterización de los mecanismos de resistencia sin el uso de instrumentación sofisticada.

En el caso de Guatemala es necesario vigilar la resistencia a los compuestos de utilidad en salud pública, debido a su amplio uso en el país para el control de plagas agrícolas. Tal es el caso de los piretroides, en donde este hecho se acentúa por su efecto residual al mantener su efecto más de diez días luego de ser rociados.

Actualmente la resistencia a los piretroides en *An. Albimanus* puede monitorearse a través de los bioensayos. Sin embargo, sería de gran utilidad contar con otros ensayos complementarios basados en métodos bioquímicos que midan la actividad de enzimas que los metabolizan. De las enzimas que se han reportado involucradas en el metabolismo de piretroides en insectos, están la NADPH-citocromo c reductasa, la citocromo P450, las esterasas, las enzimas que forman conjugados como glucurónidos y aquellas que controlan la asociación con ácidos grasos. (Wilkinson, 1976). De todos estos mecanismos que pueden contribuir con la resistencia a piretroides, se ha encontrado que aquellos que tienen más relevancia son los que generan productos de oxidaciones. Por ejemplo estudios efectuados con la mosca doméstica (Casida 1970), *Culex pipiens*, y *Drosophila melanogaster* han revelado que la actividad de

citocromos b₅, P450, y NADPH reductasas (Hodgson, 1970) es significativamente más alta en los grupos resistentes que en los grupos susceptibles a insecticidas (Matsumura, 1985). Es probable que las peroxidasas también estén involucradas en el metabolismo de xenobióticos, pues peroxidasas como cloroperoxidasas y peroxidasas de rábano pueden catalizar reacciones dependientes de peróxido similares a aquellas catalizadas por P450.

Entre los ensayos bioquímicos reportados son de interés para monitorear la resistencia a piretroides el de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa, dada su sencillez y posibilidad de aplicación en condiciones de campo. Debido a que el ensayo en peroxidasas es un método rápido y barato de analizar, su asociación con resistencia a piretroides sería de gran utilidad como método de vigilancia en los programas de control de vectores. Otra enzima que podría ser de gran utilidad para la vigilancia de resistencia a insecticida es la NADPH-citocromo c reductasa, ya que ha sido reportada como uno de los componentes principales de depuración de piretroides. (Hodgson, 1970).

El objetivo de este trabajo es evaluar los sistemas enzimáticos de peroxidasas y NADPH-citocromo c reductasa, como indicadores de resistencia a dos piretroides, permetrina y deltametrina en *Anopheles albimanus*. La finalidad es proponer un ensayo enzimático que coadyuve a monitorear la resistencia a piretroides, permetrina y deltametrina, en los mosquitos vectores de malaria.

II. OBJETIVOS

General:

Determinar si hay asociación entre la actividad de peroxidasas y citocromo c reductasa en poblaciones de *Anopheles albimanus* y la resistencia a deltametrina, fenitrotión y permetrina.

Específicos:

Medir la actividad enzimática de peroxidasas y citocromo c reductasa en homogeneizados de mosquitos correspondientes a cepas *Anopheles albimanus* resistentes y susceptibles a deltametrina, fenitrotión y permetrina.

Sugerir si los métodos ensayados son una herramienta confiable para indicar la resistencia a permetrina, fenitrotión y deltametrina en *Anopheles albimanus*, como marcadores bioquímicos de resistencia.

III. ANTECEDENTES

A. Anopheles albimanus

1. Descripción

Los mosquitos, que son vectores de malaria, pueden ser encontrados en doce zonas de prevalencia de dicha enfermedad. De acuerdo a Russell (1963) estas zonas son: 1. América del Norte; 2. Sureste de México, Las Antillas, norte de Colombia y América Central; 3. América del Sur; 4. Europa del Norte y Asia (excluye la porción del Mediterráneo); 5. Mediterráneo; 6. Desierto, que incluye Arabia y territorio africano; 7. Etiopía (incluye Arabia del sur y Malasia, además del resto de Africa; 8. Indo-Persa; 9. Indochina; 10. Malasia; 11. China; y 12. Australia.

La especie *Anopheles albimanus* es una de las 14 que comprende el género *Anopheles* (PAHO, 1996). Pertenece a la subfamilia Anophelinae y es prevalente en el área que corresponde en el hemisferio oeste, América. (Pratt, 1967). Debido a que Guatemala pertenece a este sector es importante el estudio de esta especie en particular. En Guatemala y en la región centroamericana y del Caribe se ha reconocido como el vector principal de malaria (Breeland, 1972).

El género Anopheles posee varias características en común. La mayoría de los mosquitos

anofelinos tienen alas con puntos blancos. La hembra del anopheles tiene las palpas del largo de la proboscis. Los anofelinos descansan con la cabeza, tórax y abdomen en una línea recta, que forma un ángulo de 40 a 90° con la superficie en la que se encuentra. Los huevos de los anofelinos siempre están en la superficie del agua y se mantienen así por flotadores laterales, en forma individual. La hembra deja sus huevos en grupos de 100 o más. Los huevos eclosionan de 2 a 6 días luego de la ovoposición. Las larvas de estos mosquitos están en diferentes tipos de agua, pero especialmente en cuerpos permanentes de agua fresca y principalmente aquellos que cuenten con plantas acuáticas abundantes que puedan brindarles protección de sus depredadores (Pratt, 1967).

La actividad de las hembras es mayor en la noche, pero tiene sus horas pico recién al anochecer y antes del amanecer. Pasan el día reposando en la oscuridad. La mayoría de los Anopheles requieren sangre humana para producir sus huevos. Su rango de vuelo puede variar de una a varias millas a la redonda (Pratt, 1967).

Anopheles albimanus es considerada una especie de la sección que pobló México y la parte sur de Estados Unidos, pues muestra las características morfológicas ancestrales. Esto concuerda con una distribución geográfica amplia de este vector y con su versatilidad ecológica. Faran creyó que esta especie se diferenció tempranamente de la principal línea evolucionaria del grupo y que probablemente se originó en América Central (PAHO, 1996).

A. albimanus Wiedemann tiene el tarso de las patas traseras con bandas blancas notables y posee el segmento apical de las palpas completamente blanco. (Herms, 1953) A pesar de su amplia distribución geográfica, la morfología de *Anopheles albimanus* es muy uniforme, como se evidencia también en el patrón de sus cromosomas. Dentro de las variaciones más importantes, Faran apunta a la existencia de una banda negra ancha en el segundo tarso de las piernas posteriores colectadas en

el sur de Estados Unidos (Texas), así como se compara a las áreas pálidas de las superficies inferiores del tarso de las piernas anteriores de especímenes colectadas en las antillas (PAHO, 1996).

2. Importancia del mosquito como vector de malaria y su control

Durante la última década, América Central ha sido afectada por problemas económicos y sociales que se han reflejado subsecuentemente en las estadísticas de salud. Esta región geográfica incluye siete países: Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá. De acuerdo a uno de los reportes de la Organización Panamericana de Salud (PAHO, por sus siglas en inglés), a pesar que esta área comprende solamente 5.5% de la población de América Latina, en 1992 se registraron 14.6% de los casos de malaria, un total de más de 120,000. (PAHO, 1996).

El control de mosquitos anofelinos es un componente fundamental de los programas para el control de la malaria. La mayoría de los anofelinos no son particularmente abundantes, y no son considerados normalmente como especies de plagas o pestes. Cuando Grassi y sus colegas italianos demostrados que los mosquitos anofelinos eran los vectores de la malaria a los humanos, (Harrison, 1978) el concepto de control de malaria se hizo sinónimo de control del mosquito (Beaty, 1996). A pesar del control de malaria que se logró durante las décadas de los 1940-60 con base en insecticidas residuales dirigidos para impactar a los mosquitos vectores, el control de malaria a nivel mundial se ha deteriorado debido a varias razones. Estas razones han sido el resurgimiento de la malaria en lugares donde era controlada, la resistencia a insecticidas y la escasez de fondos disponibles para estos programas.

A pesar que los programas para el control de anofelinos ya no es tan organizado ni integrado, el rociamiento de las casas sigue siendo practicado y en muchas ocasiones exitosamente (Beatty, 1996). Actualmente en Guatemala se practica este método para el control de malaria. Es importante notar que para varias especies de vectores las principales vías de control son la aplicación de insecticidas, el saneamiento ambiental y la educación en salud. Los insecticidas en spray residuales son aún los métodos ampliamente usados para el control de vectores en los programas antimaláricos. (WHO, 1984).

B. Ciclo de *Plasmodium*

El ciclo de vida de todas las especies de parásitos maláricos es muy similar, por lo que los principios aprendidos sobre una especie pueden ser aplicados a otra, tomando en cuenta la variación producida por factores intrínsecos y extrínsecos. La figura 1 presenta el ciclo de vida del plasmodio.

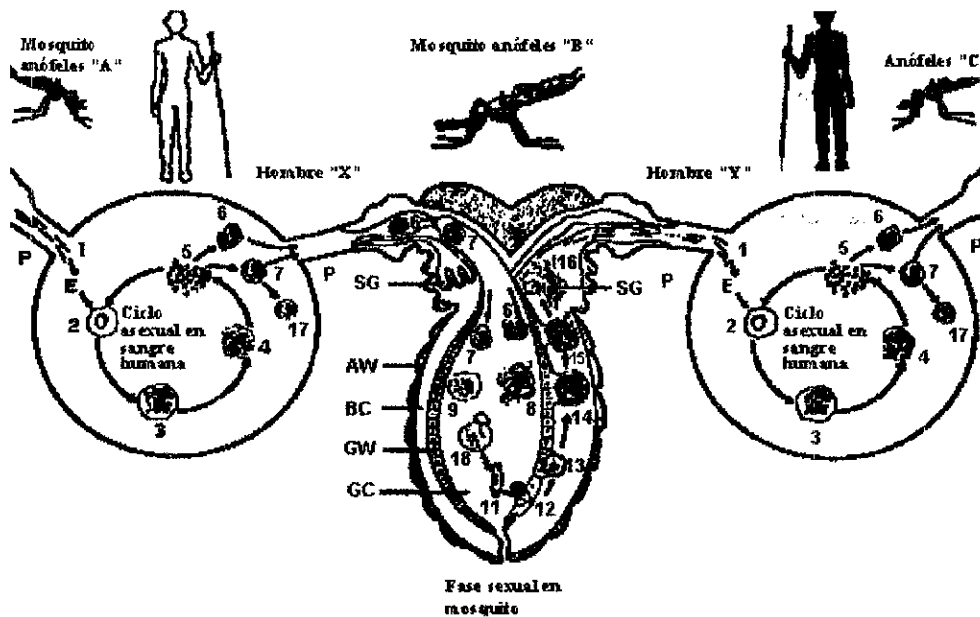
1. Esporozoito

Esta es la fase infectiva del parásito. Estos cuerpos son muy alargados, fusiformes con uno o varias masas de cromatina cerca del centro. Esto es casi todo lo que puede verse con un microscopio de luz, pero vista en un microscopio electrónico, la estructura se ve más compleja. Las funciones de varios organelos aún permanecen desconocidas, pero se ha sugerido que los organelos en pares (PO por sus siglas en inglés) y la copa (C) puede ayudar en la penetración de la célula. Los organelos encargados de la locomoción pueden estar a cargo de las fibrillas periféricas. Cuando un mosquito se alimenta, el esporozoito, que principalmente se encuentra en las

glándulas salivares, se introduce en el cuerpo con la secreción salivar. Debido a que el mosquito usualmente prueba con su proboscis hasta que encuentra un pequeño capilar, el esporozoito se introduce directamente en la corriente sanguínea y se dispersa rápidamente. También es posible que sea inyectado en el sistema linfático (Russel, 1963).

Figura 1

Ciclo de vida del *Plasmodium* (Russel, 1963)



La cadena de transmisión de malaria se muestra en la fig. 1. Un mosquito *Anopheles* infeccioso "A" infecta a un hombre "X", que se convierte en transportador de gametocitos; él infecta a un mosquito *Anopheles* "B", que inocula al hombre "Y". La sangre del último convierte al mosquito "C" en infeccioso. P, proboscis del mosquito; SG glándulas salivares; AW pared abdominal; BC cavidad corporal; GW pared estomacal; GC cavidad abdominal (las mayúsculas corresponden a las siglas en inglés. 1, esporozoitos, E, fases exoeritrocíticas; 2, trofozoito en la fase de anillo; 3, esquizonte; 4, segmentado; 5, merozoitos; 6, macho o microgametocito; 7, hembra o macrogametocito; 8, microgametocito exflagelando; 9, macrogametocito maduro; 10, flagelo o microgameto penetrando al macrogameto; 11, oocineto; 12, 13, 14 oocistos en fase de desarrollo; 15 oocisto estallando y liberando esporozoitos; 16, esporozoito en glándula salival y en el ducto salivar; 17 gametocito que, a menos que deje la corriente sanguínea no se desarrolla luego.

2. Fase exoeritrocítica

Etapa exoeritrocítica es aquella en la que el parásito vive en células distintas de los eritrocitos cuando está en el huésped vertebrado. Esta fase ocurre en el sistema retículo endotelial, los pulmones y en las células endoteliales del cerebro. En el caso de la malaria humana hay parásitos en las células parenquimáticas del hígado. En casos severos de malaria de aves (especialmente en una raza particular de pollos "avian"), pueden encontrarse en casi cualquier parte del cuerpo, y son especialmente observadas en el hígado, bazo y médula espinal. En esta fase los plasmodios carecen de pigmento puesto que la hematina tan característica de la malaria, solamente puede formarse de la hemoglobina (Russel, 1963).

Pueden surgir plasmodios en fase exoeritrocítica de distinta proveniencia. Si vienen directamente de esporozoitos se les llama criptozoitos, si se originan de generaciones subsecuentes antes de la parasitemia, se les conoce como metacriptozoitos y las que aparecen luego de la infección a los eritrocitos se conocen como fanerozoitos (Russel, 1963).

3. Etapa eritrocítica

El ciclo del parásito en la sangre inicia con el apareamiento de una forma extremadamente pequeña en los glóbulos rojos. Esto consiste de masas de cromatina amorfas y un pequeño citoplasma que generalmente asuma una forma de anillo o trofozoito (Ver fig. 1, fase 2). Esta forma pertenece a la fase asexual. Las formas jóvenes en crecimiento, y en el caso de *P. vivax* exhiben una forma muy aproximada a la actividad ameboide. Pero eventualmente el parásito tiende a circular y se convierte menos activa (esquizonte). Las preparaciones coloreadas muestran que a esta etapa la cromatina comienza a dividirse, y este proceso continúa hasta que el número de masas de cromatina características de las formas maduras y

exhiben una forma muy aproximada a la actividad ameboide. Pero eventualmente el parásito tiende a circular y se convierte menos activa (esquizonte). Las preparaciones coloreadas muestran que a esta etapa la cromatina comienza a dividirse, y este proceso continúa hasta que el número de masas de cromatina características de las formas maduras y reproducibles es alcanzada (esquizogonia o segmentación) (Russel, 1963).

4. Gametocitos

No todos los merozoitos que logran entrar a los eritrocitos proceden a otro ciclo de esquizogonia. Algunos se desarrollan en los eritrocitos hacia una forma sexual: los gametocitos. Los gametocitos de sexo masculino son llamados microgametocitos, los de sexo femenino son llamados macromegatocitos. Los merozoitos que se convertirán en gametocitos son indistinguibles de aquellos que se reproducen de forma ordinaria. Estas formas sexuales aparecen en cualquier etapa de la infección y están determinadas genéticamente a convertirse en ellas. Aquí el ambiente no parece ser factor determinante, pues en eritrocitos que han sido infectados por distintos merozoitos se ha observado la formación de trofozoitos y gametocitos (Russel, 1963). Los gametocitos sólo son capaces de completar su desarrollo en el hospedero invertebrado, y no se conoce qué papel tiene en la enfermedad del vertebrado (Russell, 1963).

5. Desarrollo en el mosquito

Los microgametocitos inmaduros tomados por el mosquito se desarrollan rápidamente. El proceso de exflagelación toma aproximadamente 15 minutos, y ya en esta etapa están listos para la fecundación. Los cambios que ocurren en la célula macho incluyen el abandono del eritrocito hospedero, la expulsión de aproximadamente 8 microgametos, y búsqueda de gametocito hembra. La maduración del macrogameto es necesaria para la fecundación. Durante este proceso no ocurre meiosis en los gametos.

En la fecundación ocurren varios procesos. Inicia con la unión del macrogameto y el microgameto en el intestino del mosquito. Luego se forma el ooquinetto o vermículo y penetra la mucosa del intestino medio del mosquito. En el interior de las células epiteliales exteriores del intestino medio se forma el ooquiste, este sufre meiosis 47-79 horas, luego de la unión de los gametos. El ooquiste madura en un período de 10 días a 3 semanas y llegan a alcanzar un tamaño de 50-60 micras. La cromatina del ooquiste maduro se divide varias veces y cada conglomerado se reviste de una cubierta de citoplasma. Se produce un gran número de esporozoitos y son liberados cuando estalla el ooquiste dentro de la cavidad corpórea del mosquito. Los esporozoitos viajan a las glándulas salivales y se colocan en los conductos o en el interior de las células. En varias ocasiones aparecen 2 ó 3 acumulaciones de cromatina, que pueden representar un intento precoz de reproducirse, ya que normalmente se dividen luego de entrar a la célula huésped al picar el mosquito, a otro vertebrado (Russell, 1963).

6. Papel del hospedero.

Como ya se indicó en la Figura 1 y en párrafos anteriores, el papel del hospedero invertebrado es dar lugar a la reproducción sexual del *Plasmodium* y fungir como vector de dicho protozoario. El hospedero vertebrado en cambio tiene como función dar lugar al ciclo asexual del plasmodio y servir como reservorio del patógeno mientras infecta a otro vector al ser picado (Russel, 1963).

Se tienen por lo tanto dos caminos para eliminar la malaria: el uso de medicamentos en el hospedero vertebrado de interés (en nuestro caso, el hombre) para terminar con el reservorio de los plasmodios, y el uso de insecticidas para eliminar el factor propagador de la enfermedad. (Russel, 1963).

C. Insecticidas

El uso de insecticidas se ha practicado desde hace varias décadas para el control de plagas. Las plagas que frecuentemente han sido objeto de control, son en su mayoría las que atacan a la agricultura. Sin embargo, otra gran aplicación radica en el control de aquellos insectos que sirven como vectores de enfermedades humanas tales como la malaria, oncocercosis, dengue y chagas.

Debido a que cada insecticida tiene distintas propiedades como el mecanismo de aniquilación y su estructura, así como distintas presentaciones en el mercado, se ha hecho necesaria una clasificación de estos compuestos.

1. Clasificación según OMS

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, los insecticidas se clasifican de acuerdo a su toxicidad y su su presentación en el mercado. Se define el LD₅₀ como la cantidad de insecticida en mg/Kg que al ser administrado a un número de animales (usualmente ratas), mata al 50% de la población de los animales que están siendo evaluados. La LD₅₀ es normalmente expresada como la cantidad administrada oralmente a los animales de prueba, sin embargo cuando se refiere a la dosis administrada en la dermis, debe ser especificado. De acuerdo a la LD₅₀ de los plaguicidas, se encuentra la clasificación presentada en el cuadro 1. En la clasificación se especifican los siguientes aspectos: estatus del insecticida, uso principal, tipo de estructura química, estado físico del plaguicida, ruta usada para determinar la toxicidad y LD₅₀.

Cuadro 1

Clasificación de los insecticidas de acuerdo a su toxicidad

Clasificación	LD ₅₀ (mg/Kg)			
	aplicación oral ¹		aplicación dermal ¹	
	liquido	sólido	liquido	sólido
Extremadamente tóxico	≤ 5	≤20	≤10	≤40
Muy tóxico	5-50	20-200	10-100	40-400
Moderadamente tóxico	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
Ligeramente tóxico	>500	>2000	>1000	>4000

(WHO, 1978)

¹: Refiere a su aplicación en ratas.

De los tipos de estructura química que se consideran en la clasificación se tienen los siguientes

Cuadro 2

Tipos de plaguicidas de acuerdo a su estructura química

Tipo de plaguicida de acuerdo a su estructura química	Abreviatura ¹
Carbamato	C
Derivados del cloronitrofenol	CNP
Compuestos organoclorados	OC
Compuestos organomercurosos	OM
Compuestos organofosforados	OP
Compuestos organotínicos	OT
Derivados piridílicos	P
Derivados del ácido fenoxiacético	PA
Piretroides	PY
Derivados de la tiacina	T
Tiocarbamatos	TC

¹: Por sus siglas en inglés

(WHO, 1978)

2. Clasificación de algunos piretroides

Solamente se describirán los de interés para este trabajo.

Cuadro 3

Clasificación de algunos piretroides de acuerdo a la OMS

Plaguicida	Estatus	Uso principal	Tipo de químico	Estado físico	Ruta	LD ₅₀ (mg/Kg)
Permetrina	ISO	I	PY	L	O	c500
Deltametrina	ISO	I	PY	S	O	c135

(WHO, 1988)

La sigla I refiere a insecticida, L, líquido; S, sólido; O, oral. En la especificación de LD₅₀, la letra "c" indica variabilidad de toxicidad del insecticida respecto de sus estereoisómeros y el vehículo de aplicación del insecticida. En este caso no se refiere a un medio de aplicación acuoso sino oleoso, aceite de maíz. (WHO, 1978)

La estructura de la permetrina corresponde a la siguiente nomenclatura, según Unión Internacional de Químicos Puros y Aplicados (UIQPA): Fenoxibencil (1RS)-cis,trans,3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano-carboxilato, permetrina. Por otra parte la estructura de la deltametrina corresponde [1R-[1α (S*), 3α]]-ciano (3-fenoxifenil)metil 3-2,2 dibromoetenil)-2,2-dimetilciclopropan-carboxilato de deltametrina (Kidd, 1988)

3. Penetración y distribución de insecticidas

Los insecticidas pueden penetrar las células por difusión pasiva o facilitada, o transporte activo. La penetración del plaguicida a través del integumento es de gran importancia, porque es posible que esté influenciada por la acción selectiva de insecticidas entre insectos y mamíferos (Wilkinson, 1976). Luego que se ha pasado la barrera integumental, el insecticida puede pasar la hemolinfa y ser transportado a todas las partes del cuerpo en solución, o ser asociado a proteínas o disolverse en partículas lipídicas. (Zerba, 1988).

Existen dos teorías acerca de cómo el insecticida penetra la cutícula del insecto. La más popular es que los compuestos no electrolitos penetran la cera y los poros de los canales, o por vía de las membranas intersegmentales y son luego translocadas por la hemolinfa. La otra teoría dice que un insecticida aplicado tópicamente se difunde lateralmente en el integumento a las traqueolas y luego entra el órgano buscado. Pero probablemente el modo de entrada es más complejo que difusión lateral o simple transporte en la hemolinfa. La penetración cuticular de los piretroides puede ocurrir por vía los canales de cera que forma una red entre la cutícula o a través de las regiones cuticulares no esclerotizadas (Zerba, 1988).

Las propiedades fisicoquímicas del insecticida y su formulación juegan un papel importante en la velocidad de penetración a través del integumento. La polaridad del insecticida es conocida como algo particularmente importante, y resultados prácticos y modelos teóricos sugieren una dependencia parabólica de la velocidad de penetración con la polaridad del insecticida. La naturaleza del solvente del insecticida también es importante, y la actividad del mismo es particular con diferentes solventes (Zerba, 1988).

4. Piretroides

Estos compuestos son derivados de las piretrinas, insecticidas extraídos de productos naturales. Las piretrinas, a pesar de haber sido los primeros insecticidas usados para el control de los anofelinos adultos (Beaty, 1996), eran demasiado lábiles y poco persistentes. La obtención de derivados de piretrinas dieron lugar a los piretroides. Los compuestos eran atractivos porque mostraban persistencia en el ambiente y tenían una actividad de aniquilación rápida (Beaty, 1996).

Los piretroides han tenido una evolución interesante, y es por ello que se les ha dividido en cuatro generaciones. La primera generación incluye a la aletrina (1949). En la segunda generación se obtuvo a la tetrametrina, (1965) y siguió la aparición de resmetrina (1967), bioresmetrina (1967), bioaletrina y finalmente fonotrina (1973). En los años 1972-73 surgió la tercera generación, que dio lugar al fenvalerato y a la permetrina. Los piretroides de la 3a. generación lograron una efectividad de 0.1 lb *ai*/A (ingrediente activo/area). Por último la cuarta generación alcanzó una efectividad de un rango de 0.01-0.05 lb *ai*/A y está formada por bifentina, lambda-cialotrina, cipermetrina, ciflutrina, deltametrina, esfenvalerato, fenpropatrina, flucitrinato, fluvalinato, praletrina y tralometrina. Todos estos son fotoestables a la luz solar y tienen una efectividad residual de hasta 10 días (Ware, 1994).

Algunas de las características de los piretroides son compartidas con las del DDT. Tienen un coeficiente de temperatura negativo (es decir que su actividad aumenta al disminuir la temperatura), y su actividad de aniquilación y el efecto de caída resulta de la acción en contra de los canales de sodio del sistema nerviosos periférico y central. (Zerba, 1988). De acuerdo a Zerba

(1988) es probable que ambos insecticidas impidan los cambios de conformación de las proteínas en la interfase lípido-proteína, aunque según Yamamoto el mecanismo de acción de ambos difiere (Yamamoto, 1970). La diferencia que indica es que el DDT inhibe la inactivación de los canales de sodio, mientras que la aletrina (un piretroide) bloquea la conductancia de sodio y potasio en las membranas nerviosas (Yamamoto, 1970). Beeman por su parte no hace mención de esta diferencia y afirma que los piretroides y el DDT retardan el cierre de los canales de sodio en los axones y por lo tanto, se opone a la repolarización de la membrana. (Beeman, 1982).

Miller (1988) indica que los piretroides actúan a nivel molecular con canales de sodio, de potasio y con algunas ATPasas. También se ha encontrado que estas sustancias afectan la actividad de canales de iones cloruro mediados por GABA (ácido gama aminobutírico, por sus siglas en inglés). Este autor también concuerda con que el principal sitio de acción de los piretroides son los canales de sodio y agrega que “no se sabe exactamente el efecto del piretroide, pero aumenta la permeabilidad a sodio durante un período prolongado y este efecto está correlacionado con lesiones funcionales”. (Miller, 1988) Adicional a esto, Beeman (1982) también menciona la acción de los piretroides como inhibidores de una ATPasa dependiente de Ca^{+2} y Mg^{+2} . Particularmente, la permetrina, cipermetrina y decametrina inhiben una ATPasa dependiente de Ca^{+2} , que lleva a una condición de una disponibilidad reducida del ion Ca^{+2} necesario para la unión con sitios específicos involucrados en la estabilización de membrana.

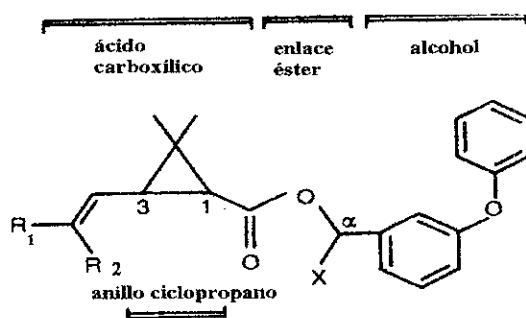
El resultado de las lesiones funcionales en el insecto incluyen estimulación repetitiva de neuronas, bloqueo de la conducción del impulso o en la transmisión neuromuscular, y depolarización espontánea del potencial de descanso. Las neuronas sensoriales, células neurosecretoras y terminaciones nerviosas son particularmente sensitivas a estos efectos. La

actividad letal del piretroide parece involucrar acción tanto en el sistema nervioso periférico como central, mientras que el efecto de caída es probablemente producido por intoxicación periférica (Zerba, 1988)

La actividad insecticida de los piretroides depende de la estereoquímica de sus moléculas. Todos los piretroides son ésteres de ácidos carboxílicos y generalmente no tienen más de tres centros quirales, localizados en el carbono 1 y 3 del anillo de ciclopropano, y el carbono α . Por lo tanto, es posible obtener varios isómeros, dependiendo de la configuración alrededor de los centros quirales, y no todos los isómeros de un compuesto tienen la misma actividad. La estructura puede verse en la figura 2.

Figura 2

Estructura general de los piretroides



(Zerba, 1988)

Nota: Para la permetrina R₁ y R₂ corresponden a -Cl y X a un átomo de H. La deltametrina tiene como sustitutos de R₁ y R₂ a -Br y a X a un grupo cianuro (-CN).

Los piretroides son usados para el control de anofelinos como larvicidas, en spray frío (niebla), y con aplicaciones como aerosol residual (WHO,1984).

D. Resistencia a insecticidas en *Anopheles albimanus*

Como ya se mencionó en la sección B.6, uno de los mecanismos para eliminar la malaria consiste en controlar con el vector del *Plasmodium*. El hecho de que los anofelinos presenten resistencia a insecticidas implica un obstáculo para el control de dicha enfermedad. De hecho se cree que el impacto de la resistencia a DDT en *An. albimanus* continúa siendo el problema operacional técnico más serio en América Central (WHO, 1986a).

En 1986 se publicó que al menos 57 especies de *Anopheles* han sido reportadas como resistentes a un insecticida o más (WHO, 1986b). Sigue siendo motivo de discusión el hecho de que la aplicación de insecticidas tiene un impacto epidemiológico útil pero su uso persistente puede convertirse en un desperdicio del insecticida. Estos obstáculos han hecho necesaria la investigación de los procesos metabólicos involucrados en la resistencia a insecticidas y en aquellos compuestos que pueden potenciar la actividad de los insecticidas.

Se ha reportado el problema de resistencia a piretroides, organoclorados, organofosforados y carbamatos en varios vectores de malaria: *An. albimanus*, *An. culicifacies*, *An. pseudopunctipennis*, *An. sacharovi* y *An. stephensi*. Este fenómeno está asociado con el uso intensivo de estos insecticidas en agricultura. En Guatemala se ha reportado resistencia de *An. albimanus* a DDT, propoxur (WHO, 1986a) fenitrotión y deltametrina (Brogdon, 1992).

El conocimiento de los mecanismos de resistencia tiene dos importantes aplicaciones: permite el uso de sinergistas (potenciadores), como inhibidores de las enzimas que depuran dichos

compuestos (Casida, 1970; Hodgson, 1970) y da lugar a la aplicación de ensayos bioquímicos para el monitoreo de resistencia en poblaciones expuestas a rociamientos de insecticida constante (WHO, 1986a).

La investigación en la bioquímica y genética de la resistencia a insecticidas continúa siendo reorganizada como un componente vital de los esfuerzos para elucidar el origen y la dinámica de la resistencia a insecticidas (WHO, 1986a).

1. Mecanismos de acción en la resistencia a insecticidas

Existen varios mecanismos de resistencia. Los mecanismos principales se describen en el cuadro 4.

Cuadro 4

Mecanismos de resistencia a insecticidas

Mecanismo de resistencia	Descripción
Por comportamiento	<ul style="list-style-type: none"> El insecto no permanece en contacto con el depósito de insecticida.
Por penetración	<ul style="list-style-type: none"> Hay un cambio en la composición del exoesqueleto que inhibe la penetración del insecticida
Sitio insensible	<ul style="list-style-type: none"> Cambio en la estructura química del sitio de acción del insecticida en su forma activa
Metabólica	<ul style="list-style-type: none"> Modificación de las vías metabólicas que detoxifican el insecticida

(Miller, 1988)

De los mecanismos de resistencia a insecticida que existen, los dos primeros son muy difíciles de estimar y el tercero requiere de equipo neurofisiológico muy sofisticado. Debido a esto, se ha puesto mucho énfasis en los mecanismos de resistencia metabólica (Miller, 1988).

Se han reportado mecanismos de resistencia de *An. albimanus* que pertenecen al área de El Salvador. Para los insecticidas propoxur y malatión la resistencia es ampliamente cruzada y ocurre en el estadio de larva o adulto. Se ha detectado por métodos de bioensayo, ensayo sinérgico, pruebas metabólicas y ensayos enzimáticos. El tipo de cambio que se ha observado es un cambio cualitativo de acetilcolinesterasas. Por otra parte también se ha reportado resistencia a DDT/dieldrín aunque es poca la resistencia cruzada que hay entre los dos. A pesar que la resistencia también ocurre en larva y adulto, esta sólo se reportó con bioensayos como métodos de detección. No se reportó alguna enzima asociada con la resistencia. (WHO, 1986a)

También en Guatemala se hicieron ensayos con respecto de la resistencia en *A. albimanus* con el estudio de Brogdon (1992), con los insecticidas fenitrotion y deltametrina. Se encontró que la resistencia a estos dos compuestos es cruzada y que se debe estererasas no sensibles. Estos resultados fueron apoyados por dos clases de resultados. El análisis cualitativo se basó en electroforesis en poliacrilamida de las isoenzimas de estererasas, y el análisis cuantitativo, que fue una medición densitométrica de las bandas obtenidas con PAGE.

En otra publicación, se registro la resistencia de *A. albimanus* a insecticidas organofosforados. Las poblaciones de mosquitos mostraron resistencia a malation y fenitrotion y esta correlaciono con acetilcolinesterasas no sensitivas a dichos compuestos.(Brogdon, 1992). Se han hecho otros

estudios para determinar en que grado disminuye la correlación de de resistencia a insecticidas determinada con bioensayos, con la medida encontrada en los ensayos de microplaca al cambiar las condiciones del campo al laboratorio. El parámetro a evaluar fue el cambio de temperatura. Estos estudios sugieren que se debe conservar o adaptar la temperatura del campo con la de laboratorio por medio de una incubación previa al ensayo de microplaca (Beach, 1989). Sin embargo, las pruebas bioquímicas no se han recludo a ensayos de laboratorio solamente. En Guatemala se evaluó la resistencia a carbamatos que presenta *A. albimanus* en un estudio de campo, con el método de microplaca para la insensibilidad de acetilcolinesterasas en varias especies de mosquitos. Se encontró que al hacer el analisis de bioensayo no habia diferencia significativa con la resistencia determinada con el metodo de microplaca en la población. (Cordón-Rosales, 1990)

Por otra parte, Matsumura (1985) reportó que los mosquitos *An. albimanus* resistentes a piretroides presentaban reducida la sensibilidad a estos insecticidas a nivel nervioso; estos resultados fueron evaluados con un criterio electrofisiológico. De la resistencia a piretroides en *Anopheles albimanus* ha reportado poco, aunque se ha encontrado resistencia cruzada a deltametrina cuando los mosquitos presentan resistencia a fenitrotión. El mecanismo parece estar asociado con esterases (Brogdon 1990) y de acuerdo con lo reportado con Zerba (Fig 3) esto puede ser posible.

An. Albimanus, el principal vector de malaria en la región de América Central y el Caribe , presenta una situación extremadamente compleja respecto de la resistencia a insecticidas. En Guatemala muchas de las regiones resistentes están localizadas en areas de intensiva producción agrícola, donde el uso de insecticidas es muchas veces intensa y descontrolada. Esto ha causado

que las poblaciones del vector desarrollen resistencia secuencial a organoclorados, organofosfatos y carbamatos. Un surgimiento de resistencia a piretroides, actualmente la última opción para el control químico de vectores, también se ha detectado.

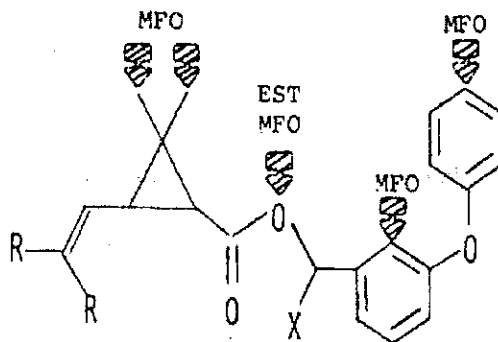
En poblaciones resistentes de *A. albimanus* en Guatemala se han identificado dos mecanismos principales usando ensayos bioquímicos: acetilcolinesterasa insensible (iACHE) y niveles elevados de esterasas no específicas (NSE por sus siglas en inglés). Las iACHE están involucradas en resistencia a carbamatos y organofosforados (Cordón-Rosales, Beach and Brogdon 1990; Brogdon et al. 1992). Los datos del campo y estudios de laboratorio con cepas colonizadas de *An. Albimanus* de Guatemala, soportan la existencia de resistencia cruzada entre fenitrotión y deltametrina (organofosforado y piretroide) basada en niveles altos de NSE (Beach, Cordón-Rosales & Brogdon, 1989; Brogdon & Barber 1990; Cordón-Rosales datos no publicados). Existe evidencia preliminar que identifica dos mecanismos adicionales de resistencia: oxidasas elevadas y resistencia de caída en el mosquito.

2. Principales mecanismos de detoxificación metabólica de piretroides y otros insecticidas

Los tres metabolitos principales de piretroides, producto de la depuración de sistemas enzimáticos, son aquellos en que el enlace éster permanece intacto, y metabolitos de los grupos carboxilo y alcohol que resultan del rompimiento del grupo éster. Las esterasas (EST) y las oxidasas de función mixta (MFO por sus siglas en inglés) son las principales enzimas involucradas en el metabolismo de los piretroides, y sus sitios de acción se muestra en la figura 3.

Figura 3

Sitios de modificación enzimática en piretroides



(Zerba, 1988)

La actividad de esterases en piretroides se ha encontrado en el cuerpo graso y cordón nervioso central de las cucarachas. No se encuentra en la hemolinfa y solamente presenta actividad con los isómeros *trans* de los piretroides, no con los isómeros *cis*. En el caso de estos insectos se ha sugerido utilizar profenfos como sinergista, ya que es un inhibidor que se conoce de estas enzimas y se ha reportado también para mosquitos. (Zerba, 1988)

Los insectos tienen varias rutas enzimáticas para metabolizar y detoxificar piretroides, principalmente por degradación oxidativa e hidrolítica (Zerba, 1988). En la mosca doméstica se ha indicado la importancia del sistema de oxidasas de función mixta, de dos citocromos: b_5 , P450 (especialmente el último), dos flavoproteínas y dos nucleótidos piridínicos en su forma reducida, en primer lugar NADPH (Terriere, 1974) y en segundo NADH (Casida, 1970;)).

a. Oxidasas de función mixta

Las oxidasas de función mixta son enzimas que pertenecen al grupo de las oxidorreductasas, y

al subgrupo que actúa en donadores simples con incorporación de oxígeno molecular (Grupo 1.13). Un esquema simple de la división de este grupo de enzimas es el siguiente: enzimas con incorporación de dos átomos de oxígeno (1.13.11); enzimas con incorporación de un átomo de oxígeno, *monooxigenasas* internas u *oxidasas internas de función mixta* (1.13.12); y aquellas que no poseen donador conocido en los sistemas biológicos (1.13.99). En el subgrupo 1.13.12 un átomo simple del oxígeno molecular es incorporado al sustrato y simultáneamente formada una molécula de agua. En este grupo de enzimas las reacciones de decarboxilación también tienen lugar. (Dixon, 1979)

El sistema de oxidasas de función mixta (MFO) se ha encontrado asociado a la bioquímica de varios insecticidas. El DDT es oxidado y los ciclodienos pueden ser epoxidados o hidroxilados (Hogson, 1974), por ejemplo, en moscas resistentes a dieldrin se encontró 10 veces la actividad de oxidasas microsomales (Terriere, 1974). Los carbamatos pueden ser dealquilados o formados a N-metiloides, hidroxilados en el anillo mientras que los organofosforados pueden ser activados o degradados, la rotenona es hidroxilada mientras que las piretrinas son metabolizadas a un número de compuestos, siendo los más importantes los derivados carboxílicos. (Hodgson, 1970)

Existen algunos compuestos que actúan como sinergistas de algunos insecticidas por ser inhibidores de oxidasas de función mixta. Se tiene especial atención el metilen dioxifenil (MDP; 1,3-benzodioxol) y sus derivados y butóxido de piperonil. (Casida, 1970; Hodgson, 1982). Entre los insecticidas que aumentan su actividad al combinarlos con sinergistas se tienen a los piretroides. Los ésteres de piretroides, aletrina y piretrina I, son ejemplo de ellos. Como dato interesante se ha encontrado que la cadena del lado del alcohol y los grupos metiles tipo *trans* de la parte isobutenil, son de gran importancia en fenómeno de sinergismo con análogos de

piretrinas, pero no la estereoquímica del grupo funcional del ácido o del alcohol. (Casida, 1970)

El sistema de oxidasas de función mixta puede aceptar y metabolizar gran variedad de compuestos lipofílicos, es decir se tiene un alto grado de inespecificidad. Consecuentemente, es un obstáculo a la efectividad de los insecticidas que ya existen y los que se manufacturarán en un futuro, pues seguirá involucrado en la resistencia a estos químicos (Wilkinson, 1976)

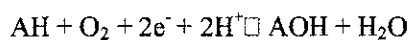
Al considerar la distribución de la actividad de oxidasas en los órganos de diferentes animales, se encuentra que estas enzimas se localizan principalmente en los tejidos asociados con las principales vías de entrada al cuerpo. En mamíferos, por ejemplo están localizados en el pulmón, piel y tracto intestinal, y debe notarse que el hígado, que es el mayor sitio de oxidación en los mamíferos es derivado embriológicamente del intestino. En insectos, la actividad de oxidasas es usualmente encontrada en el intestino o cuerpo graso (fat body) y ocasionalmente en los túbulos de Malpighian. Se presume que los tejidos que representan las primeras líneas de defensa para compuestos que ingresan al cuerpo en la dieta o por penetración cuticular poseen actividad de oxidasas. Entonces, las enzimas parecen localizadas en tejidos donde pueden funcionar con una ventaja máxima. (Wilkinson, 1976)

De acuerdo a Kulkarni (1984) las principales monooxigenasas en mosca doméstica que juegan un papel primordial en la detoxificación de piretroides, así como de otros insecticidas son la citocromo P450 y las monooxigenasas que contienen FAD.

i. Citocromo P450 b.

Las citocromo P450 monooxygenasas (P450) es un grupo diverso de enzimas codificadas por genes de una superfamilia que comprenden al menos 17 familias. Estas enzimas están normalmente involucradas en el metabolismo de hormonas y ferormonas (Fayersein, 1990)

La estequiometría teórica de las monooxygenasas citocromo P450 es



(Fayersein, 1990)

Esta reacción pertenece al grupo 1.13.12, como se mencionó anteriormente en esta sección. La inserción de un átomo del oxígeno molecular en el sustrato AH y la reducción del segundo átomo a agua es lo que se conoce como “función de oxidasas mixtas. La fuente de los equivalentes reductores es el NADPH, y la enzima microsomal NADPH:citocromo P450 reductasa (EC 1.3.2.4), una flavoproteína con un mol de FAD y uno de FMN como grupo prostético que es responsable de la transferencia de electrones, uno cada vez a las proteínas P450. Las reacciones que catalizan las P450 son muy variadas, y comprenden hidroxilación de hidrocarburos, epoxidación de olefinas, hidroxilaciones aromáticas y oxidaciones y dealquilaciones de heteroátomos (S- y N-). (Fayersein, 1990). Las citocromo P450 también catalizan hidroxilaciones de sustratos dependientes de peróxido en la ausencia de NADPH y O₂ (Hollengerg, 1992)

Evidencia de la catálisis de esta enzima en varios insecticidas se presenta a continuación. La desulfuración de paration, rompimiento de algunos organofosforados; epoxidación de clordano, hidroxilación de grupos aromáticos. En la mosca doméstica se probó contundentemente el papel de esta enzima en la epoxidación de aldrin al purificarla y probar su actividad sobre este

insecticida., también se le atribuye la hidroxilación de carbonos alifáticos y de anillos heterocíclicos; la dealquilación de carbamatos y la deshidrogenación de clordano (Kulkarni, 1984).

El papel de estas enzimas en el insecto parece ser muy importante además de tener la capacidad de metabolizar insecticidas. La P-450 metaboliza hormonas y análogos de hormonas para el desarrollo, tal como la hormona juvenil (JH) y también actúa sobre compuestos anti-JH producidos por plantas. Oxida las prohormonas a hormonas; específicamente la β -ecdisona. (Hodgson, 1983)

ii. NADPH Citocromo C reductasa

La citocromo c reductasa dependiente de NADPH es reconocida como un mediador de la cadena de transporte de electrones de NADPH a la enzima activadora de oxígeno. Es una flavoproteína estable con un peso molecular de 70,000 y que contiene dos moles de FAD por mol. Comúnmente es ensayada por la reducción de aceptores de electrones añadidos artificialmente, como el citocromo c o neotetrazolio en presencia de NADPH. Las observaciones más importante que unen esta enzima a la oxidación microsomal es que dicha oxidación se llevan a cabo mejor si se le agrega NADPH y no NADH; que la inducción de oxidasas microsomales resulta en un incremento a nivel de NADPH-citocromo c reductasa, y por último, que al agregar anticuerpos anti NADPH-citocromo c reductasa se inhibe el metabolismo oxidativo. Esta enzima ha sido encontrada en tejidos de mamíferos como en el hígado, corteza adrenal, bazo, riñón, corazón y pulmón (Wilkinson, 1976). También ha sido encontrada en insectos, en mosca doméstica (Matsumura, 1985; Casida, 1970).

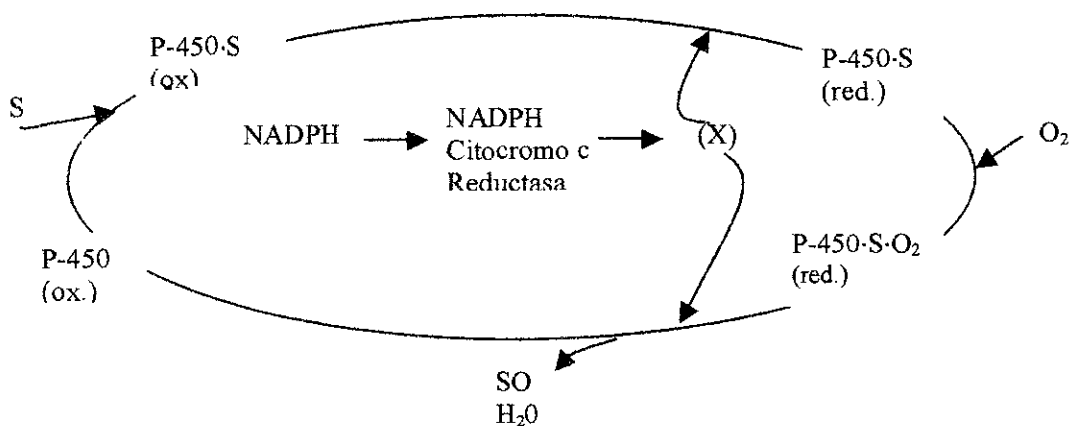
A pesar de que algunos autores afirman que el rol del citocromo b_5 y la NADH:citocromo b_5

reductasa en proveer uno de los dos electrones para algunas reacciones que involucran P450 no ha sido probada convincentemente en insectos (Fayersein, 1990); si parecen estar asociadas en el sistema de depuración (Hodgson, 1985).

El proceso de oxidación microsomal integra la transferencia de electrones de NADPH con la unión de un sustrato y oxígeno al citocromo P450. Están involucradas dos reducciones separadas que involucran transferencia de un electron, la primera ocurre luego de la formación inicial del complejo del sustrato con el citocromo P450 oxidado y la segunda en la formación del complejo citocromo P450/sustrato/oxígeno. La catálisis subsecuente, regeneración del citocromo P450 oxidado por la disociación del producto hidroxilado y agua. (Wilkinson, 1976) El esquema mostrado en la Fig 4 representa un modelo compatible con el cuerpo del conocimiento acumulado, según Hodgson.

Figura 4

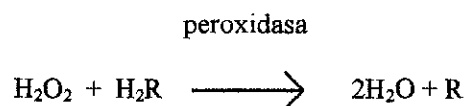
Interacción de electrones, oxígeno y sustrato en el sistema microsomal de oxidasas



b. Peroxidasas

El término peroxidasas en el sentido más amplio incluye un grupo de enzimas específicas como NAD--peroxidasas, NADP-peroxidasas, peroxidasas de ácidos grasos, citocromo-peroxidasas y glutathion-peroxidasas, así como un grupo de enzimas poco específicas de diferentes fuentes, que son conocidas simplemente como peroxidasas (Meyer, 1974)

Las peroxidasas son hemoproteínas que pertenecen al grupo 1.11.1.7 (Meyer, 1974) usualmente tienen el hierro en el estado férrico. (Cantarow, A. 1969) Con algunas excepciones, las peroxidasas catalizan la siguiente reacción:



(Cantarow, 1969)

Dichas enzimas son inhibidas por cianuro, azida de sodio, sulfuros e hidroxilamina (Cantarow, 1969) Los sustratos utilizados por las peroxidasas pueden ser HOOH, CH₃OOH, C₂H₅OOH, (Cantarow, A. 1969, Meyer) aunque la preferencia por peróxido de hidrógeno es bastante alta. Los donadores son grupos de aminofenoles, diaminas, difenoles, leucodienos, enodoles, ácido úrico y DPNH(Cantarow, A. 1969) hidroquinonas, aminas hidroquinoides, especialmente derivados de benzidina y en especial deben mencionarse o-cresol, o-toluidina, guaiacol, pirogalol, ácido homovainillínico, p-hidroquinona, o- ó p-fenilendiamina, 2,6-dicloroindofenol de forma reducida. benzidina, o-toluidina, di-oanisidina y otros colorantes azo derivados de estos (Meyer, 1974)

Las enzimas con actividad de peroxidasas que no entran en el grupo general de las mismas

incluyen oxidasas que actúan como peroxidasas ($\text{SH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{S} + \text{H}_2\text{O}_2$), monooxigenasas ($\text{S-H} + \text{O}_2 + \text{NADPH} \rightarrow \text{S-OH} + \text{NADP}^+ + \text{OH}^-$), catalasa con ciertos sustratos, por ejemplo fenoles, alcoholes y compuestos inorgánicos, y también la hemoglobina y alguno de sus productos de desecho con sustratos típicos para peroxidasas (Meyer, 1974).

Recientemente se ha reportado actividad de peroxidasas en glándulas salivales de *Anopheles albimanus* como un medio para degradar serotonina liberada en organismos y evitar inflamación al picar. (Riveiro,). Es probable que estas enzimas también estén involucradas en el metabolismo de xenobióticos, pues peroxidasas como cloroperoxidasas y peroxidasas de rábano pueden catalizar reacciones dependientes de peróxido similares a aquellas catalizadas por P450. Estudios detallados de cinética han demostrado que peroxidasas de rábano y cloroperoxidasas pueden catalizar N-demetilaciones que se llevan a cabo por un mecanismo Ping Pong Bi Bi, mientras que las P450 catalizan o-dealquilaciones por un mecanismo secuencial. Las N-demetilaciones catalizadas por P450 y peroxidasas conllevan diferentes mecanismos. La mayoría de las hemoproteínas investigadas (1.11.1; 1.13.12; 1.5) catalizan estas reacciones vía abstracción de un hidrógeno del carbono alfa, mientras que las catalizadas con P450 y cloroperoxidasas proceden vía una oxidación inicial que involucra un electrón, seguido de una desprotonación del carbono alfa (Hollenberg 1992).

E. Métodos de determinación de resistencia a insecticidas

A pesar que la Organización Mundial de la Salud ha coordinado el uso de bioensayos como un recurso de métodos estándar asociados con problemas de salud pública está muy lejos de ser la prueba deseable para vigilar la resistencia a insecticidas. Como resultado se han desarrollado y se siguen desarrollando pruebas bioquímicas, inmunológicas y de ácidos nucleicos (Brogdon, 1989).

1. Electroforesis

Juega un papel importante en insectos debido al extenso polimorfismo enzimático, tal como se ha reportado para las esterásas. Este método tiene un papel importante en identificar y separar las enzimas involucradas con la resistencia. Las monooxigenasas (oxidadas de función mixta) son enzimas variadas asociadas a membranas, y el análisis de las mismas se limita porque pierden su actividad cuando se vuelven solubles, aunque pueden ser detectadas en geles de SDS-PAGE (electroforesis de poliacrilamida usando dodecil sulfato de sodio como detergente desnaturante, SDS) por su actividad de peroxidasas que le confiere su grupo hem. (Devonshire, 1989)

2. Pruebas inmunoquímicas

Estos ensayos requieren de más esfuerzos para llevarse a cabo, y es necesario no sólo identificar las bases bioquímicas de la resistencia sino purificar suficientemente la proteína para preparar anticuerpos. Este método puede ser aplicable para vigilar resistencia causada por proteínas que no son detectables por su actividad enzimática intrínseca (Devonshire, 1990)

3. Técnicas moleculares

El mecanismo para analizar resistencia o alguna otra propiedad de las muestras de interés requerirá una caracterización amplia no sólo a nivel bioquímica sino por métodos moleculares y en muchos casos es más útil seguir usando pruebas bioquímicas para complementar los bioensayos. Sin embargo se han convertido en una herramienta para entender la genética de la resistencia (Devonshire, 1990)

En el estudio de resistencia a piretroides se está investigando los reguladores moleculares de la

biosíntesis de canales de sodio, pues la resistencia está basada aparentemente en el gen regulador (Brown, 1987). Los genes de la monooxigenasa P450 se han estudiado por medio de clones con cDNA siguiendo la inducción de RNAm en hígado de mamíferos. Mientras que el gen P-450p se encontró conservado en ratón, hamster y conejo, la respuesta que se encontró a distintos inductores fue variable dentro de estas especies. Esto sugiere que la conservación se pierde en los mecanismos regulatorios. (Brown, 1987)

4. Actividad enzimática asociada con resistencia a insecticidas

Anteriormente a la introducción de técnicas bioquímicas y moleculares el único método usado para determinar resistencia a insecticidas eran los bioensayos. El último método de evaluación es muy ineficiente para detectar resistencia incipiente, y para tener condiciones confiables de la prueba se requieren 1500 mosquitos para ser analizados.

Los bioensayos pueden ser complementarios con otras técnicas bioquímicas, inmunológicas y moleculares, aunque en monitoreo de resistencia a insecticidas se prefiere usar ensayos bioquímicos. El monitoreo bioquímico puede dar información más detallada de la población en estudio, pero sólo cuando esta información ha sido confirmada con bioensayos (Devonshire, 1990). Una de las ventajas de los ensayos bioquímicos es que se puede registrar la frecuencia de los genes de resistencia, aunque sólo puede dar información acerca de un mecanismo particular elegido para el estudio; y según Devonshire (1990) una correlación entre resistencia y un marcador bioquímico particular es soporte suficiente para el uso de este marcador en estudios de resistencia. Los métodos espectrofotométricos son bastante sugeridos por su simplicidad, y especialmente porque su adaptación a los microplatos (placas de ELISA) los simplifica más

(Devonshire, 1990).

Una disección representativa de un ensayo consta de varias partes. El primer componente es la *mezcla de reacción*, que establece el pH correcto, el sustrato y cualquier cofactor que puede ser requerido para la catálisis. Usualmente la mezcla de reacción es llevada a una temperatura específica antes de iniciar la reacción. La preparación de la enzima también debe obtenerse. La segunda parte de un ensayo es la *iniciación/incubación*. Una reacción es generalmente iniciada por la adición de la preparación de la enzima al sustrato que está presente en la mezcla de reacción. Esta combinación inicia la fase de incubación y todos los puntos de tiempo subsecuentes se refieren a esta parte como tiempo cero. Muchas reacciones requieren de *terminación*, un paso para detener la reacción. La terminación usualmente involucra la inactivación de la enzima. Puede ser seguido por *separación*, La mayoría de separaciones involucran aislamiento del sustrato del producto de reacción. El siguiente paso, la *detección*, se refiere al proceso por el que el producto es localizado, identificado y la cantidad formada durante un intervalo específico de incubación es cuantificada. Finalmente, el último paso en el ensayo involucra la reducción de los datos. Este paso incluye todos los procedimientos en que los datos son analizados y graficados para determinar las velocidades iniciales, así como las constantes cinéticas. (Rossomando, 1990).

Los métodos de ensayo se han dividido tradicionalmente en tres clases: *continuos*, *acoplados* y *discontinuos*. Los tres métodos difieren respecto de las formas de separación. Por lo tanto, mientras que las primeras dos no requieren de separar el producto del sustrato, el último sí. En adición, las primeras dos no requieren de un paso de terminación, mientras que el último usualmente sí. Para ensayos que usan este método, el sustrato y el producto deben diferir en

alguna propiedad tal que solamente uno de los dos será medido en la solución de incubación. (Rossomando, 1990).

En los ensayos enzimáticos deben tenerse claros algunos conceptos. Uno de este es el de *velocidad de reacción*, una medida de la conversión de sustrato a producto que describe cuán rápido se realiza la reacción en una unidad de tiempo bajo condiciones específicas. También el concepto de *unidades de enzima y actividad específica* deben manejarse. Al describir actividad deben ser incluidos tres puntos: la cantidad de sustrato convertida, o producto formado en una unidad estándar, usualmente el micromol (μmol); el tiempo de reacción, usualmente minutos; y la cantidad de enzima en alguna unidad como el miligramo. Por lo tanto, la actividad enzimática es usualmente dada como $\mu\text{mol}/\text{min}$ y, por conveniencia, esto es definido como una unidad. El término *unidad* debe ser leído como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de una unidad de masa de sustrato (usualmente el μmol por minuto bajo condiciones definidas de pH y temperatura. La cantidad de actividad por unidad enzima se dará como unidades/mg, y es llamada *actividad específica*. (Rossomando, 1990)

Las *condiciones de ensayo* deben ser contempladas. Para obtener el dato de velocidad inicial deben optimizarse las condiciones de reacción. Esto involucra la determinación de varias variables, como la concentración de sustrato, pH, temperatura y concentración de la enzima.

Una idea de la concentración óptima de sustrato puede ser obtenida del valor de la constante de Michaelis (K_m), la concentración de sustrato a la que la velocidad de reacción será la mitad de la velocidad máxima. Si la K_m puede ser obtenida de la literatura, es posible empezar con la concentración de sustrato dos o tres veces el valor de la K_m . Tal concentración será adecuada

para experimentos iniciales. La literatura puede proveer información de parámetros iniciales como pH, requerimiento de activadores y la temperatura óptima para la incubación (Rossomando, 1990).

IV. JUSTIFICACIÓN

Los mosquitos *Anopheles albimanus* son los principales vectores de malaria en Guatemala, Centro América y Caribe (Herms, 1953; PAHO, 1996). Para disminuir la incidencia de la enfermedad se ha optado por controlar al vector. De los insecticidas usados para su control se tienen entre otros, a los piretroides. Se ha reportado que en el área sur del país ya hay resistencia a los piretroides permetrina y deltametrina (Brogdon, 1982). En estudios preliminares se ha encontrado correlación de resistencia a deltametrina con actividad de esterasas. Por otra parte la resistencia a permetrina no está correlacionada con la actividad de estas enzimas, aun cuando éstas también poseen en su estructura un enlace éster. (Brogdon, 1982). Ya que en otros sistemas biológicos se reporta que las esterasas y las oxidasas juegan un papel importante en la resistencia a piretroides, se cree que las oxidasas están involucradas en el caso de *An. Albimanus*.

En los programas de control y vigilancia las pruebas bioquímicas que se practican para vigilar la resistencia a insecticidas en los mosquitos son de gran ayuda. Una de las ventajas que se tienen es la opción de encontrar un valor de actividad enzimática discriminante en con cada mosquito perteneciente a una población (Cordón Rosales 1990, Beach 1989). Si la medición hallada en los individuos es mayor o menor al valor discriminante establecido se verifica si es resistente o susceptible al insecticida. Poder supervisar la resistencia a piretroides en *Anopheles albimanus* con será de gran utilidad porque desarrollar una prueba bioquímica correlacionada con esta característica sería beneficioso para los programas de control.

Se ha reportado en la literatura la actividad de NADPH citocromo c reductasa, como una de las principales en la depuración de piretroides. La citocromo P450 ha sido ampliamente estudiada y se

ha encontrado asociada a la depuración de piretroides en la mosca doméstica (Scott, 1986). Sin embargo en algunos casos se ha registrado que las peroxidasas son capaces de generar productos de detoxificación iguales a los provenientes del sistema P450 (Hollenberg, 1992). Esto podría indicar que las peroxidasas constituyen un mecanismo alternativo para la detoxificación de esos xenobióticos. El grupo de Brogdon ha reportado variaciones de la actividad de peroxidasas asociada por resistencia a piretroides en cepas de Anopheles, en condiciones de inducción con fenobarbital (comunicación personal). Debido a que la medición de actividad de las peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa se lleva a cabo espectrofotométricamente en la región visible; el ensayo queda al alcance de laboratorios que poseen recursos limitados y que están involucrados con la vigilancia de la resistencia a insecticidas. Existe interés por razones de factibilidad y costo en medir la correlación de actividades enzimáticas en un homogenizado de mosquito con la resistencia a piretroides. Este interés se justifica por la sencillez e hacer una extracción por simple maceración en un buffer específico. Según Devonshire (1990), una correlación entre resistencia y un marcador bioquímico particular es soporte suficiente para el uso de este marcador en estudios de resistencia. La facilidad con la que se podría medir actividad de NADPH citocromo c reductasa y peroxidasas en un homogenizado al usar una lectora de ELISA haría el ensayo aún más sencillo y es una posibilidad que también se espera investigar. De los dos ensayos a probar el que es menos reportado en estudios de *Anopheles albimanus* es el de peroxidasas, pero hay interés especial en éste, ya que los costos del método son bastante más bajos que los de NADPH citocromo c reductasa.

V. METODOLOGIA

A. MATERIALES

Para llevar a cabo la parte experimental de este trabajo se requirió la disponibilidad de las muestras y el equipo pertinente para los análisis. A continuación se presenta un listado de los materiales utilizados.

1. Poblaciones de *Anopheles albimanus* recolectados en las regiones de El Semillero, Tiquizate, Escuintla el 5/6/95 y 2/8/95 ; Nahuá, Amates, Izabal 12/6/95 y Puente Blanco, Chiquimula, Chiquimula el 11/9/95 y 1/7/95. También se usaron cepas de mosquitos cultivados en el Insectario de la Unidad de Entomología Médica, Universidad del Valle de Guatemala, almacenados en las mismas condiciones el 8/12/96.

2. Aparatos:

1 centrífuga para viales Eppendorf, con capacidad para 10,000rpm

1 espectrofotómetro Lambda 3; Perkin Elmer.

1 lectora de Elisa con 6 filtros para región visible con software para cinética enzimática, SOFTMAX.

1 balanza analítica tipo Mettler ± 0.0001 g.

1 potenciómetro o pHímetro con electrodo para medición de pH.

3. Cristalería, recipientes y otros

2 Balones de la siguiente capacidad: 250, 100, 50, y 25 ml marca Pyrex

2 Beakers, de 250, 150, 100 y 30 ml marca Pyrex o Kimax según sea el caso

2 Probetas, 50, 10 ml. Pyrex

Pipetas, de 5, 2, 1 ml.

2 pizetas,

Micropipetas, con rango de 50-1000 μ l, y 1-100 μ l

Celdas de vidrio con capacidad de 300 μ l y longitud de 1 cm de paso. Perkin Elmer

20 Placas de Elisa CSF con 96 pozos

Puntas para micropipeta de 1000 μ l y 100 μ l y 10 μ l

40 Maceradores de teflón adaptados para homogenizar en viales cónicos para centrifuga
(3ml capacidad)

300 Viales plásticos y cónicos para centrifuga, con capacidad de 3 ml

Marcador indeleble para rotular los viales

Masking Tape

4. Reactivos

a. *Ensayo de peroxidasas*

Buffer de HEPES pH 7.0 para lectura en espectrofotómetro.

NaOH

hidrocloruro de o-dianisidina

Peróxido de hidrógeno 30%

Buffer de fosfatos pH 7.0 para extracción de la enzima

Agua destilada

b) *Ensayo de NADPH-citocromo c reductasa*

Buffer de fosfatos pH 8.0

Ferricitocromo c de corazón de vaca

NADPH

Azida de sodio

EDTA (Acido etilendiamino tetraacético)

Lecitina (fosfatidilcolina)

Agua destilada

B. DISEÑO EXPERIMENTAL

Este estudio se diseñó para determinar la asociación que existe entre la actividad enzimática de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa con la resistencia a deltametrina, permetrina o fenitrotión en las muestras colectadas en un estudio transversal.

1. Colección de las muestras:

Las muestras fueron colectadas en corrales localizados en los lugares mencionados en la parte de Materiales, que de acuerdo a datos previos presentaban variación en susceptibilidad a permetrina, deltametrina y fenitrotión. Para atrapar a los mosquitos se utilizó un capturador compuesto de un tubo plástico rígido, una malla que servía de barrera y un segmento de manguera que hace vacío por succión con la boca de la persona colectora. Las muestras provenientes de cada sitio de captura fueron separadas inicialmente en dos partes: una cantidad de mosquitos *An. Albimanus* fueron utilizados para hacer las pruebas de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa y la otra para efectuar los bioensayos. Los bioensayos se efectuaron para permetrina, deltametrina y fenitrotión. El restante de la muestra se mantuvo alimentado con sacarosa al 8% durante tres días para propiciar la depuración de sangre en el abdomen de las hembras. Este tiempo incluye el tiempo de transporte del campo hasta el laboratorio. El transporte de los mosquitos se efectuó en pintas especiales. Luego de la depuración se almacenó a -20°C en un recipiente rotulado, que contenía agente secante (drierite) para efectuar las pruebas enzimáticas de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa.

2. Bioensayos:

Para los bioensayos se eligió la metodología publicada por el reporte técnico de la OMS (WHO, 1963) y por el Manual de entomología práctica en malaria (1975). Las muestras de mosquitos de *A. albimanus* fueron alimentadas con sangre y separadas en varios grupos. Tres grupos de 100 ó 50 mosquitos fueron seleccionados para exponerse durante una hora a papeles que han sido impregnados con 1.25% permetrina, 1% Fenitrotión y Deltametrina 0.025% , respectivamente. Esta es la concentración discriminante sugerida por la OMS para efectuar bioensayos. Seguido de esto,

se dejaron un periodo de 24 horas de reposo, sin ser expuestos al agente tóxico luego del cual se anotó el número de vivos y se hicieron los cálculos de sobrevivencia. Los papeles impregnados con insecticidas en los ensayos fueron obtenidos de la Organización Mundial de la Salud , con concentraciones estándar de insecticida.

3. Preparación de la muestra para los ensayos enzimáticos

En el caso de los **ensayos enzimáticos** las muestras fueron preparadas de forma diferente. El abdomen de los mosquitos fue disectado sobre un vidrio de reloj que reposaba en hielo picado. Luego se desechó y se trabajo solamente con la cabeza y el tórax.

Inmediatamente, antes de ensayar la actividad enzimática, se procedió a colocar las muestras en viales cónicos que contenían 200 μ l de buffer de extracción HEPES con una concentración 10mM, NaCl 150mM y EDTA 1mM preparado en agua destilada y desionizada. Las muestras se maceraron con pistilos de teflón hasta homogenizar y luego se centrifugaron durante 10 minutos a -4 C. Todo el procedimiento se trabajo en frío.

El sobrenadante se colectó y se separó en dos alícuotas para poder hacer el ensayos de peroxidasas y el de NADPH citocromo c reductasa. Sesenta microlitros fueron usados para hacer una dilución 1:7 en viales previamente preparados y se usó para efectuar el ensayo de peroxidasas. Inmediatamente se virtió la otra parte del extracto de ELISA para efectuar el ensayo de NADPH citocromo c reductasa, en dos pozos con un volumen de 60 μ l cada uno.

4. Ensayos enzimáticos

Los ensayos enzimáticos han sido desarrollados en los últimos años por las ventajas que ofrecen sobre los bioensayos (ver antecedentes). Las metodologías de elección para determinar la resistencia a insecticidas incluyen la caracterización del citocromo P450, o la actividad de esterasas. Las razones por las que no se usaron estos ensayos aparecen en la sección de justificación.

La cantidad de mosquitos analizados en cada población varió entre 40 y 42 individuos. A cada uno se le practicó en duplicado los ensayos enzimáticos.

El ensayo de NADPH citocromo c reductasa fue basado en una modificación del reporte publicado por Hatefi, (1978). En el método original el ensayo se efectúa en un espectrofotómetro con celdas con capacidad de un mililitro. En esta celda se agregan 20 μ l de buffer de fosfato 1M, 20 μ l de NaN_3 0.1M, 30 μ l de citocromo c 14mg/ml ; 15 μ l de solución de lecitina (12-15mg/ml), 15 μ l de NADPH 20mM 10-20 μ l de extracto de mitocondria, o microsomas. El volumen se completa con agua hasta llegar a un mililitro y se lee la absorbancia del citocromo c reducido menos el oxidado a 550nm al usar una celda de referencia de todos los compuestos menos el NADPH. Las siguientes modificaciones se hicieron en el método anteriormente citado: el buffer de extracción fue el usado para el ensayo de peroxidasas, el sustrato, citocromo c, fue aumentado en concentración al doble. No se hizo purificación de la enzima y se leyó en un volumen de reacción de 135 μ l. La actividad enzimática de la NADPH citocromo c reductasa se midió por el cambio de absorbancia a 550nm, en una lectora de ELISA con programa para análisis enzimático SOFTMAX con filtro a 550nm, automezclado encendido, tiempo de corrida 10 minutos, en modo de cinética.

Para peroxidasas, la metodología usada fue la publicada por Riveiro (1993). En este ensayo se extraía la enzima con buffer de fosfatos 10mM pH 7 y concentración de sales de 150mM NaCl. Las muestras se dejaban en sonicador hasta que las células se rompieran. El término de la disrupción celular se apoyó con un análisis en el esteroscopio. Este extracto se centrifugaba a 10,000 g durante un minuto. El ensayo enzimático se efectuaba en buffer HEPES 10mM pH 7, con la misma concentración de sales, y al añadir el extracto se llevaba el volumen de reacción hasta 100 μ l con concentraciones finales de 1mM de peróxido de hidrógeno y de o-dianisidina ; se leía la absorbancia a 450 nm durante 3 minutos. A este procedimiento también se le hicieron modificaciones. No se usó el buffer de extracción mencionado por Riveiro (1990), al inicio de su publicación, se utilizó el sugerido por él para la cuantificación de la actividad enzimática. Las condiciones de centrifugación fueron equivalentes a las planteadas, a 2,500 gravedades durante 10 minutos a - 4°C. Se le agregó EDTA 1mM, como sugiere Deutscher (1990) para la inhibición de proteasas. El volumen vertido en la placa de ELISA fue de 250 microlitros, no de 100. De este volumen final, 200 μ l correspondían a la dilución de la muestra y 50 μ l a los sustratos. Se leyó la actividad durante 4 minutos.

A las muestras se evaluaron en duplicado para cada método postulado para la detoxificación de piretroides. El coeficiente de variación nunca fue mayor de 10. Las actividades fueron dadas en términos de velocidad inicial como el cambio de miliUnidades de densidad óptica por minuto (mOD/min) a la longitud de onda especificada para cada sustrato.

5. Análisis de Resultados

Se efectuó un análisis de línea de corte que comparó el porcentaje de sobrevivencia en los ensayos de la OMS y la sobrevivencia estimada predecida por los métodos de peroxidasas y

NADPH citocromo c reductasa. Los promedios de las actividades enzimáticas de las poblaciones fueron correlacionadas con el porcentaje de resistencia al insecticida evaluado. Se realizó un análisis de regresión lineal y se muestra el índice de determinación correspondiente a cada regresión lineal. El método de mínimos cuadrados, calculado entre la actividad enzimática de las poblaciones y el porcentaje de resistencia al insecticida también se utilizó para el análisis de los ensayos. Este valor se obtuvo para cada insecticida utilizado y con cada ensayo enzimático.

VI. RESULTADOS

Los resultados de los bioensayos propuestos por la OMS se encuentran en el cuadro 5. En él se muestran los porcentajes de sobrevivencia en las muestras de poblaciones de mosquitos hacia cada insecticida. Es característico de las poblaciones de El Semillero (sur de Guatemala) presentar una mayor resistencia o porcentaje de sobrevivencia a los tres insecticidas estudiados, cuando se comparan las poblaciones entre sí. Las muestras del norte (Nahuá y Puente Blanco) muestran mayor susceptibilidad a deltametrina que a permetrina y fenitrotión.

Para implementar los ensayos bioquímicos de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa se hicieron ensayos previos al análisis de las muestras. Para peroxidasas se corroboró que el buffer de fosfatos precipita el sustrato de la reacción registrada con la lectora de ELISA. Por lo demás, las condiciones del ensayo fueron satisfactorias y solo se comprobó que el inhibidor de proteasas usado no interfería con la medición de la actividad de la enzima (datos no publicados). Para la NADPH citocromo c reductasa fue más difícil la determinación de las condiciones ideales para la medición de su actividad. Como se muestra en los cuadros de esta sección, se optimizó la cantidad de homogenizado de mosquito (cuadro 9), el modo de lectura de la cinética de la enzima (cuadros 6-9), y el tiempo de lectura para obtener un cambio de absorbancia significativo (cuadro 6, 7 y 8). El aumento en la concentración de sustrato se debió a la disminución del coeficiente de variación de las réplicas (cuadro 9) y a las mejoras en los índices de correlación de velocidad inicial (datos no publicados).

Se hizo una comparación de las actividades enzimáticas de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa en cada mosquito de las poblaciones colectadas. Los mosquitos se ordenaron ascendentemente conforme a la actividad de peroxidasas, ya que es la que presenta mayor variación. Los datos se presentan en las gráficas 1-5 y puede verse que la actividad de NADPH citocromo c reductasa no guarda ninguna asociación con la actividad de peroxidasas, pues no se observa un patrón similar de esta última dentro de cada población. Tampoco hay un comportamiento repetitivo entre poblaciones para ninguna enzima. En la población de El Semillero A la actividad de peroxidasas tiene un rango de variación amplio, y como puede verse, a medida que aumenta su valor no hay aumento en la actividad de NADPH citocromo c reductasa (Gráfica 1). En la población de El Semillero B, el rango de actividad de peroxidasas no es tan amplio como en la población del Semillero A, pero se ve un aumento en el promedio de actividad de NADPH citocromo c reductasa en esta relación (Gráfica 2). La población de Puente Blanco que corresponde a la gráfica tres muestra un aumento de peroxidasas, con una disminución simultánea de NADPH citocromo c reductasa. Puente Blanco B muestra una grada en los valores de actividad de peroxidasas, de 26 a 37 mOD/min para un grupo de 5 mosquitos. Por último encontramos que en la población de Nahuá los mosquitos tienen actividades bajas tanto en peroxidasas como en NADPH citocromo c reductasa.

En las gráficas 12-17 se muestran los promedios y las variaciones de actividad enzimática para cada población. Los datos fueron ordenados por resistencia a insecticida para cada sistema estudiado, y se muestra en el eje x el porcentaje de resistencia que presentó cada población. El rango de actividad está distribuido hacia arriba y abajo con dos veces la desviación estándar a partir del promedio de la población. En los cuadros 10 y 11 aparecen los valores de los promedios de la desviación estándar representados en estas gráficas.

La variación de la actividad de las enzimas de acuerdo con su susceptibilidad a los insecticidas se muestra en los cuadros 12 a 14. En la segunda columna de cada cuadro se puede apreciar un análisis estadístico de punto de corte de actividad enzimática encontrada en las poblaciones. Este punto de corte se refiere al valor de actividad enzimática (mOD/min) sobre el que estaba un porcentaje determinado de las muestras analizadas. Para cada insecticida se tienen distintos valores de corte en la actividad de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa. El valor de corte más aproximado a los valores de porcentaje de sobrevivencia a los insecticidas, según los bioensayos de la OMS, está resaltado en el fondo. En todos los valores de corte, de resistencia a insecticida, se observan similitudes de un máximo de tres poblaciones de cinco cuando se comparan con los bioensayos. Aún estas similitudes tienen variaciones de 30% respecto del porcentaje de sobrevivencia (Cuadro 12), valor de corte 4 mOD/min para NADPH citocromo c reductasa. Los valores más diferentes corresponden a las velocidades enzimáticas asociadas con resistencia a deltametrina. Y para este insecticida el método enzimático que tiene más asociación con el bioensayo OMS es el sistema de NADPH citocromo c reductasa. Para hacer la comparación de los valores de corte con el porcentaje de sobrevivencia a fenitrotión no se contó con el valor de referencia, ensayos OMS, para la población de Nahuá. Las comparaciones se hicieron entonces solamente con cuatro poblaciones. Se observa que tanto para peroxidasas como para NADPH citocromo c reductasa, el valor de corte está asociado con la sobrevivencia OMS de dos poblaciones.

El otro análisis estadístico aplicado a los resultados fue la correlación existente entre los promedios de actividad enzimática de las poblaciones con sus respectivos porcentajes de resistencia a cada insecticida. Los resultados se muestran en las gráficas 18-23, y junto con ellos la gráfica de regresión lineal correspondiente a cada grupo de datos. Puede verse en cada cuadro que los índices de determinación fueron menores a 0.40 en todas los análisis efectuados. El análisis de varianza de

la recta muestra los índices de significancia de las rectas, y son mayores que 0.29 en todos los casos.

Cuadro 5

Susceptibilidad de las poblaciones de *A. Albimanus* de acuerdo con los resultados de los bioensayos estandarizados de la OMS en mosquitos adultos para permetrina, deltametrina y fenitrotión

POBLACION	Porcentaje de sobrevivencia en prueba OMS (# sobrevivientes/ #expuestos)*100		
	R permetrina	R deltametrina	R fenitrotión
Semillero, Tiquisate 5/6/95	72	57	77
Semillero, Corral 3 2/8/95	26	51	79
Puente Blanco, Chiquimula: 11/9/95	54	4	50
Nahuá Amates: 12/6/95	50	6	
Puente Blanco, Chiquimula: 11/7/95	4	1	28

R= resistencia encontrada de acuerdo a la sección de metodología

PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE NADPH
CITOCROMO C REDUCTASA EN MOSQUITOS DE POBLACIONES DE *Anopheles albimanus*

DETERMINACION DE LOS PARAMETROS A USAR :

Cuadro 6
DILUCION DEL EXTRACTO EN CEPAS DE INSECTARIO

Dilucion 1:7

Actividades enzimaticas de mosquitos *A. albimanus*. Datos obtenidos de lectora de ELISA con programa para cinetica enzimática a 550 nm, y 5 minutos de corrida.

Vo (mOD/min)	Pozo	Promedio	STDV	Coefficiente de variación
1,747 2.261	E3 F3	2.004	0.363	18.14
3.703 0.493	G3 H3	2.270	2.270	108.2
3.588 4.167	A4 B4	3.878	0.490	10.55
4.877 4.451	A4 B4	4.664	0.301	6.455
2.911 2.472	C2 D2	2.692	0.311	11.54
0.670 2.193	E2 F2	1.432	1.077	75.26
7.375 6.460	G2 H2	6.917	0.647	9.354
5.943 5.752	A3 B3	5.848	0.135	2.31
4.715 5.234	C3 D3	4.975	0.368	7.388
3.117 3.15	C4 D4	3.134	0.024	0.759
3.55 4.701	E4 F4	4.125	0.814	19.73
5.062 1.965	G4 H4	3.508	2.138	62.21

Cuadro 7

AMPLIACION DE RANGO DE TIEMPO
PARA LA OBTENCION DE DATOS USADOS EN EL CALCULO DE ACTIVIDAD
DE NADPH CITOCROMO C REDUCTASA
CINETICA ENZIMATICA DUAL

Actividades enzimáticas de mosquitos *A. albimanus*. Datos obtenidos de lectora de ELISA con programa para cinética enzimática a 550 - 450 nm, y 10 minutos de corrida.

Vo (mOD/min)	Pozo	Promedio	STDV	Coficiente de variación
12.79 13.01	E10 F10	12.9	0.154	1.195
17.05 18.4	G10 H10	17.73	0.954	5.381
14.67 14.31	A10 B10	14.49	0.25	1.728
16.04 15.07	C10 D10	15.56	0.688	4.423

Cuadro 8
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE NADPH CITOCROMO C REDUCTASA CON LA
ADICIÓN DEL DOBLE DE VOLUMEN DE MUESTRA Y RANGO DE TIEMPO
AMPLIADO.

Actividades enzimáticas de mosquitos *A. albimanus*. Datos
obtenidos de lectora de ELISA con programa para cinética enzimática
a 550 - 450 nm, y 10 minutos de corrida.

Vo (mOD/min)	Pozo
12.23	A12
22.31	B12
19.62	C12
18.76	D12
11.88	E12
16.02	F12
19.22	G12
21.95	H12

Cuadro 9

ACTIVIDAD DE LA NADPH CITOCROMO C REDUCTASA CON EL DOBLE
DE VOLUMEN DE MUESTRA, RANGO DE TIEMPO PROLONGADO Y
CONCENTRACION AUMENTADA DE CITOCROMO C.

Actividades enzimáticas de mosquitos *A. albimanus*. Datos obtenidos de lectora de ELISA
con programa para cinética enzimática a 550 m, y 10 minutos de corrida.

Pozo	Vo (mOD/min)	Promedio	STDV	Coficiente de variación
E3	2.924	2.86	0.091	3.185
F3	2.795			
G3	3.995	3.793	0.285	7.524
H3	3.591			
A4	3.260	3.172	0.125	3.933
B4	3.084			
C4	3.857	3.867	0.014	0.360
D4	3.877			
E4	5.796	5.588	0.294	5.267
F4	5.380			
G4	3.900	3.642	0.364	10.00
H4	3.385			
A5	2.594	2.595	0.002	0.061
B5	2.596			
C5	3.697	3.496	0.284	8.137
D5	3.295			
E5	2.993	2.922	0.101	3.439
F5	2.851			
G5	2.665	2.597	0.097	3.750
H5	2.528			
A6	12.320	12.17	0.206	1.689
B6	12.030			
C1	2.731	2.688	0.061	2.287
D1	2.644			
E1	5.794	5.732	0.087	1.525
F1	5.670			

Cuadro 10

Promedio de actividad enzimática encontrada en los mosquitos de las poblaciones de *Anopheles albimanus* analizadas.

GRUPO Semillero A (10a)			GRUPO Semillero B (10b)		
Mosquito	Vo dianisidina.	Vo cit c	Mosquito	Vo diasidina	Vo cit c
s10	17.71	2.86	n56	3.11	1.00
s11	26.32	3.79	n50	4.19	1.28
s12	11.73	3.17	n48	1.87	1.41
s13	4.44	3.87	n52	7.30	1.42
s14	20.22	5.59	n57	10.49	1.49
s15	11.66	3.64	n45	6.88	1.63
s16	12.24	2.60	n49	9.91	1.63
s17	1.20	3.50	n58	0.33	1.64
s18	18.63	2.92	n54	2.20	1.65
s19	15.15	2.60	n55	1.61	1.80
s20	0.01	12.17	n53	4.74	1.82
s21	10.45	2.58	n44	18.03	2.02
s22	8.75	2.36	n46	23.35	2.16
s23	11.50	4.90	n27	18.28	2.23
s24	23.00	3.49	n41	2.74	2.23
s25	4.48	3.92	n59	4.10	2.23
s26	11.81	6.77	n24	14.57	2.34
s27	8.02	4.63	n51	13.01	2.41
s28	15.73	3.03	n39	1.13	2.47
s29	7.47	3.91	n37	35.26	2.66
s30	4.76	2.67	n23	20.70	2.74
s31	7.44	3.24	n25	1.84	2.76
s32	26.30	3.74	n40	28.61	2.78
s33	24.75	3.73	n42	2.81	2.81
s34	11.37	3.05	n21	10.46	2.82
s35	6.91	3.92	n43	5.48	2.90
s36	8.27	3.99	n22	1.98	2.96
s37	35.37	5.52	n28	22.26	3.01
s38	14.81	5.12	n26	2.21	3.09
s39	8.73	5.05	n34	8.52	3.10
s40	58.57	3.52	n30	1.51	3.25
se1	18.51	2.69	n29	8.11	3.33
se2	33.43	5.73	n32	28.74	3.37
se3	22.07	4.32	n47	5.82	3.81
se4	14.19	3.55	n36	32.25	4.04
se5	2.04	1.83	n31	32.77	4.44
se6	10.25	3.95	n38	17.90	4.54
se7	22.81	3.29	n33	7.11	5.84
se8	14.58	5.11	n35	6.14	5.93
se9	18.96	3.05			
STDV	10.89	1.70	STDEV	10.19	1.14
X Vo=	15.12	3.98	X Vo =	10.98	2.69

Cuadro 11

Promedio de actividad enzimática encontrada en los mosquitos de las poblaciones de *Anopheles albimanus* analizadas.

GRUPO Puente Blanco (A) (11a)			GRUPO Nahuá, Amates (11b)		
Mosquito	Vo dianisidina	Vo cit c	Mosquito	Vo dianisidina	Vo cit c
b35	22.09	2.47	a25	2.03	1.52
b42	3.10	2.70	a23	1.77	1.87
b30	30.37	2.72	a37	1.38	2.16
b39	8.00	2.73	a14	2.73	2.29
b20	22.07	2.91	a22	1.16	2.30
b41	7.40	2.93	a24	0.96	2.73
b22	16.05	3.04	na7	0.33	2.87
b9	19.23	3.04	a10	4.79	2.92
b36	35.77	3.08	na5	4.87	3.00
b23	39.09	3.10	a39	11.95	3.01
b10	3.35	3.35	a34	2.82	3.17
b37	11.43	3.36	a40	3.26	3.47
b2	14.69	3.40	a27	3.13	3.54
b14	1.47	3.50	a28	3.12	3.62
b17	18.56	3.53	a21	4.86	3.73
b33	4.26	3.57	a38	0.72	3.83
b4	1.54	3.60	a18	4.56	3.86
b38	3.70	3.61	a29	4.37	3.86
b26	24.48	3.66	na4	1.68	3.87
b15	29.93	3.85	na1	2.06	3.94
b7	11.44	3.93	a12	1.89	4.05
b12	11.33	3.98	a15	6.41	4.12
b5	3.49	4.05	a36	7.47	4.14
b29	8.96	4.06	na8	5.98	4.15
b32	7.12	4.15	a33	1.11	4.17
b6	3.50	4.28	a30	2.06	4.26
b34	13.46	4.32	na6	4.13	4.35
b11	0.01	4.45	a19	2.74	4.38
b13	4.41	4.52	a31	12.15	4.44
b21	0.00	4.70	a13	2.99	4.52
b28	11.25	4.93	na3	2.96	4.60
b25	1.84	5.27	a17	2.86	4.69
b24	5.42	5.36	na2	5.32	4.78
b40	15.52	5.50	a20	2.95	5.81
b18	18.71	5.70	a26	12.00	6.60
b31	12.93	6.53	a11	1.33	6.80
b19	7.89	6.56	a16	2.48	6.96
b8	10.66	7.09	na9	1.12	7.67
b3	0.17	7.26	a32	2.20	8.81
b1	0.09	9.42	a35	2.70	13.33
b16	0.31	10.89			
b27	0.33	12.80			
STDV	10.16	2.20	STDV	2.91	2.12
X Vo=	13.29	3.46	X Vo	3.63	4.35

Grupo Puente Blanco (B) (11c)

Mosquito	Vo cit c	Vo dianisidina.
p28	1.57	16.12
pb1	2.18	37.26
p11	2.32	21.88
p27	2.42	18.09
p17	2.65	16.93
p19	2.70	17.01
p38	2.72	20.40
pb3	2.76	0.48
p29	2.81	24.67
p18	2.82	14.73
p14	2.83	21.76
p10	3.13	14.42
p31	3.18	37.17
p23	3.28	19.91
p35	3.33	38.91
pb2	3.37	5.19
p39	3.39	8.21
p13	3.46	7.99
p36	3.50	38.91
p26	3.50	17.42
p21	3.52	3.09
p16	3.70	3.37
p41	3.73	60.45
pb6	3.76	1.53
p15	3.91	8.49
p22	3.91	5.25
pb7	4.11	8.96
p25	4.16	10.10
pb4	4.19	8.89
p20	4.25	5.40
p30	4.27	5.19
p12	4.44	12.21
p40	4.46	41.64
p32	4.48	18.82
pb5	4.67	5.26
pb9	4.87	2.20
p33	5.02	7.06
p34	5.38	7.18
p24	5.58	12.68
pb8	6.57	12.67
p37	6.73	18.98
STDEV	1.10	13.08
X Vo	3.75	16.02

COMPARACION DEL PORCENTAJE DE RESISTENCIA OBSERVADO EN EL BIOENSAYO DE LA OMS Y EL PORCENTAJE DE RESISTENCIA ESTIMADA POR LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASAS Y NADPH CITOCROMO C REDUCTASA EN CINCO POBLACIONES DE *A. Albimanus* PERTENECIENTES A GUATEMALA

Cuadro 12

DATOS ASOCIADOS CON RESISTENCIA A PERMETRINA

Método	Punto de corte (mOD/min)	Porcentaje de sobrevivencia				
		Semillero (A)	Semillero (B)	Puente B. (A)	Nahua	Puente B (B)
Bioensayos Permetrina		72	26	54	50	4
PEROXIDASAS	5	87	58	63	17	87
	15	41	29	29	0	45
	20	26	19	16	0	19
NADPH citocromo c reductasa	2	99	70	100	92	97
	3	78	32	87	78	73
	5	22	8	27	18	12
	6	10	2	18	16	5

Cuadro 13

DATOS ASOCIADOS CON RESISTENCIA A DELTAMETRINA

Método	Punto de corte (mOD/min)	Porcentaje de sobrevivencia				
		Semillero (A)	Semillero (B)	Puente B. (A)	Nahua	Puente B (B)
Bioensayos Deltametrina		57	51	4	6	1
PEROXIDASAS	10	68	36	48	8	58
	20	26	19	16	0	24
	30	9.7	8	4	0	15
	40	6	0	2	0	5
NADPH citocromo c reductasa	3	80	29	87	78	73
	5	20	8	27	18	12
	7	5	0	12	9	2

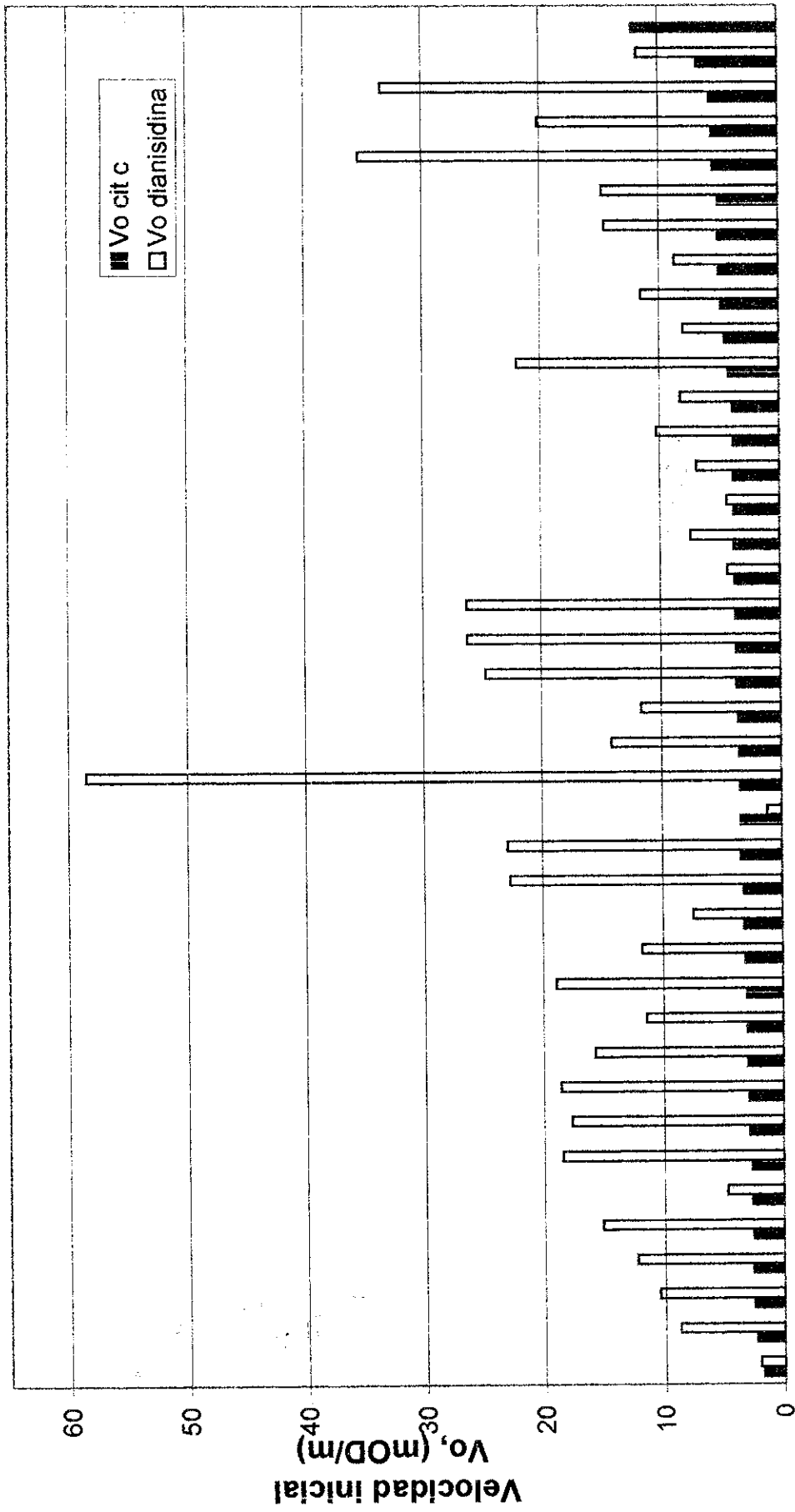
Cuadro 14

DATOS ASOCIADOS CON RESISTENCIA A FENITROTION

Método	Punto de corte (mOD/min)	Porcentaje de sobrevivencia				
		Semillero (A)	Semillero (B)	Puente B. (A)	Nahua	Puente B (B)
Bioensayos Fenitrotión		77	79	50		28
PEROXIDASAS						
	10	65	39	48		58
	12	48	31	38		56
	14	46	29	32		48
NADPH citocromo c reductasa	2	99	70	100		97
	3	78	29	87		73
	5	7	8	27		12

Gráfica 1

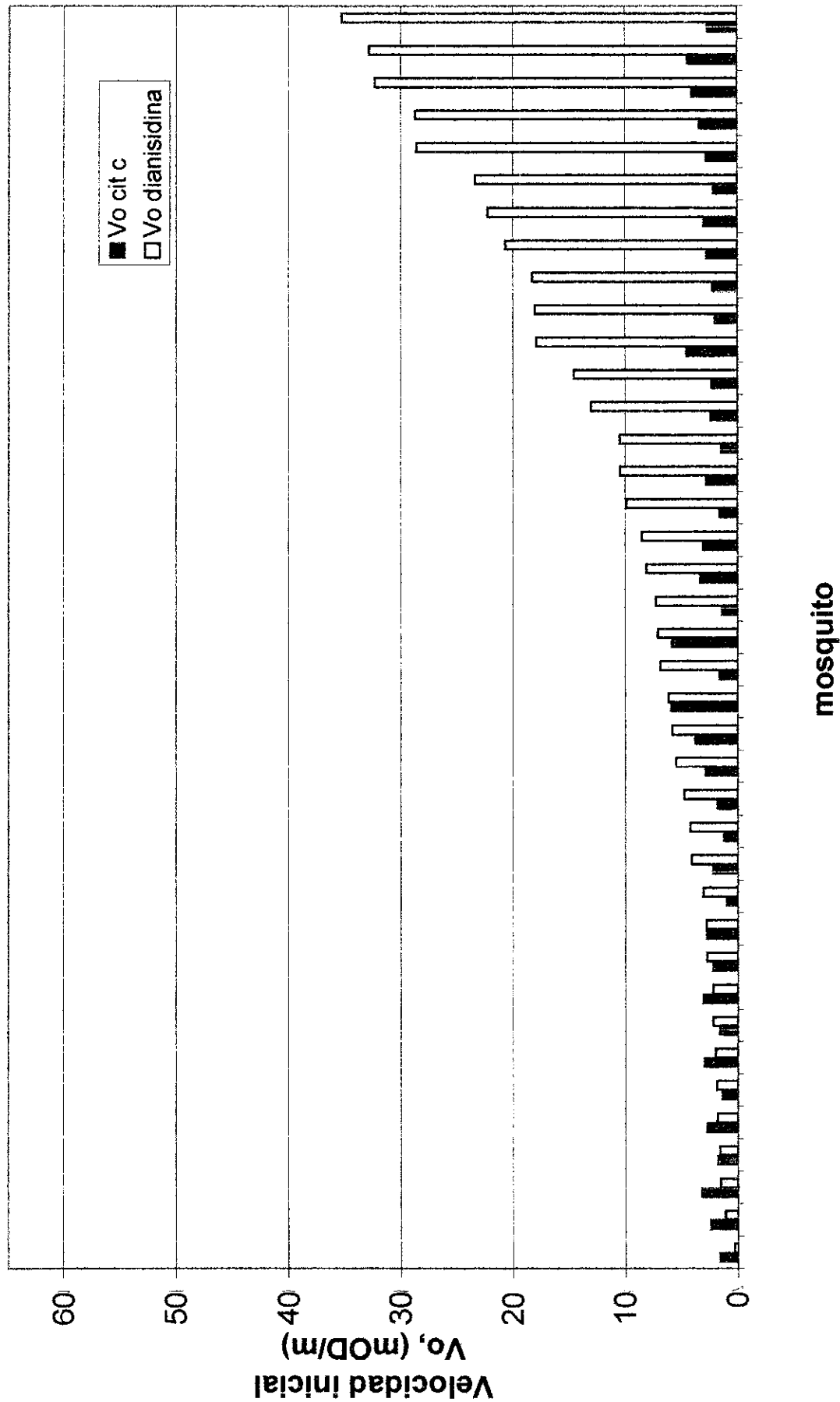
Actividad enzimática de peroxidasa y NADPH citocromo c reductasa por mosquito en *Anopheles albimanus* de la población Semillero (A)



Mosquito

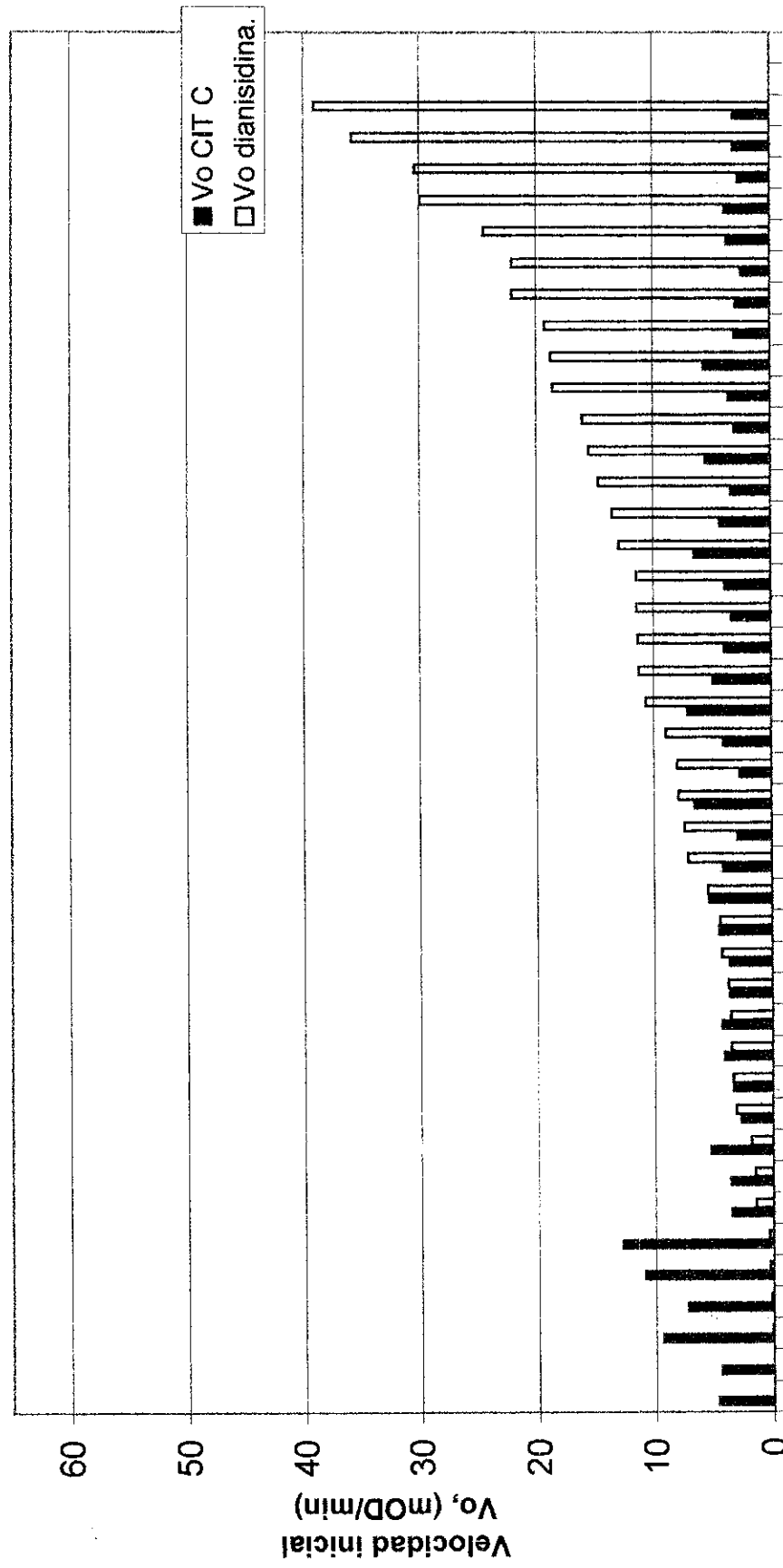
Gráfica 2

Actividad enzimática de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa por mosquito en *Anopheles albimanus* de la población Semillero (B).



Gráfica 3

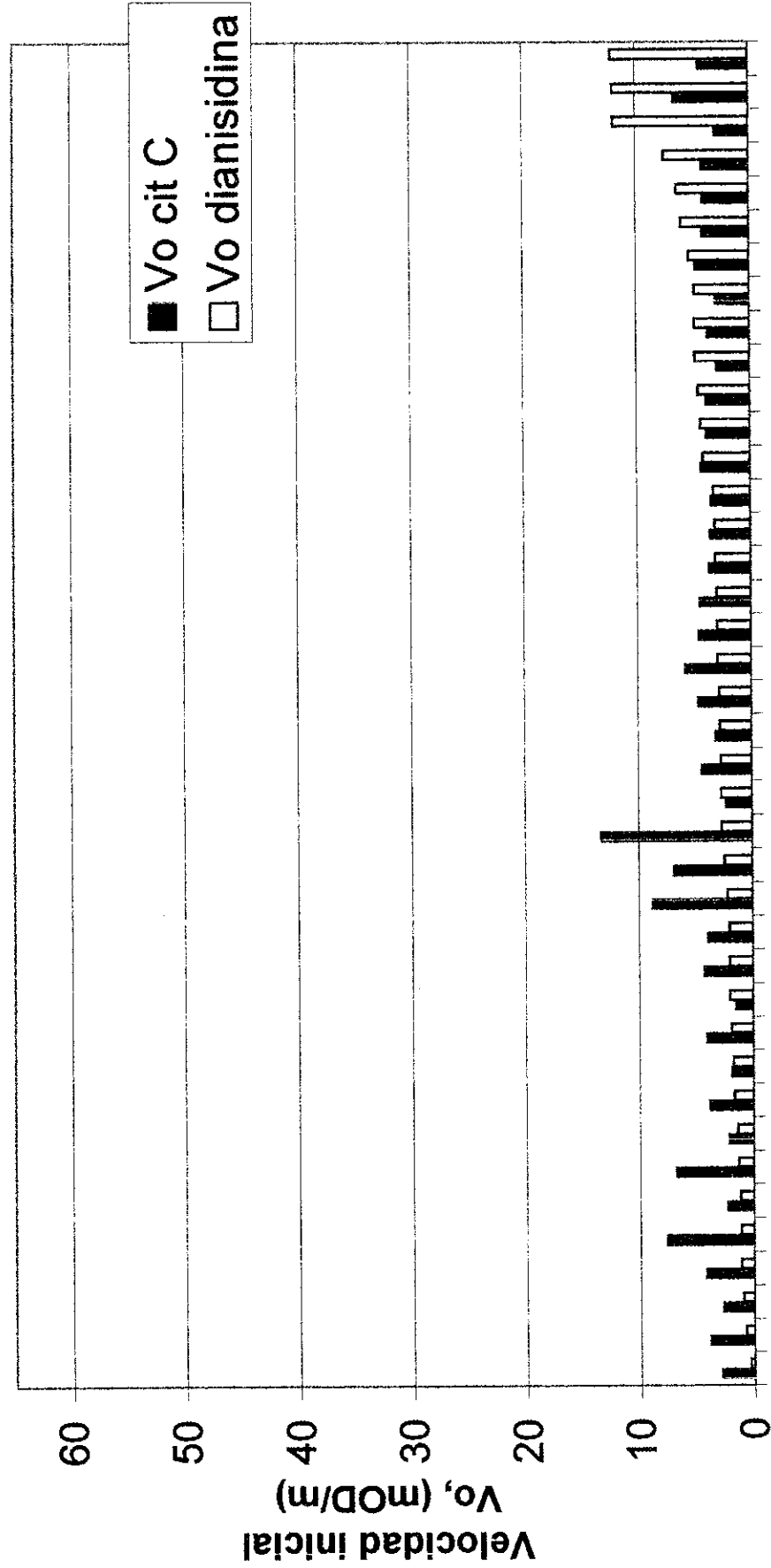
Actividad enzimática de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa por mosquito en *Anopheles albimanus*, de la población Puente Blanco (A)



mosquito

Gráfica 4

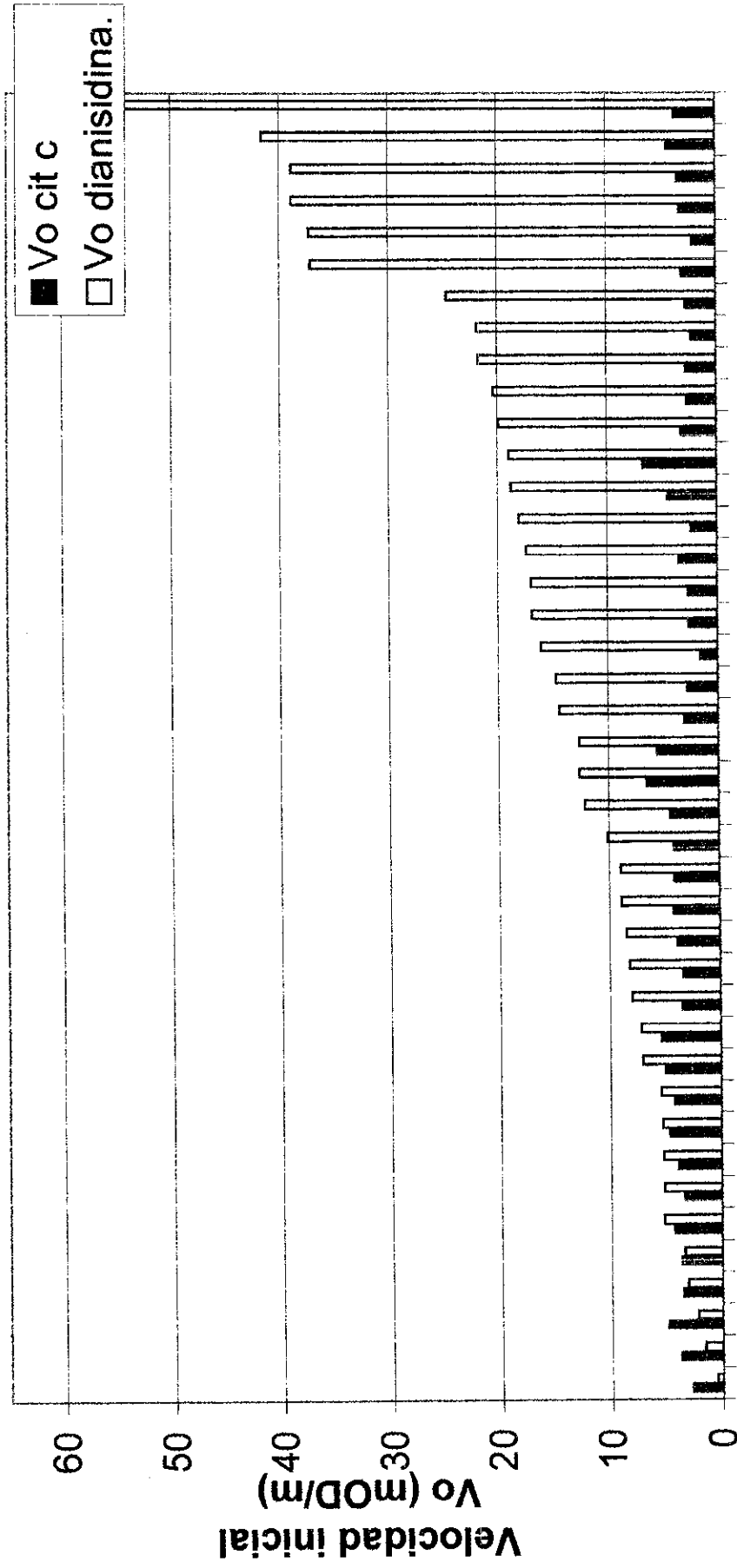
Actividad enzimática de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa en *Anopheles albimanus*, de la población Nahuá Amates.



mosquito

Gráfica 5

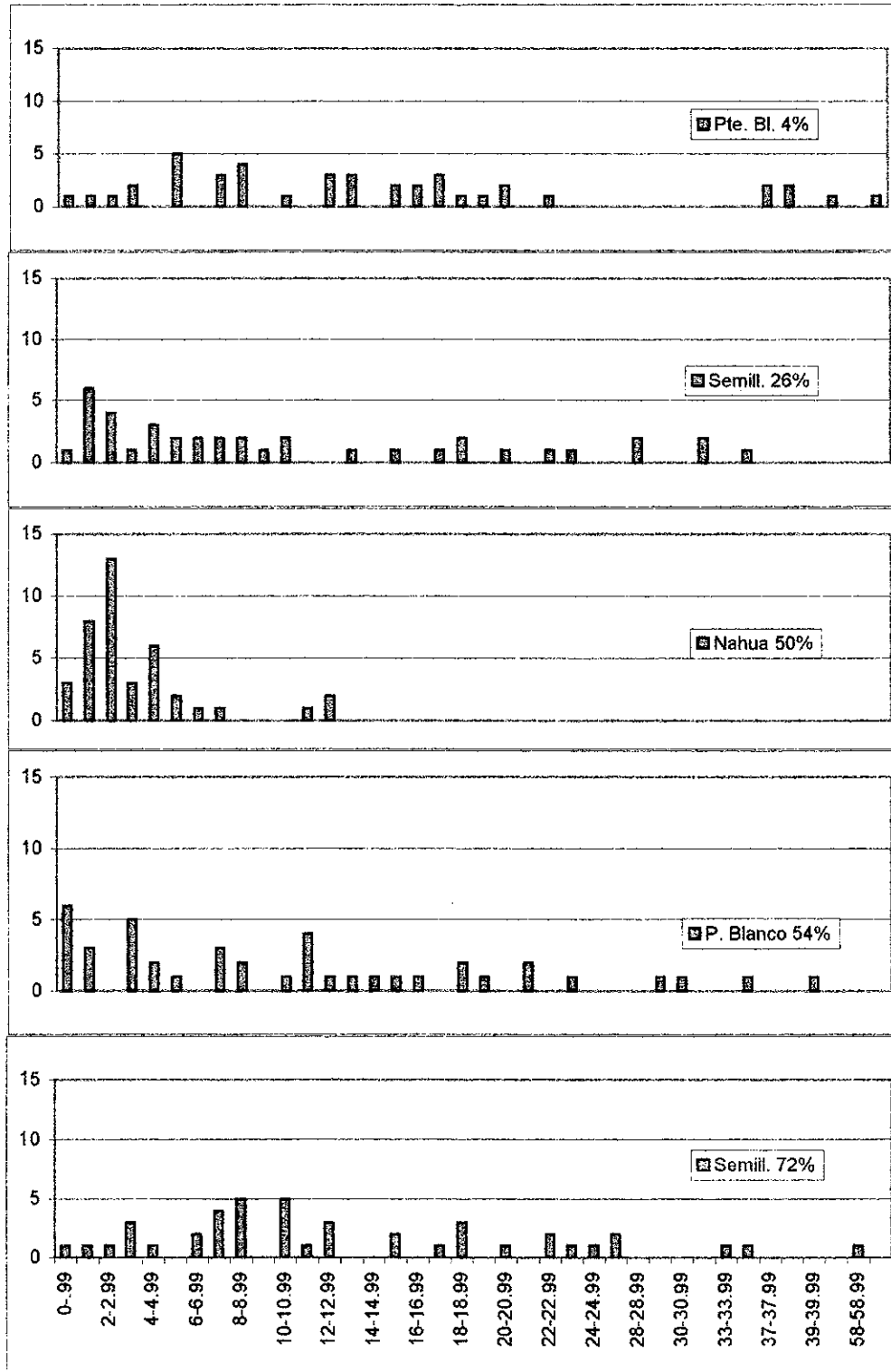
Actividad enzimática de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa en *Anopheles Albimanus*, de la población Puente Blanco (B)



mosquito

Gráfica 6

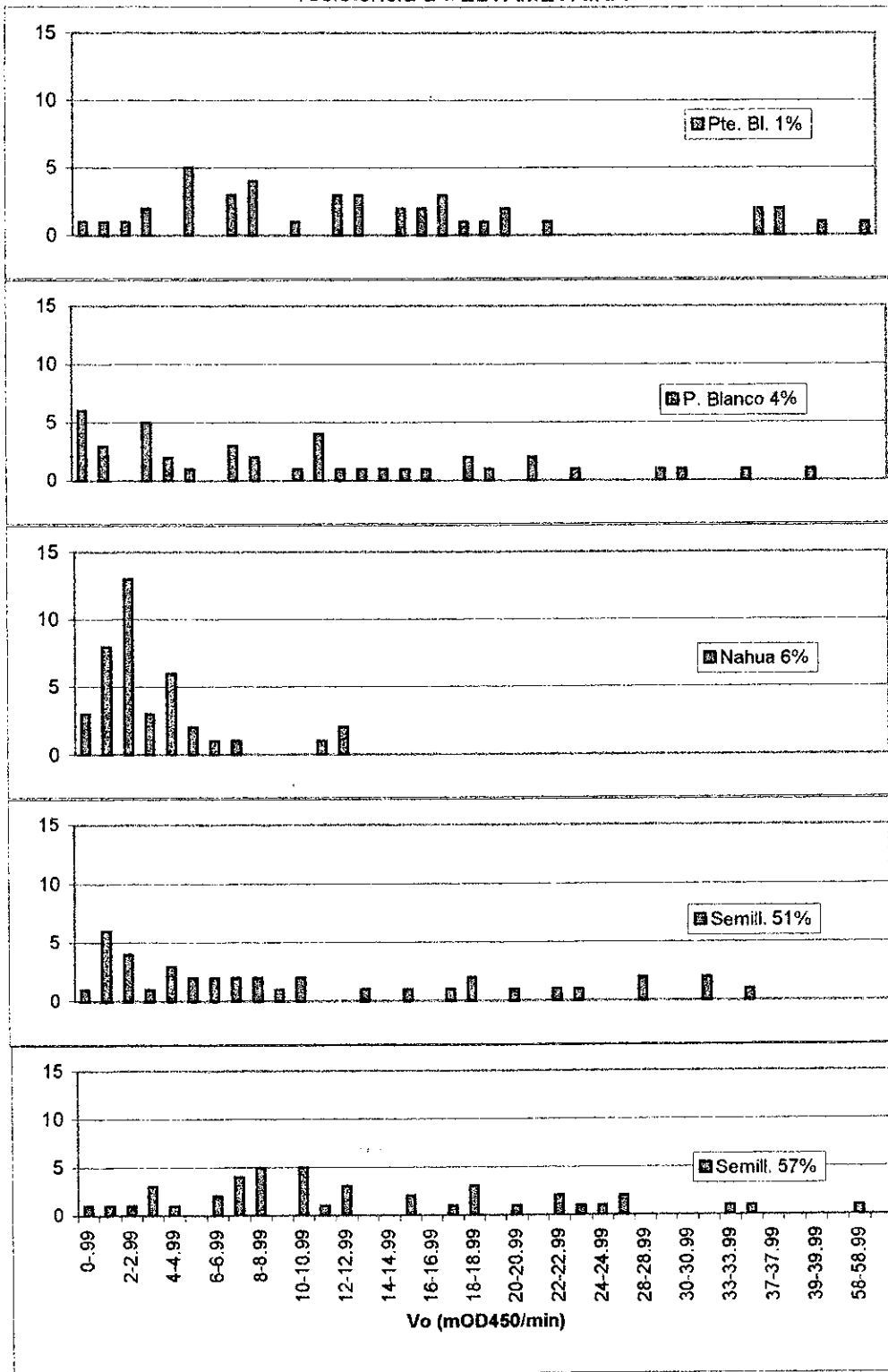
Distribución de frecuencias de actividad de peroxidasas en las poblaciones con diferente resistencia a PERMETRINA



El cuadro que aparece dentro de la gráfica corresponde a la resistencia de la población a permetrina según bioensayos de la OMS.

Gráfica 7

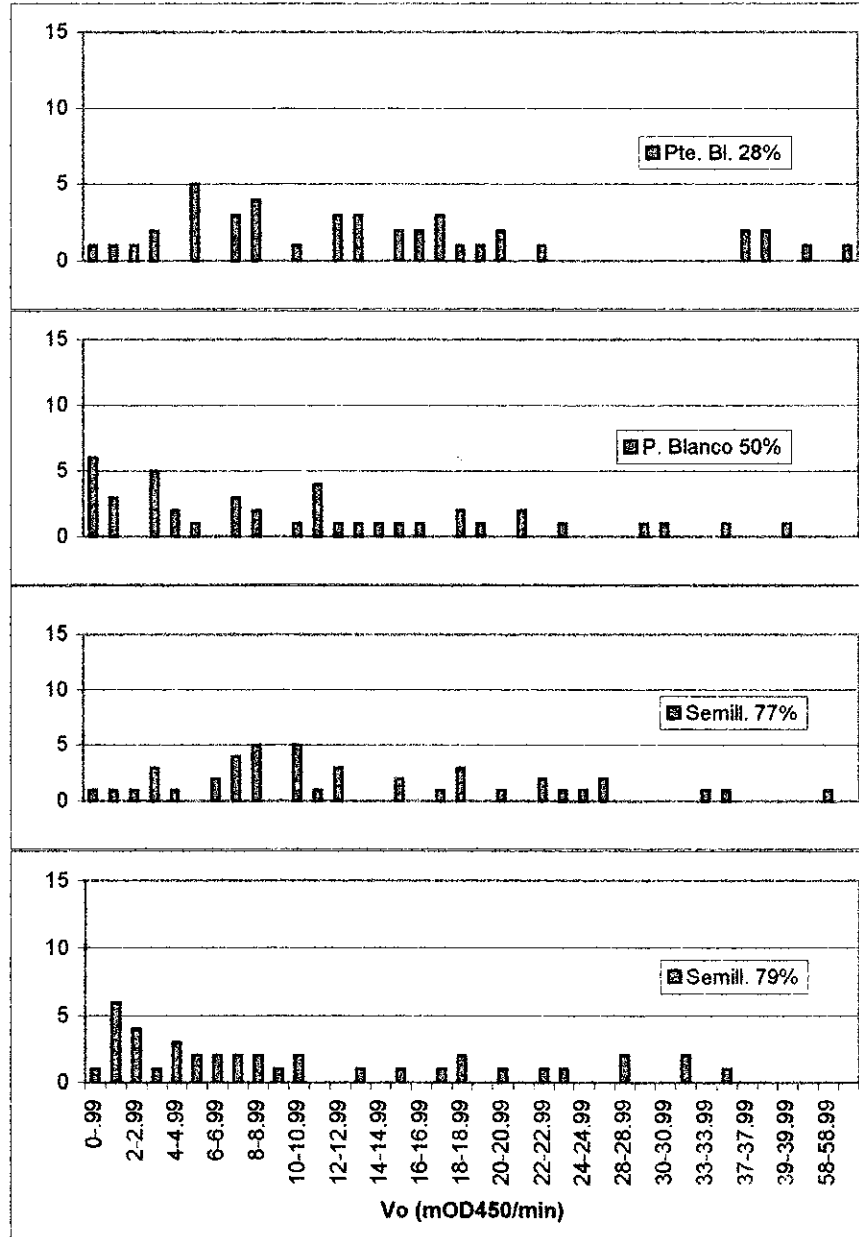
Distribución de frecuencias de actividad de peroxidasa en las poblaciones con diferente resistencia a DELTAMETRINA



El cuadro que aparece dentro de la gráfica corresponde a la resistencia de la población a deltametrina según bioensayos de la OMS.

Gráfica 8

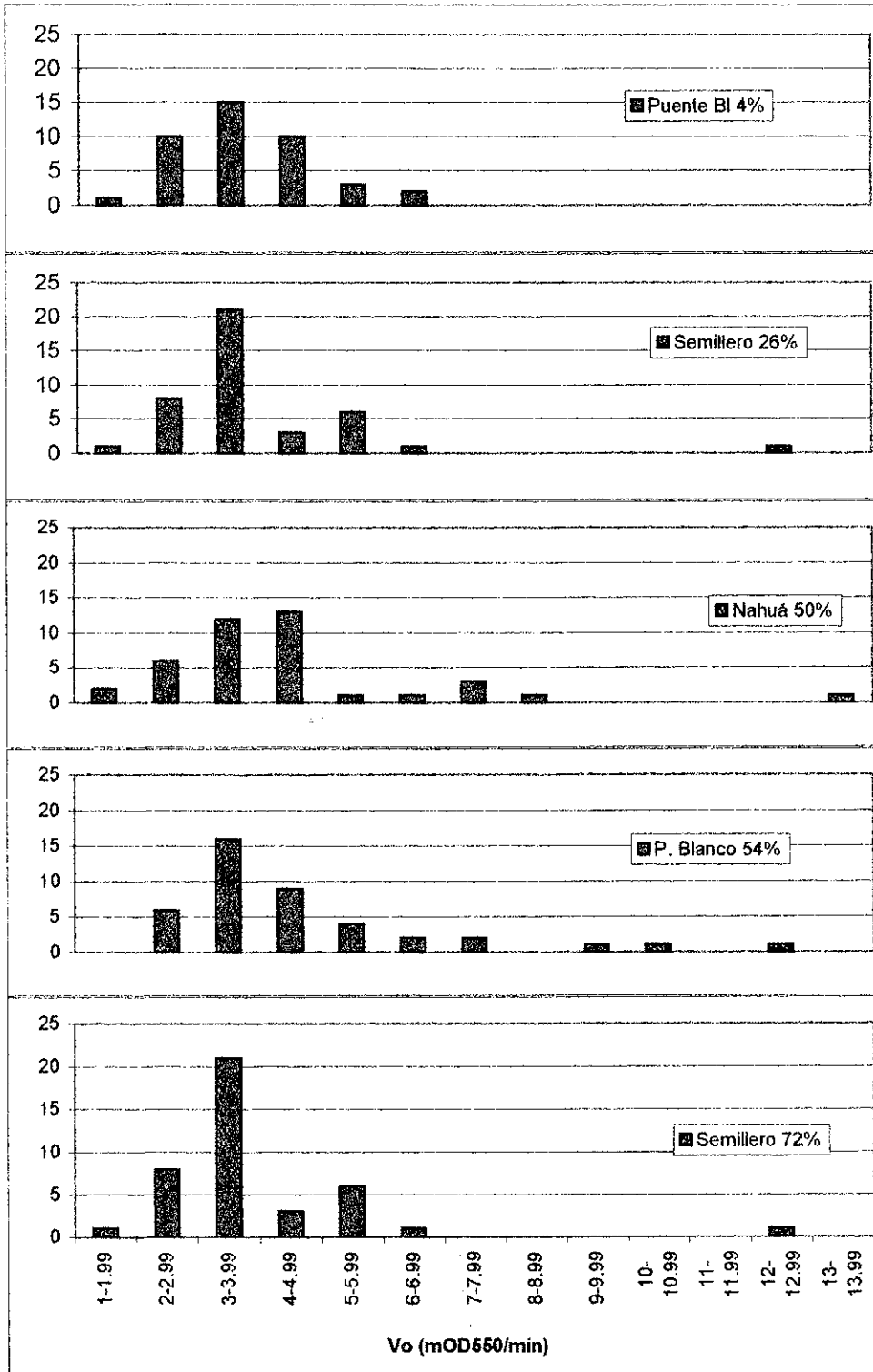
Distribución de frecuencias de actividad de peroxidasas en las poblaciones con diferente resistencia a FENITROTION



El cuadro que aparece dentro de la gráfica corresponde a la resistencia de la población a fenitrotión según resultados en bioensayos de la OMS.

Gráfica 9

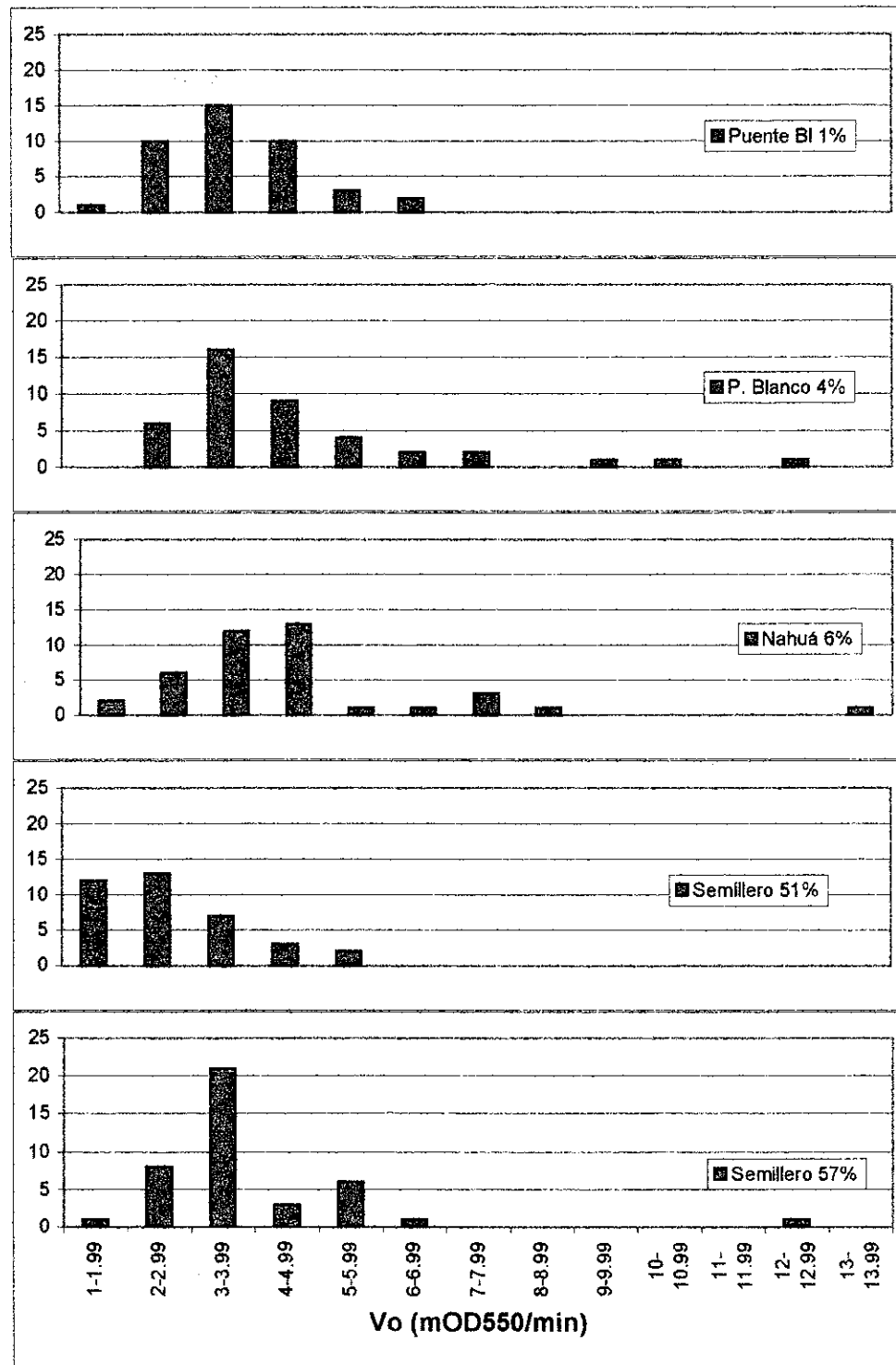
Distribución de frecuencias de Actividades de NADPH citocromo C reductasa en las poblaciones con diferente resistencia a PERMETRINA



El cuadro que aparece dentro de la gráfica corresponde a la resistencia de la población a permetrina, según resultados en bioensayos de la OMS

Gráfica 10

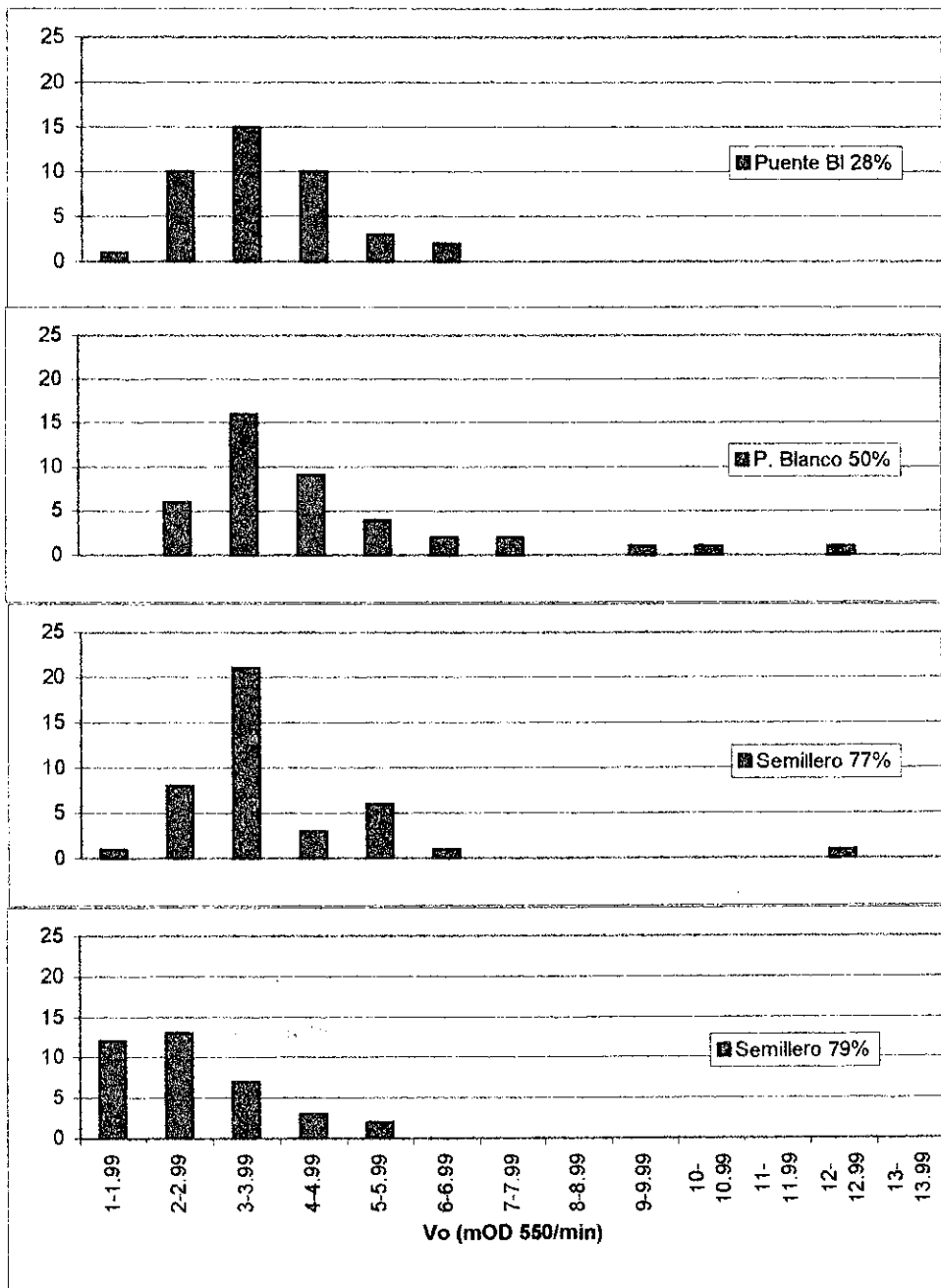
Distribución de frecuencias de Actividades NADPH de citocromo C reductasa en las poblaciones con diferente resistencia a DELTAMETRINA



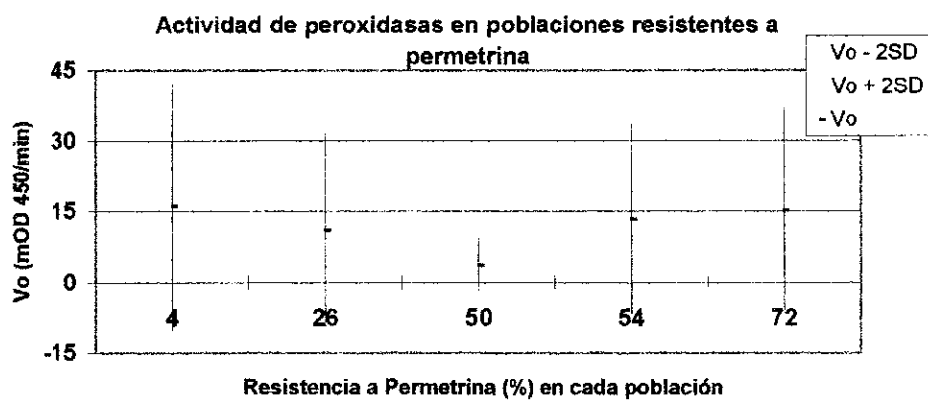
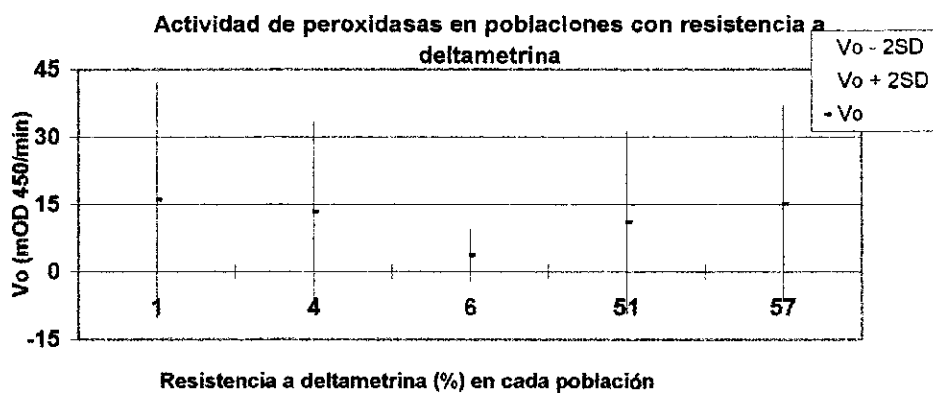
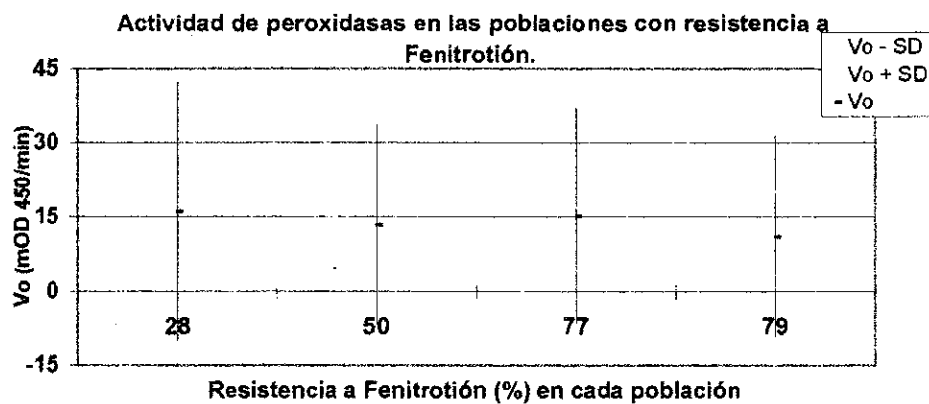
El cuadro que aparece dentro de la gráfica corresponde a la resistencia de la población a deltametrina según resultados en bioensayos de la OMS.

Grafica 11

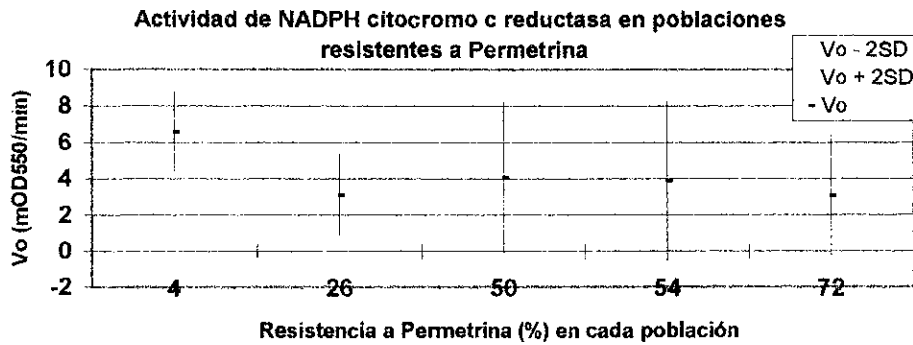
Distribución de frecuencias de Actividades NADPH de citocromo C reductasa en las poblaciones con diferente resistencia a FENITROTION



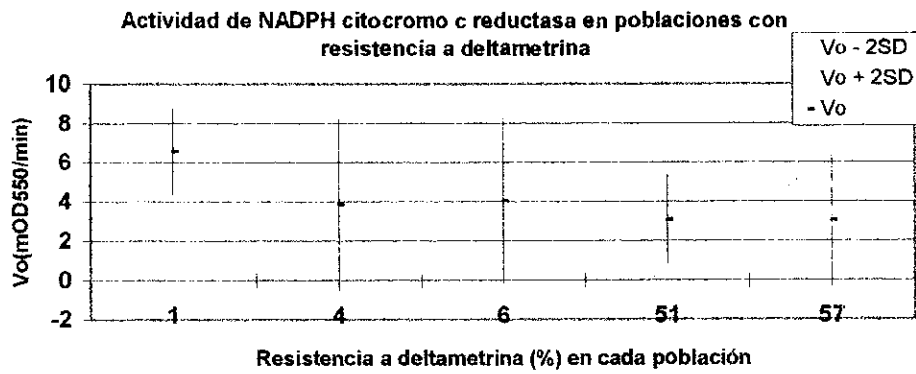
El cuadro que aparece dentro de la gráfica corresponde a la resistencia de la población a fenitrotión según resultados en bioensayos de la OMS.

Gráfica 12**Gráfica 13****Gráfica 14**

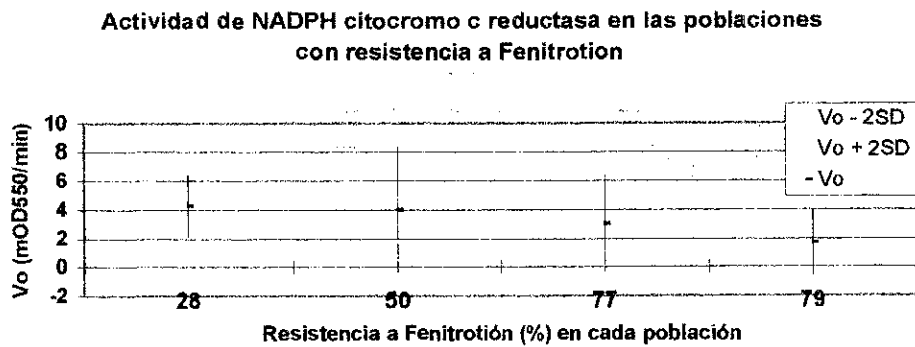
Gráfica 15



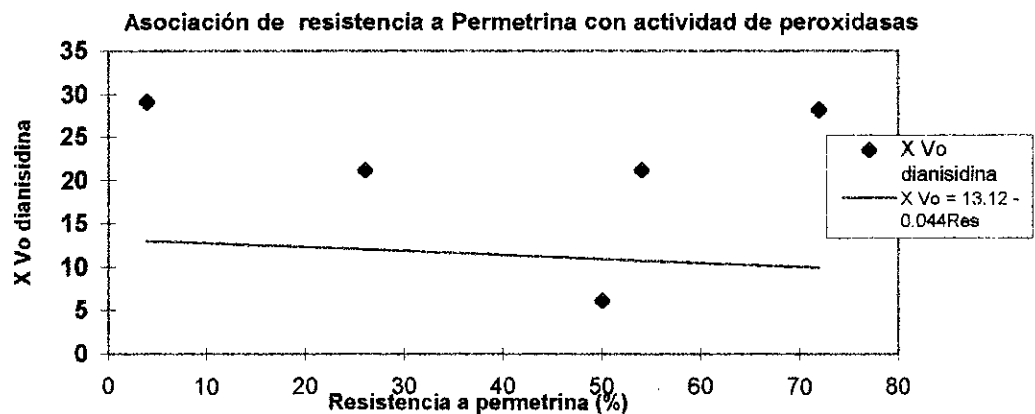
Gráfica 16



Gráfica 17



Gráfica 18



PERMETRINA

Estadística de Regresión

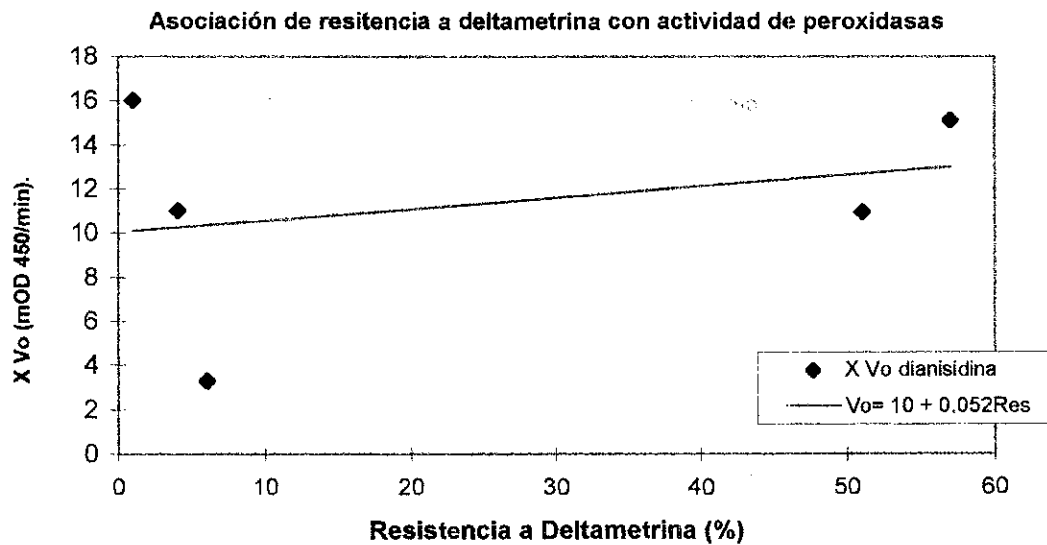
R múltiple	0.23486
R cuadrado	0.05516
Ajuste de R cuadrado	-0.25979
Error Estándar	5.63457
Observaciones	5

ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regresión	1	5.5601	5.5601	0.1751	0.7037
Residuo	3	95.2451	31.7484		
Total	4	100.8052			

	<i>Coefficientes</i>	<i>STDV</i>	<i>t Stat</i>	<i>Valor P</i>	<i>Bajo 95%</i>
Intercepto	13.12438	5.05604	2.59578	0.08067	-2.96620
R permetrina	-0.04452	0.10639	-0.41849	0.70374	-0.38311

Gráfica 19



DELTAMETRINA

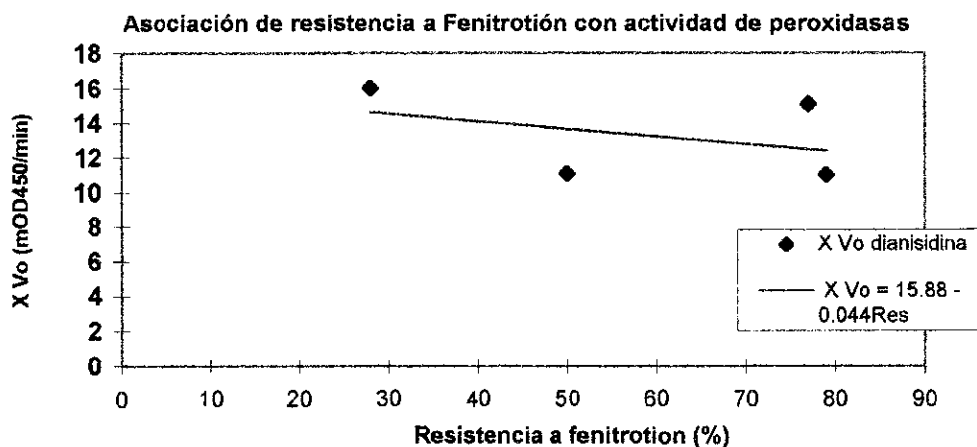
<i>Estadística de Regresión</i>	
R múltiple	0.28461044
R cuadrado	0.08100311
Ajuste de R cuadrado	-0.22532919
Error Estándar	5.55696757
Observaciones	5

ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significancia F</i>
Regresión	1	8.165534	8.165534	0.264429	0.642576242
Residuo	3	92.63967	30.87989		
Total	4	100.8052			

	<i>Coefficientes</i>	<i>STDV</i>	<i>t Stat</i>	<i>Valor P</i>	<i>Bajo 95%</i>	<i>Alto 95%</i>
Intercepto	10.0627	3.4456	2.9205	0.0615	-0.9027	21.0281
R deltametrina	0.0516	0.1003	0.5142	0.6426	-0.2676	0.3707

Gráfica 20

**FENITROTION***Estadística de Regresión*

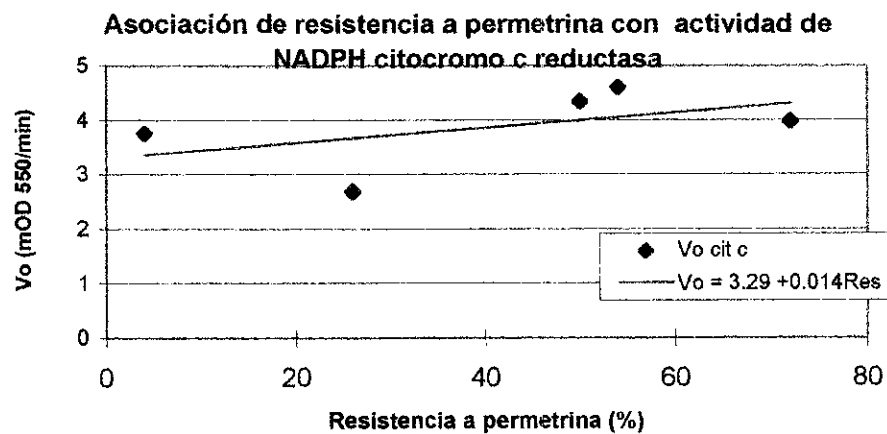
R múltiple	0.40483
R cuadrado	0.16389
Ajuste de R cuadrado	-0.25416
Error Estandár	2.96448
Observaciones	4

ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significancia F</i>
Regresión	1	3.445258	3.445258	0.392034	0.595165056
Residuo	2	17.57634	8.788171		
Total	3	21.0216			

	<i>Coefficientes</i>	<i>STDV</i>	<i>t Stat</i>	<i>Valor P</i>	<i>Bajo 95%</i>	<i>Alto 95%</i>
Intercepto	15.88461	4.38599	3.62167	0.06850	-2.98679	34.75600
R fenitrotión	-0.04418	0.07056	-0.62613	0.59517	-0.34779	0.25943

Gráfica 21



PERMETRINA

Estadística de Regresión

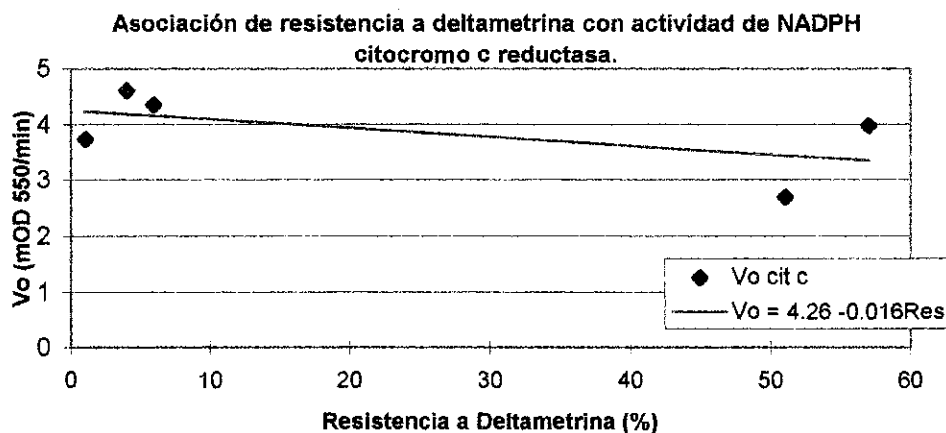
R múltiple	0.50302
R cuadrado	0.25303
Ajuste de R cuadrado	0.00404
Error Estándar	0.73957
Observaciones	5.00000

ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significancia F</i>
Regresión	1	0.55583	0.55583	1.01621	0.38768
Residuo	3	1.64089	0.54696		
Total	4	2.19672			

	<i>Coefficientes</i>	<i>STDV</i>	<i>t Stat</i>	<i>Valor P</i>	<i>Bajo 95%</i>	<i>Alto 95%</i>
Intercepto	3.29602	0.66363	4.96661	0.01568	1.18403	5.40800
X Variable 1	0.01408	0.01396	1.00807	0.38768	-0.03036	0.05852

Gráfica 22



DELTAMETRINA

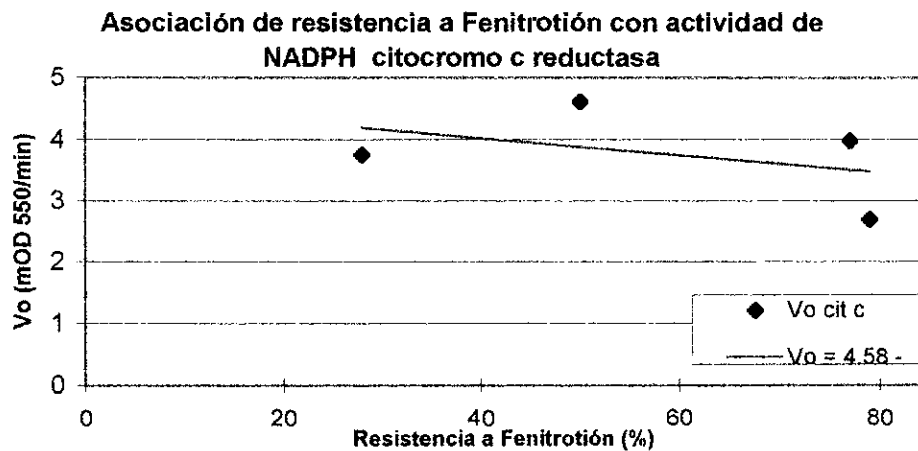
<i>Estadística de Regresión</i>	
R múltiple	0.59543
R cuadrado	0.35454
Ajuste de R cuadrado	0.13938
Error Estandár	0.68748
Observaciones	5

ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significancia F</i>
Regresión	1	0.77882	0.77882	1.64783	0.28942
Residuo	3	1.41790	0.47263		
Total	4	2.19672			

	<i>Coefficientes</i>	<i>STDV</i>	<i>t Stat</i>	<i>Valor P</i>	<i>Bajo 95%</i>	<i>Alto 95%</i>
Intercepto	4.25503	0.42627	9.98193	0.00214	2.89843	5.61162
X Variable 1	-0.01593	0.01241	-1.28368	0.28942	-0.05541	0.02356

Gráfica 23



FENITROTION

Estadística de Regresión

R múltiple	0.42622
R cuadrado	0.18166
Ajuste de R cuadrado	-0.22751
Error Estándar	0.88539
Observaciones	4.00000

ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significancia F</i>
Regresión	1	0.348043	0.348043	0.44398	0.573780826
Residuo	2	1.567832	0.783916		
Total	3	1.915875			

	<i>Coefficientes</i>	<i>STDV</i>	<i>t Stat</i>	<i>Valor P</i>	<i>Bajo 95%</i>	<i>Alto 95%</i>
Intercepto	4.57899	1.30994	3.49556	0.07299	-1.05725	10.21523
X Variable 1	-0.01404	0.02107	-0.66632	0.57378	-0.10472	0.07663

74
75

100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200

VI. DISCUSION

A. Consideraciones metodológicas:

1. Manejo de muestras

El ensayo se practicó al usar solamente la cabeza y el tórax de los mosquitos. El abdomen no se empleó para el análisis, por haberse encontrado en estudios preliminares trazas de sangre. La presencia de sangre en el abdomen tuvo como consecuencia un aumento significativo en la actividad enzimática reportada por el ensayo con *o*-dianisidina. En efecto, tal como puede verse en el anexo 1, los extractos que incluían el abdomen de los mosquitos, presentan una actividad de tres a cuatro veces mayor que la observada con los extractos de cabeza y tórax. De acuerdo con Stryer (1991), la hemoglobina y los productos del catabolismo de ésta pueden degradar el peróxido de hidrógeno en presencia de un agente reductor. Esta actividad se debe probablemente a la presencia del grupo hemo, muy cercano en su estructura al grupo hemo catalítico presente en las peroxidasas. Los extractos de algunos mosquitos enteros presentaban una coloración rojiza, sugiriendo contaminación por la presencia de sangre en el tracto digestivo. Con el objeto de determinar el grado de importancia del efecto de la sangre en el ensayo de peroxidasas debido a la presencia del grupo hemo de la hemoglobina, se realizó una prueba de confirmación. Dicha prueba consistió en alimentar con sangre unos mosquitos del insectario de la unidad de Entomología Médica (UVG), para luego efectuar el ensayo de peroxidasas bajo las mismas condiciones empleadas anteriormente. Los resultados obtenidos fueron similares a los encontrados con los mosquitos que se supusieron contaminados por simple observación.

Gracias a los análisis preliminares efectuados para determinar el efecto de la contaminación con sangre, se descartó el uso del abdomen en los ensayos para peroxidasas. En efecto, el empleo del abdomen para la determinación de la actividad de peroxidasas presentaba cierto riesgo de contaminación. Usualmente antes de almacenar las poblaciones colectadas en el campo los mosquitos son alimentados únicamente con una solución de a sacarosa al 8% durante tres días. Esta exposición permite, teóricamente, que los mosquitos digieran la sangre que tienen en su tracto gastrointestinal en el momento de ser capturados. Sin embargo, dadas las observaciones anteriores, el tiempo de exposición empleado habitualmente no es suficiente en algunos casos.

La metodología propuesta inicialmente fue alterada para los dos ensayos enzimáticos utilizados. Para el ensayo de **peroxidasas** se modificó tanto el volumen de reacción como el buffer de extracción. En el método propuesto por Riveiro (1991), el volumen final de lectura es de 100µl. Se optó por usar 250µl de volumen final para la reacción, puesto que no se contaba con suficiente extracto puro para efectuar por duplicado los dos ensayos con cada individuo. Por ello, se hizo una dilución de los extractos de mosquitos 1:7. Este aumento en la dilución fue suficiente para realizar los dos ensayos en duplicado para cada muestra. Sin embargo, como consecuencia de la dilución del extracto, fue necesario aumentar el volumen de extracto agregado a la mezcla de reacción con el fin de lograr una respuesta cuantificable en ambos ensayos. Debe notarse que, no obstante esta dilución, las concentraciones finales de los reactivos, sugeridas por Riveiro (1991) fueron conservadas.

2. Principios enzimáticos

Los cambios efectuados al buffer de extracción consistieron en: a) se usó buffer HEPES en lugar del buffer de fosfatos propuesto en el método de Riveiro (1991); b) se agregó EDTA. La principal razón para cambiar las sales del buffer de extracción es la comprobación de que, tal como

indica Riveiro (1991), la o-dianisidina precipita en el buffer de fosfatos. Existía la posibilidad de utilizar un buffer de extracción diferente y luego agregar buffer HEPES para efectuar el ensayo de o-dianisidina (Riveiro, 1991). Sin embargo, este procedimiento hubiera tenido como consecuencia la dilución de la muestra a niveles que posiblemente impedirían la cuantificación de la actividad de peroxidasas. La dilución excesiva de la muestra podría compensarse con la adición de una mayor cantidad de extracto a la mezcla de reacción. Sin embargo, ésta no fue una alternativa viable, ya que el volumen final de la mezcla superaba la capacidad de los pozos de la placa de ELISA. El EDTA se empleó para inhibir las proteasas presentes en el extracto, de manera que no mermaran las actividades enzimáticas a determinar. Por último, se recomienda usar buffers de Good para la extracción de enzimas, pues no poseen un nivel alto de carga iónica y salinidad. Entre esta clase de buffers se encuentra el HEPES.

Por otro lado, el ensayo de **NADPH citocromo c reductasa** se realizó con el extracto original usado para la dilución del ensayo de Peroxidasas. La razón por la que no se diluyó fue que se obtenía una respuesta muy baja en la lectora de ELISA y no distinguía actividades enzimáticas entre mosquitos. Para aumentar la respuesta, también se modificó la concentración del sustrato, citocromo c, aumentándolo en un 50% (0.633mg/ml en vez de 0.420mg/ml en mezcla de lectura). Con estas modificaciones se logró obtener valores discriminantes de actividad enzimática entre mosquitos.

Al comparar los resultados de actividades enzimáticas (Gráficas 1-5) se pudo observar que el sistema NADPH citocromo c reductasa presentó un cambio de absorbancia por minuto (mOD/min), en promedio menor. Esta variación se pudo deber al uso de lecitina en el ensayo, que provocaba cierto grado de turbidez. Este compuesto es requerido para que la enzima adopte la conformación necesaria para catalizar la reacción; por ser una enzima de membrana es imprescindible. Al existir

esta turbidez en la celda de reacción el cambio en absorbancia por la aparición del citocromo c reducido no era tan significativo como si existiera en una solución clara.

De la misma manera en que la adición del fosfolípido lecitina es indispensable para la medición de la actividad enzimática de la NADPH citocromo c reductasa, es muy probable que existan otros factores importantes que de los cuales depende la actividad. Por consiguiente, se deben tener consideraciones adicionales al escoger el método ideal para la extracción de esta enzima. Las modificaciones más simples podrían incluir la adición de un compuesto que disminuyera la polaridad del medio. Esta modificación limitaría el uso del extracto a la determinación de la actividad de unas pocas enzimas, disminuyendo su potencia como método para la vigilancia de resistencia a insecticidas. En efecto, uno de los objetos del empleo de métodos bioquímicos como indicadores de resistencia es, precisamente, la posibilidad de evaluar los mismos mosquitos al usar varias pruebas asociadas con resistencia a insecticidas.

Debido a las consideraciones anteriores, se practicó el ensayo de NADPH citocromo c reductasa al usar el homogeneizado de mosquitos sin algunas modificaciones que podrían haber aumentado su sensibilidad, a expensas de la posibilidad de realizar otras pruebas útiles, como la electroforesis de esterases. El hecho de que el pH óptimo para la reacción catalizada por la NADPH citocromo c reductasa difiera en una unidad del pH del buffer de extracción pudo ser otra causa de la actividad tan baja encontrada inicialmente. No obstante, el cambio del pH del extracto tendría el impacto similar al que tendría la adición de un compuesto que redujera la polaridad del medio.

Debe considerarse también que el ensayo para NADPH citocromo c reductasa se hizo al emplear un homogeneizado del mosquito, cuando usualmente se utilizan los extractos microsomaes para ello. Esto es, se procede a una purificación de la enzima previo a la determinación de la actividad. Esta modificación se hizo porque de encontrarse alguna asociación con la resistencia a

insecticidas y el ensayo bajo estas condiciones, el costo del método disminuiría en tiempo y reactivos. Además, de hacerse el extracto microsomal, sería preferible medir la concentración de citocromo P450, más estudiado en la depuración de xenobióticos en insectos.

B. Relación entre actividad de peroxidasas y NADPH citocromo c reductasa

Como puede verse en las gráficas 1-5, no existe ninguna asociación entre las actividades de la NADPH citocromo c reductasa y de las peroxidasas. Esto indica que al menos estos dos ensayos miden diferentes sistemas, y sus determinaciones no interfieren entre sí. En la única población en la que los valores de actividad enzimática de los dos sistemas son similares es en Nahuá, Amates. Es posible que esta diferencia se deba a un factor externo no controlado, o que dependa de la población en sí. Tal es el caso de la edad de los mosquitos, su previa exposición a insecticidas, o una diferencia fenotípica establecida entre esta población y las otras analizadas. Sin embargo, esta aseveración es tan incierta como inferir que esta diferencia se debe a la degradación de enzimas durante el almacenamiento.

C. Distribución de actividades enzimáticas entre poblaciones:

En las gráficas 6-11 se puede ver el comportamiento de las poblaciones conforme aumenta la resistencia a cada insecticida. Las distribuciones de frecuencia de actividad de peroxidasas en las poblaciones no muestran un comportamiento similar (gráficas 6-8). Esto confirma nuevamente, que existe gran variación entre las poblaciones. Lejos de simular distribuciones normales, se encuentran muchas variaciones entre ellas. Así, no solamente se encuentran diferencias entre poblaciones sino dentro de los grupos.

De haber encontrado una asociación entre resistencia a algún insecticida y actividad de peroxidasa, se habría observado un desplazamiento de las distribuciones en el eje x de izquierda a derecha. Esto indicaría que a medida que aumenta la señal al usar el método de o-dianisidina, aumenta la frecuencia de individuos que presentan mayor actividad enzimática. Por el contrario, los resultados muestran una distribución de actividad enzimática centrada a la izquierda, es decir, es independiente a la resistencia a insecticidas.

En el caso de NADPH citocromo c reductasa, las distribuciones de frecuencia en las poblaciones tienen el mismo comportamiento entre sí (gráficas 9-11). Por ser una enzima que interviene en la respiración celular, este patrón es esperado y por lo tanto, de encontrarse una asociación con resistencia a insecticidas sería imprescindible una purificación microsomal. Sin embargo se observa también en este sistema que todas las poblaciones, independientemente del porcentaje de resistencia se aglomeran hacia la izquierda. Como puede verse en resultados la variación en los valores de actividad de esta enzima no fue muy grande. Esta puede ser una de las razones por las que todas las poblaciones muestran el mismo comportamiento.

D. Relación entre actividad enzimática y resistencia a insecticidas; pruebas estadísticas.

Para poder evaluar estadísticamente el comportamiento de la actividad enzimática de cinco poblaciones y asociarlas a la resistencia a insecticidas, fue necesario obtener datos de bioensayos para cada una de ellas. Todas las poblaciones usadas para tratar de establecer relaciones de actividad enzimática y resistencia a insecticidas fueron evaluadas con al menos dos insecticidas: permetrina y deltametrina, los piretroides de interés por ser los de uso en Guatemala. Además se evaluaron las poblaciones contra un insecticida que es organofosforado: fenitrotión.

Según las gráficas 12-17, el promedio de la actividad enzimática de las poblaciones usadas no está asociado a su porcentaje de resistencia a insecticidas tanto para peroxidasas (gráficas 12-14), como para NADPH citocromo c reductasa (gráficas 15-17). Como puede verse, los rangos en los que se distribuye 90% de la población ($X \pm 2 DS$) se sobreponen entre poblaciones. También se observa que los promedios de cambio de absorbancia por minuto (mOD/min), de los grupos tienen una desviación estándar menor, en varios casos, que las desviaciones estándar de las poblaciones mismas. Este resultado sostiene que hay gran variabilidad de actividad enzimática de los dos sistemas enzimáticos evaluados dentro de los grupos de mosquitos. Otra interpretación de estos resultados es que existe una gran diversidad dentro de los grupos susceptibles y resistentes. Es importante notar que los valores de actividad enzimática usados son promedio de una población de 40 individuos. Estadísticamente este número de ensayos es buen representante del comportamiento de una población. De acuerdo al teorema del límite central cuando el número de casos evaluados respecto de una variable es mayor a 32, el comportamiento tiende a ser el de la población.

Una prueba estadística utilizada para determinar si hay relación entre dos variables, es el índice de correlación. Al hacer una línea de regresión al utilizar el método de mínimos cuadrados entre resistencia a insecticidas y actividad de peroxidasas y citocromo c reductasa, observamos que no existe correlación entre la actividad enzimática y porcentaje de resistencia a insecticidas (ver gráficas 18-23). En el caso de los piretroides, se encontró que solamente 5.5% de los individuos se acercan al modelo de una línea recta ($r^2=0.055$). Además, su valor de significancia al hacer una prueba de ANOVA fue de 0.7037, indicando que existe un 70% de probabilidad de equivocarse si se rechaza la hipótesis de que el promedio de actividad enzimática en las poblaciones susceptibles es igual al promedio de la actividad enzimática en la población de mosquitos resistentes. Los mismos parámetros evaluados para deltametrina nos dan valores de $r^2=0.081$ y un valor de significancia de 0.6425, por lo que es válido concluir que tampoco existe relación entre actividad enzimática de peroxidasas y resistencia a deltametrina. Por otra parte, aunque no se encontró una dependencia

entre actividad de peroxidasas con resistencia a fenitrotión se observa una asociación importante. El mecanismo de acción de este insecticida involucra una modificación que inicialmente da lugar al fenitroxón. Aquellos organismos que logran modificar al fenitrotión son los que se intoxican. Curiosamente se observa en la gráfica 20 que hay una tendencia de menor actividad de peroxidasas en las poblaciones más resistentes. Aunque la gráfica muestra coincidencia con los mecanismos reportados en la literatura, se recomendaría hacer estudios con más poblaciones, pues para este caso, el comportamiento se basa en cuatro grupos de mosquitos.

Al igual que en peroxidasas, el sistema NADPH citocromo c reductasa no se encontró asociado con resistencia a insecticidas. Sin embargo los valores de r^2 son mayores en todas las relaciones al compararlos con los encontrados con peroxidasas. En el caso de asociación de NADPH citocromo c reductasa con resistencia a permetrina se encontró un índice de correlación de 0.3545. Este resultado también se podría interpretar como que 35% de la resistencia a permetrina es por la variable analizada. Sin embargo, aunque esta sea la interpretación del método no es recomendable para la vigilancia en la resistencia a piretroides por las razones anteriormente expuestas.

Como es de esperarse, el índice de significancia disminuyó. Pero no llega a los valores esperados de $P=0.005$; se obtuvo un $P= 0.2894$. En las gráficas 21 y 23 pueden verse los resultados obtenidos para la asociación entre este sistema y la resistencia a fenitrotión o deltametrina. Tampoco se obtuvieron los resultados esperados. La causa por la que se pudo haber obtenido una mejor correlación en este sistema enzimático que en el de peroxidasas es la poca variación relativa que había entre los datos de las poblaciones.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los residuos de sangre en el abdomen de los mosquitos aumentan la actividad de peroxidasas de estos. Por lo que es necesaria su escisión antes del análisis en microplaca.

Para obtener resultados más exactos de la asociación de la actividad de NADPH citocromo c reductasa respecto de la resistencia a insectidas, es necesario un estudio que incluya la purificación microsomal previa al análisis.

No se encontró asociación entre la actividad de peroxidasas y el porcentaje de resistencia a los piretroides permetrina y deltametrina.

No se encontró asociación entre la actividad de peroxidasas y el porcentaje de resistencia a fenitrotión.

No se encontró asociación entre la actividad de NADPH citocromo c reductasa y el porcentaje de resistencia a permetrina ni deltametrina.

No se encontró asociación entre la actividad de NADPH citocromo c reductasa y el porcentaje de resistencia a fenitrotión.

Se recomienda continuar la investigación de inducción de enzimas detoxificantes en *An. albimanus* para caracterizar los tipos de citocromo P450 involucrados en la depuración de piretroides.

Si se lleva a cabo el estudio con enzimas detoxificantes, se recomienda hacer uso de esa información para buscar un marcador molecular asociado con una característica del citocromo P450.

IX. LITERATURA CITADA

- Barman, T.(ed). Enzyme Handbook. Vol. I. Springer-Verlag New York. 1969 (reimpreso 1985). 1-499pp.
- Beach, R.F., Brogdon, W.G., Castañaza, L.A., Córdón-Rosales, C. and Calderón, M. Effect of temperature on an enzyme assay to detect fenitrothion resistance in *Anopheles albimanus* mosquitos. *Bulletin of the World Health Organization*. 1989. 67(2): 203-208pp.
- Beaty, B., Marquardt, W. (ed) The biology of disease vectors. University Press of Colorado, Colorado. 1996.632pp.
- Beeman, R. Recent advances in mode of action of insecticides. *Annual Review of Entomology*. 1982. Vol 27: 538-581
- Breeland, S. Studies on the diurnal resting habits of *Anopheles albimanus* and *a Pseudopunctipennis* in El Salvador. *Mosquito News* 1972. Vol 32 (1): 99-106
- Brogdon, W. Biochemical Resistance Detection: An alternative to Bioassay. *Parasitology Today*. 1989. Vol. 5 (2): 56-60.
- Brogdon, W.G.; Barber, A.M. Fenitrothion-deltmethrin cross-resistance conferred by esterases in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1990. 37: 130-139.
- Brogdon, W.G., Beach, R.F., Barber, A.M. and Córdón-Rosales, C. A generalized approach to detection of organophosphate resistance in mosquitoes. *Medical and Veterinayr Entomology*. 1992 (6): 110-114pp.
- Brown, T. Brogdon, W. Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. *Ann. Rev. Entomol.* 1987. Vol 32:145-162pp

Cantarow, A. Schepartz, B. Biochemistry. 3a. ed. Saunders Co Philadelphia, 1962.. 938pp.

Casida, J. Mixed Function Oxidase Involvement in the Biochemistry of Insecticide Synergists. *J. of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 18. 1970. 753-772pp

Cordón-Rosales, C., Beach, R.F., and Brogdon, W.G. Field evaluation of methods for estimating carbamate resistance in *Anopheles albimanus* mosquitos from a microplate assay for insensitive acetylcholinesterase. *Bulletin of World Health Organization*. 1990. 68(3): 323-329pp.

Deutscher, Murray. Maintaining Protein Stability Tomado de Methods in enzymology, Vol. 182. Academic Press, U.S.A 1990. 83-89pp.

Devonshire, A.L. "The role of electrophoresis in the biochemical detection of insecticide resistance" tomado de Electrophoretic studies on agricultural pests. *Sistematic Association Special Volume No. 39*. Clarendon Press, Oxford 1989 363-374 pp.

Devonshire, A.L. "Biochemical and DNA probing techniques for monitoring insecticide resistance genes..." Tomado de Pesticides and alternatives, Elsevier Science Publishers B.V. 1990. 421- 431PP

Dixon, M; Webb, E. Enzymes. 3rd. ed. Academic Press. 1979. New York. 1116pp.

Feyereisen, R ; Koener, J.F., Cariño, F.A. "Biochemistry and molecular biology of insect cytochrome P450." tomado de Molecular Insect Science Plenum Press, New York 1990. pág. 263-272 (el editor del libro es H.H> Hagedorn

Hataffi, Y. ; Stiggall, D. Preparation and properties of NADH:cytochrome c oxidoreductase (complex I-III) Methods Enzymology. Vol. 53:5-10.

Harrison, G.. Mosquitoes, malaria and man "A history of the Hostilities since 1880"., E.P. Dutton. New York 314pp.

Hermes, W.B. Medical entomology. The Macmillan Company. New York 1953. 643pp

- Hodgson, E.; Plapp, F. Biochemical Characteristics of Insect Microsomes. *J. of Agricultural Food Chemistry*. 1970, Vol. 18, No. 6, 1048-1055pp.
- Hodgson, E. The significance of cytochrome P-450 in insects *Insect Biochem.* 1983 Vol 13 (3): 237-246
- Hodgson, E. "Microsomal monooxygenases" Tomado de : In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, 1985. Oxford. Vol 11 pp 225-321.
- Hollenberg P.F. Mechanisms of cytochrome P450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism. *FASEB J.* 1992 Jan 6; 6(2): pag 686-694.
- Kidd, H.; Hartley, D. (ed.) Pesticide Index. "An Index of chemical, common and trade names of pesticides and related crop-protection products". 1988. Royal Society of Chemistry Copyright. 258pp
- Kulkarni, A.P.; Hodgson, E. The metabolism of insecticides: the role of monooxygenase enzymes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1984. Vol 24: 19-42 .
- Matsumura, F. Toxicology of Insecticides. 2nd. ed. Plenum Press, 1985. New York 598pp.
- Meyer, Bergen (ed.) Methods of enzymatic analysis. 2nd. ed. Verlag Chemie Academic Press. Vol I y II. 309-317pp
- Miller, T.A. Mechanism of resistance to pyrethroid insecticides. *Parasitology Today*. 1988. Vol e: S8- S12.
- PAHO. Biology and ecology of *Anopheles albimanus* Wiedmann in Central America. Technical paper no. 43. PAHO Regional Office of the WHO . Washington 1996. 44 pp
- Pratt, Harry, Darsie, R. & Littig, Kent. Mosquitoes of public health importance and their control. U.S. Department of health, education and welfare/Public health service/ center for disease and control. 1977

- Riveiro, J.; Nussvenzveig, R. The salivary catechol oxidase/oxidase activities of the mosquito *Anopheles albimanus*. *Journal of experimental Biology*. 1993. Vol. 179, 273-287pp
- Robert, et.al. DDT Global Strategies and a Malaria control crisis in South America. *J. Emerging Infectious Disease*. 1997. Vol 3(3) pp. 295-302.
- Rossomando, E. "Measurement of Enzyme Activity" tomado de Methods in enzymology, Vol. 182. Academic Press, U.S.A 1990, 39-49pp.
- Russell, Paul, et. al. Practical Malariology 2a. ed. London. 1963. Oxford University Press 750 pp
- Scott, J, Georghiou, G. Mechanisms Responsible for High levels of Permethrin Resistance in the House Fly. *Pesticide Sci.* Vol 17: 195-206.
- Terriere, L. ; Yu, S.J. The induction of detoxifying enzymes in insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1974. Vol 22 (3): 366-373
- Ware, G. The pesticide book. 4th. ed. Thompsons Publications. 1994. Fresno California. 3865pp
- WHO. Insecticide resistance and vector control: thirteenth report of the WHO Expert Comitee. Technical report Series Series No. 265 1963.
- WHO. Manual on practical entomology in malaria. Part II: methods and techniques. 1975. Geneva, WHO Offset Publication No. 13.
- WHO. Chemical methods for the control of arthropod vectors and pests of public health importance. World Health Organization. 1984 .Geneva
- WHO. The WHO recomend classification of pesticides by Hazrd & guidelines to classification 1988- 1989. Division of vector biology & control, WHO. 1989. Geneva.
- WHOa. Resistance of vectors and reservoirs of disease to pesticides. "Tenth report of the WHO Expert Comitee on Vector Biology and Control." World Health Organization, Geneva. 1986

WHO. WHO Expert Comitee on Malaria, eighteenth report. World Health Organization, Geneva.
1986. 104 pp

Wilkinson, C.F (ed). Insecticide Biochemistry and Physiology . Plenum Press, New York &
London.1985 768pp

Yamamoto, I. Mode of action of pyrethroids, nicotinoids and rotenoids. *Ann. Review of
Entomology.* 1970. 257-272pp

Zerba, E. Insecticidal Activity of pyrethroids on insects of medical importance. *Parasitology
Today.*Vol. 4. 1988.

