

UNIVERSIDAD DE PANAMA  
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO  
PROGRAMA DE MAESTRIA EN ENTOMOLOGIA

ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ACTIVIDAD DE LAS ESTERASAS  
A Y B ASOCIADAS CON LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS EN POBLACIONES DE *Anopheles albimanus*  
(*Diptera: Culicidae*).

Por: Licdo. Lorenzo Cáceres C.

Tesis presentada como uno de los requisitos para  
optar por el título de Maestro en Ciencias con  
Especialización Entomología Médica

Panamá, República de Panamá

1997

T.M.

18 AGO 1997

ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ACTIVIDAD DE LAS ESTERASAS A Y B ASOCIADAS CON LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN POBLACIONES DE *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae).

TESIS

Sometida para optar por el título de Maestro en Ciencias con Especialización en Entomología Médica.

VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO  
DIRECCION DE POSTGRADO

Permiso para su publicación y reproducción total o parcial, debe ser obtenido en la Vicerrectoria de Investigación y Postgrado.

Aprobado

_____	Asesor
_____	Jurado
_____	Jurado

Representante de la Vicerrectoria de Investigación y Postgrado

Adv. del Autor

195/11

# DEDICATORIA

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Jaime Espinoza, por su muy acertada guía y estímulo constante en la elaboración del presente trabajo.

Al Maestro en Ciencias Evidelio Adames A., y a la profesora Felícita Sousa M.Sc., por su colaboración y ayuda constante en la culminación de este trabajo de tesis.

Mi especial agradecimiento al Dr. Michael Nelson, por hacer posible mi participación en el Programa de Maestría de Entomología.

Deseo también agradecer al Dr. Lee Weith, Jefe del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Smithsonian, por permitir desarrollar la parte bioquímica de este estudio en dicha institución, con igual agradecimiento al Lic. Juan Maté, por su ayuda y colaboración.

Finalmente, quiero agradecer a todos los profesores de la Maestría por todos los conocimientos vertidos, como también al personal de la División de Control de Vectores, que de una forma u otra hicieron posible que alcanzara la meta señalada.

## **INDICE GENERAL**

	Página
DEDICATORIA . . . . .	ii
AGRADECIMIENTO . . . . .	iv
INDICE GENERAL . . . . .	vi
RESUMEN . . . . .	xiv
INTRODUCCION . . . . .	xvi
<b>CAPITULO I</b>	
<b>NOTAS PRELIMINARES . . . . .</b>	<b>1</b>
1. Los Insecticidas Organofosforados . . . . .	2
1.1 Modo de Acción de los Insecticidas Organofosforados . . . . .	5
2. El Desarrollo de la Resistencia en los Insectos . . . . .	8
3. La Resistencia y su Impacto en el Control de Mosquitos Vectores . . . . .	12
3.1 Factores Relacionados con la Aparición de la Resistencia . . . . .	19
3.2 La Resistencia Fisiológica a Compuestos Organofosforado . . . . .	24
3.3 Transmisión Hereditaria de la Resistencia . . . . .	26
3.4 Mecanismos de Resistencia de los Organofosforados . . . . .	32
4. La Lucha Antimalárica y el Desarrollo de la Resistencia del <i>Anopheles albimanus</i> a los Insecticidas en Panamá . . . . .	35
4.1 Inicio de la Lucha Antimalárica en Panamá . . . . .	35
4.2 Cronología de Aplicación de Insecticidas en la Lucha contra la Malaria en Panamá . . . . .	38
4.3 El Desarrollo de la Resistencia del <i>Anopheles albimanus</i> a los Insecticidas . . . . .	43
5. Detección y Medición de los Niveles Críticos de Resistencia . . . . .	51

	<b>Página</b>
6. Asociación de las Esterasas con la Resistencia a Compuestos Organofosforados en Mosquitos vectores . . . . .	57
7. Medidas para Contrarrestar el Desarrollo Resistencia . . . . .	67
<b>CAPITULO II</b>	
<b>METODOLOGIA . . . . .</b>	<b>77</b>
1. Colecta y Colonización de Cepas de <i>Anopheles albimanus</i> . . . . .	78
2. Pruebas Bioquímicas . . . . .	79
2.1 Preparación del Sistema Buffer . . . . .	80
2.1.1 Buffer del gel y electrodos . . . . .	80
2.1.2 Preparación del buffer de las esterassas . . . . .	80
2.2 Substratos de las Esterasas A y B . . . . .	81
2.3 Preparación del Agar . . . . .	81
2.4 Instalación del Aparato de Electroforesis . . . . .	81
2.5 Preparación de los Geles . . . . .	82
2.6 Preparación de las Muestras y Corrida Electroforética . . . . .	83
2.7 Tinción del Gel . . . . .	84
<b>CAPITULO III</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSION . . . . .</b>	<b>86</b>
1. Patrones Electroforéticos de las Esterasas A y B . . . . .	87
2. Efecto de la Edad en la Actividad de las Esterasas . . . . .	88
3. Comportamiento de los Patrones de Esterasas . . . . .	89
3.1 Patrones de Esterasa A . . . . .	90
3.1.1 Cepa Barranco Montaña . . . . .	90
3.1.2 Cepa Puente Bayano . . . . .	91
3.2 Patrones de Esterasa B . . . . .	93
3.2.1 Cepa Barranco Montaña . . . . .	93
3.2.2 Cepa Puente Bayano . . . . .	94
4. Niveles de Actividad de las Esterasas A y B . . . . .	95
4.1 Actividad de la Esterasa A . . . . .	95
4.2 Actividad de la Esterasa B . . . . .	99

## **INDICE DE APENDICES**



#### APENDICE A.

1. Patrones enzimáticos de la esterasa A en la cepa de Barranco Montaña de *Anopheles albimanus*.
2. Patrones enzimáticos de la esterasa A en la cepa de Puente Bayano de *Anopheles albimanus*.
3. Patrones enzimáticos de la esterasa B en la cepa de Barranco Montaña de *Anopheles albimanus*.
4. Patrones enzimáticos de la esterasa B en la cepa de Puente Bayano de *Anopheles albimanus*.

#### APENDICE B.

1. Alelos de esterasa A registrados en las muestras de *Anopheles albimanus* de la cepa de Barranco Montaña.
2. Alelos de esterasa A registrados en las muestras de *Anopheles albimanus* de la cepa de Puente Bayano.
3. Alelos de esterasa B registrados en las muestras de *Anopheles albimanus* de la cepa de Barranco Montaña.
4. Alelos de esterasa B registrados en las muestras de *Anopheles albimanus* de la cepa de Puente Bayano.
5. Población de *Anopheles albimanus* sometidas a la prueba de Hardy-Weinberg.
6. Frecuencias alélicas en las poblaciones de *Anopheles albimanus* sometidos a la prueba de Hardy-Weinberg.
7. Prueba de Chi-Cuadrado para determinar la desviación de equilibrio genético de Hardy-Weinberg. Población: Barranco Montaña A.
8. Prueba de Chi-Cuadrado para determinar la desviación de equilibrio genético de Hardy-Weinberg. Población: Puente Bayano A.
9. Prueba de Chi-Cuadrado para determinar la desviación de equilibrio genético de Hardy-Weinberg. Población: Barranco Montaña B.
10. Prueba de Chi-Cuadrado para determinar la desviación de equilibrio genético de Hardy-Weinberg. Población: Puente Bayano B.

#### **APENDICE C.**

1. Variación del comportamiento de mosquitos anofelinos en relación con el efecto de los insecticidas y la resistencia que provocan.
2. Resistencia de los mosquitos anofelinos a los insecticidas en país o zonas.
3. Factores que influyen en la selección de resistencia a los plaguicidas en las poblaciones de campo.
4. Consumo de Dieldrina por el SNEM contra vectores anofelinos.
5. Consumo de Propoxur por el SNEM en su primer año de aplicación.
6. Metabolismo de Malatión-<sup>14</sup>C en *Culex quinquefasciatus*
7. Metabolismo de Fenitrotión-<sup>14</sup>C en *Culex quinquefasciatus*

#### **APENDICE D.**

1. Inactivación de la acetilcolinesterasa por ésteres organofosforados.
2. Inhibición de la acetilcolinesterasa

#### **APENDICE E.**

1. Consumo de dieldrina grado técnico por el SNEM contra vectores anofelinos.
2. Consumo de DDT grado técnico por el SNEM contra vectores anofelinos.
3. Consumo de Propoxur (OMS-33) grado técnico por el SNEM contra vectores anofelinos.
4. Consumo de fenitrotión (OMS-43) grado técnico por el SNEM contra vectores anofelinos.
5. Comportamiento poblacional de anofelinos debido a la aplicación de DDT en Gatuncillo, Panamá en 1994.

#### **APENDICE F.**

1. Areas de aplicación de DDT y propoxur (OMS-33) contra anofelinos, según el SNEM (1972).

2. Áreas de aplicación de DDT, propoxur (OMS-33) y fenitrotión (OMS-43) contra anofelinos, según el SNEM (1982).
3. Áreas afectadas por problemas técnicos en la lucha antimalárica, de acuerdo al SNEM (1975).
4. Regiones de la República de Panamá con problemas técnicos en la lucha antimalárica, según el SNEM (1980).
5. Regiones de la República de Panamá con problemas técnicos en la lucha antimalárica, según el SNEM (1982).
6. Regiones de la República de Panamá con problemas técnicos en la lucha antimalárica, según el SNEM (1985).
7. Cronología de aparición de la resistencia al DDT en *Anopheles albimanus* en la República de Panamá.

#### APENDICE G.

1. Aparato de electroforesis utilizado para realizar las pruebas bioquímicas.
2. Preparación de los geles de celulosa para las pruebas electroforéticas.
- 3-6. Preparación de las muestras de mosquitos *An. albimanus* para realizar las pruebas bioquímicas.
7. Tinción de los geles de celulosa.
8. Revelado de las bandas enzimáticas de esterasa.
9. Lectura de la movilidad electroforética de las bandas enzimáticas.
10. Patrones enzimáticos de la esterasa A en la cepa de Barranco Montaña de *An. albimanus*.
11. Patrones enzimáticos de la esterasa A en la cepa de Puente Bayano de *An. albimanus*.
12. Patrones enzimáticos de la esterasa B en la cepa de Barranco Montaña de *An. albimanus*.
13. Patrones enzimáticos de la esterasa B en la cepa de Puente Bayano de *An. albimanus*.

## **RESUMEN**

Para la realización de esta investigación se llevó a cabo una primera fase, que consistió en la colecta y colonización de dos cepas de mosquitos *Anopheles albimanus* provenientes de regiones de la República de Panamá que han estado sometidas a una potencial presión selectiva de insecticidas, ya sea de uso en salud pública o de uso agrícola. Una de las cepas se colectó en la localidad de Barranco Montaña en la Provincia de Bocas del Toro, y la otra fué colectada en la localidad de Puente Bayano, en la provincia de Panamá. Se emplearon hembras adultas de 3 a 10 días de emergencia de estas dos cepas de mosquitos, con el objetivo de determinar a través de ensayos electroforéticos en gel de celulosa, los niveles de actividad de las esterases A y B asociadas con la resistencia a insecticidas organofosforados. Mediante los ensayos bioquímicos se detectaron en las dos cepas de *An. albimanus* las Est-1, Est-2 y Est-3; en las esterasa A y B respectivamente. Los niveles de actividad de la esterasa A al ser hidrolizada con  $\alpha$ -naftil-acetato, revelaron como resultado la existencia de una relativa sensibilidad al fenitrotión en las dos cepas de *An. albimanus*; de acuerdo a los patrones enzimáticos. En cuanto a la esterasa B, los niveles de actividad identificados mediante la catálisis con  $\beta$ -naftil acetato, registraron la presencia de una resistencia intermedia en las dos cepas de mosquitos.

Todas las muestras de mosquitos evaluadas de las dos poblaciones, fueron sometidas a la prueba de equilibrio genético de Hardy-Weimberg; obteniéndose, que el alelo más frecuente en las dos cepas para la esterasa A y B, fué el alelo BB; además se identificó que ambas poblaciones de mosquitos no estaban en equilibrio genético. Ello revela una correlación directa entre los resultados obtenidos a través de los patrones enzimáticos de las esterases A y B y la prueba de Hardy-Weimberg; ya que la primera hace evidente la existencia de una resistencia intermedia, y la segunda, nos indica que las fuerzas evolutivas de la resistencia, en este caso la presión selectiva, no han ejercido un efecto completo para el establecimiento de la resistencia en ambas cepas de *An. albimanus*.

## SUMMARY

For the accomplishment of this investigation, a first phase was carried out, consisting in the collection and colonization of two strains of the **Anopheles albimanus** mosquitoes from regions of the Republic of Panamá, that had been under a selective insecticide potential pressure, whether of public health use, or agriculture use. One of the strains was collected at the locality of Barranco Montaña, Bocas del Toro Province and the other was collected at Puente Bayano Province of Panamá. Of these two mosquitoes strains, adults females from 3 to 10 emergency days were used for the object to determine through electrophoretics in cellulose gel, the levels of activity of the esterases A and B associated with the resistance of organophosphate insecticide. By means of the biochemical assays the Est-1, Est-2 and Est-3 were detected in both **An. albimanus** strains in esterases A and B respectively, according to the enzymatic patterns after being hydrolyzed with alpha naphthyl-acetate the levels of activity of the esterase A revealed the existence of a relative sensibility to the fenitrothion in both strains of **An. albimanus**. As for the esterase B, the levels of activity identified by catalysis with beta naphthyl-acetate registered the presence of an intermediate resistance in both mosquitoes strains.

All the evaluated mosquitoes samples of the two population, were submitted to the Hardy-Wienberg genetic equilibrium test, achieving that the most frequent alleles in both strains for the enzymes A and B, was the allele BB; also it was identified that both mosquitoes population were not in genetic balance. This revealed a direct correlation among the obtained results through the enzymatic patterns of the esterase A and B and the Hardy-Weinberg test, since the first makes evident the existence of an intermediate resistance, and the second, indicates that the evolutive resistance force, in this case, selective pressure has not exercised a complete effect for the establishment for both **An. albimanus** strains resistance.

# **INTRODUCCION**

El mosquito *Anopheles albimanus* es el principal vector de la malaria en Panamá; el Programa de Erradicación de la Malaria, desde su inicio en 1956, ha sido enfocado hacia dos objetivos principales: a) el de contrarrestar la misma enfermedad a través de la búsqueda y tratamiento de los casos por medio de quimioterapia; y, b) mediante el control de la población de mosquitos anofelinos a través del uso de diferentes insecticidas organoclorados, organofosforados y carbamatos que son rociados en áreas del domicilio y peridomicilio en diferentes regiones del país. El uso de insecticidas sintéticos a lo largo del programa antivectorial, han sometido a las poblaciones de *An. albimanus* a una presión selectiva, que han llevado a que los anofelinos muestren un comportamiento variable en cuanto a la incidencia de la resistencia a través de los años en el programa antimalárico. Sin embargo, a pesar de conocer la variabilidad en el comportamiento de la susceptibilidad del vector a los insecticidas aplicados actualmente, se desconoce, a los mecanismos responsables de la resistencia en diferentes poblaciones de *An. albimanus* en distintas regiones del país; no obstante se sabe que las modificaciones enzimáticas son de importancia en el desarrollo de la resistencia. También se conoce que los organofosforados que son quizás el grupo más importante de los insecticidas que se utiliza en salud pública interactúan con enzimas esterásicas presentes en los insectos.



El estudio del comportamiento de la susceptibilidad del *An. albimanus* a través de técnicas electroforéticas, podría permitir conocer la variación de los niveles de actividad de las esterasas A y B y su asociación a la resistencia a compuestos organofosforados. Con estos resultados la División de Control de Vectores podría considerar examinar y poner en práctica estrategias en cuanto al uso de insecticidas por medio de la detección temprana de la resistencia y tener así una relación adecuada entre costo y beneficio de las medidas de control.

Este trabajo se planteó como objetivo, la determinación y el estudio de los niveles de actividad de las esterasas A y B asociados con la resistencia a organofosforados en poblaciones de *An. albimanus*.

En el primer capítulo, se hace referencia en cuanto a los insecticidas organofosforados y su modo de acción, el impacto de la resistencia en los programas antivectoriales, el desarrollo de la resistencia en los insectos; la lucha antimalárica en nuestro país; la detección y medición de la resistencia; la asociación de las esterasas con la resistencia a compuestos organofosforados y por último las medidas que se pueden tomar para contrarrestar la resistencia.

En el segundo capítulo se hace una descripción de la metodología experimental utilizada en este estudio. En el tercer capítulo, se presentan y se discuten los resultados de esta investigación. En el capítulo cuarto, se tienen las conclusiones de esta tesis; finalmente, en una serie de apéndices se adicionan los Cuadros, Gráficas, Figuras y Fotografías que contienen datos generales y particulares de la investigación.

**CAPITULO I**  
**NOTAS PRELIMINARES**

## 1. Los Insecticidas Organofosforados

Durante el período de la Segunda Guerra Mundial, el químico Gerhard Schrader y sus colaboradores trabajaron la química del fósforo en los Laboratorios Bayer, Alemania. Mediante sus estudios sintetizaron unas 300 sustancias que contenían fósforo combinado con compuestos orgánicos, incluyendo "gases neurotóxicos o nerviosos" como tabún e insecticidas altamente tóxicos como el Schradan, TEPP, HETP y paratión. Durante la investigación se encontró que muchos de estos compuestos eran de una toxicidad muy alta, tanto para los mamíferos de sangre caliente como para los artrópodos de sangre fría. Desde entonces, se han empleado millones de kilos de paratión para combatir los insectos que causan daños en la ganadería, la agricultura y la salud pública. Una investigación sistemática continua ha dado por resultado el desarrollo de compuestos organofosforados de amplio espectro, menos tóxicos para mamíferos como el diazinón, el malatión y el ronel, que se emplean mucho en el control de artrópodos de importancia en salud pública [p.e. OMS, (1964)]. Los insecticidas organofosforados (o, más comúnmente, compuestos organofosforados) representan hoy día aproximadamente el 30% de los insecticidas sintéticos y acaricidas usados, y su número se incrementa estadísticamente cada vez más. Los cuales posteriormente han sido referidos como organofosfatos, debido a que sus componentes químicos están formados de

fosfatos. Los trabajos pioneros con organofosfatos fueron iniciados alrededor de 1934 por Gerhard Schrader en Alemania. Los compuestos organofosforados y sus propiedades como insecticidas han sido probadas y los estudios de estos compuestos han permitido muchos descubrimientos acerca de la bioquímica de los sistemas nerviosos de algunos vertebrados e invertebrados [p.e. Matsumura, (1980)]. Los trabajos de Schrader son el origen de esta importante familia de insecticidas, caracterizada por la presencia de funciones fosfatos o tiofosfatos. A los primeros representantes de la serie TEPP (tetraetilpirofosfato), paratión, muy tóxicos para los mamíferos, han sucedido numerosos análogos organofosforados alifáticos (malatión, dimetoato, terbufós...), vinílicos (mevinfos, diclorvos...), o aromáticos (diazinón, leptofós, metilpirimifós...) con diversos perfiles de actividad [p.e. Russel, (1983)].

El fenitrotión, el cual es conocido comercialmente como Sumitión, es un insecticida con moderada acción fumigante (presión de vapor de  $5.4 \times 10^{-5}$  mm Hg a 20°C; Schrader, 1963. Presenta una  $DL_{50}$  oral en ratas de 250-670 mg/Kg y es un insecticida muy selectivo, como agente en el control de mosquitos y moscas caseras, éste presenta un mayor efecto residual que el metilparatión y ha sido extensamente usado como sustituto del paratión y el DDT en el control de plagas [p.e. Matsumura, (Op. Cit.)].

Este insecticida fué inventado por primera vez en 1959 en los Laboratorios de Sumitomo Chemical en Japón. Entre los años 1960 a 1967, se efectúa la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta etapa de pruebas de fenitrotión (OMS-43) requerida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para nuevos insecticidas. El último ensayo, séptimo y final se realiza en Kisumu (Kenya), con el patrocinio de la OMS, entre 1972 a 1976, y en el mismo participa un calificado equipo de técnicos quienes efectuaron una evaluación ento-epidemiológica de largo plazo. Se anuncia que en aplicaciones intradomiciliarias con fenitrotión, el control contra la malaria es suficiente. En 1973, la Comisión de Expertos en insecticidas de la OMS sostiene la posibilidad operacional del uso del fenitrotión como alternativa al DDT cuando sea necesario [p.e. Sumitomo, (1978)].

Los insecticidas inhibidores de colinesterasas (organofosforados y carbamatos) se vienen utilizando a gran escala en nivel mundial, desde la década de 1970; éstos han reemplazado los insecticidas organoclorados. Los organofosforados ingresan al organismo por vía dérmica, respiratoria, digestiva y conjuntiva. La vía dérmica es responsable de un alto porcentaje de intoxicaciones. La vida media de los organofosforados y sus productos de biotransformación es relativamente corta (horas a días). Su biotransformación se hace mediante enzimas oxidasas,

hidrolasas y transferasas. La eliminación tiene lugar por la orina y en menor cantidad por heces y aire respirado. El primer efecto bioquímico asociado con la toxicidad de los organofosforados es la inhibición de la acetilcolinesterasa. La FAO, ya en 1978, estimó el consumo mundial de insecticidas anticolinérgicos, siendo de 117 millones de Kg; de ello, 78 millones de Kg eran organofosforados y el 33% de carbamatos. Un alto porcentaje de la población de América Latina y el Caribe se dedica a la agricultura y vive en sectores rurales, donde se hace un mayor uso de insecticidas sintéticos con fines agrarios y en actividades de salud pública para el control de vectores. En la actualidad hay muchos compuestos organofosforados en uso; los más importantes son de las clases de: fosfatos, fósforotioatos, fósforoditioatos, fósforoamidas, fosfonatos y pirofosfatos [p.e. OPS, (1986)].

### **1.1 Modo de Acción de los Insecticidas Organofosforados**

Para el mejor conocimiento del modo de acción de los compuestos organofosforados, al explicar la resistencia han de tomarse en consideración primordialmente tres sistemas. Los insecticidas organofosforados se caracterizan por: estructuras similares, pues todos ellos pueden ser considerados derivados del ácido fosfórico y su modo de acción. Los insectos resistentes pueden tener niveles más altos de colinesterasa; pueden poseer sistemas de intoxicación menos eficientes, o

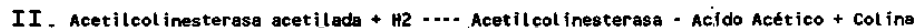
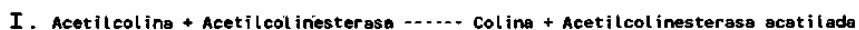
pueden poseer mecanismos de desintoxicación más eficientes. Se ha demostrado que algunas especies resistentes a organofosforados contienen niveles de colinesterasas más altos que las especies susceptibles, mientras que otras no muestran ninguna diferencia. Así pues, el aumento de los niveles de colinesterasa no pueden ser la causa primaria de la resistencia. Sin embargo se ha encontrado que la desintoxicación y la eliminación son más efectivas en las especies resistentes que en las especies susceptibles. La interrelación de estos tres sistemas explica las diferencias entre la susceptibilidad y la tolerancia, y las características diferenciales de la resistencia a los compuestos organofosforados [p.e. March, (1958)].

El modo de acción de los compuestos organofosforados, consiste en la capacidad de interferir con el mecanismo normal de transmisión de impulsos nerviosos. Cuando se transmite un impulso nervioso se libera acetilcolina, que actúa directamente sobre las células efectoras para producir su reacción característica, cual es la contracción de un músculo o la secreción de una glándula. La enzima colinesterasa se encuentra en los nervios y normalmente detiene el efecto hidrolizando la acetilcolina en un ión acetato y la colina, es decir, "despeja el camino" para la conducción del próximo impulso nervioso. Esta reacción puede ocurrir en décimas de segundo o microsegundos. Parte de los



insecticidas organofosforados se unen a la colinesterasa en el nervio e impiden que esta enzima desdoble la acetilcolina. Si la acetilcolina se acumula, los impulsos continúan pasando a lo largo de los nervios y causan una actividad no coordinada o interferida a través de todo el organismo, de lo que resultan temblores, convulsiones, parálisis muscular y, finalmente, la muerte por una variedad de fallas en los órganos y asfixia [p.e. OMS, (Op. Cit.)].

En la función normal del sistema nervioso, la acción de la acetilcolina debe ser muy corta, cerca de 1/500 seg., para lo cual la enzima acetilcolinesterasa hidroliza rápidamente la acetilcolina en colina y ácido acético. La colina puede regresar a la membrana presináptica y ser utilizada en la síntesis de la acetilcolina.



El grupo de las enzimas que producen la hidrólisis de la acetilcolina y de otros ésteres se conocen como esterazas; dentro de este grupo las colinesterasas son aquellas que hidrolizan la acetilcolina [p.e. OPS, (Op. Cit.)].

## 2. El Desarrollo de la Resistencia en Insectos

La palabra "resistencia" se aplica a toda población de insectos pertenecientes a una especie normalmente sensible a un insecticida determinado, que ya no puede ser controlado por la contaminación normal del insecticida. En otros términos, la resistencia es una peculiaridad adquirida que llega a caracterizar a una población de insectos y su descendencia después del tratamiento continuado con el insecticida [p.e. Brown y Pal, (1971)].

Algunos autores definen la resistencia al insecticida como la habilidad que tiene una población de insectos para tolerar un tóxico que era, gradualmente, letal para otras poblaciones previas. En la mayoría de las poblaciones de insectos hay ejemplares que varían en susceptibilidad a los insecticidas. Como consecuencia, el ejercer presión selectiva sobre una población con un producto químico tóxico conduce a la supervivencia de aquellos ejemplares que "toleran" el tóxico. Si se continúa ejerciendo esta presión selectiva se produce un cambio en la población, dejando una población en la que la mayoría de los ejemplares son tolerantes, por lo que se dice de este tipo de población es resistente al producto químico [(p.e. Brown y Pal, (Op. cit))].

Entre los mecanismos primarios de la resistencia están:

(a) la creciente destoxificación de los insecticidas por medio de enzimas específicas. Estas controlan las reacciones tales como la deshidrocloración (de DDT), la oxidación (de carbamatos), la hidrólisis, la desalquilación o desarilación (de los organofosfatos); (b) la reducción de la sensibilidad del área de aplicación. Por ejemplo, a la reducción de la sensibilidad de la colinesterasa acetilica en el *An. albimanus* se debe en gran parte la resistencia de esta especie a varios organofosfatos y carbamatos. Igualmente la sensibilidad reducida de los tejidos nerviosos es la causa de la resistencia a los ciclodienos, aparte de la resistencia al DDT, y de la mayor parte de la resistencia a los piretroides. Finalmente, (c) muchos casos de la resistencia entrañan una penetración más lenta de la sustancia química en el integumento [p.e. Georghiou, (1980)].

En cuanto a la resistencia fisiológica, se pueden distinguir dos tipos: (1) la resistencia innata; y, (2) la resistencia adquirida por hábito. Estos dos tipos de resistencia están relacionados a condiciones creadas artificialmente por el hombre y se basan siempre en dos escuelas: (1) la escuela neodarwiniana; y, (2) la escuela lamarckiana. La primera es la teoría de la variación selectiva (Darwinismo), es decir, se trata de individuos resistentes (R) que sólo, sobreviven en una población sometida a una presión selectiva de insecticida. En este caso si hay

pocos R, tendremos por cruce con las cepas sensibles (S) una dilución rápida de la resistencia; en el caso contrario, se establecerá rápidamente una dominancia de R. Se trata de una verdadera resistencia hereditaria. La segunda teoría, la teoría adaptativa (Lamarckiana) supone que las resistencias preexistentes no existen, sino que serían inducidas por la presión de insecticidas, como por ejemplo, las variaciones enzimáticas, que no serían por otro lado transmisibles genéticamente; se habla de resistencia condicional. La selección entre las dos teorías, es delicada ya que a menudo es difícil separar la influencia de los genes, caso 1, de la influencia del medio, caso 2, y la interacción entre los dos sistemas es permanente y por lo tanto el origen de las dos cepas resistentes. Además existen las pseudoresistencias de las cuales hay que desconfiar, son las que proceden del mal uso de los productos: dosis, estadíos de aplicación, condiciones naturales durante el tratamiento, técnicas de pulverización, etc.. Las cuales hay que discernir inmediatamente, antes de iniciar un programa de investigación contra una eventual resistencia fisiológica verdadera [p.e. Russel (Op. Cit.)].

El grado en el cual los insectos pueden metabolizar y lleguen a degradar tóxicos y otros químicos perjudiciales, es considerado de importancia para sobrevivir en ambientes químicos pocos favorables. Recientes estudios de

destoxificación en insectos han revelado que la versatilidad con que los insectos se adaptan a su ambiente es promovida por el fenómeno de inducción. Este es un proceso en el cual los químicos estimulan el aumento de la actividad del sistema de destoxificación por la producción de enzimas adicionales. Las enzimas localizadas en el retículo endoplasmático, el cual cuenta con un gran número de células especializadas que pueden insertar un átomo de oxígeno dentro de una variedad de grupos funcionales de moléculas lipofílicas, por medio de ellas, se da una acción más rápida de excreción. La función del sistema se da en la hemoproteína P-450, donde formas del complejo ternario con una molécula de xenobiótico es oxidada y una molécula de oxígeno. Los tres sistemas más importantes en el insecto de destoxificación son: las oxidasas microsomales, el glutathion -S- transferasa de importancia en el metabolismo de insecticidas organofosforados y carboxiesterasas que degradan carbamatos, organofosforados y piretroides; como también la hormona juvenil y sus análogos [p.e. Terriere, (1984)].

La resistencia fisiológica es la habilidad a través de un proceso fisiológico de tolerar un tóxico, por diferencias en: (1) la permeabilidad del exoesqueleto de los insectos a los insecticidas; (2) la desintoxicación de los insecticidas a compuestos menos dañinos; (3) la acumulación de los insecticidas en tejidos del cuerpo menos accesibles metabólicamente tales como tejidos grasos; o, (4) la excreción

de los insecticidas. Algunos mecanismos bioquímicos para desarrollar resistencia están tan generalizados que se presenta una resistencia cruzada entre plaguicidas similares o virtualmente sin relación dando también la resistencia múltiple. Otro tipo de resistencia mostrada por los insectos es el cambio o modificación de conducta a través de los hábitos de comportamiento [p.e. OPS (OP. Cit.)].

De acuerdo a la OMS, se define la resistencia como una característica heredada que otorga una mayor tolerancia a un plaguicida o grupo de plaguicidas de tal modo que los individuos resistentes sobreviven a una concentración de compuestos que generalmente sería mortal para la especie [p.e. OMS, (1992)].

### **3. La Resistencia y su Impacto en el Control de Mosquitos Vectores.**

La notable intensificación de la lucha contra vectores de la malaria en todo el mundo y la pretendida campaña de erradicación que se ha llevado a cabo en las Américas han hecho resaltar el peligro que significa para el éxito de estas la resistencia de los anofelinos a los insecticidas usados contra ellos y la importancia fundamental que tiene el descubrimiento en sus comienzos las modificaciones del grado de susceptibilidad de los vectores, para tratar de neutralizar inmediatamente sus notables efectos [p.e. OPS, (1956)]. El

aumento notable de la resistencia desde la introducción de los insecticidas sintéticos en los principales vectores de paludismo, ha sido el principal problema técnico en la erradicación de esta enfermedad en las distintas regiones del mundo, donde hay una alta incidencia de transmisión [p.e. Busvine, (1963)].

Con el objetivo de recabar información necesaria acerca de los efectos de la resistencia a los insecticidas sobre la lucha contra los vectores de enfermedades, la OMS preparó y envió a más de 100 países, un cuestionario para averiguar los siguientes datos:

- a) Planes de lucha en cada país, insecticidas utilizados y amplitud de operaciones;
- b) Resistencia a los insecticidas, grupos de insecticidas, resistencia sospechada o confirmada; efectos moderados o graves de la resistencia sobre la lucha antivectorial; insecticidas abandonados, posibilidades de aumento de la morbilidad a causa de la resistencia .

De 70 respuestas recibidas, se llegó a la conclusión de que una cantidad cada vez mayor de especies insectiles ha llegado a adquirir resistencia contra uno o más productos insecticidas en diferentes regiones geográficas del mundo [p.e. OMS, (1970)].

Los problemas que plantea la resistencia a los insecticidas organoclorados se ha puesto de manifiesto desde hace tiempo, y simultáneamente se ha advertido la necesidad de contar con insecticidas de un modo de acción diferente, como carbamatos y compuestos organofosforados. Es de esperar que estos insecticidas satisfagan las condiciones que exige la lucha contra los vectores. Algunos compuestos son de acción bastante específica, pero todos ellos resultan más caros que los insecticidas organoclorados de prolongada residualidad. Además, existe siempre la amenaza de que aparezca resistencia a nuevos compuestos, y deben proseguir las investigaciones para encontrar otros insecticidas y estudiar nuevos métodos de control [p.e. OMS, (Supra Cit)].

Desde que se introdujeron en los programas sanitarios los potentes insecticidas sintéticos, el principal problema técnico que se ha presentado es el de la resistencia de los insectos que antes eran exterminados por esos productos. Hasta 1956, buen número de investigadores no admitían que el aumento creciente de fallas en la lucha contra los insectos se debía a la aparición de la resistencia [p.e. Brown y Pal, (1972)].

La resistencia en los insectos ha repercutido sobre todo en las campañas de erradicación del paludismo. Los primeros fracasos del DDT sobre el *Anopheles sacharovi* se observaron



desde 1951 en la Grecia meridional, y el desarrollo progresivo pero constante de resistencia al DDT y a los ciclodienicos en esa especie fue causa de que el paludismo por *Plasmodium vivax* persistiera durante 15 años después de iniciarse las operaciones de rociamiento en las viviendas. En América la doble resistencia del *An. albimanus* al DDT y la dieldrina ha impedido la erradicación del paludismo en El Salvador y países vecinos. Tampoco se ha logrado la erradicación en el Estado Chiapas (México), donde el *An. pseudopunctipennis* ha presentado tolerancia al DDT y resistencia a la dieldrina. En Venezuela, la resistencia de *An. aquasalis* a la dieldrina ha provocado la persistencia del paludismo en la parte nororiental del país, registrándose igual fenómeno en *An. albicansis*. En tanto que el *An. nunez-tovari* presentaba resistencia a la dieldrina y DDT, igual situación ocurre en otras regiones del mundo con las principales especies vectoras del paludismo [p. e. Brown y Pal, (Sup. cit.)].

La resistencia fisiológica de los mosquitos del género *Anopheles* a los insecticidas se ha convertido en un importante obstáculo opuesto a la erradicación del paludismo y a la lucha antipalúdica. En 1975, el Comité de Expertos de la OMS en Insecticidas declaró: "Por fin se está reconociendo que la resistencia es quizás el mayor obstáculo con que se tropieza en la lucha contra las enfermedades transmitidas por vectores y es la causa principal de que en muchos países no se logre

erradicar el paludismo". Desde entonces, la situación ha empeorado todavía más con la aparición de resistencia a los insecticidas organofosforados, como el malatión y el fenitrotión (p.e. OMS, (1979)]. El Comité de Expertos en Biología de los Vectores y Lucha Antivectorial, menciona que una caída en los niveles de susceptibilidad a los insecticidas puede tener un efecto considerable en los programas de salud pública, impidiendo la reducción o la eliminación de enfermedades y está acarrearía modificaciones en los insecticidas que se utilizan en los programas de lucha como también en las estrategias usadas. Tal situación puede tener graves implicaciones de tipo financiero que podría significar el gasto o el ahorro de millones de dólares [p.e. OMS, (1980)1.

Desde la reunión efectuada por el Comité de Expertos de la OMS en Biología de los Vectores y la Lucha Antivectorial, la resistencia ha continuado extendiéndose y afectando a los programas de lucha contra diversas enfermedades en numerosos países. En ocasiones, sin embargo, es difícil separar los posibles efectos de la resistencia de los efectos de varios otros factores que influyen en la lucha antivectorial, en particular las diferencias operacionales, los cambios ambientales y otros (Cuadro I). La resistencia se ha extendido a todas las clases de compuestos que se utilizaban comúnmente: organoclorados (DDT, dieldrina, HCH),

organofosforados, carbamatos y piretroides. Hay pruebas, además, de que pudiera desarrollarse resistencia a las hormonas juveniles, al diflubenzurón, e incluso al *Bacillus thuringiensis* H-14, aunque esas pruebas provienen de estudios de laboratorios [p.e. OMS, (1986)1..

La aparición de resistencia múltiple entre los vectores del paludismo es particularmente inquietante y ahora se tienen registradas cinco especies importantes (*An. albimanus*; *An. culicifacies*; *An. pseudopunctipennis*; *An. sacharovi* y *An. stephensi*) que han mostrado resistencia a compuestos organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides en determinadas zonas geográficas. En mosquitos anofelinos se tienen registrados 50 especies como resistente a uno o más insecticidas. Por lo menos 11 de las 50 especies resistentes son vectores importantes [p.e. OMS (op. Cit.)].

La elaboración de insecticidas de prolongado efecto residual durante el decenio de 1940 a 1950, proporcionó un modelo único de lucha antivectorial con una relación entre costo y beneficio extremadamente alto, convirtiéndose en el componente principal de muchos programas de lucha antivectorial. El fenómeno de la resistencia en mosquitos fue detectado por primera vez en Italia entre 1946 y 1947, en mosquitos culicinos [p.e. OPS, (1991)]. El impacto de la resistencia en mosquitos y su incidencia en la transmisión de

enfermedades, es difícil de establecer, y no se ha llegado a evaluar hasta el momento en las Américas. Usualmente los niveles moderados de resistencia son detectables en áreas donde la continua transmisión de malaria, incide muchas veces con los ciclos de aplicación de insecticidas residuales. Para considerar la presencia de resistencia en mosquitos vectores es necesario conocer otros factores, entre ellos: el cambio de insecticida, la incompleta aplicación de insecticida, etc. [p.e. Nelson, (1991)].

La resistencia al malatión y fenitrotión ha sido reportada en *An. albimanus* en México y varias regiones de América Central, y en *An. pseudopunctipennis* en Honduras y Guatemala. En América Central el *An. albimanus* ha demostrado resistencia al propoxur y piretroides, en tanto que el DDT, el *An. albimanus* ha mostrado resistencia en México, América Central y en la Española (Rep. Dominicana y Haití) y en diferentes zonas de Colombia [p.e. Nelson (Supra Cit.)]. Con referencia a la situación actual de la resistencia en los anofelinos en la región de las Américas, cuatro especies importantes de vectores del paludismo se han registrado resistencia a uno o más insecticidas, siendo ellos: *An. albimanus*, *An. vestitipennis*, *An. pseudopunctipennis* y *An. darlingi*. Los Cuadros II al V registran las principales especies de anofelinos resistentes a los distintos grupos de insecticidas. No se hace referencia a la dieldrina/HCH en los

cuadros, debido a que éstos insecticidas sólo se utilizan en ciertos países para combatir ciertos mosquitos, triatominos y cucarachas [p.e. OMS, (Op. Cit.)]. La aparición de resistencia a insecticidas entre *An. albimanus* es el problema técnico más grave de los programas de control de paludismo en México y América Central. Con frecuencia se observa en la naturaleza como una reducción progresiva en el control que se obtiene por aplicación de insecticidas con intensidades inicialmente efectivas [p.e. Frederickson, (1993)].

### **3.1 Factores Relacionados con la Aparición de la Resistencia**

En cuanto a la genética de los mosquitos, con especial referencia a la resistencia, se sabe relativamente poco acerca de la herencia de la resistencia y de la susceptibilidad a los insecticidas. Hasta ahora, las investigaciones se han referido a tres aspectos principales. Uno es la hibridación y la formación de especies. El segundo aspecto ha sido el estudio de la citología y la citogenética de los mosquitos, especialmente la citogenética de los cromosomas de las glándulas salivales. El tercero es el estudio de las mutaciones y de la herencia de genes, de los grupos de enlace, los cruces, determinación de sexo y otros mecanismos genéticos fundamentales [p.e. Kitzmiller, (1958)].

Como el *An. albimanus* es un mosquito de áreas

rurales que se reproduce extensamente en campos de cultivo y en sus proximidades, se sospecha desde hacía mucho tiempo que la aplicación intensiva de plaguicidas en los cultivos era una de las principales causas de aparición de resistencias en poblaciones de vectores locales [p.e. Georghiou, (1972)]. Durante un estudio realizado en El Salvador (1970- 1972), para determinar la estacionalidad de los niveles de resistencia, se observó que la resistencia de las larvas a paratión, metilparatión, malatión, fenitrotión, carbaril y propoxur aumentaba durante la estación de fumigación y disminuía en diversos grados durante el período intermedio en que no se fumigaba. Los aumentos de resistencia siempre eran mayores que las disminuciones, lo que daba lugar a un aumento neto de la resistencia [p.e. Georghiou *et al*, (1973)].

El desarrollo de la resistencia a cualquier insecticida orgánico es usualmente debido a la destoxificación bioquímica y a otros mecanismos fisiológicos, donde la base genética en muchos casos no son conocidas. La selección de presión ejercida por varios insecticidas con cantidades presentes en el ambiente de los insectos durante sucesivas generaciones. Como la cantidad de plaguicidas usados en la agricultura es varias veces, que el aplicado contra los vectores de malaria, el desarrollo de las resistencias en los vectores y su agravamiento es usualmente una secuencia de la intensiva selección de presión ejercida por pesticidas

agrícolas en estados inmaduros y adulto de los mosquitos transmisores de malaria. La prolongación de la cobertura con insecticidas contra la malaria en áreas de incipientes resistencia en vectores existentes normalmente acelera el desarrollo de altos niveles de resistencia [p.e. WHO, (1976)]. La aparición de resistencia a los insecticidas depende de muchos factores, los que pueden dividirse en dos grupos principales: los relacionados con la biología y la ecología de las especies vectoras que se pretende destruir y lo relativo al tipo y a la intensidad de la presión de selección ejercida por los insecticidas [p.e. OPS, (1976)] .

Las áreas donde el vector es resistente al DDT, dieldrina, malatión y propoxur han sido históricamente en siempre zonas de plantaciones con tratamiento intensivo de plaguicidas, particularmente en cultivos de algodón y arroz. Cuando los insecticidas modernos fueron introducidos por primera vez en campañas antimaláricas, desafortunadamente se le dio poca atención en cuanto a la importancia de la influencia de los plaguicidas usados en la agricultura y el estatus de la susceptibilidad de los vectores de enfermedades humanas. Sólo cuando una pronunciada resistencia es reportada, es cuando se le presta cierta atención y es cuando se empieza a coleccionar información [p.e. WHO, (Op. Cit.)].

La aparición de la resistencia a uno o varios

insecticidas en los anofelinos, puede ser un asunto bastante complicado de decidir, ya que hay diversos factores que contribuyen al cuadro global de la resistencia y a su efecto epidemiológico. Entre los factores relacionados con la aparición de la resistencia, están: la selección de un producto o productos químicos, la intensidad de la presión de selección; la fase de selección; el objetivo de la presión de selección, y el hecho de que la población considerada como objetivo sea o no un complejo de especies. Poniéndose de manifiesto que la "resistencia" puede variar muchísimo en cuanto a origen, intensidad e importancia para la lucha contra los vectores de enfermedades en una población dada, y que al juzgar esa importancia, se deben tener en cuenta las características bioquímicas y genéticas de los aspectos eco-epidemiológicos del ambiente y operacionales [p.e. OMS, (Op. Cit.)]. A pesar de la amplia distribución de la resistencia, es bien sabido que la resistencia se ha manifestado lentamente en algunas especies y más rápidamente en otras. Aún en la misma especie, bajo ciertas circunstancias, la resistencia se ha desarrollado rápidamente, mientras que bajo otras circunstancias la resistencia se ha desarrollado lentamente o no se ha manifestado. Actualmente se reconoce tres tipos de factores que influyen en la evolución de la resistencia, a saber: genéticos, biológicos y operacionales (Cuadro VI). Los factores genéticos y biológicos son intrínsecos de la especie y, por lo tanto,



están fuera de nuestro control. Sin embargo, el conocimiento de su contribución es importante, ya que sirve para evaluar la propensividad a la resistencia en una población, ejemplo, el riesgo de resistencia en la población. Los factores operacionales están bajo nuestro control y se les puede dar más o menos énfasis al establecer un programa de manejo de plaguicidas, dependiendo de nuestra evaluación del riesgo de resistencia indicado por los dos primeros factores [p.e. Georghiou, (Op. Cit.)].

Para comprender bien el fenómeno de la resistencia, hay que determinar bien los factores que la limitan o facilitan la adaptación; esos son de cuatro tipos: **Genéticos:** que involucra entre otros, la probabilidad de mutación al nivel de los genes implicados en el metabolismo o en el receptor del producto considerado; el número de genes que condicionan el potencial de resistencia, la incidencia de la mutación, la importancia en una población dada del número de individuos portadores o no de genes de resistencia. **Biológicos:** determinado por el potencial de reproducción por hembras de la especie considerada, el número de generaciones posibles por año, etc. **Ecológicos,** pudiendo estar determinado por el clima a lo largo del año que permita o no una reproducción continua de la especie considerada, el aislamiento mayor o menor del biotopo considerado que permitiera o no cruces con cepas sensibles. **Agronómicos:** la

importancia de la fertilización y en particular de los abonos nitrogenados [p.e. Russel, (Op. Cit.)].

### 3.2 La Resistencia Fisiológica a Compuestos Organofosforado

En cuanto a las potencialidades fisiológicas de resistencia en los insectos, la distinción entre resistencia fisiológica y resistencia de comportamiento no es válida, pero en la práctica es válida. Los mecanismos fisiológicos de la resistencia pueden clasificarse según el resultado del hecho que el mosquito eluda el insecticida, o de que lo elimine. En el primer caso podemos encontrarnos con cambios en el comportamiento, alteraciones estructurales importantes y reducciones debido a otras causas en la tasa de penetración del insecticida. Los mecanismos de eliminación pueden comprender: aumento de la capacidad de almacenamiento, aumento de la rapidez de excreción, una mejor descomposición metabólica del tóxico, reducción de la sensibilidad de los tejidos vitales, e incremento del empleo de los sistemas de derivación [p.e. Chadwick, (1957)].

Al aparecer resistencia a dieldrina y al DDT en México, se realizaron pruebas con malatión como insecticida alternativo. Los ensayos biológicos de superficies de una colonia de laboratorio de *An. albimanus* sensibles con varios tipos de superficies indicaron un control deficiente. La mortalidad de

mosquitos retenidos durante media hora en superficies tratadas disminuyó rápidamente al cabo de 48 horas y en varias superficies no se observó mortalidad al cabo de seis días. En pruebas de campo en casas rociadas experimentalmente se observó una mortalidad del 70% al 100% la primera semana, pero a la sexta semana no había mortalidad. La única excepción fueron las superficies de madera [p.e. Barrera, (1959)1].

La primera indicación de que aparecería resistencia a compuestos organofosforados en poblaciones de campo de *An. albimanus* fue el aumento de la tolerancia a malatión, observada en Nicaragua y Guatemala [p.e. OMS, (1965)]. Por otra parte, los primeros intentos para estimular resistencia a organofosforados se hicieron con cepas de varias zonas de Haití. La selección para resistencia a fenitrotión durante 25 generaciones multiplicó la resistencia solo 1.1. En la misma colonia aparecieron elevados niveles de resistencia al DDT y a dieldrina cuando se seleccionó la resistencia a estos insecticidas [p.e. Georghiou y Colman, (1969)]. En la costa del Pacífico de El Salvador, se expusieron jaulas de *An. albimanus* capturados en el campo y criados en el laboratorio a aplicaciones aéreas de concentraciones extremadamente bajas de malatión. La mortalidad media entre las poblaciones naturales solo fue del 19.7% en comparación con el 71.1% en los mosquitos criados en el insectario. En los bioensayos de pared se confirmó la resistencia, con una supervivencia del

70% en concentraciones de hasta 6.5 ppm y una supervivencia del 7% en concentraciones similares en la prueba de la OMS. Los mosquitos se capturaron en una zona de cultivo intensivo de algodón y, aunque no habían tenido contacto con el malatión utilizado en la lucha antivectorial, habían estado expuestos a aplicaciones intensivas de insecticidas agrícolas con un modo de acción similar, como malatión, triclorfano y metilparatión [p.e. Breeland *et al.*, (1970)]. Durante 1971 se realizaron pruebas en larvas de *An. albimanus* capturados en el campo en zonas algodonerías de El Salvador y Nicaragua que indicaron una resistencia muy difundida a numerosos compuestos organofosforados y al propoxur. Se observaron niveles bajos en Guatemala, mientras que las muestras procedentes de Honduras seguían siendo sensibles. Los adultos capturados en Nicaragua presentaban niveles significativos de resistencia al propoxur [p.e. Georghiou, (1972)1].

### 3.3 Transmisión Hereditaria de la Resistencia

Dentro de los aspectos genéticos de la resistencia a los insecticidas, toda investigación sobre la resistencia presupone: (a) la existencia de diferencias heredadas entre los individuos; y, (b) la posibilidad de conocerla. La tolerancia de un agente tóxico es una propiedad individual determinada genéticamente, por lo menos en grado considerable; sin embargo, puede cambiar durante la vida y los factores ambientales pueden modificarla. Es necesario saber distinguir

entre diferencias genéticas aparentes y diferencias genéticas reales [p.e. Milani, (1958)]. En cuanto a este aspecto, en la literatura se utilizan los términos "tolerancia" que ha adquirido connotaciones especiales y la "resistencia". Se emplea el término resistencia cuando se conoce un mecanismo específico y tolerancia (con implicación de alta tolerancia) cuando se refiere a una disminución de susceptibilidad específica y muy notable. Los dos términos se refieren a fenómenos que se fundan uno con otro, pero la distinción entre ambos tiene ciertas ventajas prácticas. Genéticamente, es con toda evidencia más fácil ocuparse de la resistencia que de la tolerancia, si bien esto no significa que la tolerancia no esté bajo control genético. Cabe suponer, sin embargo, que las variaciones puramente fenotípicas pueden resultar más intrigantes en el segundo caso [p.e. Milani, (Supra Cit.)]. Es importante recalcar los diferentes mecanismos de transmisión hereditaria de la resistencia al insecticida dieldrina y al DDT. Por el carácter recesivo de la resistencia al DDT es de esperarse que su aparición en una población sea lenta, con intervalos de dos años antes de manifestarse súbitamente. En la resistencia al DDT, el heterocigoto es eliminado junto con los homocigotos para el gen de sensibilidad y, por tanto, aumenta lentamente la frecuencia del gen resistente. En cambio, la resistencia a dieldrina aparece mucho más rápidamente por su carácter dominante. Los heterocigotos pueden sobrevivir a la

exposición al insecticida como los homocigotos. El tiempo necesario para que aparezca la resistencia depende del grado de presión selectiva y de la frecuencia del gen al comienzo de la exposición al insecticida [p.e. MacDonald, (1959)]. En cuanto a las variaciones de sensibilidad entre individuos de poblaciones de mosquitos sensibles, la tolerancia de vigor a un tipo de insecticida, se debe al tamaño y estado de nutrición y de salud del individuo. Se ha demostrado que los factores nutricionales producen una reducción hasta de tres veces en la sensibilidad a los insecticidas [p.e. Gordon, (1961)1].

Luego de investigaciones realizadas es posible adicionar, en cuanto a la inherencia de la resistencia, a cuatro especies de mosquitos: *An. albimanus*; *An. stephensi*; *An. quadrimaculatus* y *Cx. tarsalis*. Esas nuevas adiciones indican que el aprovechamiento de la genética es de gran significado en organismos no previamente incluidos en estudios de este tipo. Los estudios genéticos sobre la resistencia actualmente parecen estar dirigidos a mantener tres líneas de investigación: (1) Inherencia de formas particulares de resistencia; (2) Aspectos genéticos de resistencia cruzada o resistencia múltiple; y, (3) Propiedades bioquímicas genéticamente relacionadas con la resistencia [p.e. Milani, (1963)]. La característica de mayor importancia de la resistencia es su transmisión hereditaria; en consecuencia, se

pueden obtener especies de laboratorio cuya descendencia es resistente y que mantiene su resistencia en mayor o menor grado. Del mismo modo, en campañas han aparecido poblaciones que se caracterizan por su resistencia a los insecticidas durante períodos considerables y a lo largo de muchas generaciones. Es evidente que la descendencia de los individuos pertenecientes a una variedad resistente permite determinar la proporción de tipos resistentes de esa variedad [p.e. (Lichtuardt, 1956 En: Brown, 1973)].

En 1964, el grupo científico de la OMS sobre genética puso de relieve la importancia de esta disciplina en el estudio de la resistencia, fenómeno que presenta extramuros esenciales como problema de genética de poblaciones. Además, la correlación establecida entre los mecanismos de resistencia y determinados genes, contribuye a comprender mejor la complejidad de los diferentes problemas que plantea la resistencia y las probabilidades de éxito que pueden tener medidas para contrarrestarlas. Se ha observado en casi todos los casos que la resistencia se debe a genes principales únicos, y se han descubierto genes que confieren resistencia a la dieldrina en 17 especies, al DDT en 12 especies, a los compuestos organofosforados en cuatro especies, y a los carbamatos en la mosca doméstica. En general la resistencia al DDT es de carácter recesiva, la resistencia a los compuestos organofosforados es dominante, y la resistencia a

la dieldrina es intermedia [p.e. Brown y Cal, (Op. Cit)1].

Es muy importante averiguar si un tipo determinado de resistencia es monogénico u obedece a varios tipos de genes. Si existe una potencialidad genética de aparición de una resistencia a un insecticida determinado, el tiempo que tarda en manifestarse la resistencia dependerá de diversos factores evidentemente importantes, como la frecuencia y el carácter dominante de los genes de resistencia, la presión selectiva y los antecedentes de exposición a insecticidas. Hay que contar así mismo con influencias ecológicas, tales como el aislamiento, la endogamia y el potencial reproductor de la población de insectos. La resistencia debida a la selección por un insecticida determinado de uno o varios genes se extiende por lo general a otros compuestos, es lo que se llama resistencia cruzada. Una de las razones evidentes de este fenómeno es que un solo insecticida puede seleccionar diferentes grupos de genes [p.e. OMS, (Op. Cit.)].

Se ha comprobado que un solo gen, caso dominante, gobierna la resistencia de *An. albimanus* a los organofosfatos y los carbamatos. Se considera que este gen se encuentra en el brazo derecho del cromosoma 2; también se ha demostrado que en esta especie la resistencia al DDT y a la dieldrina es conjunta y radica en el cromosoma 3 [p.e. Davidson y Sawyer, (1975)]. En ciertos casos donde los altos niveles de



resistencia a organofosforados se debe al incremento de las esterasas, esto ha sido atribuido al incremento del porcentaje de síntesis enzimática como el resultado de la amplificación del gen y reduplicación de los genes de esterasas. Alternativamente, las mutaciones de los genes aumentan el poder de función de los alelos de esterasas, o genes mutantes con una estructura de locus para funcionar equivalentemente con esterasas con poder de producir moléculas enzimáticas de alta eficacia catalítica [p.e. Villani, et al., (1983)1].

Recientemente se ha postulado sobre la base de datos limitados que en la mosca doméstica, y posiblemente en otros insectos, hay tres genes principales que proporcionan la resistencia a los insecticidas: uno para absorción reducida de insecticidas, otro para creación de resistencia en el lugar considerado como objetivo y un tercero para la creación de resistencia metabólica. Se consideró que el último actuaba recíprocamente con genes menores ubicados en otra parte del genoma. Se formuló la hipótesis de que el gen principal de la resistencia metabólica codifica una proteína receptora que reconoce y liga los insecticidas y después induce la síntesis de enzimas desintoxicadoras apropiadas, por ejemplo, oxidasas, esterasas y glutatión -S- transferasa [p.e. OMS, (Op. Cit.)1].

### 3.4 Mecanismos de Resistencia de los Organofosforados

En estudios realizados, al mezclarse compuestos de fosforotioatos con el sinergista butoxido de piperonil, se produjo un intenso antagonismo, lo que sugiere una inhibición del proceso de activación. Se pensó que la falta de sinergismo encontrada en los compuestos de fosfatos se debía a la acción contra el tioato antes de su conversión a fosfato o a un proceso de degradación no oxidativa. Un bajo nivel de sinergismo de paraxón con S,S,S-tributil fósforo-tritioato indicaba un mecanismo de demetilación [p.e. Ariaratnan y Georghiou, (1971)]. Se ha demostrado de modo claro que el cambio del punto de acción es una causa de resistencia a los inhibidores de la colinesterasa. En estos casos, se produce una acetilcolinesterasa mutante que los insecticidas inhiben más lentamente que la enzima normal de las estirpes susceptibles. Por lo general, este fenómeno da resistencia a gran número de compuestos, aunque el factor de insensibilidad (velocidad de inhibición en las cepas susceptibles con relación a la de las resistentes), depende de cada sustancia [p.e. OMS, (Op. Cit.)].

Los principales mecanismos de resistencia que se han identificado hasta la fecha (sin contar los que son específicos de los compuestos organoclorados) incluyen: 1) aceleración del metabolismo del agente tóxico por medio de

oxidasas de función mixta; hidrolasas, esterases y transferasas dependientes de glutatión; 2) reducción de la susceptibilidad en el sitio de acción por: insensibilidad nerviosa, falta de reactividad de la acetilcolinesterasa; 3) escasa penetración en el sitio activo. La reducción de la penetración es otro mecanismo de resistencia, si bien menos importante. Por lo general, su importancia obedece a que refuerza la resistencia provocada por otros factores. Una fuerte resistencia puede ser el resultado de la interacción de varios factores, algunos de los cuales ejercen poca influencia cuando intervienen aisladamente [p.e. OMS, (Op. Cit.)]. La resistencia de los inhibidores de la colinesterasa (organofosforados y carbamatos) deriva de una disminución de la reactividad de la acetilcolinesterasa que es análoga a la resistencia que obedece a la disminución de la sensibilidad del sistema nervioso. En ambos casos este tipo de resistencia parece formarse después de aplicar presiones selectivas extremadamente intensas y sostenidas. Al "sobrecargar" los mecanismos de insensibilidad, que es considerablemente más "eficiente" [p.e. OMS, (Op. Cit.)]. La resistencia al malatión y al propoxur en *An. albimanus* se debe a la isoenzima acetilcolinesterasa (AChE), insensible a la inhibición por este insecticida. Se ha observado que la inhibición de estas enzimas por malaxón y fenitroxón en cepas resistentes eran cinco veces más lenta que en cepas sensibles normales de *An. albimanus* [p.e. Hemingway y Georghiou, (1983)]. En los

mosquitos, la resistencia a los insecticidas puede depender de una reducción de la absorción o un aumento en la degradación enzimática o ambas. Es decir, insensibilidad neural en las membranas de nervios y ganglios (con referencia a la resistencia a los organoclorados y piretroides) o actividad enzimática de acetilcolinesterasa (con insecticidas organofosforados y carbamatos) [p.e. Brown, (1986)].

Entre los mecanismos bioquímicos que causan resistencia a los insecticidas, ciertos factores genéticos gobiernan la resistencia a insecticidas organofosforados, la cual se ha expresado como una asociación con cantidades anormales de niveles altos de particulares enzimas. De acuerdo a Plapp (1976), estas esterasas se han clasificado como carboxiesterasas = aliesterasas = esterasa B = hidrolasas = E.C. 3.1.1.1., excepto que su eficacia no es restringida a compuestos con cadena de carboxilester. Ellas funcionan por destoxificación de insecticidas de esteres organofosforados, incluye hidrólisis, así que el nivel de resistencia está directamente relacionado al aumento de esterasas disponibles. En ciertos casos donde hay altos grados de resistencia, se ha atribuido el incremento del porcentaje de síntesis de enzima como resultado de la amplificación de genes, y reduplicación de genes de esterasas. Alternativamente, las regulares mutaciones de los genes pueden aumentar la función de los alelos de esterasas, y pueden producir moléculas de enzimas de

alta eficiencia catalítica [p.e. Villani *et al.*, (Op. Cit.)].

Los siguientes mecanismos de destoxificación confieren resistencia a ciertos insecticidas: a) oxidasas de función mixta; b) hidrolasas, incluidas esterasas específicas o de amplio espectro, c) S-transferasas de glutatión, d) insensibilidad del lugar considerado como objetivo, es decir, sensibilidad reducida de la acetilcolinesterasa a los compuestos organofosforados y carbamatos, e) factores de penetración [p.e. OMS, (Op. Cit.)]. El metabolismo de los insecticidas organofosforados ocurre principalmente por oxidación, hidrólisis por esterasas, y por transferencia de porciones de la molécula de glutatión. La oxidación de los insecticidas organofosforados da como resultado más o menos productos tóxicos. En general, los fosforotiatos no son directamente tóxicos ya que requiere la oxidación metabólica de la toxina proximal [p.e. WHO, (Op. Cit.)].

#### **4. La Lucha Antimalárica y el Desarrollo de la Resistencia del *Anopheles albimanus* a los Insecticidas en Panamá.**

##### **4.1 Inicio de la Lucha Antimalárica en Panamá**

La lucha contra el paludismo en Panamá, se inició en forma de campaña organizada, antes y durante la construcción del Canal de Panamá por parte de los Estados Unidos. Esta

labor era realizada en todos los poblados que estaban bajo la jurisdicción de la Comisión Istmica del Canal, que eran aproximadamente 500 millas cuadradas y sólo 100 millas del total eran donde se realizaban los trabajos del Departamento de Sanidad, las labores de saneamiento eran también realizadas en las ciudades terminales de Panamá y Colón. Los trabajos dirigidos por Williams C. Gorgas, consistían en saneamiento, drenajes, rellenos, desinfección y fumigación. En las ciudades de Panamá y Colón se construyó un sistema de alcantarillado, los edificios de la Zona del Canal eran sometidos a una inspección periódica, en los poblados cercanos los pozos eran cerrados y desinfectados con una solución larvicida, muy efectiva y preparación barata. [p.e. Mears, (1911)].

Los principales focos de infección de fiebre amarilla y malaria eran los poblados terminales de la vía férrea, Colón en el Caribe y Panamá en el Pacífico. Panamá en comparación con La Habana, era un pueblo pequeño, La Habana en 1904 tenía una población de 250,000 habitantes y Panamá alrededor de 20,000 habitantes. Los trabajos antimaláricos en los poblados de Panamá y Colón fueron exactamente similar a los que se realizaron en la ciudad de La Habana. El cual se realizaba a lo largo de la línea del Canal entre los poblados terminales, Colón y Panamá, que eran enteramente diferente, y el problema era mucho más extenso del que se dió en La Habana. El Departamento de Sanidad dividió en 24 distritos sanitarios

correspondientes a los poblados existente en esa época [p.e. Gorgas, (1918)].

Los trabajos contra la malaria, consistían en construcción de drenajes de concretos y canales en los alrededores, rellenos de lagunas, saneamiento de criaderos de mosquitos, protección de las casas y edificios con telas metálicas, el uso de larvicidas y la fumigación de las casas. Para la realización de estos trabajos se contaba con un suficiente número de trabajadores bajo la responsabilidad de uno o más capataz, de acuerdo al tamaño del distrito [p.e. Gorgas, (Sup. Cit.)].

La lucha contra la malaria en Panamá se inició casi simultáneamente con la construcción del Canal Interoceánico. Es un hecho histórico que las obras de construcción del Canal de Panamá por el gobierno de los Estados Unidos, fueron grandemente afectadas por la malaria. Los trabajos de control de esta enfermedad que se realizaron previa y forzosamente dentro del área del canal y sus alrededores, permitieron la ejecución de esta gigantesca obra de ingeniería. Hasta 1931 el control se limitó a las ciudades de Panamá y Colón. Dentro de la Zona del Canal se realizaron estas mismas medidas por el gobierno de los Estados Unidos, de acuerdo a convenio establecido con el Gobierno de Panamá [p.e. SNEM, (1970)].

Desde 1931 hasta 1946, con la cooperación de la Fundación Rockefeller, se extendió el programa de control hacia algunas ciudades de importancia, cubriendo la mayor parte de los centros urbanos situados a lo largo de la carretera interamericana Panamá-David, con el objetivo de disminuir la incidencia malárica en áreas de importancia económica. Dichos trabajos comprendieron la aplicación de larvicidas y la construcción de drenajes para eliminar criaderos de anofelinos [p.e. SNEM, (Supra Cit.)]. La campaña de erradicación de la malaria se inició en Panamá en 1956, de esta forma el programa de control pasó a ser de erradicación, creándose el 24 de agosto de 1956, mediante el Decreto No. 769, el Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SNEM), dependencia del Ministerio de Trabajo, Prevención Social y Salud Pública [p.e. SNEM, (1967)].

#### **4.2 Cronología de Aplicación de Insecticida en la Lucha Contra la Malaria en Panamá**

Antes y durante la construcción del Canal de Panamá por parte del Gobierno de los Estados Unidos, la lucha contra los mosquitos transmisores de enfermedades (malaria y fiebre amarilla), además de los trabajos de saneamiento del medio, relleno de laguna y construcción de canales de desagües, las medidas consistían también en la aplicación en los criaderos de aceite crudo y en general se utilizaban varias mezclas las cuales eran rociadas. El larvicida utilizado en los criaderos



de mosquitos era una mezcla de ácido carbónico crudo, resina, soda cáustica y cal (larvicida Panamá), en tanto que las casas eran fumigadas con humo de mecheros de azufre y pelitre [p.e. Gorgas, (Op. Cit.)].

Entre las medidas más importantes, de carácter temporal en la lucha contra la malaria, que van dirigidas a la destrucción del mosquito en su fase acuática: huevo, larva y pupa, las más prácticas y efectivas empleados son: riego de petróleo o aceite crudo, uso de larvicida "Panamá" y la espolvorización de verde de París, el cual se aplicaba en una proporción de una parte por cada 99 parte de diluyente [p.e. Roux, (1944)].

En el verano de 1944, en un campo experimental en las riveras del Río Chagres, se inició un estudio detallado sobre la efectividad del DDT en tratamientos residuales en viviendas nativas dirigidas al control de los vectores de la malaria. Siendo las áreas seleccionadas Guayabalito y Santa Rosa, y las aldeas adyacentes se utilizaron como control. El material utilizado para el rociamiento, fue el DDT grado técnico al 5% en kerosene, usándose aproximadamente tres galones por vivienda [p.e. Trapido, (1946)].

En 1947 se comenzó a usar DDT mediante rociamiento intradomiciliario en áreas limitadas (centros urbanos), para

luego extenderlos a determinadas zonas rurales de alta incidencia malárica. En octubre de 1957, se firmó un Convenio Tripartito con la OPS/OMS y UNICEF para la erradicación de la malaria en todo el territorio panameño. La fase de ataque comenzó en 1957, empleándose dieldrina (DLN) en ciclos anuales con dosis de 0.6 g Grado Técnico (GT)/m<sup>2</sup>, y consumo promedio por vivienda de 132 g de DLN (GT) (Cuadro VII), hasta 1962 cuando fue sustituido por DDT en ciclos semestrales con dosis de 200 g GT/m<sup>2</sup>, y consumo promedio de 444 g/m<sup>2</sup> de DDT (GT). Este cambio de insecticida se debió a que el DLN aplicado en un solo ciclo anual no había logrado interrumpir la transmisión y además porque la DLN afectaba a los animales domésticos y originaba constantemente renuencias al rociado por parte de la población [p.e. SNEM, (Op. Cit.)].

Durante el brote malárico en Las Cumbres (provincia de Panamá), se aplicaron medidas natilarvarias, entre ellas físicas y el uso de Baytex, un compuesto organofosforado [p.e. SNEM (1971)].

El OMS-33 (propoxur), un carbamato de aplicación trimestral, se comenzó a utilizar en los programas antimaláricos del SNEM en 1972 en las áreas de mayor incidencia malárica (cuadro VIII y Mapa No. 1); luego de realizarse su fase experimental evaluativa; debido al descubrimiento de la resistencia del *An. albimanus* al DDT

[p.e. SNEM, (1972)]. Durante 1982 se introdujo el rociamiento experimental con OMS-43 (fenitrotión) un insecticida organofosforado de ciclo trimestral con dosis de 2.0 g GT/m<sup>2</sup>. Aplicándose en diferentes localidades situadas en la Costa Atlántica, en Cascajal y Morales (Portobelo), y La Miel (en San Blas); Puerto Piña en el Pacífico, como también en los poblados de Los Pavitos y Quebrada Guinea ubicados en las márgenes de la Meseta Central, con resultados satisfactorios (Mapa No. 2). Integrándose posteriormente al programa de lucha antivectorial [p.e. SNEM, (1982)]. Actualmente son dos los insecticidas utilizados: fenitrotión (OMS-43) y propoxur (OMS-33) aplicados indistintamente con periodicidad cuatrimestral y trimestral, dependiendo de la frecuencia recomendada, pruebas entomológicas, vulnerabilidad de las áreas y, en general, del resultado de las encuestas maláricas. El DDT se dejó de utilizar a partir del segundo semestre de 1988, siendo reemplazado por el fenitrotión, y el propoxur es aplicado solamente en la comarca de San Blas [p.e. SNEM, (1989)].

Previendo la aparición de resistencia a los insecticidas utilizados por el SNEM contra el *An. albimanus* se iniciaron ensayos con Solfac PH al 10% (piretroidé de aplicación semestral) de septiembre de 1992 a septiembre de 1993 en la localidad de Ipetí Kuna. Las pruebas biológicas de pared, dieron resultados variables de mortalidad, con un

promedio a lo largo del ensayo muy bajo de 69.2% de mortalidad. En las pruebas de susceptibilidad, utilizando el equipo de prueba de la OMS, se obtuvo un promedio de mortalidad en las pruebas de 99.3% [p.e. SNEM, (1993)]. En octubre de 1993, se inicia la fase experimental con un nuevo insecticida de efecto residual, K-Othrine (Deltametrina) PH al 5%, en dos localidades del sector Este de la provincia de Panamá (Aguas Claras y Puente Bayano). Obteniéndose resultados favorables en cuanto a la efectividad en el control de *An. albimanus* [p.e. (SNEM), (1994)]. Finalmente, en la Gráfica No. 1 se observa el consumo de dieldrina (GT) de 1957 cuando se inició su uso hasta 1962 en que se dejó de utilizar. Siendo su mayor consumo en 1959 con 22,734.5 Kg de DLN (GT). En la Gráfica No. 2, se muestra el consumo de DDT (GT) en kilos por año desde 1962 cuando se empezó a utilizar hasta 1988, cuando fué prohibido su uso. La Gráfica No. 3, se observa la cantidad utilizada de propoxur (OMS-33) grado técnico de 1972 a 1990; y por último, en la Gráfica No. 4, se muestra el consumo en miles de kilos de fenitrotión (GT) de 1983 a 1995 por el programa antimalárico del SNEM.

Durante el inicio de la década de los 90', Panamá contaba con el 8 % de la población de América Central, representando su territorio el 14.4 % de la superficie total del Istmo. Entre los años 1980 y 1989 Panamá importó un total de 68.883,284 Kg de plaguicidas, para un consumo promedio

anual de 6.888,328 Kg, o sea el 12.8 % de las importaciones promedio anuales de Centroamérica para ese mismo período. Durante esa década Panamá gastó aproximadamente entre 18 a 20 millones de dolares por año en plaguicidas. Estimandose, que existe una población de 540,404 que están generalmente expuestas, aunque en distintos grados de intensidad, a los plaguicidas. Actualmente, en el comercio se oferta para la venta de plaguicidas un 16 % de insecticidas, 28 % de fungicidas, un 35 % de herbicidas y un 21 % otros [p.e. Jenkins, (1995)].

#### **4.3 El Desarrollo de la Resistencia del *Anopheles albimanus* a los Insecticidas**

Durante los estudios realizados entre 1944 a 1946, en el poblado de Gatuncillo cercano al río Chagres, donde se realizaron rociamientos dentro y fuera de las viviendas con una solución de DDT al 5% en kerosene con periodicidad o ciclo de cuatro meses, las observaciones hechas en el área tratada y dos poblados adyacentes, Guayabito y Santa Rosa que se usaron como control dieron como resultado las siguientes conclusiones: 1) Una gran reducción en el número de mosquitos; 2) el porcentaje de sobrevivencia de mosquitos a las 24 horas es bajo luego de tres meses de aplicación; 3) durante el período de tratamiento el potencial de transmisión de la malaria se redujo en un 99.9%; 4) el tratamiento de rociado en las casas produce una marcada reducción en la población de

mosquitos, en áreas fuera de las casas y en alguna medida en la vegetación adyacente [p.e. Trapido, (Op. Cit.)].

Dos posibles explicaciones de como sucedio la aparición de la respuesta modificada del *An. albimanus* al DDT en casas tratadas en la localidad de Santa rosa cercana al Río Chagres, Panamá en 1952 son: Uno que los mosquitos sean resistentes al DDT, la otra es que cuando se inicio el rociamiento un pequeño grupo de mosquitos era irritado por el DDT, la población actual contiene una gran cantidad de individuos con una predisposición a la irritabilidad con un mínimo contacto con superficies tratadas con DDT. En ambos casos uno de los factores envuelven a otro completamente. De acuerdo a esto, la población pudo haber desarrollado hiperirritabilidad y algunas resistencias: la hiperirritabilidad puede ser asegurada con solo un mínimo contacto con las superficies tratadas con DDT; la resistencia se pudo dar, al alcanzar un ligero umbral durante el tiempo de contacto por la acumulación de dosis letales de DDT en el punto donde hubo mayor sobrevivencia de individuos [p.e. Trapido, (1952)]. En estudios realizados por H. Trapido durante 1944-1946, y 1952 a 1953, en un sector del Río Chagres, cuyas aldeas fueron rociadas muchas veces con DDT, sobre "Estimaciones cuantitativas para la comprensión del fenómeno de la resistencia por conducta en Panamá", se llegó a la conclusión de que existía la posibilidad de que hubiese producido un

cambio en la conducta intradoméstica del *An. albimanus* [p.e. Dueret, (1958)]

Debido a la comprobación de la resistencia del *An. albimanus* al DLN en todo el territorio de El Salvador en 1958, motivó la suspensión total en ese país del uso de este insecticida. Por lo cual la OPS/OMS con la aprobación de su oficina en Washington, programo actividades para conocer el estado de la susceptibilidad en Centroamerica y Panamá. En Panamá el Dr. J.P. Duret, entomólogo del Laboratorio Gorgas, realizaba pruebas de susceptibilidad en Puerto Armuelles. En caso de comprobarse la resistencia, esas investigaciones serían extendidas a otras áreas del país para así poder con seguridad recomendar la discontinuación del uso de dieldrina [p.e. Nota de OPS/OMS, (1958)]. Con la aparición de la resistencia del *An. albimanus* a dieldrina en varios lugares de El Salvador, Guatemala y Nicaragua, el Dr. Oswaldo J. Da Silva, consultor de la OMS, recomienda se estimule en lo posible a los países de la región, el establecimiento y funcionamiento de servicios rutinarios para determinar los niveles de susceptibilidad de las especies vectoras. Esta recomendación fue aprobada en el Seminario sobre "Susceptibilidad y Resistencia", que se celebró en Panamá [p.e. Nota OPS/OMS, (1958)] »

El comportamiento de la resistencia del *An. albimanus* al

DDT observado en poblaciones en el Río Chagres por Trapido en 1952, que fue reinvestigada en 1958. La medida del efecto excitatorio del DDT en la inducción de evasión presentada por hembras adultas excitadas en poblaciones de Gatuncillo y Santa Rosa en las riveras del Río Chagres, eran respetivamente significativas, y casi significativamente menos que aquellas poblaciones de áreas no tratadas o de poblaciones de laboratorio procedentes de lugares que nunca han sido tratadas con DDT. En estudios comparativos sobre la irritabilidad del *An. albimanus*, de un poblado no tratado con DDT, Río Gatuncillo, y de un poblado tratado con DDT, Río Chagres. Mediante pruebas de laboratorio y utilizando trampas de cobertizo, se confirmó que era más fácil provocar el vuelo de las poblaciones de Río Chagres que las de Río Gatún y el de estas más que el de la colonia Gorgas. Sin embargo, las diferencias no eran significativas. Se observó que las poblaciones de campo escapaban más rápidamente de las casas tratadas hacia las trampas de ventana que la colonia Gorgas, pero no se encontraron diferencias entre mosquitos de los pueblos tratados y no tratados [p.e. Duret, (1961)].

En pruebas de susceptibilidad realizadas con cuatro especies, las cuales eran las más frecuentes durante las capturas realizadas: *An. albimanus*; *An. punctimacula*; *An. triannulatus* y *An. maculipalpus*, tanto con concentraciones de 0.4% de DLN y a 4.0% de DDT todos los resultados dieron 100%



de mortalidad luego de una hora de exposición y 24 horas de espera. Determinándose que todas las especies de *Anopheles* son susceptibles al DLN como al DDT. Aparte de la irritabilidad del *An. albimanus* en localidades en la región del Chagres, no se ha observado en Panamá ningún problema con anofelinos ocasionados por la presión de los insecticidas [p.e. SNEM, (1962)]. En investigaciones entomológicas, se llegó a observar que los anofelinos llenos de sangre eran difícil encontrarlo sobre las paredes rociadas; observándose que algunos mosquitos con el estómago vacío permanecían pocos minutos en paredes tratadas; quizás esto sea debido a la urgencia de sangre. En trabajos realizados en la localidad de Limones en Chiriquí, los *An. albimanus* llegaban directamente al cebo humano, pero no se lograba encontrarlo después reposando en las paredes. En las fincas de Fátima y Santa Ana en Divalá, se observó que los *An. albimanus*, picaban dentro de las casas y después abandonaban las viviendas. Esto también se observó en Madre Vieja, La Esperanza y El Rompío, en Puerto Armuelles [p.e. SNEM, (1964)].

Para 1969, se hace referencia a la aparición de la resistencia del *An. albimanus* al DDT, por lo cual se hace el cambio de insecticida en los años siguientes, utilizando primero un carbamato y posteriormente un organofosforado [p.e. Frederickson, (Op Cit.)]. Las pruebas de excito-repelencia permitieron comprobar el elevado grado de irritabilidad de los

*An. albimanus* al DDT en algunas localidades de dos áreas de persistencia: Transísmica y Lago Gatún, pero no se observó resistencia fisiológica en ninguna. En los resultados de las pruebas de susceptibilidad en Las Lajas (Las Cumbres) presentan una mortalidad promedio de 86% que se interpreta en la actualidad como "resistencia intermedia", observándose también la inactividad del DDT al *An. albimanus* en casas con paredes de madres pintadas (con pintura de aceite) y rociadas con solución de DDT. De acuerdo con las pruebas de susceptibilidad se encontró resistencia al DDT en algunas localidades de los distritos de Colón, Portobelo y Panamá [p.e. SNEM, (Op. Cit.)]. En Panamá, Trapido observó la aparición de resistencia polivalente, que según Smith era sumamente intensa en algunos vertederos de basura donde durante varios años se había empleado intensamente el DDT y más tarde HCH [p.e. Trapido en Brown, (1971)1].

El ataque con rociado se ha subdividido en tres clases. semestral con DDT, trimestral con DDT y trimestral con OMS-33 (Propoxur). Esta última fase se inicio en marzo de 1972, al comprobarse la resistencia del *An. albimanus* al DDT [p.e. SNEM, (Op. Cit.)]. La aplicación de OMS-33 se realizó en localidades que presentaban problemas de resistencia del vector al DDT en los distritos de Colón, Panamá, Chepo y Chepigana [p.e. SNEM, (1973)]. A través de estudios entomológicos realizados por el SNEM y la OPS, se han

determinado las regiones del país con problemas técnicos especialmente resistencia del vector, siendo las siguientes localidades con estos problemas: Transístmica- Portobelo, El Escobal, Lago Gatún, Garachiné, Sambú, San Blas, Bajo Bayano y Barú (Mapa No. 3) [p.e. SNEM, (1975)]. Los estudios realizados en Chiriquí, Colón, Bocas del Toro, Panamá, Darién y San Blas demostraron que las localidades en las que se encontró resistencia al DDT (Mapa No. 4), en años anteriores, muestran un aumento de la resistencia, aunque esta persiste [p.e. SNEM, (1980)].

La realización con un nuevo insecticida (fenitrotión) de aplicación trimestral, se inició en Darién y San Blas con fin de tener alternativas de solución, en caso de resistencia al propoxur y considerando su costo en comparación al fenitrotión. Los rociados experimentales fueron realizados también en dos localidades de la Costa Atlántica (Limón y La Represa), La Miel, Cascajal, y Morales; en el Pacífico en Puerto Piña, la Meseta Central y márgenes de la carretera Panamericana; Los Pavitos y Quebrada Guinea. Con resultados hasta el momento satisfactorios de casi el 100% de mortalidad [p.e. SNEM, Op. Cit.]. Los principales focos de resistencia del *An. albimanus* al DDT, se registraron en Calovébora, Santa Catalina y Tobobe, región occidental de la Costa Atlántica, San Blas, Sambú y Taimatí en Garachiné, y márgenes del Río Chico y carretera Panamericana en el corregimiento de Yaviza;

otras localidades fueron Jagu  y Chim n (Mapa No. 5) [p.e. SNEM, (Supra Cit.)].

La experiencia del servicio, nos enseña que en áreas de malaria responsiva (favorable) donde se efectúa una buena cobertura con fenitrotión en forma completa, total, suficiente y regular, la incidencia de malaria ha bajado satisfactoriamente. Igual situación ocurrió con el DDT (en provincias centr les) cuando su efectividad era 100% y se logró pasar a Fase de Consolidación en 1973 y en 1976 grandes extensiones del área originalmente malárica donde habitaban 1,177,826 habitantes (88.6%). Sin embargo, áreas como Darién, Bocas del Toro y San Blas (Mapa No.6), donde la transmisión nunca ha sido interrumpida en forma total y completa en período en que el *An. albimanus* fue altamente susceptible al DDT, persistiendo la transmisión, aunque a niveles mas bajos, debido quizás a factores antropológicos y otros ajenos a la resistencia del vector al insecticida [p.e. SNEM, (1985)].

El uso de insecticida como medida antivectorial, se mantiene en aquellas localidades de las regiones de Bocas del Toro, Darién, Chiriquí y en la región de Alto Bayano en el distrito de Chepo. Los trabajos de pruebas de susceptibilidad demuestran que el *An. albimanus* es susceptible a la dosis aplicada de fenitrotión en las zonas de Chiriquí, Alto Bayano y San Blas, no así en la región malárica de Bocas del Toro en

donde los índices de mortalidad observados en agosto (40%) y en diciembre del año 1992 (46.6%) demuestran una tendencia a resistencia de los anofelinos a la dosis recomendada [p.e. SNEM, (1992)]. El uso de fenitrotión en aplicaciones residuales se mantiene, con periodicidad trimestral e intradomicilios. En las pruebas de susceptibilidad con *An. albimanus*, se analizó con cyflutrina 0.005% y fenitrotión 1.0% con especímenes de Puente Bayano, obteniéndose mortalidad del 99.4% con cyflutrina y 100% al fenitrotión [p.e. SNEM, (1993)].

Con base a los datos bibliográficos citados con anterioridad y conversaciones realizadas con el personal técnico del Departamento de Entomología del SNEM, en referencia a la detección de resistencia en *An. albimanus* al DDT, presentamos un resumen cronológico en el Mapa No. 7, de los principales puntos del país en que se detectó resistencia del *An. albimanus* al DDT.

##### **5. Detección y Medición de los Niveles Críticos de Resistencia.**

En el VI Informe del Comité de Expertos en Malaria de la OMS de 1955, se manifestó lo siguiente: "La importancia creciente del problema de la resistencia fisiológica a los insecticidas, hace recomendable que se realicen cuidadosas mediciones de la susceptibilidad de los vectores locales,

antes de la campaña, y periódicamente después, durante todo el desarrollo del programa. "El estudio de la resistencia no debe considerarse más como una inquietud científica, sino como un problema operacional" [p.e. OPS, (1956)].

La determinación de la línea base de la susceptibilidad de los anofelinos vectores a los insecticidas de acción residual que se utilizan en las campañas de erradicación de la malaria, tiene como objeto el de poder luego vigilar los cambios que pudieran presentarse en dicha susceptibilidad a medida que las operaciones de rociados progresan, con el propósito de tomar las medidas adecuadas antes de que se establezca una resistencia a la dosis aplicada habitualmente. Entre las técnicas conocidas dos son las más usadas actualmente: la de Busvine-Nash, de origen inglés y que es la más frecuente empleada; y la de Fay-Quarterman, ideada en el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los EE.UU. Por su parte la OMS, reconociendo los defectos de las técnicas desarrolladas hasta ese momento, resolvió tomar los elementos más útiles, y así emplear una nueva prueba la cual posiblemente se llamará de la OMS [p.e. OPS, (Supra Cit.)]. Para descubrir la aparición de una especie/cepa de mosquitos resistentes a los insecticidas, es necesario disponer de los datos básicos sobre las características que presentaba la especie antes de generalizarse el empleo de los insecticidas o establecerse comparaciones con mosquitos de una zona no

tratada. Cuando se emprenden campañas de lucha contra mosquitos mediante la aplicación de insecticidas en gran escala, conviene determinar lo antes posible los límites normales de la susceptibilidad, para lo cual es preciso practicar varias pruebas (ocho por lo menos) en distintas localidades y en distintas épocas del año a fin de conocer la intensidad de las variaciones biológicas normales. Será preciso averiguar además los antecedentes sobre el uso que se haga de los insecticidas en la zona, tanto para la lucha contra los mosquitos, como para las principales aplicaciones agrícolas [p.e. OMS, (1957)].

En una corta revisión de las extensas investigaciones de la resistencia posterior al uso del DDT en relación a las ventajas de las técnicas experimentales, el estudio de la resistencia ha ido gradualmente involucrando otras disciplinas, notables como la genética y la bioquímica. Durante el período de 1952 a 1972, varios tipos de investigaciones se han caracterizado entre las cuales destacan: 1) detección y medidas; 2) estudios genéticos; 3) principios de toxicología; y, 4) bioquímica toxicológica. La integración de todas las diferentes investigaciones atacan la resistencia continuamente y donde numerosas especies están sujetas a las ventajas de los estudios bioquímicos y genéticos que cada vez se incrementan [p.e. Busvine, (Op. Cit.)].

Considerando los criterios para la determinación del nivel crítico de la resistencia del vector para la toma de decisión, la XVII Conferencia del Comité de Expertos de Insecticida llegó a las principales conclusiones: a) La detección de los niveles críticos de mortalidad obtenidos por pruebas de susceptibilidad muy bien pueden retrasarse hasta después que los datos parasitológicos reflejen un incremento de transmisión debido a la presencia de una alta fracción resistente en la población de vectores; b) los resultados de las pruebas de susceptibilidad están sujetas a gran variabilidad muchas veces debido al inadecuado tamaño de las muestras puestas a prueba; c) existe una falta de conocimiento en cuanto al significado de los resultados de las pruebas de susceptibilidad en términos en lo correspondiente a la mortalidad en el campo bajo varios sistemas de rociado, d) se tiene que conocer también las limitaciones de los datos parasitológicos, ya que estos pueden presentar un estancamiento en la situación epidemiológica o gradualmente tiende a determinar los rociados bajo insecticida [p.e. OMS, (Op. Cit.)].

El Comité examinó además, la necesidad de normalizar aún más las condiciones de prueba y convino en la necesidad de insistir sobre ciertos puntos importantes del procedimiento de ensayo, sobre todo: a) el efecto de la temperatura (coeficiente térmico positivo o negativo); b) el mantenimiento



de los mosquitos durante el periodo de exposición, evitando alimentarlo con soluciones azucaradas, que puedan rebajar la mortalidad de la prueba; y, c) la normalización de la hora del día en que se efectúen las pruebas, ya que algunos experimentos revelan ritmo circadiano de susceptibilidad [p.e. OMS, (Sup. Cit.)]. Ninguna especie reacciona siempre de la misma forma, ni siquiera en las condiciones más naturales; la línea de referencia depende, de numerosos factores, tales como la estación del año, el estado de nutrición, el tiempo transcurrido desde la última ingestión de sangre, la fase de desarrollo de huevo y la edad. Igualmente influyen sobre los resultados las condiciones durante la prueba: temperatura, luminosidad y, en general todo factor que ejerza algún efecto sobre la actividad de los insectos estudiados [p.e. OMS, (Op. Cit.)].

La sensibilidad puede variar de un sexo a otro y, en general, los machos son mas sensibles que las hembras. La edad también es un factor de importancia de variación. Como regla general, los individuos más longevos son menos sensibles que los individuos jóvenes. Esto es particularmente válido para las larvas de mosquitos. El estado fisiológico influye también en la sensibilidad. Así, es el caso de las hembras de mosquitos, los individuos más jóvenes son más sensibles que las que están llenas de sangre y las grávidas, al curso del ciclo gonadotrófico, la sensibilidad varía y alcanza su máxima

expresión luego de 24 horas de alimentarse de sangre. La calidad de alimentación y el parasitismo, en particular en el caso de las larvas de mosquitos, puede influenciar su grado de sensibilidad [p.e. Brengues y Caosemans, (1977)].

La detección temprana de la resistencia de los vectores es una labor de búsqueda sistemática en las áreas propuestas para la lucha antivectorial durante el planeamiento y ejecución de las operaciones de aplicación de los agentes químicos. Con el fin de lograr las máximas probabilidades de detección temprana, las operaciones de vigilancia se deben concretar cuidadosamente en las áreas donde grandes poblaciones de vectores ya están siendo sometidas a la aplicación del mismo plaguicida u otro similar [p.e. OMS, (Op. Cit.)].

La función de las pruebas de susceptibilidad, no es solo la de confirmar si existe o no resistencia, sino que su uso más importante es detectar oportunamente el decaimiento del nivel de susceptibilidad y por ende la emergencia del nivel de resistencia lo suficientemente alto para que cause un fracaso en el control [Brown, (Op. Cit.)].

En general, el criterio para definir la presencia de resistencia ha sido la supervivencia del 20% o más de los individuos sometidos a ensayos con las concentraciones de

diagnóstico actualmente conocidas de los plaguicidas comúnmente disponibles usando los estuches para ensayos sobre el terreno de la OMS [p.e. OMS, (Op. cit.)].

## **6. Asociación de las Esterasas con la Resistencia a Compuestos Organofosforados en Mosquitos Vectores.**

Los compuestos organofosforados son inhibidores de cierto número de enzimas de esterazas. Entre éstas es fundamental el sistema de acetilcolina-colinesterasa, que interviene vitalmente en la actividad de los tejidos excitados. Si bien muchas esterazas quedan inhibidas, algunas no resultan afectadas. Se ha encontrado que varias de estas esterazas no afectadas hidrolizan los compuestos organofosforados y no hay duda que se muestran activas en los mecanismos de destoxificación. Ciertos compuestos organofosforados son inhibidores directos, mientras que otros han de ser metabolizados ya sea por reacciones simples o por reacciones complejas, para convertirlo en inhibidores activos en el organismo vivo. Los sistemas de destoxificación del organismo vivo funciona mediante la hidrólisis de los compuestos organofosforados, que los convierten en productos menos inhibidores o no inhibidores. Estos procesos pueden entrañar la simple hidrólisis de los grupos substitutivos directamente unidos al átomo de fósforo o una hidrólisis más compleja que

afecta también a otros restos substitutivos [p.e. Marsh, (Op. Cit.)].

Para mejor conocimiento del modo de acción de los compuestos organofosforados, al explicar la resistencia han de tomarse en consideración primordialmente tres sistemas. Los insectos resistentes pueden tener niveles más altos de colinesterasa; pueden poseer sistemas destoxificadores menos eficientes, o pueden poseer sistemas destoxificadores más eficientes. Se ha demostrado que algunas especies resistentes a organofosforados contienen niveles de colinesterasas más altos que las especies susceptibles, mientras que otras no muestran ninguna diferencia. Así pues, el aumento de colinesterasa no puede ser la causa primaria de la resistencia. Sin embargo, se ha encontrado que la desintoxicación y la eliminación son más efectivas en las especies resistentes que en las especies susceptibles. La interrelación de estos tres sistemas explica las diferencias entre la susceptibilidad y la tolerancia y las características diferenciables de la resistencia a los compuestos organofosforados [p.e. Marsh, (Supra Cit.)].

Se asume que los insectos son muertos por los efectos de compuestos organofosforados y carbamatos debido a la colinesterasa, por esta razón los ejemplos están habitualmente confinados a las enzimas, sin embargo, las principales

discusiones son aplicadas a esterases B en general. La discusión de la acción biológica de los compuestos organofosforados que es dependiente de la reacción de las proteínas con actividad esterásica; esta enzima es la esterasa B, pero no es colinesterasa. Los compuestos organofosforados al reaccionar con la colinesterasa produce relativa estabilidad fosforilada en la enzima [p.e. Aldridge, (1971)].

La inactivación de la acetilcolinesterasa (AChE) por ésteres organofosforados ha sido demostrada por los resultados en reacciones químicas actuales entre la enzima y compuestos organofosforados. Sobre el proceso de inhibición, principal, últimamente se debe a la formación de un enlace covalente de enzimas fosforiladas, la cual está representada en la Reacción No. 1, en donde el ester y la enzima se combinan primero y forman un complejo y este es seguido por la fosforilación. El modelo para la actividad del sitio de AChE propuesto por Krupka (1964), es utilizado para el propósito de ilustración. En este esquema, **B** es un grupo básico (histidina, imidazol, nitrógeno), **OH** es serina-hidroxil, **HA** es un grupo ácido (tirosina-hidroxil) y **S** es el sitio aniónico. El sitio aniónico, cuya función normal es la de atraer el componente trimetilamonio, en el sustrato natural de la acetilcolina (ACh) del sitio de activación, por la que puede ser visualizado la flexibilidad para meterse en los restos de carga negativa. En ciertos casos el grupo de ésteres de

organofosfatos, R en la posición 3-fenil, primero interactúa con el sitio aniónico y algunos ayudan o impiden el proceso de inhibición [p.e. Fukuto (1971)].

De acuerdo a los mecanismos de inhibición la fosforilación de AChE ejecutada en el sitio por el ataque de serina-hidroxil en átomos de fósforo, el estado de la reacción es catalizada por los componentes básicos y ácidos en el sitio de activación. La enzima fosforilada de este modo obtenida es inhabilitada de catálisis de hidrólisis de AChE. La relación entre la estructura química de los ésteres de organofosfatos y la inactivación de AChE ha sido intensamente estudiada. Los estudios han postulado que la actividad anticolinesterasa de los ésteres de organofosfatos depende considerablemente de la reactividad del éster [p.e. Fukuto, (Supra Cit.)1].

La presencia de colinesterasa (ChE), acetilcolina y colina acetil transferasa en los tejidos nerviosos de los insectos han sido bien establecidas. La inhibición de ChE es considerada como el principal modo de acción de los insecticidas organofosforados y carbamatos, pero existe poco conocimiento en lo referente a los niveles de inhibición requerido para causar la muerte [p.e. Booth y Lee, (1971)]

Entre los mecanismos responsables para la creación de resistencia a los insecticidas, las modificaciones enzimáticas

juegan un papel muy importante. Así la dehidroclorinasa es el mayor factor en la creación de resistencia al DDT, la carboxilesterasa, fosfotriesterasa, acetilcolinesterasa, las dependiente de glutathion transferasas y las oxidasas de función mixta (OFM) están envueltas en la resistencia de organofosforados. Las OFM son importantes en la resistencia a carbamatos. La O-demitilisa, que recientemente presenta la mayor enzima de detoxificación en resistencia al metoprene en la mosca casera, *Musca domestica* [p.e. Georghiou y Pasteur, (1978)]: La resistencia en *Culex quinquefasciatus* Say, en California a compuestos organofosforados, es heredado como un monofactor, de carácter parcialmente dominante. En donde la presencia de esta resistencia, lo más probable es que sea debido a la detoxificación por estererasas [p.e. Georghiou et al., (1980)]. La alta actividad de estererasas ha presentado su asociación con la resistencia a insecticidas organofosforados en mosquitos *Cx. quinquefasciatus*. Los códigos de estererasas y la inducción de genes resistentes en laboratorio de cepas seleccionadas han tenido idéntica o una unión más estrecha [p.e. Georghiou y Pasteur, (1980)].

Por otro lado, el reporte de resistencia a organofosforados en poblaciones del complejo *Cx. pipiens* en Camerún y Sierra Leona, Malasia, California y sur de Francia esta estrechamente asociada con la actividad normal de estererasas [p.e. Curtis y Pasteur, (1981)]. En tanto en

poblaciones naturales de mosquitos del complejo *Cx. pipiens* L., la frecuencia de Est-2<sup>0.64</sup> tiene un alto significado de correlación con la resistencia a insecticidas organofosforados [p.e. Pasteur et al., (1981)]. Así mismo, en diferentes especies del género *Culex*, la resistencia a los insecticidas organofosforados está asociada con la presencia de una alta actividad de las esterasas relacionada con la hidrólisis de sustratos de naftil-acetatos. Distinguiéndose dos clases iguales de alta actividad enzimática (esterasa A' y esterasa B'), esta facultad puede estar presente sola, en algunos o en compañía de la otra en *Cx. pipiens* [p.e. Pasteur et al., (1981)].

Entre los mecanismos bioquímicos causantes de resistencia a los insecticidas, ciertos factores genéticos gobiernan la resistencia a organofosforados, la cual es expresada como, o la asociación con anormales niveles altos de enzimas en particular esterasas, estas esterasas han sido clasificadas como carboxilesterasas = aliesterasas = esterasas B = hidrolasas = E.C.3.1.1.1., excepto que su eficacia no es restringida a compuestos con cadena de carboxilester. Ellas funcionan por destoxificación de ésteres de insecticidas organofosforados, del mismo modo en que los niveles de resistencia están directamente relacionados con el aumento o actividad de esterasas disponibles [p.e. Villani et al., (Op. Cit.)].



En California con mosquitos *Culex tarsalis* Coquillette, dos tipos de mecanismos de resistencia han sido identificados, el incremento de destoxificación y la reducción en la penetración del insecticida. En estudios de esterasas en varias especies y cepas de mosquitos, Giorghiou y Pasteur (1978) reportaron la presencia de cepas de *Cx. tarsalis* resistentes a organofosforados, donde dos esterasas mostraron altos niveles de actividad hacia sustratos de naftil acetatos y su ausencia en cepas susceptibles. Desde entonces estas esterasas, junto con sus altos niveles de actividad han sido presentadas como las responsables de la resistencia a insecticidas organofosforados en numerosas especies de insectos [p.e. Prabhaker *et al.*, (1987)]. La alta actividad de esterasas es asociada con insecticidas resistentes en un gran número de especies de insectos. En *Cx. quinquefasciatus* Say, la resistencia a ciertos insecticidas organofosforados es asociada con una aloenzima de esterasas, esterasa B1. El papel de las esterasas en la resistencia ha sido confirmada por estudios genéticos que han demostrado que las esterasas son indisociables de los fenotipos resistentes [p.e. Ferrari y Georghiou, (1990)]. Una gran cantidad de esterasas y diversos grupos de enzimas, en muchas instancias la variación en la actividad de esterasas han sido asociadas con la resistencia a insecticidas organofosforados. Estas enzimas permiten que el sitio que sirve de blanco, sea catalizado por la hidrólisis del insecticida. En general, las esterasas

tienen un amplio rango de sustratos específicos, ellas pueden unirse a triésteres de fosfato, ésteres, tioésteres, amidas y péptidos [p.e. Dary *et al.*, (1990)].

Las resistencias que presentan las poblaciones de mosquitos de *Cx. tarsalis* en ciertas regiones de Italia ha sido conferidas por dos mecanismos: Elevación no específica de los niveles de esterases y la alteración de la acetilcolinesterasa (AChE), la prevalencia reportada ha sido debido a cambios en respuestas a continuas presiones selectivas de insecticidas. Las alteraciones de sensibilidad a insecticidas en insectos a la acetilcolinesterasa, es uno de los mayores mecanismos causantes de un amplio espectro de resistencia a insecticidas organofosforados y carbamatos [p.e. Hemingway *et al.*, (1991)].

El primer efecto bioquímico asociado con la toxicidad de los insecticidas organofosforados, es la inhibición de la AChE. La función normal de la AChE es la terminación de la neurotransmisión de la ACh liberada en la parte colinérgica del nervio en respuesta a un estímulo nervioso. El daño causado por la actividad de la AChE, conduce hacia rangos con efectos que resultan con la excesiva estimulación nerviosa y culmina con falla respiratoria y finalmente la muerte. La química de inhibición de la AChE y muchas otras esterases por estos químicos es similar y es explicada en forma esquemática

por la Reacción No. 2. Seguido por la formación del complejo de Michaelis (Reacción 1), un residuo específico de serina en la proteína que es fosforilada con pérdida de parte del grupo X (Reacción 2). Dos reacciones más pueden ser posibles Reacción 3 (reactivación), la cual puede ocurrir espontáneamente, un porcentaje de esta reacción es dependiente de la forma como es atacado el grupo y la proteína, siendo dependiente también de la influencia del pH y la adición de reacciones nucleofílicas, tales como las oximas, las cuales catalizan la reactivación; Reacción 4 que envuelve la división de una cadena R-O-P- con el desprendimiento de R y formación de residuos de ácido fosfórico monosustituído al ser atacada la proteína [p.e. WHO, (1986)].

El *Cx. quinquefasciatus* SAYS, es uno de los principales mosquitos vectores de la filariasis linfática humana en Africa tropical. El intenso uso de insecticidas contra los mosquitos, aplicado a sitios de criaderos cercano a las viviendas humanas, ha dado como resultado el desarrollo de la resistencia a organofosforados, carbamatos y piretroides, como también fué originada la resistencia al DDT y los ciclodienos. Las esterasas con extremadas altas actividades a alfa y beta naftil-acetatos han sido observado en cepas resistentes de *Cx. quinquefasciatus*. El incremento de la destoxificación es una ruta obvia de la resistencia, sin embargo, es probable que la función de estas enzimas sólo funciona por la privación y

competencia con el blanco de la acetilcolinesterasa (AChE) para el insecticida. La masiva sobreproducción de cualquier proteína de esterasa por insectos resistentes, da como resultado en la destoxificación de los ésteres del insecticida, primero por privación y luego por hidrólisis cuando es inhibida la reacción de las esterasas [p.e. Khayrandish y Wood, (1993)]. En estudios sobre los altos niveles de esterasas A<sub>2</sub> y B<sub>2</sub> y el metabolismo de los insecticidas en dos cepas de *Cx. quinquefasciatus*, la Pel-RR (resistente) y la Pel-SS (susceptible), con los insecticidas malatión y fenitrotión. El fenitrotión presentó una hidrólisis más rápida que el malatión, lo cual significa que una gran cantidad de fenitrotión fue metabolizado en Pel-RR comparado con la cepa susceptible Pel-SS, sin embargo la cantidad de malatión metabolizada en las dos cepas no fue significativamente diferente. En donde los mayores metabolitos en la cepa Pel-RR fueron el 3-metil,4-nitrofenol y el carboxifenitrotión; los cuales son productos del metabolismo a base de esterasas. En tanto que la cepa Pel-SS, los mayores metabolitos fueron el 3-metil,4-nitrofenol y el fenitrooxón. El 3-metil, 4-nitrofenol fue producido en una significativa gran cantidad en la cepa Pel-RR que en la cepa Pel-SS (Cuadros IX y X). Existiendo más hidrólisis de esterasas en el fenitrotión que oxidasas o glutatión-S-transferasas metabolizadas en Pel-RR, lo cual sugiere que los altos niveles de esterasas en las cepas así el metabolismo, en

cuanto a sus funciones y su relativa importancia dependerá del insecticida utilizado [p.e. Peiris y Hemingway, (1993)].

## **7. Medidas para Contrarrestar el Desarrollo de la Resistencia.**

El interés en el control biológico de insectos ha sido grandemente considerado, por el desarrollo de la resistencia a los insecticidas en consecuencia el aprovechamiento del control químico ha sido parcial y ha ocasionando además problemas referentes a contaminación del ambiente y a riesgos de la salud. Durante años recientes muchos intentos de avances se han hecho en el desarrollo del control de insectos por manipulación genética. Estos métodos incluyen la técnica de machos estériles, el cual sido eficaz y predecible. En recientes experimentos de campo llevados a cabo por la OMS en *Cx. fatigans* han demostrado que la ocurrencia natural de los mecanismos citogenéticos, como la incompatibilidad citoplasmática puede ser utilizada exitosamente sin el uso de radiaciones o quimioesterilizantes [p.e. OMS, (Op. Cit.)].

El Comité de la OMS de Expertos de Insecticidas, ha examinado los progresos realizados en la utilización de esterilizantes químicos, de sustancias miméticas de las hormonas juveniles y de agentes de lucha biológica tales como nemátodos, hongos, protozoos, bacterias y virus. Se ha hecho observar que el origen natural de los productos que pueden

sustituir a los insecticidas químicos, no significa necesariamente que estén exento de riesgo para las personas, los animales domésticos y la fauna [p.e. OMS, (1967)]. Hasta la fecha, sólo se ha aislado un reducido número de virus patógenos para los artrópodos de importancia en la salud pública y veterinaria. Diversos virus que presentaban cuerpos de inclusión de polihidrosis nuclear o citoplasmática han sido aisladas en mosquitos (*Aedes*, *Culex* y *Anopheles*). En *Anopheles* se ha aislado un poxvirus y en especies de *Aedes* y *Simulium* virus iridiscentes. La infección experimental ha tenido éxito y se han definido las propiedades particulares de algunos de estos virus. Actualmente se esta estudiando la estructura, la especificidad y la epidemiología de algunos virus con inclusiones de polihidrosis nuclear y citoplasmáticas de virus iridiscentes [p.e. OMS, (1973)].

La utilización de insecticidas selecciona de manera inevitable mutaciones genéticas que confieren resistencia. Sin embargo, en todos los programas de lucha contra vectores, habrá una proporción de la población que elude el tratamiento o que consiste en inmigrantes provenientes de otras zonas no rociadas. Los genes no seleccionados aportados por estos insectos a generaciones subsiguientes tienden a demorar el establecimiento de la resistencia. Esta aportacion podria maximizarse, mediante la aplicación de las siguientes medidas: limitación del control químico a zonas con elevados niveles de

transmisión de enfermedades; limitación del control químico a las estaciones del año en que la transmisión de enfermedades llegan al nivel más elevado; utilización de métodos de control no químico únicamente, o reemplazo de insecticidas de acción residual por los de acción no residual aplicados solo cuando son esenciales para la lucha adecuada contra vectores [p.e. OMS, (Op. Cit.)].

Al examinar estrategias que entrañan el uso de dos insecticidas, en general uno no se puede permitir pasar por alto el riesgo de que la población a la que se destinan las medidas desarrolle resistencia a ambos compuestos. Ese riesgo se puede reducir intercambiando dos o más insecticidas no relacionados ("rotación"). Hay tres medios diferentes de proceder al respecto: cambiando de insecticidas cuando el nivel de resistencia a un insecticida llega a un nivel intolerable; intercambiando la primera vez que se detecta la resistencia a un insecticida; intercambiando de acuerdo con un programa planificado previamente. Cuando la resistencia al insecticida alcanza niveles de importancia para las operaciones, se plantea la cuestión de qué insecticida o insecticidas de sustitución han de elegirse. La elección dependerá de varias consideraciones prácticas, como la eficacia, la disponibilidad de formulaciones adecuadas, los costos, la seguridad y los efectos ambientales. Siendo el factor más importante, el potencial que tenga la población de insectos de

resistencia significativa en el campo a un insecticida en particular [p.e. OMS, (Supra Cit.)].

En los programas de lucha antivectorial, las mayores oportunidades para contrarrestar la resistencia dependerá de la habilidad que se tenga de limitar el grado de presión de selección de acuerdo con la "propensidad a la resistencia" de la población que es objeto de tratamiento. La resistencia será demorada o inhibida si el plaguicida tiene una breve estabilidad química, sino está relacionado con un producto químico empleado anteriormente, y si la formulación no permite una prolongada liberación de la sustancia química en el ambiente [p.e. Georghiou, (Op. Cit.)].

En lo referente a los programas de lucha contra vectores, es de importancia determinar que factores cabe modificar para prevenir, o cuando menos retrasar, la aparición de la resistencia. Sería muy conveniente llegar a expresar en términos cuantitativos estos factores con una precisión suficiente para intentar predecir la posibilidad de una resistencia y su ritmo de crecimiento. Por desgracia, esto parece imposible mientras no se esclarezcan la existencia y frecuencia de los genes resistentes en poblaciones silvestres de insectos. Sin embargo, partiendo de una supuesta frecuencia de estos genes, ha de ser posible cuantificar los factores ecológicos suficientemente para poder identificar los



más importantes incluso quizás modificarlo. No obstante, parece que por lo general, la modificación del tipo y la intensidad es la que ofrece más posibilidades de frenar el ritmo de desarrollo de la resistencia [p.e. OMS, (Op. Cit.)]. Para retrasar la aparición de la resistencia, hay que limitar las aplicaciones de los insecticidas a zonas y estaciones en las que la transmisión de la malaria sea máxima, para reducir la exposición de poblaciones de vectores y, por tanto, la presión selectiva sobre estas. La limitación de la zona de aplicación de los insecticidas permite la existencia de una gran población no expuesta y no seleccionada que puede diluir los genes de la resistencia que surgen en la zona de control de la malaria por la inmigración de insectos sensibles. Cuando el alelo de la resistencia es dominante puede aparecer rápidamente una resistencia, el insecticida empleado no debería ser persistente o desaparecer gradualmente con el tiempo a fin de seleccionar los sensibles y no los heterocigotos [p.e. Taylor y Georghiou, (1979)]. Deberá realizarse los mayores esfuerzos para retrasar o evitar el desarrollo de la resistencia, porque una vez que aparece la única alternativa es el cambio de insecticida. Aunque será difícil, si no imposible, eliminar la resistencia, los cambios de estrategia de control al menos pueden retrasarla hasta que se disponga de mejores medidas de alternativas de control. Sugiriéndose que los programas de control podrían evitar la resistencia considerando las siguientes medidas: a) Reduciendo

la aplicación de insecticida a zonas focales bien definidas de transmisión en vez de cubrir amplias extensiones; b) Aplicando el insecticida solo cuando la actividad estacional del vector y la transmisión de la enfermedad sean máximas, en vez de mantener todo el año niveles residuales elevados de insecticida; c) empleando insecticidas residuales que no se utilicen en la agricultura local; d) No usando el mismo insecticida contra las poblaciones de larvas y adultos; e) empleando el control no químico donde y cuando sea posible [p.e. Georghiou, (Op. Cit.)].

Probablemente el factor más importante en el manejo de insecticida sea evitar el cambio prematuro de estos. Después de seleccionar un insecticida para un programa de control, hay que elegir un insecticida alternativo según las pruebas de efectividad y resistencia cruzada para utilizarlo cuando aparezca la resistencia. El insecticida primero se emplea hasta que su efectividad se vea comprometida y en evaluaciones amplias se compruebe el fracaso del control [p.e. Brown, (Op.Cit.)].

El manejo de la resistencia abarca todas las medidas para retrasar o prevenir grados de resistencia que superen aquellos que obligan a abandonar el insecticida, manteniendo al mismo tiempo el control eficaz de la enfermedad. Esto implica aplicar sólidos conocimientos técnicos y los medios

disponibles para prolongar el uso eficaz de insecticida en la forma más prudente y eficaz en relación con el costo. Exige un sistema confiable de vigilancia, detección temprana y vigilancia precisa. Para el manejo eficaz de la resistencia, el primer paso es tomar todas las precauciones necesarias para prevenir la aparición de resistencia y preparar por adelantado un plan para contrarrestarla en las etapas tempranas de su desarrollo. Las principales medidas específicas que se pueden aplicar en el proceso de control de la resistencia son: a) selección y secuencia del empleo de insecticida; b) aplicación selectiva de insecticida, que involucra aplicación focal, aplicación estacional, aplicación parcial de insecticida en determinados sitios de reposo, aplicación parcial de plaguicidas a mosquiteros, cortinas y trampas; b) rotación de plaguicidas; c) mezclas de plaguicidas; d) uso de sinergistas, e) empleo de dosis bajas o altas [p.e. OMS, (1985)].

Se puede definir la lucha antivectorial integrada como la utilización de todos los procedimientos tecnológicos y de ordenamiento apropiados para lograr un grado eficaz de disminución de los vectores con una relación adecuada entre costo y eficacia. En este sentido, el concepto de lucha antivectorial integrada no es nuevo en el campo de la lucha contra los vectores como medio para eliminar las enfermedades. A fines del siglo XIX y a comienzos del XX, cuando se comprobó y reconoció la función de los vectores en la transmisión de

las enfermedades, las recomendaciones para el ordenamiento y la lucha incluía: 1) protección personal mediante mamparas, mosquiteros y uso de repelentes; 2) ordenamiento del hábitat y reducción de las fuentes y eliminación de los criaderos artificiales; 3) uso de insecticidas como larvicidas y adulticidas; 4) estimación de las posibilidades de la lucha biológica; 5) capacitación y educación [p.e. OMS, (1983)].

El requisito esencial de la lucha antivectorial integrada es la disponibilidad de más de un método de lucha o posibilidad de usar un método que favorezca la acción de otro, por ejemplo, un insecticida selectivo que no tenga efectos nocivos sobre otros agentes de lucha biológica que exista en la naturaleza. Requiriendo aún más, conocimientos para identificar el vector y su función en la transmisión de enfermedades, para descubrir su distribución geográfica y estacional y para documentar su ciclo biológico. Es importante una mayor comprensión del efecto de los métodos de lucha sobre la etapa o etapas del vector que resulten afectadas; esa comprensión se basa en el conocimiento de las poblaciones de vectores y de la dinámica de la transmisión. Los beneficios deben ser evidentes y justificar los costos [p.e. OMS, (Supra Cit.)]. El interés en el control biológico ha tenido una gran importancia en los últimos años, debido al desarrollo de la resistencia contra los insecticidas utilizados y consecuentemente el parcial aprovechamiento del

control químico. Otro factor de importancia, son los problemas de contaminación ambiental y su asociación con el riesgo de la salud. Durante los últimos años, se ha considerado los avances que se han hecho en las investigaciones sobre el control de insectos por manipulación genética de las poblaciones. El control genético de los insectos no está solamente limitado al uso de machos radioesterilizados o quimioesterilizados, otros mecanismos conocidos por los geneticistas son probados o adaptados para el control de vectores. Estos incluyen incompatibilidad citoplasmática, híbridos estériles, translocación cromosómica, distorsión de sexo por radiación y genes letales condicionales [p.e. Knipling (1968)].

Por control biológico entendemos, el control de una especie por la acción directa o indirecta de otra especie animal que es su enemigo natural, con o sin sus metabolitos. La razón por la cual en las últimas décadas se ha presentado un resurgimiento del control biológico obedece a la desilusión con los métodos de control químico. Se suma la escalada de los precios, el incremento de la resistencia y la contaminación ambiental [p.e. OPS, (Op Cit.)].

Debido a los problemas de contaminación con insecticidas sintéticos, los altos costos que representa su desarrollo, y la resistencia mostrada por especies de mosquitos, estos

factores han estimulado la interesante aplicación de la biología molecular en el estudio de mosquitos vectores de malaria, enfocado hacia dos aspectos. Primero, el aumentar la existencia de medidas de control que van desde el desarrollo de un sistema de prueba simplificado de ADN para la identificación de especies, cuando se trata de complejo de especies. El segundo aspecto, es considerar el desarrollo completo de nuevas estrategias para la manipulación genética de mosquitos vectores de malaria, con el fin de alterar su habilidad de transmitir la enfermedad. El mayor requerimiento es la producción de mosquitos transgénicos que junto con otras perspectivas pueden llegar a utilizarse para el futuro control de la malaria [p.e. Crampton, et al (1990)].

**CAPITULO II**

**METODOLOGIA**

Para la realización del presente estudio, se contó con las facilidades de las instalaciones del Ministerio de Salud ubicadas en la División de Control de Vectores, específicamente en el Departamento de Entomología. Utilizándose además las instalaciones técnicas del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Tropicales Smithsonian, localizadas en la isla de Naos.

#### **1. Colecta y Colonización de Cepas de *Anopheles albimanus*.**

Para la ejecución de esta primera fase de la parte experimental de este estudio, se colectó material biológico de *An. albimanus* provenientes de dos localidades del país. La selección de los lugares de colecta de mosquitos adultos, se hizo en base a regiones que han estado por lo general sometida a una continua presión selectiva de insecticidas, ya sea de uso en salud pública o en el agricultura. Una de las cepas se colectó en la localidad de Barranco o Barranco Montaña ubicada entre las coordenadas geográficas de Latitud  $09^{\circ} 31' 23''.4$  y Longitud  $82^{\circ} 42' 07''.3$ , en la provincia de Bocas del Toro. La otra cepa fué colectada en la región del Bayano, en la localidad de Puente Bayano, ubicada entre las coordenadas geográficas de Latitud  $09^{\circ} 09' 29''.3$  y Longitud  $78^{\circ} 48' 01''.5$ , en el sector este de la provincia de Panamá.



Los especímenes de cada una de las cepas colectadas, fueron puestos en jaulas especiales y se alimentaban con sangre de cobayos, dentro de las jaulas se colocaban bandejas con agua para la obtención de posturas y de esta forma mantener durante varias generaciones las dos colonias de mosquitos para poder ser utilizadas en este estudio. Las jaulas fueron mantenidas en el insectario del Departamento de Entomología. El área donde estaban las colonias de *An. albimanus*, se registró la temperatura máxima y mínima, y la humedad relativa; obteniéndose promedios mensuales de 30.0°C y 28.5 °C y 67.5%, respectivamente.

## **2. Pruebas Bioquímicas.**

En cuanto a la metodología utilizada para la realización de las pruebas bioquímicas, esta se hizo mediante ensayos electroforéticos utilizando gel de celulosa en acetato, el cual brinda un método sensible, que al igual que las otras técnicas electroforéticas, permite detectar pequeñas diferencias en moléculas casi idénticas. Las diferencias más fácilmente detectables por este método son sustituciones de aminoácidos que se traducen en una carga diferente en una molécula proteica, ya sea porque el aminoácido sustituido parte la carga diferente o porque su sustitución resulta en un cambio en la configuración de la molécula y así hay en consecuencia un cambio en la carga debido a que se cubran o no grupos ionizables.

Para una mejor descripción de la metodología utilizada, el procedimiento fué dividido en partes o pasos.

## **2.1 Preparación del Sistema Buffer.**

### **2.1.1 Buffer del gel y electrodos.**

El buffer utilizado tanto para los geles como para los electrodos, consistió de Tris-glicina pH = 8.5. Su preparación se realizó utilizando 30 g de Trisma base y 144 g de Glicina diluida con agua destilada, para una cantidad total de un litro. Antes de ser utilizada esta solución, se hacía una dilución de 1:9 con agua destilada para la obtención de un buffer de pH = 8.5; el cual se utilizaba para la inmersión de los geles y para los electrodos durante las corridas.

### **2.1.2 Preparación del buffer de las esterasas**

En cuanto al sistema buffer para el revelado de las enzimas, se realizó de acuerdo a Steiner y Joslyn (1979), se preparó un buffer a partir de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  A (fosfato de sodio monobásico) 0.2M, se pesó 13.2 g y se le adicionó agua destilada para un volumen total de 500 ml y pH = 4.4. Una segunda solución se hizo a partir de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  B (fosfato de sodio dibásico), agregando 26.81 g de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  B a 500 ml de agua destilada para la obtención de un pH = 8.7. Cada una de las soluciones buffer fueron guardadas en envases oscuros y

almacenados en la refrigeradora a una temperatura aproximada de 5 °C para su posterior uso.

## **2.2 Substratos de las Esterasas A y B**

Para la preparación de los sustratos de las esterases A y B, se utilizó respectivamente 1.0 g de alfa naftil acetato en 50 ml de acetona; y 1.0 g de beta naftil acetato en 25 ml de acetona y 25 ml de agua destilada. Ambas soluciones fueron puestas cada una en envases oscuros y guardadas en el congelador, para mantenerlos a temperaturas bajo cero; según indicaciones de Steiner y Joslyn (Op. Cit.)

## **2.3 Preparación del Agar**

El agar utilizado para cubrir el gel de celulosa fijado en láminas de acetato durante el proceso de tinción de las esterases, se preparó con 3.6 g de agar grado bacterial en 250 ml de agua destilada, el cual fue calentado por dos a tres minutos en un micro-onda y guardado en el refrigerador a temperatura de aproximadamente 5°C para luego ser utilizado.

## **2.4 Instalación del Aparato de Electroforesis**

El aparato de electroforesis utilizado para la realización de las corridas electroforéticas (Foto 1), consta de tres cámaras, dos cámaras donde se encuentran los electrodos que corren a lo largo de las mismas y es donde se

deposita el buffer Tris-glicina pH = 8.5. En la tercera cámara central, eran colocadas dos segmentos de esponjas que con anterioridad eran sumergidas en agua y metidas al congelador para ser utilizada durante las corridas.

Antes de cada corrida electroforética, la instalación secuencial del aparato de electroforesis se realizaba de la manera siguiente: Se conectaba la cámara electroforética a la fuente de poder, que previamente había sido graduado al voltaje recomendado. Luego en el borde interior de cada cámara donde se encuentran los electrodos se colocaba un soporte, seguidamente se adicionaban a las cámaras el buffer Tris-glicina con pH = 8.5 hasta llegar al nivel inferior de cada soporte; sobre los soportes eran colocadas bandas de papel filtro que una vez humedecidas con el buffer permitirían que las láminas de geles tuvieran un buen contacto con los electrodos. Posteriormente, se colocaban en la cámara central las esponjas, que tenían la función de mantener una temperatura adecuada durante las corridas. De esta forma el aparato de electroforesis quedaba instalado y listo para iniciar las corridas electroforéticas.

## **2.5 Preparación de los Geles**

Los geles de celulosa en láminas de acetato (Titan III, Helena Laboratories), antes de llegar a fijar las muestras de mosquitos, eran puestas en una gradilla especial

para ser sumergidas en un envase de 500 ml que contenía el buffer Tris-glicina pH = 8.5. Al ser sumergidas las láminas de gel, se hacía lentamente para prevenir la formación de burbujas en los geles, dejándose sumergida por aproximadamente 20 minutos antes de ser utilizadas (Foto 2).

## **2.6 Preparación de las Muestras y Corrida Electroforética**

Las muestras de cada uno de los mosquitos adultos utilizados, eran homogenizados en 25  $\mu$ l de una solución buffer 0.1M que contenía 10% de sucrosa y una pequeña cantidad de azul de bromofenol; todo este procedimiento era realizado sobre una bandeja con hielo (Foto 3). Una vez homogenizadas las muestras, se extraía de cada una de ellas 10  $\mu$ L del homogenado utilizando un "tips" para cada una de las muestras, las muestras se colocaban en una gradilla especial con capacidad para 12 muestras; en el último espacio era puesto un marcador (azul de bromofenol). Completada esta fase, se sacaban las láminas de gel de la solución de buffer y eran puestas sobre papel filtro para quitarle el exceso de la solución buffer; seguidamente con un aplicador las muestras eran fijadas en los geles. Finalmente, los geles eran colocados sobre los soportes de la cámara de electroforesis, con el lado donde está el gel fijado hacia abajo y ubicando la parte donde se hizo la aplicación hacia el electrodo (negativo) para que las enzimas corrieran hacia el electrodo

positivo. Las corridas eran efectuadas a temperatura ambiente a 200 voltios y por 20 minutos (Fotos 4, 5 y 6).

## 2.7 Tinción del Gel

Una vez completada cada corrida las láminas de gel se colocaban en unas bandejas, con el lado en que se encuentra fijado el gel hacia arriba. Para el revelado de las esterases A y B se siguió la siguiente metodología: 1) para la tinción de la esterasa A, en un pequeño vaso químico plástico de 10 ml se adicionaban 2 ml de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , A, 400  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , B, 1.6 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, 100  $\mu\text{l}$  del substrato de la esterasa A  $\alpha$ -naftil acetato y por último 0.0066 mg de Fast Blue RR Salt; 2) Para la tinción de la esterasa B se adicionaban en otro vaso químico los mismos reactivos y cantidad antes mencionada; a excepción de los 100  $\mu\text{l}$  de  $\alpha$ -naftil acetato que eran reemplazados por el substrato de la esterasa B, el  $\beta$ -naftil acetato, del que se agregaba también 100  $\mu\text{l}$  (Foto 7).

Una vez realizada rápidamente esta fase, a cada una de las soluciones finales se le adicionaba de manera rápida también 2 ml de agar, que previamente había sido calentado a una temperatura promedio de 60 °C, y se agitaba la bandeja para que la solución se distribuyera de forma homogénea sobre los geles.

Completado este paso, la bandeja con los geles eran

colocadas en un compartimento oscuro por un período de tiempo de aproximadamente 45 min (Foto 8). Luego de reveladas las enzimas, los genes eran lavados con agua destilada y colocados en una incubadora a 70 °C por aproximadamente 10 minutos. Una vez secas las láminas de geles, eran guardadas para su posterior lectura para determinar la movilidad electroforética o Rf de las esterasas de cada una de las muestras en los distintos geles utilizando un Vernier (Foto 9).

**CAPITULO III**  
**RESULTADOS Y DISCUSION**



## 1. Patrones Electroforéticos de las Esterasas A y B.

Los patrones de bandas enzimáticas observadas en este estudio, sobre los niveles de actividad de esterásas A y B relacionados con la resistencia a compuestos organofosforados, se obtuvieron mediante el uso de técnicas electroforéticas con geles de celulosa en láminas de acetato. Para la obtención de estos patrones de esterásas, se utilizaron muestras de poblaciones de mosquitos adultos de *An. albimanus* de las cepas de Barranco Montaña y Puente Bayano. Mediante el uso de esta técnica, las esterásas se hicieron visibles inmediatamente luego de ser teñidos los geles, mostrando una clara y consistente diferencia entre las intensidades de las bandas de esterásas A y B; en presencia de alfa y beta naftil-acetato que son utilizados como substratos debido a su elevada actividad hidrolítica. Las esterásas de los especímenes utilizados de las cepas de Barranco Montaña y Puente Bayano, aparecieron en forma de bandas de color azul y rojo respectivamente en el enzimograma. Las bandas azules son conocidas como esterasa A, que son con preferencia hidrolizadas por alfa naftil-acetato; y las bandas rojas corresponden a la esterásas B, y que son hidrolizadas con preferencia por beta naftil-acetato. Las bandas azules de esterasa A, corresponden a individuos susceptibles y las bandas rojas de esterásas B a mosquitos resistentes a

compuestos organofosforados de acuerdo a la nomenclatura adoptada por Georghiou y Pasteur (1978).

Para la determinación de los niveles de esterasa A y B se utilizaron un total de 736 muestras de mosquitos de *An. albimanus*, 369 muestras de mosquitos adultos utilizados procedían de la cepa de Barranco Montaña y 367 especímenes mosquitos adultos de la cepa de Puente Bayano.

## **2. Efecto de la Edad en la Actividad de las Esterasas.**

Durante las pruebas bioquímicas se utilizaron muestras de hembras adultas de las dos cepas en este estudio, con un tiempo de vida entre 3 y 10 días de emergencia, mostrándose una mayor intensidad de tinción de las esterasas, que en las bandas de mosquitos con un mayor período de tiempo de emergencia. Sin embargo, se notó poca variación en la intensidad de tinción en las bandas de esterasas de mosquitos con más de 10 días de emergencia. Estos resultados tienen un significado igual o similar a los obtenidos por Gargan y Barr (1977), quienes encontraron poca variación en la intensidad de tinción de las bandas utilizando mosquitos adultos entre 4 a 21 días de emergencia; sin encontrar diferencias cualitativas en el enzymograma de adultos de diferentes edades. Villani *et al.* (1983), obtuvieron patrones de bandas de esterasas bien definidas utilizando hembras adultas de mosquitos de *Cx.*

*pipiens* de 2 a 10 días de emergencia, éstos mismos resultados fueron utilizados para todo el estudio. Por su parte, Georghiou y Pasteur (1990), en estudios realizados sobre la actividad de variación de la esterasa B, en *Cx. quinquefasciatus*, manifiestan que entre los diversos factores que pueden ser considerados en la declinación de la actividad de la esterasa, es la edad de los mosquitos adultos, en donde el porcentaje de declinación de la cepa estudiada fue de aproximadamente 7% por día en mosquitos de 1 a 4 días de edad, y de 1% con mosquitos con más de 4 días de edad hasta 20 días de emergencia. Por otro lado, Peires y Hemingway (1993), hacen mención en sus pruebas electroforéticas para la determinación de los niveles de actividad de las esterases, que todos los valores en sus estudios fueron obtenidos de mosquitos adultos de *Cx. quinquefasciatus* de un día de emergencia. Manifestando además, que factores ambientales como los nutricionales o el estado reproductivo, pueden contribuir a la variación de la actividad de las esterases. Mencionando además, que la magnitud del efecto del comportamiento en la actividad enzimática es probable que sea mayor en poblaciones de campo, que las que pertenecen a cepas de laboratorio.

### **3. Comportamiento de los Patrones de Esterasas.**

La actividad registrada por las bandas de esterases A y B reveladas en los ensayos electroforéticos utilizando geles

de celulosa con muestras de mosquitos de *An. albimanus* de las cepas de Barranco Montaña y Puente Bayano, de forma general llegaron a mostrar una clara definición de las bandas enzimáticas, sin embargo, en cuanto al comportamiento de la intensidad de tinción de las diferentes bandas de esterases A y B en los distintos geles con las muestras de mosquitos utilizadas, se llegó a observar diferencias en las intensidades de las bandas de esterases en un mismo gel, y de un gel a otro. También se observaron variaciones en los patrones de esterases A y B entre las cepas utilizadas, en cuanto a su movilidad electroforética o  $R_f$  se refiere.

### **3.1 Patrones de Esterasa A.**

#### **3.1.1 Cepa Barranco Montaña**

Utilizando muestras de hembras adultas de *An. albimanus* de 3 a 10 días de emergencia de la cepa de Barranco Montaña, se llegaron a realizar un total de 17 pruebas o corridas electroforéticas, usando 187 especímenes, de los cuales se llegaron a revelar un total de 185 bandas de esterases luego de haber incubado los geles en presencia de alfa naftil-acetato en un compartimiento oscuro por aproximadamente 45 minutos. El comportamiento o variabilidad en la intensidad de tinción de las bandas de esterases A observadas individualmente en cada uno de los geles en la cepa de Barranco Montaña, fue visible en las bandas enzimáticas reveladas en todos los geles, a través de una tinción

predominantemente fuerte de color azul en los patrones de esterases de las bandas 1, 8, 9, 10 y 11; indicando de esta manera una elevada actividad de esterasa A1; ellas registraron una movilidad relativa o Rf promedio de 0.95, 0.92, 0.91, 0.91 y 0.91, respectivamente. Por su parte las bandas de esterases que revelaron una moderada tinción con respecto a las anteriores bandas mencionadas, fueron las bandas 2, 3, 4 y 6, con una actividad intermedia de esterasa A1; promedios de 0.95, 0.94, 0.94 y 0.92, respectivamente. Por último, las bandas de esterasa A1 en que se observó una baja intensidad de tinción con respecto a los dos grupos anteriores, fueron las bandas 5 y 7, registrando bajos niveles de actividad de esterasa A1; con Rf promedios de 0.93 en ambas bandas enzimáticas.

La banda de esterasa que más rápidamente migró, le fue asignado el valor de Rf = 100, y tenía la misma movilidad que el marcador azul de bromofenol (Foto No. 10). En tanto que la gráfica No. 1 muestra el comportamiento de los patrones de esterasa A1 en la cepa de Barranco Montaña, considerando los Rf y la variabilidad de las intensidades de tinción de las bandas enzimáticas.

### 3.1.2 Cepa Puente Bayano.

Con las muestras de hembras adultas de *An. albimanus* de Puente Bayano con un período de emergencia de 3

a 10 días, se llegaron a realizar un total de 17 electroforegramas con sus respectivas geles de celulosa; con este total de geles se evaluaron 187 muestras de mosquitos, que dieron como resultado un total de 183 bandas de esterasa A reveladas. El comportamiento de las bandas enzimáticas registrado en las bandas de esterasa A1, permitió a observar una fuerte intensidad de tinción de las bandas 1, 2, 9, 10 y 11; siendo éstas bandas las que registraron el mayor nivel de actividad de la esterasa A1 en la cepa de Puente Bayano. En cada una de estas bandas se registró una movilidad electroforética promedio de 0.96, 0.96, 0.93, 0.92 y 0.92, respectivamente. En tanto que las bandas en las cuales se observó una moderada tinción con respecto a las anteriores fueron las bandas 3, 4, 6 y 8 con una actividad enzimática intermedia de esterasa A1, y con registro de Rf de 0.96, 0.94, 0.94 y 0.93, respectivamente. Finalmente, las bandas de esterases que mostraron baja intensidad de tinción, con su correspondiente baja actividad de esterasa A1, fueron las bandas 5 y 7; con Rf de 0.95 y 0.94 respectivamente. La Foto No.11 muestra la distribución e intensidad de las bandas de esterasa A en la cepa de Puente Bayano. En la gráfica No. 2, se observa las variaciones en el comportamiento de los patrones de la esterasa A1 en la cepa de Puente Bayano, y muestra las bandas con una fuerte, intermedia y baja actividad de los niveles de esterasa.

### 3.2 Patrones de Esterasa B.

#### 3.2.1 Cepa Barranco Montaña.

En lo referente al comportamiento de las bandas de esterasa B, utilizando muestras de hembras adultas de *An. albimanus* con un tiempo de emergencia de 3 a 10 días de la cepa de Barranco Montaña, se llegaron a correr un total de 17 pruebas electroforéticas con la cantidad de 187 mosquitos; de este total se llegaron a revelar un total de 185 bandas de esterasa B. La variabilidad registrada en las intensidades de tinción en los patrones enzimáticos en las diferentes muestras de mosquitos, mostraron que las bandas 2, 6, 10 y 11 una fuerte intensidad de tinción con su correspondiente alta actividad de esterasa B1; registrando una movilidad electroforética o Rf de 0.97, 0.95, 0.93 y 0.93, respectivamente. Las bandas en que se llegó a observar una moderada intensidad de tinción, y a su vez una actividad intermedia de la esterasa B1, con respecto a los grupos anteriores, fueron las bandas 1, 3, 8 y 9, que tuvieron una movilidad electroforética de 0.97, 0.97, 0.94 y 0.94, respectivamente. Por último, las bandas en las cuales esta enzima mostró una baja intensidad en la tinción con respecto a los dos grupos anteriores de bandas, y los más bajos niveles de actividad de la esterasa B1, fueron las bandas 4, 5 y 7; siendo la movilidad electroforética de cada una de ellas de 0.96, 0.96 y 0.95, respectivamente (Foto No. 12). Por su parte en la gráfica No. 3 se observa los patrones enzimáticos

registrados por la esterasa B en la cepa de Barranco Montaña.

### 3.2.2 Cepa Puente Bayano

El comportamiento de los patrones de esterases, utilizando muestras de hembras de *An. albimanus* de la cepa de Puente Bayano, con las cuales se llegaron a realizar un total de 17 electroforegramas, usando un total de 187 mosquitos individuales, y de las cuales se llegaron a revelar un total de 184 bandas de esterasa B. Las bandas de esterases mostraron una fuerte intensidad de tinción en casi todos los geles. Luego de someter a los geles a un proceso de revelado, las bandas en que se observó una mayor intensidad de tinción, fueron las 5, 9, 10 y 11; indicando así altos niveles de actividad de la esterasa B1. Estas bandas llegaron a registrar una movilidad electroforética de 0.95, 0.93, 0.92 y 0.92, respectivamente. Por otro lado, las bandas en las cuales se observó una moderada intensidad de tinción con respecto a las bandas anteriormente mencionadas, fueron las bandas 2, 3, 4, 6 y 8; registrando de esta forma una actividad intermedia de la esterasa B1. En estas bandas se obtuvo un Rf de 0.97, 0.96, 0.96, 0.95 y 0.94 para cada una de ellas, respectivamente. Finalmente, en las bandas en las cuales se pudo observar una baja intensidad de tinción, con respecto a los dos grupos antes mencionados, y con una baja actividad de esterasa B1, fueron las bandas 1 y 7. Estas dos bandas tuvieron una movilidad relativa de 0.97 y 0.94,



respectivamente (Foto No. 13). En la gráfica No. 4, se observa el comportamiento mostrado por la esterasa B en la cepa de Puente Bayano.

#### **4. Niveles de Actividad de las Esterasas A y B.**

Los resultados obtenidos en este estudio a través de las pruebas bioquímicas para la determinación de los niveles de actividad de las esterazas A y B asociadas con la resistencia de mosquitos a insecticidas organofosforados, utilizando para esta investigación hembras adulta de *An. albimanus* de las cepas de Barranco Montaña y Puente Bayano. La actividad general de las esterazas se determinó mediante el registro de las diferencias observadas en los patrones de las bandas enzimáticas, con respecto a las variaciones de las intensidades de tinción de cada una de las bandas de esterazas en los distintos geles de celulosa. Los patrones de las bandas de esterazas, fueron analizados de forma individual en cada una de las muestras de mosquitos de *An. albimanus*, para así llegar a conocer los niveles de actividad general de las esterazas A y B en las dos cepas de mosquitos utilizados en este estudio.

##### **4.1 Actividad de la Esterasa A**

Considerando los resultados obtenido en nuestra investigación, podemos manifestar que de acuerdo a la interpretación de las observaciones realizadas en los patrones

de esterasa A, en relación a las intensidades de tinción de las bandas enzimáticas de las cepas de Barranco Montaña y Puente Bayano asociadas con mosquitos susceptibles a compuestos organofosforados; ambas cepas mostraron un comportamiento casi similar en los niveles de actividad general de la bandas de esterasa en cada uno de los geles. Según los resultados anteriormente descritos, con respecto a los patrones enzimáticos de la esterasa A, en las dos cepas de mosquitos de *An. albimanus*, en la cual no se llegó a observar una fuerte intensidad de tinción en todas las bandas de esterases en cada uno de los geles. Observándose en ambas cepas solo cinco bandas fuertemente teñidas, indicando elevados niveles de actividad de la esterasa A, en tanto que se observó una actividad intermedia de acuerdo a la intensidad de tinción en cuatro bandas enzimáticas; y una baja actividad de la esterasa A en dos bandas en cada una de las cepas.

Con estos resultados obtenidos en los patrones de la esterasa A, de acuerdo a las intensidades de tinción de las bandas enzimáticas, hemos llegado a determinar que ambas cepas de *An. albimanus* existe una relativa sensibilidad a insecticidas organofosforados, en este caso específicamente al fenitrotión.

Los resultados obtenidos en esta investigación hacen meritorio considerar, en relación a la variación observada en

la actividad general de las esterasas, los estudios realizados con esterasas por Georghiou y Pasteur (1978), ellos tomando en cuenta la existencia de diferencias extremas en el grado de la intensidad de tinción de las bandas enzimáticas, dividieron la esterasa B en dos grupos: la esterasa B1, con una actividad extremadamente alta, y la esterasa B2, con una baja actividad. En *Cx. pipiens*, llegaron a demostrar que existen tres esterasas codificadas en el locus, la Est-1, Est-2 y Est-3; y que esta codificación es encontrada de igual forma en las esterasas de tipo A y B. De acuerdo a este planteamiento y a los resultados obtenidos en esta investigación, el tipo de esterasas revelado en las dos cepas de *An. albimanus*, considerando la intensidad de tinción de las bandas enzimáticas, corresponde a la esterasa A1; llegándose también a registrar en este estudio la Est-2 y Est-3. En cuanto al decrecimiento de la actividad de la esterasa A en este estudio en distintos geles, de acuerdo a Georghiou y Pasteur (1981), indican que esto puede ser explicado por la competencia entre los fosforotioatos (P=S) y el alfa naftil-acetato. Sin embargo, los fosfatos (P=O), pueden llegar a inhibir la actividad de las esterasas directamente, y que según ellas, las oxidadas de función mixta (OFM) se encuentran indudablemente en el homogenado de las muestras. En las diferencias observadas en los geles, en relación a la movilidad electroforética registrada por los distintos frentes de las bandas enzimáticas (Rees et al. (1985), manifiesta que

estas variaciones pueden llegar a ser atribuidas a diferencias polimórficas y no a diferencias observadas en la intensidad de tinción y que esto se debe a las esterasas asociadas con la resistencia a insecticidas organofosforados.

En relación a los mecanismos involucrados en la resistencia de los insectos a insecticidas organofosforados, indudablemente las esterasas tienen un rol importante en el desarrollo de la resistencia, ello se ha visto reflejado en este trabajo en las intensidades de tinción de bandas enzimáticas, que reflejan los niveles de actividad de las esterasas con respecto a los insecticidas organofosforados. De acuerdo a la OMS (1986), se expresa que se ha demostrado de forma muy clara que el cambio del punto de acción, es una de las causas de la resistencia a los inhibidores de la colinesterasa. En estos casos se produce una acetilcolinesterasa mutante o modificada en su estructura que los insecticidas inhiben más lentamente que la enzima normal de las cepas susceptibles. Por lo general, este fenómeno da resistencia a un gran número de compuestos, aunque el factor de insensibilidad (velocidad e inhibición en las cepas susceptibles con relación a las cepas susceptibles), dependerá también de la sustancia y su estructura química.

Scott y Georghiou (1986), reportaron que la cepas de *An. stephensi* resistentes al malatión, presentaban una alta

actividad de hidrolasas que no se registraba en las cepas susceptibles; y que tampoco llegaban a presentar una alta hidrolización de naftil-acetato. En adición, la ausencia del incremento general de la actividad de las esterases, de acuerdo a tales estudios, solo pueden indicar la completa ausencia de resistencia en una población de campo, lo que puede dar a entender que otros mecanismos no relacionados con este tipo de resistencia pueden estar presentes. Considerando lo anteriormente citado, se manifiesta que no solo las esterases llegan a estar envueltas en la resistencia de mosquitos vectores a insecticidas organofosforados, y que la baja actividad de esterasa A en las dos cepas de *An. albimanus* determinada en este estudio, solo llega a reflejar uno de los mecanismos de resistencia de este vector a los insecticidas organofosforados, por lo que es necesario la realización de otros estudios bioquímicos y metabólicos que permitan conocer la existencia de otros mecanismos de resistencia en estas dos cepas de *An. albimanus*.

#### **4.2 Actividad de la Esterasa B**

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos bioquímicos, mediante la interpretación de los patrones de esterasa B, en relación a las diferencias observadas en la intensidad de tinción de las bandas enzimáticas asociadas con la actividad general de las esterases, se puede manifestar que las cepas de Barranco Montaña y Puente Bayano llegaron a

mostrar poca diferencia en cuanto a los niveles de actividad de la esterasa B1, registrándose actividad también de la Est-2 y Est-3. La actividad mostrada por la esterasa B, puede ser atribuida a la habilidad de este tipo de esterases de hidrolizar un gran número de substratos de compuestos organofosforados resistentes, que en mosquitos susceptibles no llegan a estar presentes, y donde éstos mismos caracteres mostrados por la esterasa B, en lo referente a la esterasa A, puede corresponder a las diferencias de las formas alélicas

Teniendo en cuenta los resultados de las pruebas electroforéticas con la esterasa B, de acuerdo a la variabilidad mostrada en las intensidades de tinción reveladas, que indican la actividad general de las esterases, se puede llegar a manifestar que en las dos cepas de mosquitos *An. albimanus*, se llegó solamente a mostrar una fuerte intensidad de tinción en cuatro bandas, con su correspondiente elevada actividad de esterasa en ambas cepas. Con una actividad intermedia de intensidad de tinción en cuatro bandas en la cepa de Barranco Montaña y cinco bandas en la cepa de Puente Bayano, y registrándose una baja actividad de las esterases de acuerdo a las intensidades de tinción, en tres bandas en la cepa de Barranco Montaña y en dos bandas en la cepa de Puente Bayano.

Con estos resultados obtenidos en esta investigación

con lo que respecta a la esterasa B; que está directamente relacionada con la resistencia a compuestos organofosforados, indican que la resistencia en las dos cepas estudiadas no es significativa de acuerdo a la interpretación de las intensidades de tinción mostrada por los patrones de esterasa. La relativa actividad de la esterasa B, mostrada en las cepas de Barranco Montaña y Puente Bayano, puede ser interpretada como una resistencia intermedia. De acuerdo a Narang (1981) en estudios realizados con la hexoquinasa-1 en *An. albimanus*, quien indica que la inherencia de los patrones y la estructura de la hexoquinasa en el *An. albimanus*, presenta algunas similitudes en las diferencias observadas en estudios similares en otras especies de mosquitos. Considerando los niveles de actividad de la esterasa B1 mostrada en nuestro estudio, y tomando en cuenta los estudios realizados por Curtis y Pasteur (1981), que hacen una misma interpretación de los resultados obtenidos en esta investigación; en sus trabajos con *Cx. pipiens* con esterases, indican que la resistencia intermedia en la cepa de Colombo no puede ser satisfactoriamente explicada por la baja frecuencia en los genes resistentes. La diferencia y menor actividad de los genes resistentes probablemente existen o se debe a una cerrada homocigosis en la población, y esto sugiere que el mecanismo que induce a un incremento en la actividad de las esterases es liberado comúnmente en las especies y presumiblemente, aparece en diferentes lugares

independientemente. Ello indica también que la resistencia intermedia no es una resistencia natural geográfica, sino que es el resultado de la selección, debido al uso de insecticidas organofosforados por más de 20 años.

Es importante manifestar y dejar claramente entendido que existen diversos mecanismos de resistencia que pueden ser utilizados por los insectos al verse sometidos a una presión selectiva por el uso de insecticidas. Con respecto a los niveles de actividad de las esterasas y otros factores relacionados a la resistencia, Villani *et al*, (1983), indica que en ciertos casos donde los altos niveles de resistencia a organofosforados se debe al incremento de las esterasas, y que esto se ha atribuido al incremento de síntesis enzimática, como el resultado de la amplificación y reduplicación de genes de esterasas. De acuerdo a esos estudios, también se manifiesta que los altos niveles de esterasas por sí solos no llegan a ser un factor de resistencia, que hay que tomar en cuenta otros factores involucrados en la resistencia, como la aceleración del metabolismo del agente tóxico por medio de las oxidasas de función mixta (OFM), transferasas de glutatión dependiente, reducción de susceptibilidad en el sitio de acción, escasa penetración en el sitio activo, y la penetración que es otro mecanismo, aunque menos importante. Por último, se indica que en individuos con estos y otros tipos de resistencia no pueden



ser detectados mediante el análisis de esterasas. Por su parte, Hemingway *et al.* (1987), expresan en sus trabajos que los pesticidas utilizados en agricultura que están envueltos en la selección de resistencia, los insectos solo pueden llegar a utilizar los factores de oxidadas y esterasas, como mecanismos de resistencia; y que juntos producen un espectro de resistencia muy similar.

Según Prabhaker *et al.* (1987), de acuerdo a estudios muy similares al presente, manifiesta que las esterasas A3 y B3 presentan respectivamente propiedades bioquímicas muy similares a aquellas que presentan altas actividades de esterasas, como lo son la A1 y B1, que son las responsables de la resistencia a insecticidas organofosforados en mosquitos del complejo *Cx. pipiens*. Donde ellos indican que en recientes pruebas realizadas con esterasas A1 y B1 parcialmente purificadas, el resultado de la actividad de las dos esterasas fue de 70 y 500 veces en un incremento de su producción respectivamente, en mosquitos resistentes.

En trabajos de investigación realizados por Hemingway *et al.* (1989), sobre los mecanismos de resistencia en *Ae. aegypti* con compuestos organofosforados y carbamatos, se manifiesta que el fenitroxón producido es un potente inhibidor de la actividad de la acetilcolinesterasa, y que resultados similares de patrones de inhibición de la

acetilcolinesterasa solo están presentes en cepas resistentes y susceptibles, de acuerdo a estos resultados, se indica que las oxidasas no están envueltas en la resistencia observada. En estudios similares llevados a cabo por Dary *et al.* (1990), expresa que la ausencia en el incremento general de la actividad de la esterasas, no necesariamente llegue a indicar que las esterasas estén ausentes. En sus estudios se llegó a demostrar con una cepa resistente de *An. stephensi* al malatión que existía una alta actividad de hidrolasas, que no se llegaba a registrar en las cepas susceptibles; pero que estas mismas cepas no presentaban una alta actividad de hidrólisis de naftil-acetato. Por tal motivo, se manifiesta que esto puede llegar a tener su origen en la presencia de otros tipos de mecanismos de resistencia. En trabajos realizados por Bisset *Et al.* (1990), relacionados con las esterasas y la correlación de la resistencia de insecticidas organofosforados como el malatión con una elevada actividad de esterasas en cepas de *Cx. quinquefasciatus*, sugiere que la esterasa envuelta es la carboxisterasa. Indicando además que los estudios metabólicos necesitan demostrar si la resistencia al malatión es debido a la hidrólisis del enlace de carboxilester o al desdoblamiento del insecticida por las esterasas.

De acuerdo a Ferrari y Georghiou (1990), el hecho que las cepas de mosquitos que presentan una relativa alta actividad de niveles de resistencia, es debido a una relación

proporcional a los cambios en la actividad de las esterasas, que es un resultado directamente proporcional al cambio en los niveles de resistencia. Por otro lado, Peires y Hemingway (1993), en estudios realizados con dos cepas de *Cx. quinquefasciatus*, la Pel-RR (resistente) y la Pel-SS (susceptible), sobre la caracterización e inhibición de los niveles de esterasas con los insecticidas fenitrotión y malatión, manifiestan que a diferencia del malatión una o ambas esterasas A2 y B2, tienen la capacidad de metabolizar el fenitrotión.

Por medio de la realización del presente estudio, con mosquitos *An. albimanus* de las cepas de Barranco Montaña y Puente Bayano, utilizadas para determinar los niveles de actividad de esterasas relacionados con la resistencia a insecticidas organofosforados, se ha podido confirmar que la actividad de la esterasa B, es la responsable de la variación total de las esterasas en relación a la diferenciación de poblaciones de mosquitos susceptibles y resistentes. Considerando los resultados obtenidos en esta investigación, se puede manifestar que debido a la relativa influencia de las cuatro bandas de esterasas que fueron observadas fuertemente teñidas en las cepas de Barranco Montaña y Puente Bayano, determinan la existencia de una resistencia intermedia en ambas cepas. Donde los incrementos observados en los niveles de actividad de la esterasa, es el resultado directo de altos

niveles de esterasa B1 en las cuatro bandas enzimáticas, estas están claramente asociadas a un incremento de la habilidad de sobrevivencia de los mosquitos a las aplicaciones o tratamientos con insecticidas. Sin embargo, tampoco se puede descartar, otros posibles mecanismos adicionales de resistencia.

##### 5. Comportamiento del Locus de Esterasa A y B.

Para llegar a determinar las frecuencias alélicas o genotípicas de las poblaciones de *An. albimanus* en este estudio, el análisis se realizó en base a un solo locus, correspondiente al locus de esterasa, el cual fué analizado en las cuatro muestras de las poblaciones utilizadas (Cuadro I al IV); las cuales corresponden a las poblaciones de mosquitos de Barranco Montaña A y Puente Bayano A, con un total de especímenes por cada una de las poblaciones de 185 y 183 respectivamente; y las poblaciones de Barranco Montaña B y Puente Bayano B, con un total de individuos por población de 185 y 184, respectivamente. Con un número máximo de alelos por locus de esterasa de tres. La mayor frecuencia alélica registrada en el locus de esterasa, en las cuatro muestras de poblaciones de mosquitos de *An. albimanus* (Cuadro V), fué el alelo BB (Cuadro VI). De acuerdo a estos resultados, en las cuatro muestras se registró un similar comportamiento de la frecuencias alélicas, lo cual quiere decir que ambas cepas presentan caracteres genéticos similares en cuanto a la

manifestación de su comportamiento de susceptibilidad o resistencia debido a la presión selectiva de los insecticidas organofosforados.

Según Storder (1976), las diferencias bioquímicas existentes entre la esterasa A (usando alfa naftil-acetato) y esterasa B (usando beta naftil-acetato), considerando además, que en cada individuo no hay más que dos esterásas de cada tipo, donde siempre se han observado, puede ser interpretado dentro de las diferencias genéticas. Por su parte, Gargan y Barr (1977), indican que en todos los mosquitos donde las esterásas han sido estudiadas, los alelos han sido codominante y autosomal; entre ellos: *Ae. aegypti*; *An. albimanus*; *An. punctipennis*; *An. stephensi*; *An. atroparvus* y *Cx. pipiens*. Refiriéndose a este hecho, Georghiou y Pasteur (1978), dicen que los dos genes de esterasa confieren diferentes propiedades bioquímicas, y que debido a este hecho se espera que el espectro de la resistencia se presente de acuerdo al gen o genes envueltos. Del mismo modo Georghiou (1980), enuncia que la tasa de desarrollo de la resistencia es extremadamente variable e influenciada por diferentes factores, entre ellos los genéticos, que llegan a determinar la frecuencia de los alelos R, número de alelos R, interacción de alelos R, integración de alelos R con factores de consecuencia y presión selectiva con otros químicos. Con base a las enunciaciones antes expuestas, se puede expresar que las dos cepas de *An.*

*albimanus* utilizadas en esta investigación para determinar a través de los niveles de actividad general de las esterasas A y B, el comportamiento de la susceptibilidad y/o resistencia, tienen inequívocamente una connotación genética; y que es consecuencia de la selección ejercida por los insecticidas organofosforados, que influyen de manera distinta en la selección de genes que permiten la sobrevivencia de los mosquitos al ser tratados con insecticidas. Sin embargo, hay que considerar que el grado de selección de genes resistentes y su reflejo en el nivel de resistencia encontrado en un momento dado en una población de mosquitos, dependerá del grado de evolución de los genes resistentes, que son consecuencia de la presión selectiva ejercida durante un período de tiempo prolongado; sin llegar a descartar otros factores que llegan a contrarrestar la resistencia, como es la migración de poblaciones susceptibles.

En este estudio, para determinar las frecuencias alélicas o genotípicas en las dos cepas de *An. albimanus* utilizadas, se calculó en base al número de individuos de cada una de las poblaciones, asumiendo que las poblaciones se encontraban en equilibrio genético según la Ley de Hardy y Weinberg. Bisset *et al.* (1990), en estudios similares a este, indican que las frecuencias de los genes para los genotipos susceptibles y resistentes fue calculado a partir del número de individuos homocigotos susceptibles asumiendo que la

población están en equilibrio, según la Ley de Hardy-Weinberg. La Ley de Hardy-Weinberg es utilizada para predecir bajo ciertas condiciones, las frecuencias genotípicas que pueden presentarse en el locus, y fueron formulados en 1908 por G.H. Hardy y W. Weinberg. Hoenigsber (1992), refiriéndose a lo que establece la Ley de Hardy-Weinberg, indica que bajo ciertas condiciones las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes en una población de generación en generación. Los genes y genotipos bajo esta condición, así como los caracteres que ellos determinan, se dice que están en equilibrio.

De acuerdo a los principios que enuncia la Ley de Hardy-Weinberg, el sometimiento de las poblaciones de *An. albimanus* a esta prueba para determinar las frecuencias génicas y genotípicas de las cepas de Barranco Montaña y Puente Bayano asociadas con la actividad de la esterasa A, dieron como resultado que el locus de esterasa A no estaban en equilibrio genético en las dos cepas de *An. albimanus*, considerando los principios de la Ley de Hardy-Weinberg (Cuadros VII y VIII). Este resultado es reflejado por el valor Chi-cuadrado, ya que el valor obtenido en la prueba en cada una de las dos poblaciones es diferente al valor real de acuerdo a la tabla de Chi-Cuadrado; que es consecuencia de las diferencias existentes de las frecuencias alélicas o génicas del locus de esterasa A.

Interpretando los resultados obtenidos de la prueba de Hardy-Weinberg, y considerando también el comportamiento de los patrones de esterases, y las intensidades de tinción de las bandas enzimáticas, se puede decir que existe una correspondencia en cada uno de estos resultados, esto significa que la susceptibilidad del *An. albimanus* a insecticidas organofosforados (fenitrotión) en las dos cepas estudiadas no está totalmente establecida, debido a que existe un comportamiento variable en el grado de susceptibilidad; y que genéticamente queda establecida de acuerdo a las expresiones de las frecuencias alélicas o genotípicas del locus de esterases.

En cuanto a la determinación del comportamiento de las frecuencias génicas y genotípicas de las cepas de *An. albimanus* de Barranco Montaña y Puente Bayano, utilizadas para conocer el nivel de actividad general de la esterasa B, considerando del mismo modo las frecuencias observadas y esperadas para el locus de esterasa, de acuerdo a los resultados obtenidos al someter ambas poblaciones a la prueba de Hardy-Weinberg, estos indican que el locus de esterasa B, no está en equilibrio genético (Cuadros IX y X). Al igual que lo ocurrido con el locus de esterasa A, existe diferencia entre las frecuencias observada y la frecuencia esperada; y del mismo modo el valor de Chi-Cuadrado para el locus de esterasa B obtenido en la prueba es diferente al valor real



Cit.) exponen la hipótesis de que un gen único controla los niveles elevados de esterasas, y que de los individuos heterocigotos se puede esperar que haya una similar actividad de patrones de resistencia, dependiendo si los genes de resistencia son recesivos, dominantes o semidominantes.

En cuanto al comportamiento genético de la resistencia o susceptibilidad en poblaciones de *Cx. pipiens* estudiadas por Rivet y Pasteur (1993), expresan que los cambios en la frecuencia de los genes puede tener uno o varios orígenes; que involucra a cuatro factores: mutación, selección, migración o flujo genético. En donde ellos encuentran razonable desestimar la hipótesis de mutación en las poblaciones de mosquito luego de haber realizado una gran cantidad de observaciones; entre las principales están: 1) que la mutación permite el aumento de genes resistentes que son extremadamente raros; y, 2) se sabe que la resistencia permanece estable en cepas homocigotas de laboratorio; lo que indica que las mutaciones reversibles son improbables. Además de que el flujo genético es también improbable que haya tenido un mayor impacto en la población de mosquitos, especialmente en las variaciones ocurridas en los meses en que la población es muy abundante. Manifestando finalmente, que las variaciones observadas en la frecuencia de genes resistentes son probablemente el resultado de la selección o migración, o una interacción de ambas.

## **CONCLUSIONES**

1. Los patrones de esterases A y B en la dos cepas de *An. albimanus* procedentes de Barranco Montaña en la provincia de Bocas del Toro y Puente Bayano en la provincia de Panamá, se revelaron inmediatamente luego de ser teñidos los geles, mostrando una clara y consistente diferencia entre las intensidades de tinción de las esterases en presencia de alfa y beta naftil acetato.
2. En las pruebas bioquímicas en las cuales se utilizaron hembras adultas de *An. albimanus* de 3 a 10 días de emergencia, mostraron una mayor intensidad de tinción de las esterases que en las muestras de más de 21 días de emergencia.
3. La movilidad electroforética o Rf mostrada por las esterases A y B en las dos cepas de *An. albimanus* de Barranco Montaña y Puente Bayano utilizadas en este estudio, no llegaron a tener diferencias significativas en casi todos los geles.
4. En las pruebas bioquímicas con la esterasa A realizadas con la cepa de Barranco Montaña, se llegó a observar una fuerte tinción con alta actividad de esterasa, en cinco bandas, una actividad intermedia en cuatro bandas y una baja actividad en dos bandas de esterases.

5. La cepa de Puente Bayano en los patrones de esterasa A mostró una fuerte tinción con alta actividad de esterasa, en cinco bandas, una actividad intermedia en cuatro bandas y una baja actividad en dos bandas de esterasa.
6. Según los patrones de esterasa B, en la cepa de Barranco Montaña se observó altos niveles de esterasa en cuatro bandas, con una actividad intermedia en cuatro bandas y una baja actividad de esterasa en tres bandas.
7. En las bandas reveladas de esterasa B en la cepa de Puente Bayano, se registró una alta actividad de esterasa en cuatro bandas, una actividad intermedia en cinco bandas de esterasa y una baja actividad en dos bandas enzimáticas.
8. La variación observada en los niveles de actividad de la esterasa B en la cepa de Barranco Montaña y Puente Bayano, puede ser atribuida a la habilidad de la esterasa B de hidrolizar un gran número de substratos de compuestos organofosforados que no están presentes en mosquitos susceptibles y a las diferencias de formas alélicas.

9. Los patrones de esterasa A y B de las cepas de Barranco Montaña y Puente Bayano, no llegaron a mostrar diferencias significativas en la actividad general de los niveles de esterases.
10. A través de este estudio, que de acuerdo a la actividad de la esterasa A, se ha determinado que las dos cepas de *An. albimanus* evaluados poseen una relativa sensibilidad a insecticidas organofosforados.
11. La resistencia del *An. albimanus* en las dos cepas estudiadas no es significativa, de acuerdo a los niveles de actividad de la esterasa B registradas en los patrones enzimáticos, por lo que se reveló una resistencia intermedia en las poblaciones evaluadas.
12. Las dos cepas de *An. albimanus* registraron una igual expresión de las frecuencias alélicas, por lo cual ambas poblaciones presentan caracteres genéticos similares en cuanto a la manifestación de su comportamiento de susceptibilidad o resistencia debido a la presión selectiva ejercida por los insecticidas organofosforados.

## **RECOMENDACIONES**

1. Los resultados obtenidos en este estudio, mediante la utilización de técnicas electroforéticas para la determinación de los niveles de esterasas asociadas con la resistencia de mosquitos a insecticidas organofosforados, permitirá a la División de Control de Vectores, considerar y poner en práctica estrategias en cuanto al uso de insecticidas por medio de la detección temprana de la resistencia mediante el uso de esta técnica bioquímica; también permitirá tener así una relación adecuada entre costo y beneficio en las medidas de control de vectores.
2. Es importante realizar más estudios similares al presente, que permitan establecer el comportamiento de la susceptibilidad del *An. albimanus* en las diferentes regiones del país donde se aplican medidas de control mediante el uso de insecticidas organofosforados.
3. Es necesario ampliar los estudios para conocer además de los niveles de actividad de las esterasas relacionadas con la resistencia del *An. albimanus* a compuestos organofosforados, mediante estudios metabólicos, cuales son los principales metabolitos relacionados con la resistencia al fenitrotión en esta especie de mosquito.

4. Se recomienda el uso de esta técnica bioquímica de determinación de los niveles de esterasas asociados con la resistencia a insecticidas organofosforados, para el seguimiento de la resistencia en los programas de control de vectores del SNEM, así como el establecimiento de esta técnica en el SNEM/MINSA.

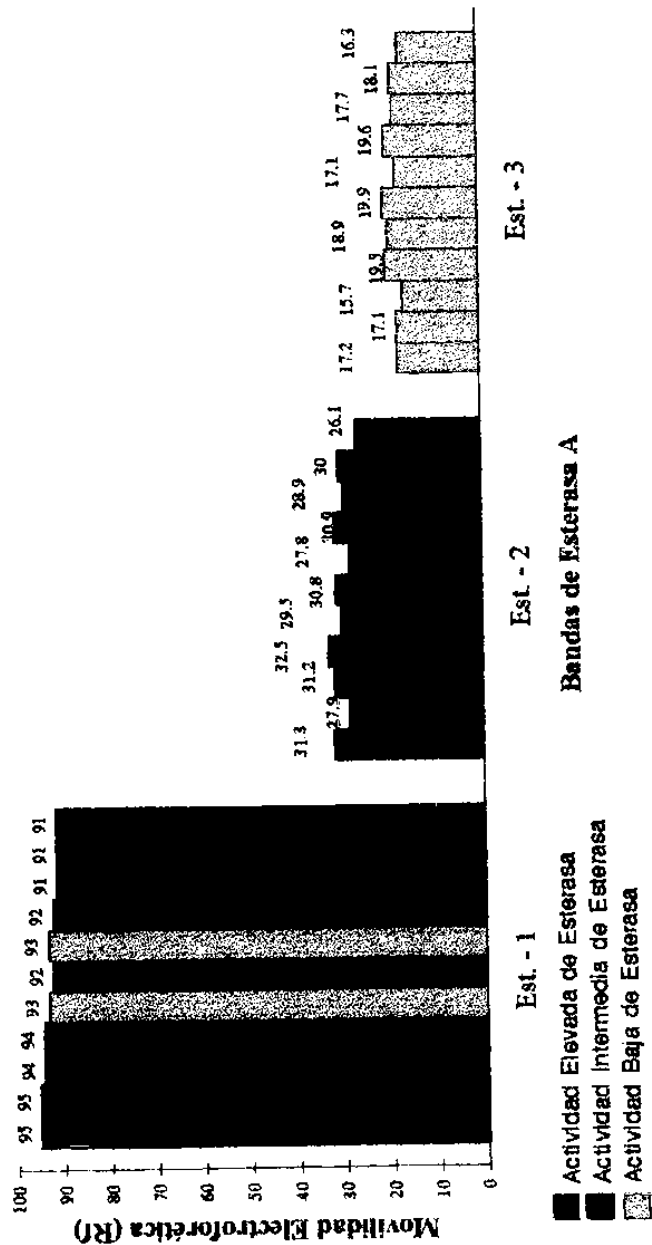


## **BIBLIOGRAFIA CITADA**

- Aldridge, W. N. 1971. The nature of the reaction organophosphorous compounds and carbamates with esterases. *Bull. World Hlth. Org.* **44**: 225-30.
- Ariaratnan, V. and Georghiou, G. P. 1971. Selection of resistance to carbamate and organophosphorous insecticides in *Anopheles albimanus*. *Nature*. **232**: 642-644.
- Barrera, A. 1959. Investigaciones sobre la efectividad del malatión en *Anopheles (A.) pseudopunctipennis* de la zona molerense de resistencia al dieldrín y en *Anopheles (N.) albimanus* de insectario y de la Costa Grande de Guerrero. *CNEP. Bol. (México)*. **3**: 18-30.
- Booth, G. M. and Lee, An-Harng. 1971. Distribution of cholinesterases in insects. *Bull. World Helt. Org.* **44**: 91-98.
- Breeland, S.; Kliener, J.; Austin, J. and Miller, C. 1970b. Observation on malathion-resistan adult of *Anopheles albimanus* in El Salvador. I. Characteristic of the test site and the natural population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **23**: 274-281.
- Brown, A. W. and Pal, R. 1971. Insecticide resistance in arthropods. *World Hlth. Org., Monograph Series No. 38*. Second ed. Genova. 1971. 491 pág.
- Brown, A.W. and Pal, R. 1973. Resistencia de los artrópodos a los insecticidas. *Org. Mund. Salud. Segunda Ed. No. 38*, 544 pág.
- Brown, A.W. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **2**: 123-140.
- Brown, A.W. 1986. Insecticide resistance research on *Aedes aegypti*. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **2**(2): 123-140.
- Brenges, J. and Cooseman, M. 1977. Sensibilite et resistance des insectes des aux insecticides Afrique Tropicale. WHO/VBC/77.680 (Documento mimeografiado).
- Busvine, J.R. 1963. The present status of insecticide resistance. *Bull. World Helth. Org.* **29 Suppl.**, pág. 31-40.
- Chadwick, L. E. 1957. Progress in physiological studies of insecticide resistance. *Bull Wld. Hlth. Org.* Vol. **16**(6): 1203-1218.

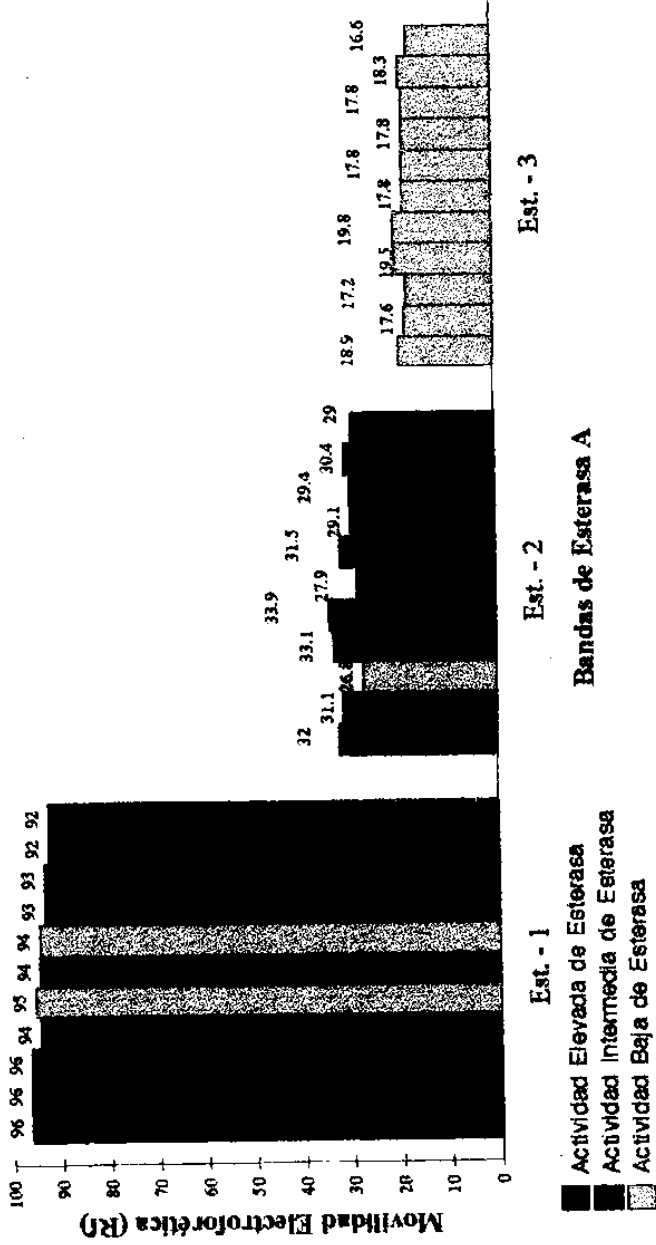
- Crampton, J. M.; Conley, I.; Eggleton, P.; Hill, S. 1992. Molecular biological approaches to the study of vectors in relation to malaria control. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 87, Suppl. III, 43-49.
- Curtis, C. F. and Pasteur, N. 1981. Organophosphate resistance in vector populations of the complex of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). Bull. Entom. Research. 71, 153-161.
- Dary, O.; Georghiou, G. P.; Parsons, E. and Pasteur, N. 1990. Microplate adaptation of Gomori's assays activity in single insects. J. Ecn. Entomol. Vol. 83(6): 2187-2192.
- Davidson, G. and Sawyer, B. 1975. Carbamate and organophosphate resistance in *Anopheles albimanus*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 69: 443-431.
- Duret, J. P. 1958. Estimaciones cuantitativas para la comprensión del fenómeno de la resistencia de conducta en *Anopheles albimanus* en Panamá. Seminario de Susceptibilidad de los Insectos a los Insecticidas. OPS, Panamá, 1958, 3 pág.
- Duret, J. P. 1961. Estudio sobre el comportamiento de los anofelinos del río Chagres, Panamá. Bol. Sanit. Panamá. 51: 285-302.
- Ferrari, J. A. and Georghious, G. P. 1980. Esterase B1 activity variation within and among insecticide resistant, susceptible and heterozygous strains of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J. Ecn. Entomol. Vol. 83(5): 1704-1710.
- Frederickson, E. C. 1993. Bionomía y control de *Anopheles albimanus*. Org. Mund. Salud. Cuad. Téc. No. 34, 83 pág.
- Fukuto, T. R. 1971. Relationships between the structure of organophosphorous compounds and their activity as acetylcholinesterase inhibitors. Bull. Wld. Hlt. Org. 44: 31-42.
- Gargan, T. P. and Barr, R. A. 1977. Inherence of an esterase locus in *Culex pipiens*. Ann. Entomol. Soc. Amer. Vol. 70(3): 402-408.
- Georghiou, G. P.; Calman, J. 1969. Result of fenitrothion selection of *Culex pipiens fatigans* Wied. and *Anopheles albimanus* Wied. Bull. Helt. Org. 40: 97-101.

**PATRONES DE ESTERASA - A**  
**Barranco Montaña**



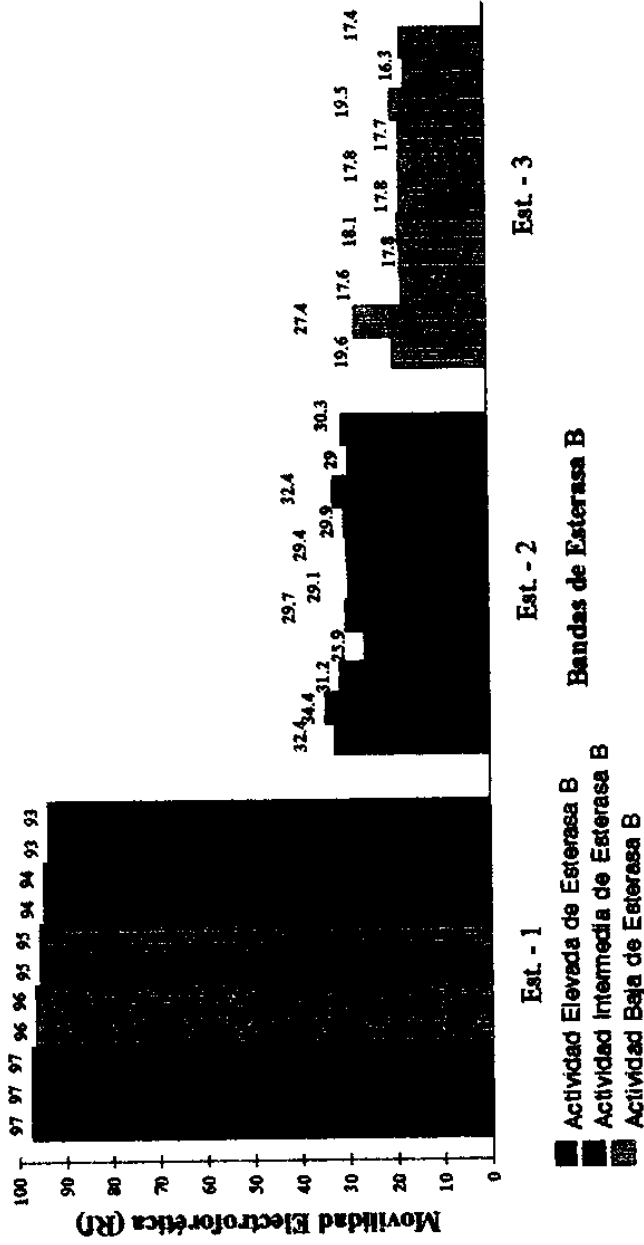
**Gráfica No. 1: PATRONES DE ESTERASA A** observados en muestras de mosquitos *An. albimanus* de la Cepa de Barranco Montaña. A = Alfa Nafill Acetato. Las barras oscuras, medias y claras indican el decremento de la intensidad de tinción. Los valores de Rf fueron dados de acuerdo al frente del marcador azul de bromofenol.

**PATRONES DE ESTERASA - A**  
**Puente Bayano**



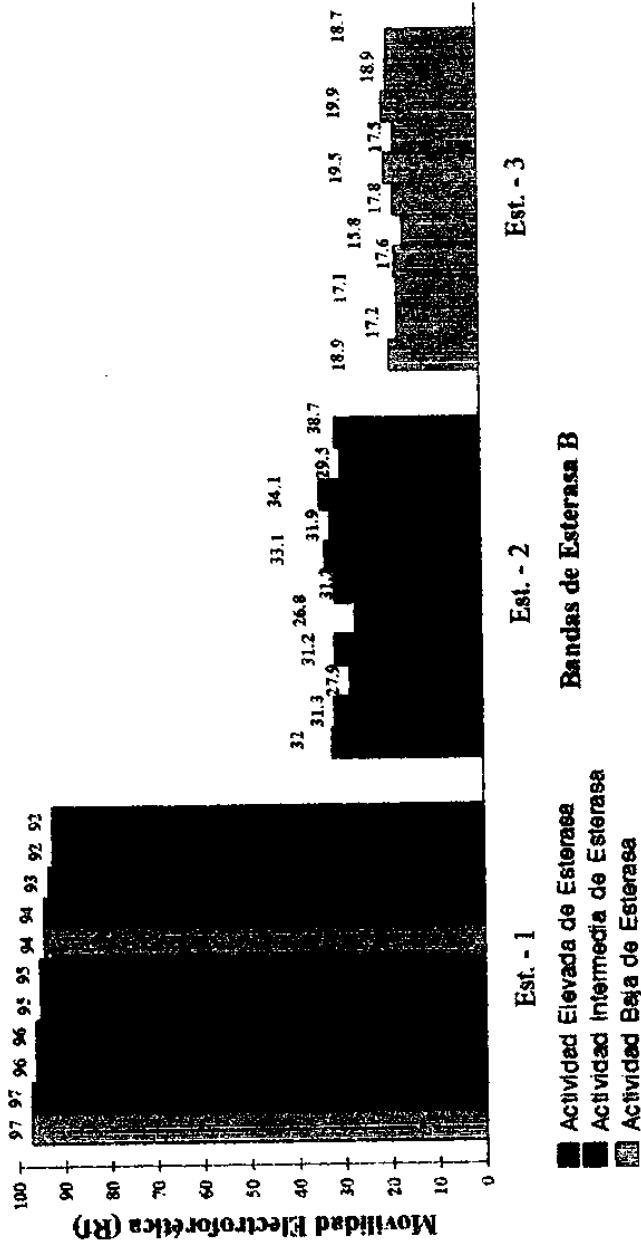
**Gráfica No. 2: PATRONES DE ESTERASA A** observados en muestras de mosquitos *An. albimanus* de la Cepa de Puente Bayano. A = Alfa Naftil Acetato. Las barras oscuras, medias y claras indican el decrecimiento de la intensidad de tinción. Los valores de Rf fueron dados de acuerdo al frente del marcador azul de bromofenol.

**PATRONES DE ESTERASA - B**  
**Barranco Montaña**



**Gráfica No. 3: PATRONES DE ESTERASA B** observados en muestras de mosquitos *An. albimanus* de la Cepa de Barranco Montaña. B = Beta Naftil Acetato. Las barras oscuras, medias y claras indican el decrecimiento de la intensidad de tinción. Los valores de Rf fueron dados de acuerdo al frente del marcador azul de bromofenol.

**PATRONES DE ESTERASA - B**  
**Puente Bayano**



**Gráfica No. 4: PATRONES DE ESTERASA B** observados en muestras de mosquitos *An. albimanus* de la Cepa de Puente Bayano B = Beta Nafill Acetato. Las barras oscuras, medias y claras indican el decrecimiento de la intensidad de tinción. Los valores de Rf fueron dados de acuerdo al frente del marcador azul de bromofenol.

**APENDICE B**



**Cuadro I**  
**Alelos de esterasa A registrados en las pruebas bioquímicas**  
**con *Anopheles albimanus* de la cepa de Barranco Montaña**

No. de Ensayo	Número de alelos en el locus de la esterasa A					
	AA	AB	AC	BB	BC	CC
1	3	1	0	4	0	3
2	2	1	0	3	1	3
3	3	2	0	3	0	3
4	2	2	0	3	2	2
5	3	2	0	2	1	3
6	2	1	1	2	3	2
7	2	2	0	4	1	2
8	3	2	1	2	0	2
9	2	2	1	4	1	1
10	2	1	0	3	3	2
11	1	1	1	4	2	2
12	2	1	1	2	3	3
13	3	1	0	2	3	2
14	1	2	0	2	2	3
15	3	1	0	3	1	2
16	3	1	0	3	1	3
17	3	1	0	2	1	4
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>24</b>	<b>5</b>	<b>48</b>	<b>25</b>	<b>42</b>
<b>TOTAL DE MUESTRAS:</b>	<b>184</b>					

**Cuadro II**  
**Alelos de esterasa A registrados en las pruebas bioquímicas**  
**con *Anopheles albimanus* de la cepa de Puente Bayano**

No. de Ensayo	Número de alelos en el locus de la esterasa A					
	AA	AB	AC	BB	BC	CC
1	3	1	1	5	0	1
2	3	0	0	4	2	2
3	3	1	0	2	2	3
4	2	5	0	2	0	2
5	1	2	0	3	3	2
6	2	2	1	3	1	2
7	2	1	1	3	0	3
8	2	2	0	3	3	1
9	2	4	0	2	0	3
10	3	1	0	2	2	3
11	3	3	0	2	2	1
12	3	1	0	3	3	1
13	3	2	1	2	1	2
14	3	2	0	3	0	2
15	3	1	0	3	0	3
16	3	1	0	4	1	2
17	3	1	0	3	1	2
<b>TOTAL</b>	<b>44</b>	<b>30</b>	<b>4</b>	<b>49</b>	<b>21</b>	<b>35</b>
<b>TOTAL DE MUESTRAS:</b>	<b>183</b>					

**Cuadro III**  
**Alelos de esterasa B registrados en las pruebas bioquímicas**  
**con *Anopheles albimanus* de la cepa de Barranco Montaña**

No. de Ensayo	Número de alelos en el locus de la esterasa A					
	AA	AB	AC	BB	BC	CC
1	3	2	0	2	2	2
2	3	2	0	3	2	1
3	2	0	0	3	4	2
4	2	1	1	4	1	2
5	3	1	0	2	2	3
6	2	2	0	3	0	4
7	3	1	1	3	0	3
8	2	1	0	2	2	3
9	2	1	0	2	3	2
10	3	1	0	3	2	2
11	2	1	0	3	1	4
12	3	3	0	3	0	2
13	3	1	0	3	0	4
14	3	1	0	3	2	2
15	3	1	1	3	0	3
16	1	1	1	4	2	2
17	2	2	0	2	2	3
<b>TOTAL</b>	<b>42</b>	<b>22</b>	<b>4</b>	<b>48</b>	<b>25</b>	<b>44</b>
<b>TOTAL DE MUESTRAS:</b>	<b>185</b>					

**Cuadro IV**  
**Alelos de esterasa B registrados en las pruebas bioquímicas**  
**con *Anopheles albimanus* de la cepa de Puente Bayano**

No. de Ensayo	Número de alelos en el locus de la esterasa A					
	AA	AB	AC	BB	BC	CC
1	3	1	0	3	1	3
2	2	2	0	3	1	2
3	4	1	0	3	1	2
4	3	1	1	3	1	2
5	3	2	0	2	1	3
6	2	2	0	3	1	3
7	3	1	0	3	1	3
8	3	2	0	2	1	3
9	2	2	0	2	3	2
10	2	2	0	2	3	2
11	2	2	1	3	1	2
12	2	2	1	3	1	2
13	3	1	0	2	1	3
14	2	1	0	2	2	3
15	3	2	0	3	1	2
16	3	1	0	4	0	3
17	3	2	0	3	0	3
<b>TOTAL</b>	<b>45</b>	<b>27</b>	<b>3</b>	<b>46</b>	<b>20</b>	<b>43</b>
<b>TOTAL DE MUESTRAS:</b>	<b>184</b>					

**CUADRO V**

---

**POBLACIONES DE *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae)  
SOMETIDAS A LA PRUEBA DE  
HARDY - WEINBERG**

<b>POBLACIÓN ORIGINAL</b>	<b>NO. DE POBLACIÓN</b>	<b>NOMBRE DE POBLACIÓN</b>
OTU1	1	Barranco Montaña A
OTU2	2	Puente Bayano A
OTU3	3	Barranco Montaña B
OTU4	4	Puente Bayano B

**CUADRO VI**

**FRECUENCIAS ALÉLICAS EN LAS POBLACIONES  
DE *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) SOMETIDAS A  
LA PRUEBA DE HARDY - WEINBERG**

	POBLACION			
LOCUS	1	2	3	4
EST				
(N)	184	183	185	184
A	.296	.333	.297	.326
B	.394	.407	.392	.378
C	.310	.260	.311	.296

**CUADRO VII**

**PRUEBA DE CHI-CUADRADO PARA DETERMINAR LA  
DESVIACIÓN DE EQUILIBRIO GENÉTICO  
DE HARDY-WEINBERG**

**POBLACIÓN: BARRANCO MONTANA A (Nº1)**

Eventos	Clase	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	Chi- cuadrado	Gf	P
EST	A-A	40	16.038			
	A-B	24	43.065			
	A-C	5	33.858			
	B-B	48	28.447			
	B-C	25	45.041			
	C-C	42	17.550			
				125.255	3	.000

### CUADRO VIII

#### PRUEBA DE CHI-CUADRADO PARA DETERMINAR LA DESVIACIÓN DE EQUILIBRIO GENÉTICO DE HARDY-WEINBERG

EN LA POBLACIÓN: PUENTE BAYANO A (N°2)

Clases	Clase	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	Chi- cuadrado	Gf	P
EST	A-A	44	20.222			
	A-B	30	49.803			
	A-C	4	31.753			
	B-B	49	30.208			
	B-C	21	38.781			
	C-C	35	12.233			
				122.306	3	.000



**CUADRO IX**

**PRUEBA DE CHI-CUADRADO PARA DETERMINAR LA  
DESVIACIÓN DE EQUILIBRIO GENÉTICO  
DE HARDY-WEINBERG**

**EN LA POBLACIÓN: BARRANCO MONTANA B (N°3)**

Localidad	Clase	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	Chi-Cuadrado	Gr. Lib.	P
EST	A-A	42	16.247			
	A-B	22	43.225			
	A-C	4	34.282			
	B-B	49	28.293			
	B-C	25	45.190			
	C-C	43	17.764			
				138.020	3	.000

**CUADRO X****PRUEBA DE CHI-CUADRADO PARA DETERMINAR LA  
DESVIACIÓN DE EQUILIBRIO GENÉTICO  
DE HARDY-WEINBERG****EN LA POBLACIÓN: PUENTE BAYANO B (Nº4)**

Genotipo	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	Chi-cuadrado	G	P
EST					
A-A	45	19.455			
A-B	27	45.450			
A-C	3	35.640			
B-B	46	26.134			
B-C	20	41.283			
C-C	43	16.038			
			142.324	3	.000

**APENDICE C**

## CUADRO I

### VARIACION DEL COMPORTAMIENTO DE MOSQUITOS ANOFELINOS EN RELACION CON EL EFECTO DE LOS INSECTICIDAS Y LA RESISTENCIA QUE PROVOCAN

Comportamiento	Efectos de la aplicación de insecticidas	
	Favorables	Desfavorables
<i>Comportamiento fenotípico</i>		
Irritabilidad al Ddt y a los piretroides	Desviación a la alimentación al aire libre sobre animales y/o hacia ambientes hostiles al aire libre, por ejemplo, <i>A. culicifacies</i> en partes más secas de la India	Repelencia después de la alimentación conducente a reducida absorción de insecticidas y a descanso en medios ambientales favorables al aire libre, por ejemplo, <i>A. culicifacies</i> en zonas forestales de la India.
Cambios en la tendencia a la picadura causada por el contacto con el DDT	Tendencia a la picadura demorada, por ejemplo, <i>A. atroparvus</i> , <i>A. messeae</i> y otros en la URSS	Tendencia a la picadura acrecentada, por ejemplo, <i>A. sacharovi</i> en la URSS
<i>Comportamiento genotípico</i>		
Variación entre especies en comportamiento natural de descanso y alimentación en viviendas	Antropofilia con endofilia, por ejemplo, <i>A. funestus</i> Zoofilia con exofilia, por ejemplo, <i>A. nigerrimus</i> y <i>A. hyrcanus</i>	Antropofilia con exofilia, por ejemplo, complejo de <i>A. balabacensis</i> y <i>A. farauti</i>
Variación entre las especies en comportamiento natural de descanso y alimentación en viviendas	Monoformismo en el comportamiento de descanso y alimentación, por ejemplo, <i>A. culicifacies</i> en Sri Lanka y <i>A. gambiae</i> en las regiones costeras de la Rep. Unida de Tanzania	Poliformismo en el comportamiento de descanso y alimentación, por ejemplo, <i>A. balabacensis</i> s.I. en Sabah y <i>A. gambiae</i> en Nigeria
Cambios en irritabilidad	Irritabilidad excesiva, por ejemplo, <i>A. pseudopunctipennis</i> en México	Poca irritabilidad conducente a la picadura en viviendas rociadas, por ejemplo, <i>A. sacharovi</i> resistente al DDT en la URSS
Reducción del tiempo de descanso en viviendas rociadas o sin rociar		Resistencia real del comportamiento como resultado de la presión de selección de los insecticidas, por ejemplo, <i>A. sundaicus</i> en Indonesia, <i>A. pulcherrimus</i> en Tadjikistán, y <i>A. minimus</i> en Tailandia y Birmania
Efectos en el comportamiento de los genes de resistencia		Comportamiento anormal de enjambre conducente al apareamiento variado, por ejemplo, <i>A. stephensi</i> resistente a la dieldrina.

Cuadro de acuerdo a la OMS 1986

**JADRO II Resistencia de los mosquitos anofelinos a los insecticidas en países o zonas**

<b>Especies</b>	<b>DDT</b>	<b>Compuestos organofosforados</b>	<b>Otros compuestos</b>
<i>ophelus aconitus</i>	Bangladesh, India, Indonesia, Nepal, Tailandia		--
<i>Albimanus</i>	Belice, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Haití, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, República Dominicana	Costa Rica (a), El Salvador (a,b,d,g,h,i,j,k), Guatemala (b,c,e*,f*,i,k), Honduras (a), Haití* (b), México (a,b,i), Nicaragua (a,b,i)	Costa Rica (l), Ecuador* (m) El Salvador (l,m), Guatemala (l,m), Haití* (l) Honduras (l), México (l,m), Nicaragua (l), Panamá (l)
<i>albicansis</i>	Brasil, Colombia	--	--
<i>annularis</i>	Bangladesh, India, Myanmar, Nepal, Pakistán, Tailandia	Sri Lanka (a)	--
<i>picinacula</i>	Panamá	--	--
<i>trabensis</i>	Arabia Saudita*, Etiopia*, Mauricio, República Unida de Tanzania (Zanzibar), Senegal, Sudán, Swazilandia	Sudán (a,o)	Sudán (l,m)
<i>troparvus</i>	España, Portugal, Reino Unido, Rumania, URSS	España (a,b,f,i) Portugal (f,i)	España (l), Portugal (l), Rumania
<i>barbirostris</i>	India, Indonesia, Myanmar*, Sri Lanka	Sri Lanka (a)	--
<i>coustani</i>	Arabia Saudita*, Egipto, Reunión*	Egipto (a,b)	--
<i>crucians</i>	México	--	--
<i>implejo</i>	Afganistán, Bhután*, Emiratos Árabes Unidos, India, Myanmar, Nepal, Omán, Pakistán, República Islámica del Irán, Sri Lanka, Tailandia	Emiratos Árabes Unidos (a*,b*,e, h), India (a,b,f), Omán a*,b*,e), Pakistán (a,b), Sri Lanka (a,b)	Emiratos Árabes Unidos (l,n) India (l), Omán (l,m*), Sri Lanka (m)
<i>culicifacies</i>			
<i>luido</i>			
<i>c. adenensis</i>			
<i>darlingi</i>	Colombia, Venezuela	--	--
<i>donaldi</i>	Malasia	--	--

De acuerdo a la OMS, 1992

CUADRO III Resistencia de los mosquitos anofelinos a los insecticidas en países o zonas

Especies	DDT	Compuestos organofosforados	Otros compuestos
<i>d'thali*</i>	República Islámica del Irán	Egipto* (h,f,p), Jordania* (e)	Egipto* (l)
<i>farauti</i>	Islas Salomón*	--	--
<i>fluvialis</i>	Afganistán, India, Nepal, Pakistán		Nepal (l)
<i>funestus*</i>	Sudán*	--	--
<i>gambiae</i>	Benin, Burkina Faso, Camerún, Congo, Ghana, Liberia, Malí, Níger, Nigeria, República Centroafricana, República Unida de Tanzania (Zanzibar), Sudáfrica, Togo, Zaire	--	Nigeria (m)
<i>isu stricto</i>			
<i>hyrcanus</i>	Afganistán, India*, Myanmar*, Pakistán*, Turquía, URSS	Turquía (b,f,g,i,j)	Turquía (l), URSS (l)-
<i>jamesi</i>	Myanmar		
<i>karwari*</i>	--	Sri Lanka (a)	--
<i>kochi</i>	India	Sri Lanka* (a)	--
<i>koltensis</i>	Indonesia	--	--
<i>labranchiae</i>	Argelia, Marruecos, Túnez	--	--
<i>maculatus</i>	Bhután*, India, Myanmar, Nepal*, Pakistán, Tailandia	Italia (a)	--
<i>maculipennis</i>	Bulgaria*, Grecia, República Islámica del Irán, Rumania, Turquía, URSS	Grecia (b), Rumania (b,f), Turquía (b,g)	Bulgaria* (l), Grecia (l), Rumania (l), Turquía (l)
<i>melanoon</i>	Turquía	--	--
<i>messeae</i>	Bulgaria, Rumania, URSS	Rumania (a,f)	URSS (l)
<i>minimus*</i>	Tailandia*	--	--
<i>multicolor</i>	Arabia Saudita	Egipto (a*,b,f,h,p), Jordania* (e)	Egipto (l,m)

**ADRO IV Resistencia de los mosquitos anofelinos a los insecticidas en países o zonas**

Especies	DDT	Compuestos organofosforados	Otros compu
<i>nigerrimus</i>	India, Indonesia, Myanmar, Pakistán, Sri Lanka, Tailandia	India (a), Sri Lanka (a,b,f,i)	Sri Lanka (l,m)
<i>pallidus</i>	India, Sri Lanka	Sri Lanka* (a)	--
<i>pedataeniatus</i>	Indonesia, Sri Lanka*, Viet Nam	--	--
<i>pharoensis</i>	Angola, Egipto, Etiopia, Sudán	Egipto (a,b,f,h,p)	Egipto (l)
<i>philippinensis</i>	Bolivia, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Perú	Guatemala (a*, b), Honduras (a,b)	Guatemala (m), Hon
<i>pulcherrimus</i>	Afganistán, Arabia Saudita*, Iraq, Pakistán, URSS	--	--
<i>punctimacula</i>	Colombia, Ecuador, Panamá	--	--
<i>punctulatus</i>	Indonesia	--	--
<i>quadrinaculatus</i>	Estados Unidos de América, México	Estados Unidos de América* (e)	Estados Unidos de A (m)
<i>modesiensis</i>	--	Djiboutí (h)	--
<i>sacharovi</i>	Bulgaria, Grecia, Iraq, Libano, República Arabe Siria, República Islámica del Irán, Turquía, URSS	Bulgaria (b), Grecia (b), Libano (b), República Arabe Siria (b) Turquía (a,b,f,g,h,i,j,k)	Bulgaria (l), Grecia (l) República Arabe Siria Turquía (l,m); URS
<i>sergentii</i>	Egipto	Egipto* (c), Jordania (e)	--
<i>sinensis</i>	China, Japón, Nepal*, Viet Nam	China (a,b), Hong Kong (a,b), Japón (a,f), República de Corea (b,f)	--
<i>splendidus</i>	India	--	--
<i>stephensi</i>	Afganistán, Arabia Saudita, Emiratos Arabes Unidos, India, Iraq, Omán, Pakistán, República Islámica del Irán, Yemen*	India (a,b,e,f,g), Irak (a,b,d*), Pakistán (a,b*), República Islámica del Irán (a,b,d*,g,i,j)	Dubai* (m), India (l) Pakistán* (l)

**JADRO V Resistencia de los mosquitos anofelinos a los insecticidas en países o zonas**

Especies	DDT	Compuestos organofosforados	Otros compuestos
<i>subpictus</i>	Afganistán, Bangladesh, India, Indonesia, Myanmar, Nepal, Pakistán, Sri Lanka, Viet Nam	India (a,f*), Sri Lanka (a,b,i)	Sri Lanka* (l) (sólo las larva)
<i>sundaicus</i>	Indonesia, Malasia, Tailandia, Viet Nam*	--	--
<i>superpictus</i>	Afganistán, URSS	--	--
<i>tessellatus</i>	India, Indonesia, Nepal, Sri Lanka*	--	--
<i>triannulatus</i>	Bolivia	--	--
<i>turkhudi</i>	Afganistán	--	--
<i>vagus</i>	Bangladesh, India, Indonesia, Malasia, Myanmar, Nepal, Sri Lanka, Tailandia, Viet Nam	Sri Lanka (a,b*,i)	Sri Lanka (l)
<i>varuna</i>	India, Nepal, Sri Lanka	Sri Lanka (a,i)	--
<i>vestipennis</i>	Guatemala, México	--	--

**CLAVE DE LETRAS**

malatión	h	clorpirifós	o	pentoato	v	diflubenzurón	C	fentión etílico	J	arsénico
fenitroión	i	clorfoxim	p	bromofós	w	diazinón	D	diocrotofós	K	formamid
paratión metílico	j	foxim	q	monocrotofós	x	sin información precisa	E	etión	L	ciromacin
pirimifós metílico	k	paratión	r	profenofós	y	diclorvós	F	dioxatión	M	acefato
temefós	l	carbarnatos	s	triclortón	z	coumafós	G	cianofós		
fenitón	m	piretroides	t	dimetoato	A	tetractlorvinfós	H	propetanfós		
jodfenfós (icodofenfós)	n	hormonas juveniles	u	clorfenvinfós	B	diclofentión	I	protiofós		

registro nuevo de país, especies o un insecticida.



## **CUADRO VI**

### **FACTORES CONOCIDOS O SUGERIDOS QUE INFLUYEN EN LA SELECCIÓN DE RESISTENCIA A LOS PLAGUICIDAS EN LAS POBLACIONES DEL CAMPO**

#### **A. Genéticos.**

1. Frecuencia de los alelos R.
2. Número de Alelos R.
3. Dominancia de alelos R.
4. Penetración; expresividad; interacción entre alelos R.
5. Selección pasada por otros productos químicos
6. Grado de integración del genoma R con los factores de disposición (idoneidad, oportunidad)

#### **B. Biológicos**

##### **a. Biótico**

1. Renovación de la generación
2. Progenie por generación
3. Monogamia / poligamia, partenogenesis

##### **b. Comportamiento**

1. Aislamiento; movilidad; migración
2. Monofagia / polifagia
3. Supervivencia fortuita; refugio

#### **C. Operacional**

##### **a. Química**

1. Naturaleza química del plaguicida
2. Relación con sustancias químicas usadas anteriormente
3. Persistencia de residuos; formulación

##### **b. Aplicación**

1. Umbral de aplicación
2. Umbral de selección
3. Etapa (s) de vida seleccionada
4. Modo de aplicación
5. Selección de espacio límite
6. Selección alterna

De acuerdo a Georghlon, G.P. (1980)

## CUADRO VII

### CONSUMO DE DIELDRINA DURANTE LOS PRIMEROS AÑOS POR EL SERVICIO NACIONAL DE ERRADICACIÓN DE LA MALARIA CONTRA VECTORES ANAFELINOS (1957-1961)

CONCEPTO	I AÑO	II AÑO	III AÑO	IV AÑO
Nº Localidades Terminadas	7,961	7,996	7,311	7,569
Nº Casas totalmente rociadas	155,966	154,638	131,270	159,902
Nº Rociadas con Dieldrina 100%	9,873	10,639	6,470	15,274
Nº Rociadas con Dieldrina 50%	146,093	143,999	128,800	144,628
Nº Casas total y parcialm. rociadas	155,966	154,638	131,270	159,902
Nº Casas no rociadas	5,690	8,371	9,093	10,754
Nº No rociables	643	2,247	1,825	1,222
Nº Renuentes	155	267	330	1,697
Nº Carradas	4,892	5,857	6,738	7,835
Dieldrina grado técnico (Kg.)	120.0	1,402.0	892.9	2,220.9
Dieldrina 50% (Kg.)	34,772.0	42,664.9	31,428.7	40,243.2

### RENDIMIENTO

CONCEPTO	I AÑO	II AÑO	III AÑO	IV AÑO
Casas por rociador - día	6.67	6.92	7.30	6.70
Grms. Dieldrin 100% por casa	119.20	146.95	126.50	139.70
Nº habitantes direct. protegidos	724,381	739,061	562,495	699,860

Este cuadro registra las actividades de rociado iniciados el 19/VIII/57 (I ciclo), hasta el 31/XII/61 (IV ciclo)



## CUADRO IX

Malatión con  $^{14}\text{C}$  metabolizado por las cepas Pel RR y Pel SS de Sri Lanka de *Culex quinquefasciatus* luego de 6 horas de incubación del homogenado de los mosquitos con 2 nmoles de malatión a 28 °C según Peiris y Hemingway, 1993.

COMPUESTO	PORCENTAJE DE $^{14}\text{C}$ Recobrado ( $\pm$ SE)	
	Pel SS	Pel RR
Malatión	92.95 $\pm$ 2	92.14 $\pm$ 1.4
Metabolitos		
Malaoxón	0.64 $\pm$ 0.2	0.52 $\pm$ 0.1
Malatión monoácido	1.35 $\pm$ 0.3	2.67 $\pm$ 0.4
Malatión diácido	0.67 $\pm$ 0.09	0.59 $\pm$ 0.1
Productos de oxidación	2.39 $\pm$ 0.5	2.39 $\pm$ 0.2

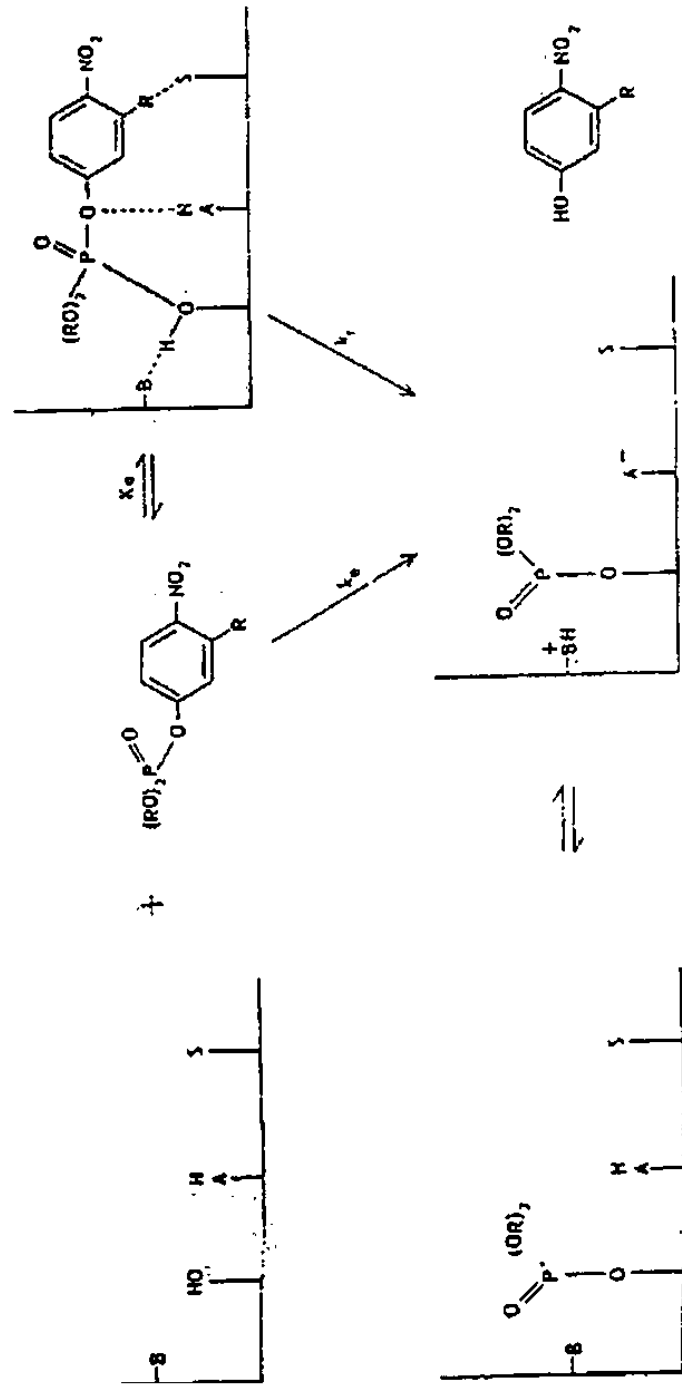
## CUADRO X

Fenitrotión con  $^{14}\text{C}$  metabolizado por las cepas Pel RR y Pel SS de Sri Lanka de *Culex quinquefasciatus* luego de 6 horas de incubación del homogenado de los mosquitos con 2 nmoles de fenitrotión a 28 °C según Peiris y Hemingway, 1993

COMPUESTO	PORCENTAJE DE $^{14}\text{C}$ Recobrado ( $\pm$ SE)	
	Pel SS	Pel RR
Fenitrotión	92.08 $\pm$ 4.2	82.68 $\pm$ 2.6
Metabolitos		
3-metil-4-nitrofenol	0.8 $\pm$ 0.4	5.6 $\pm$ 1.0
Desmetil fenitrotión	0.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1
Desmetil fenitroaxon	0.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.08
Carboxifenitrotión	0.1 $\pm$ 0.01	4.0 $\pm$ 0.6
Carboxifenitrooxon	0.1 $\pm$ 0.04	0.2 $\pm$ 0.04
3-carboxi-4-nitrofenol	0.1 $\pm$ 0.02	0.1 $\pm$ 0.01
Hidroximetil fenitrotión	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.05
Hidroximetil fenitrooxon	0.2 $\pm$ 0.08	0.3 $\pm$ 0.02
Fenitrooxon	0.7 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.02

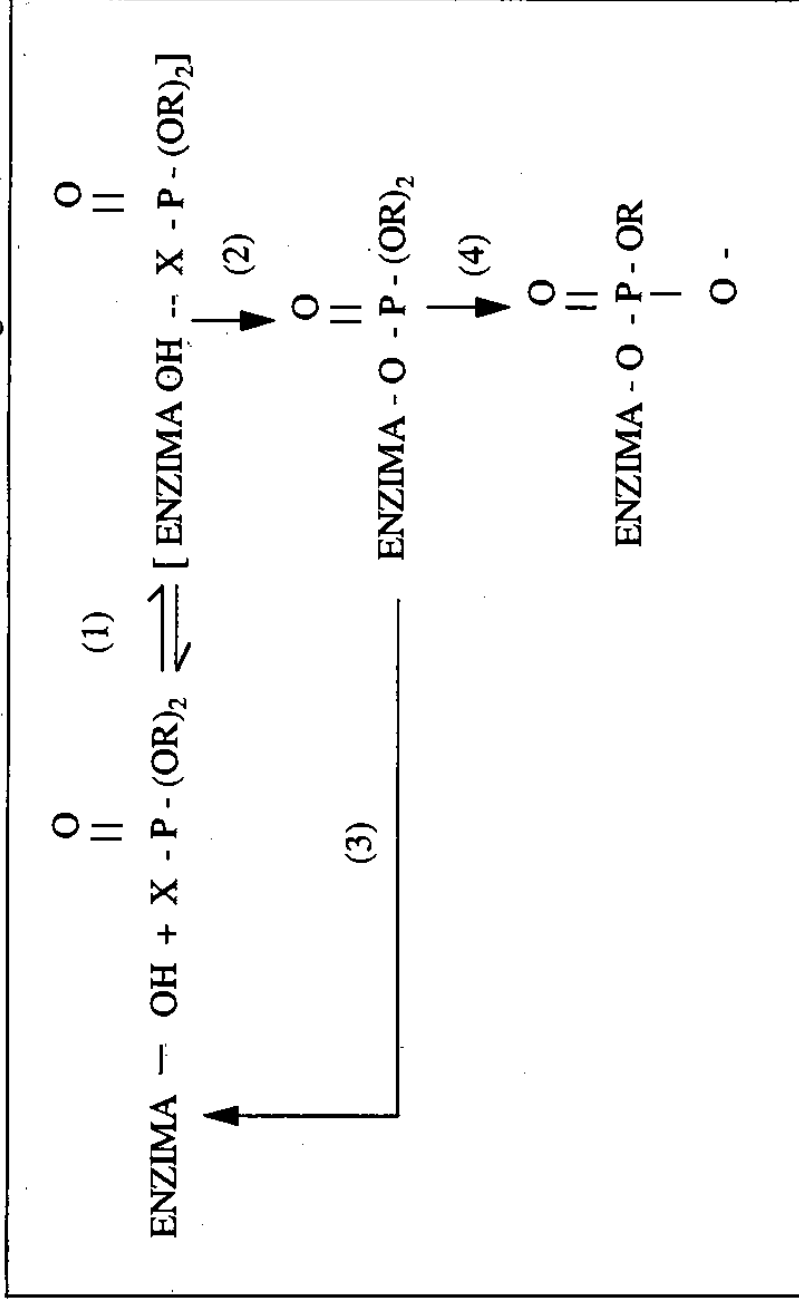
## **APENDICE D**

**Fig.1 Inhibición de la Acetilcolinesterasa por un Ester de Organofosforado, (Fukuto, 1971)**



# REACCIÓN N°2 Inhibición de la Acetilcolinesterasa

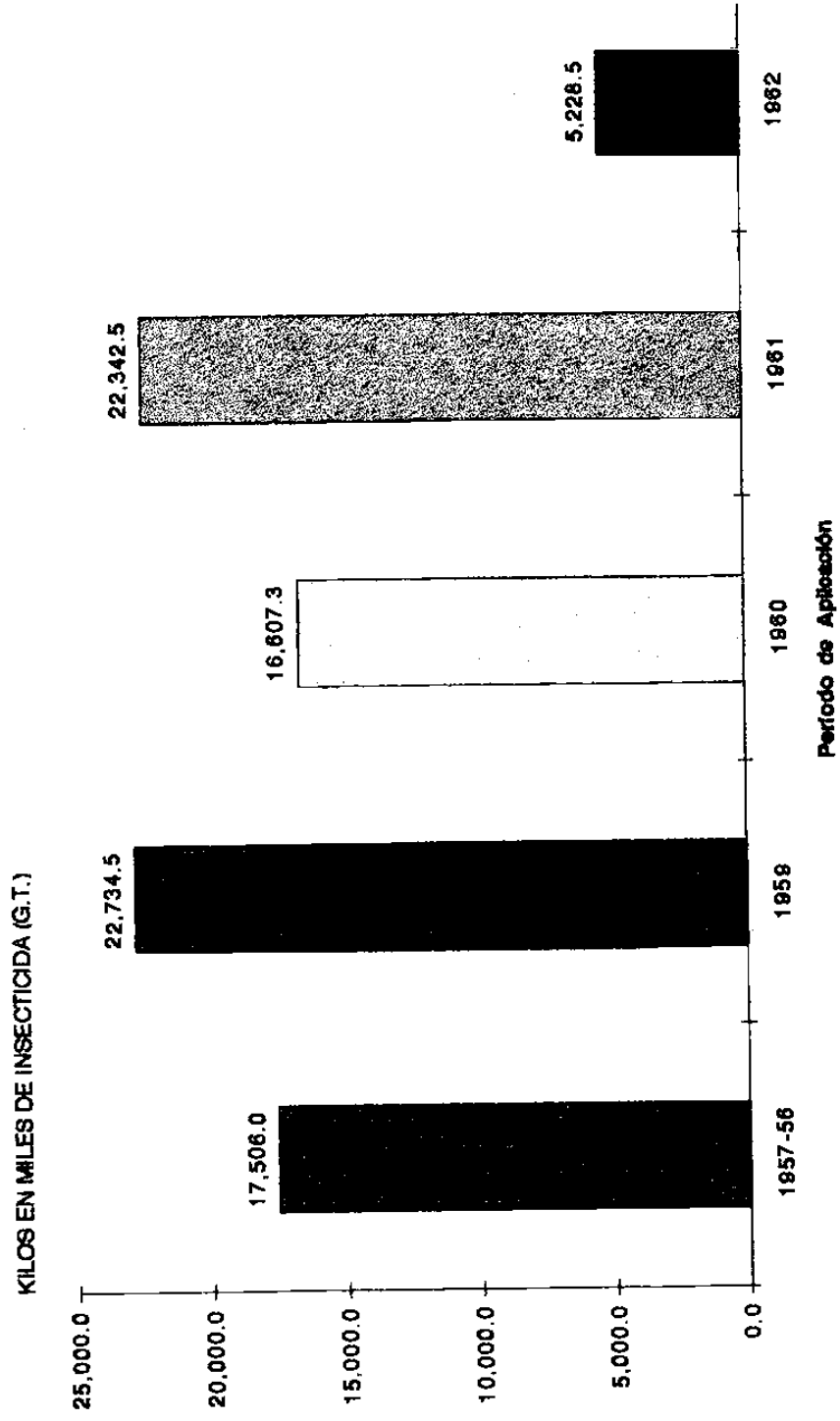
Según WHO, 1986



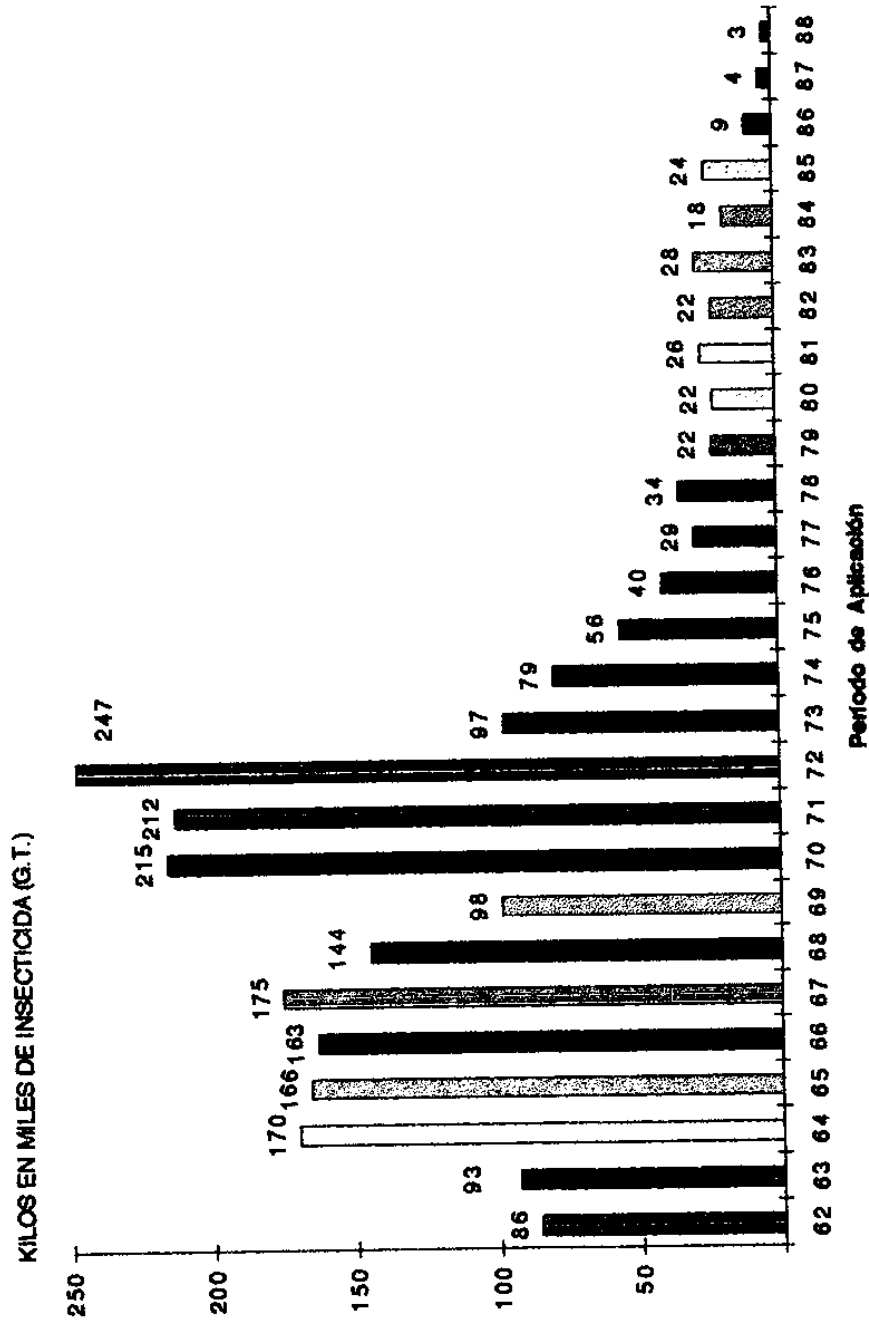


**APENDICE E**

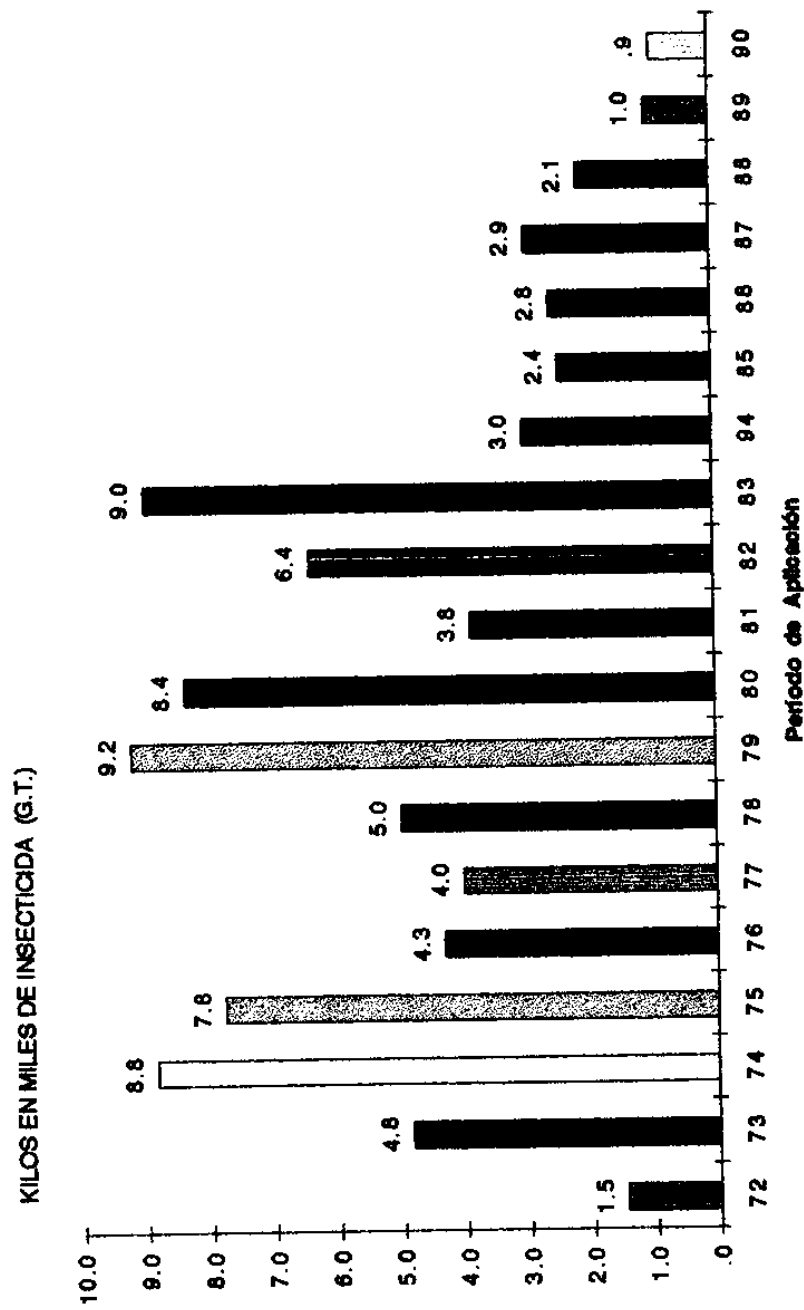
**Gráfica No. 1**  
Consumo de Dieldrina grado Técnico por el SNEM contra vectores Anofelino



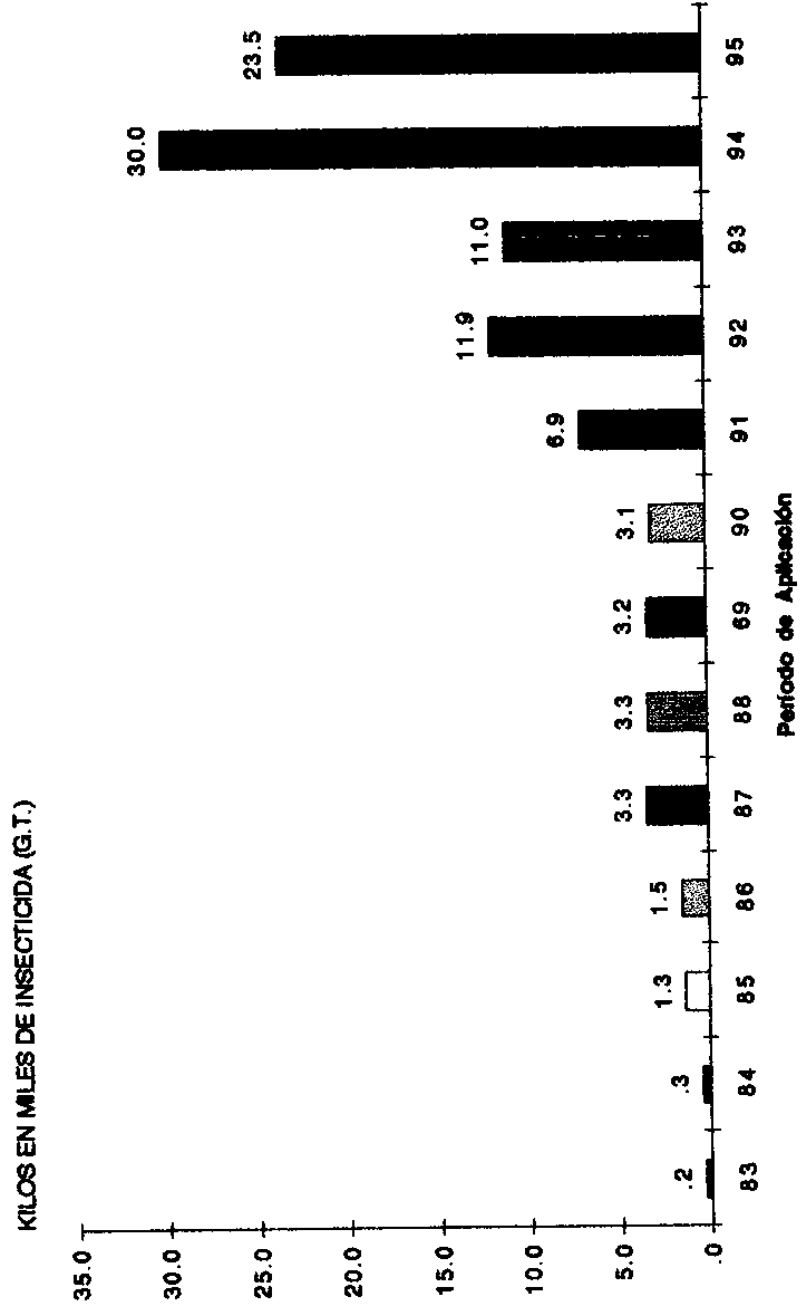
**Gráfica No. 2**  
**Consumo de DDT grado técnico por el SNEM contra vectores Anofelinos**



**Gráfica No. 3**  
**Consumo de Propoxur grado técnico por el SNEM contra vectores Anofelinos**

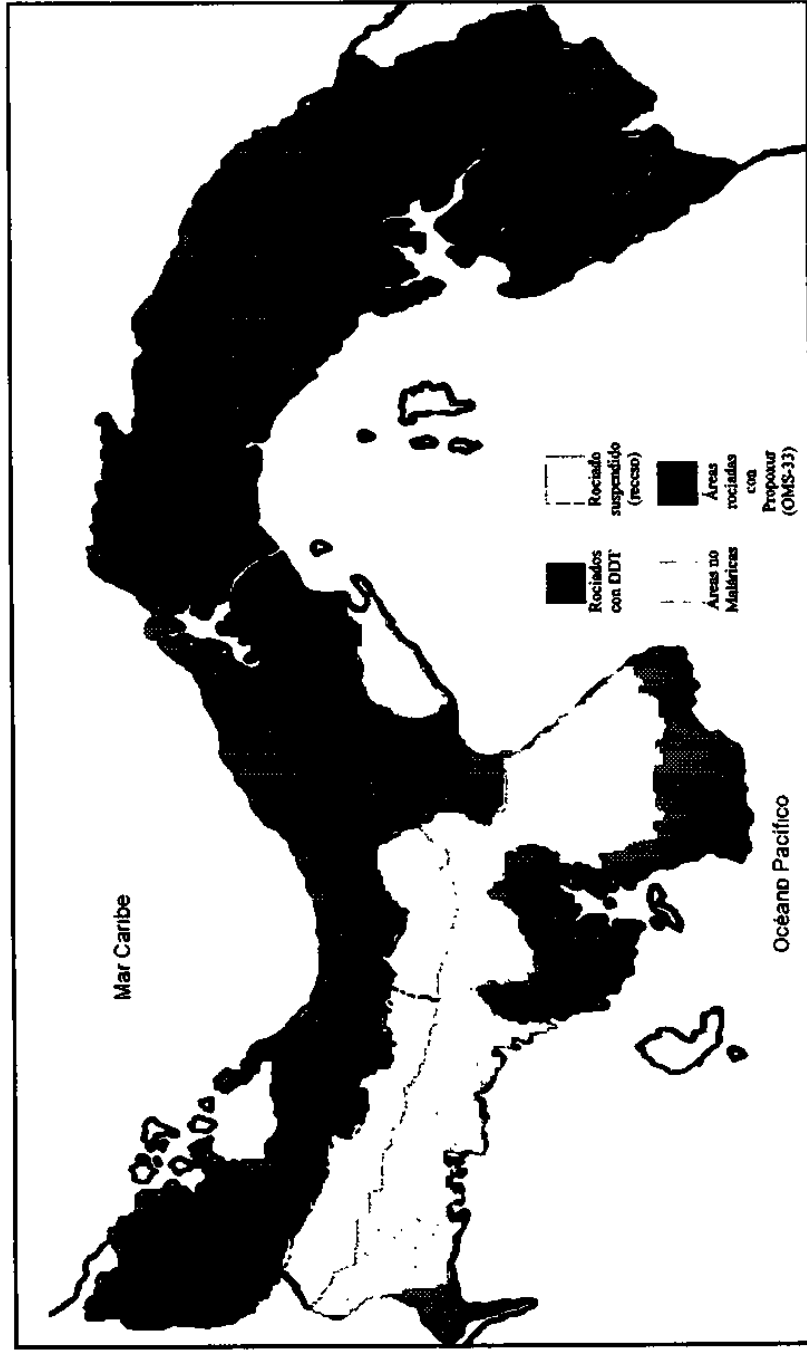


**Gráfica No. 4**  
**Consumo de Fenitroton por el SNEM contra vectores Anofelinos**

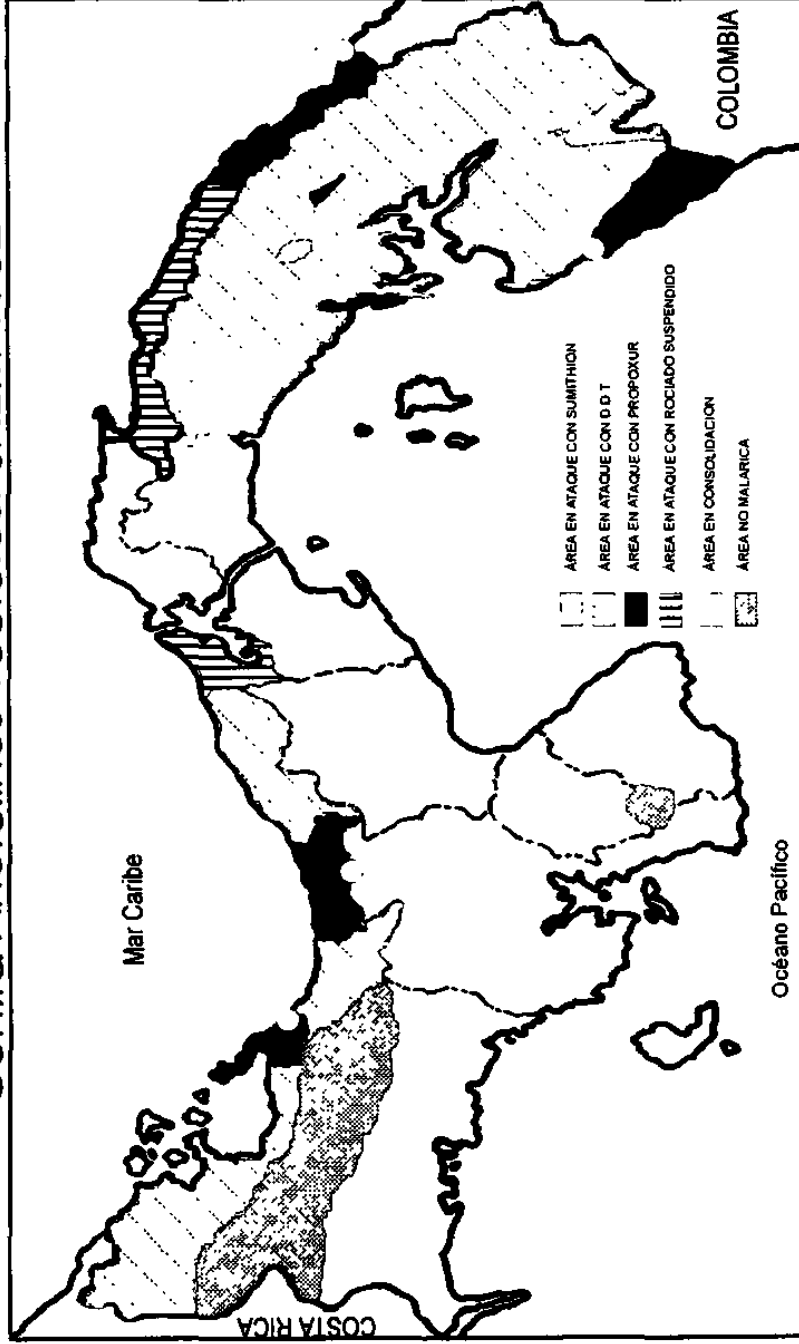


**APENDICE F**

Mapa N°1. Áreas de aplicación de DDT y Propoxur Contra  
Anofelinos Vectores en Panamá  
SNEM 1972

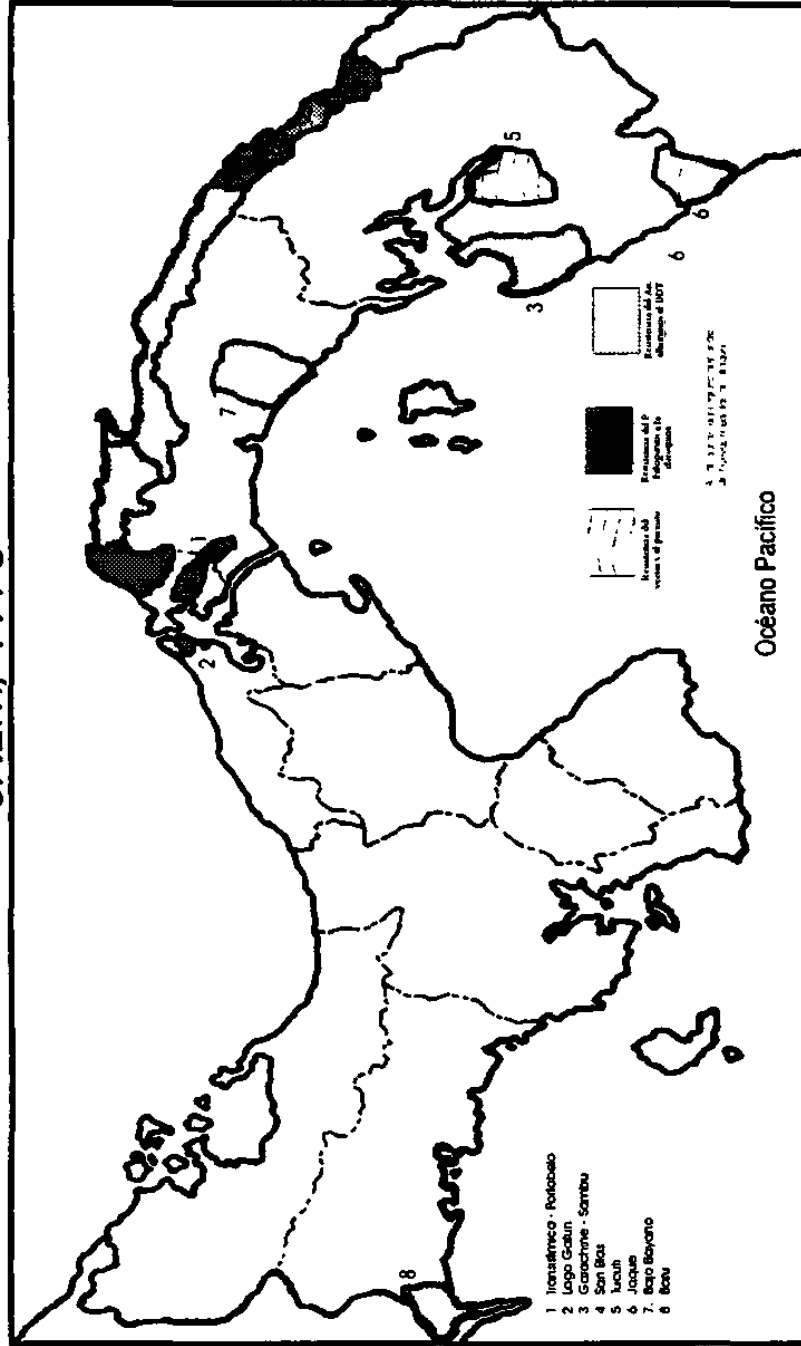


Mapa No.2 Áreas de Aplicación de DDT,  
Propoxur (OMS-33) y Fenitrotión (OMS-43)  
Contra Anofelinos Vérticos. SNEM 1982

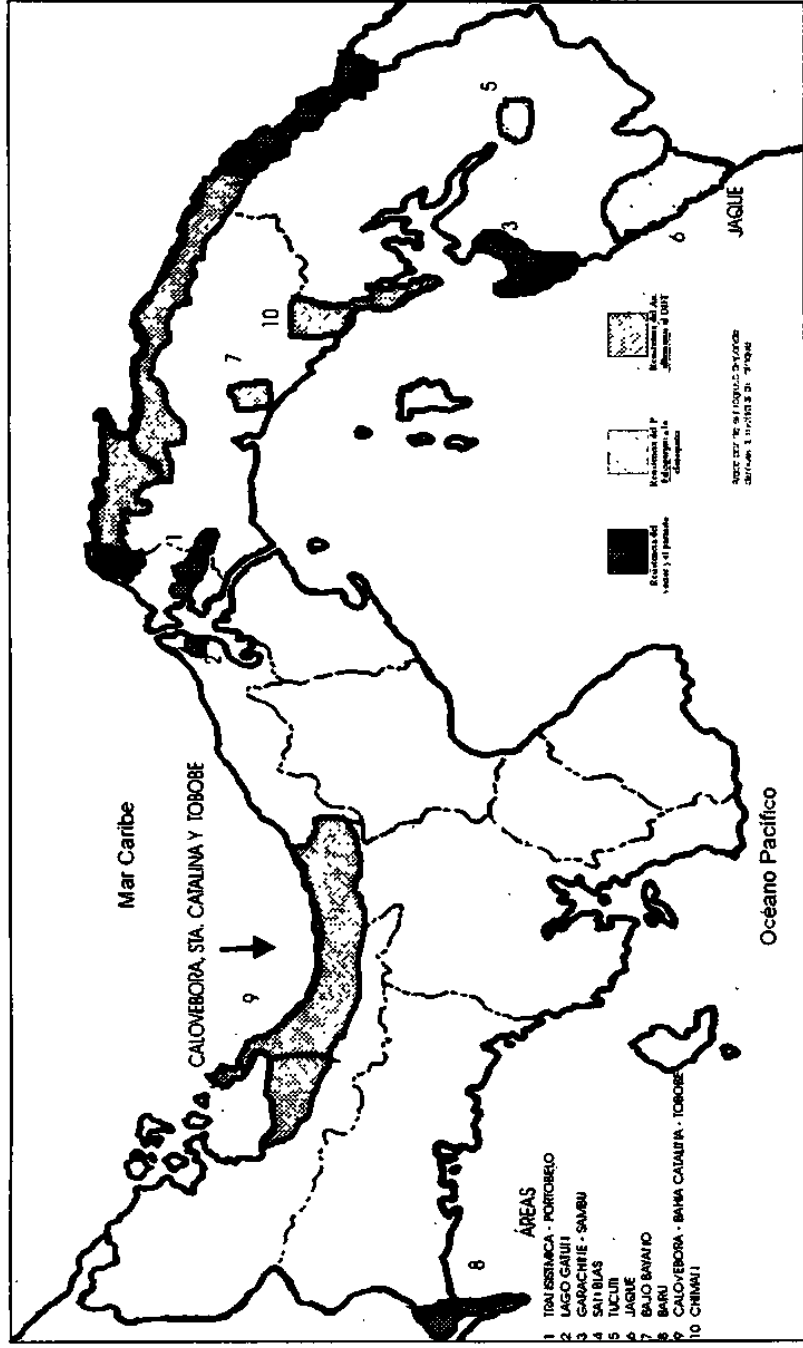




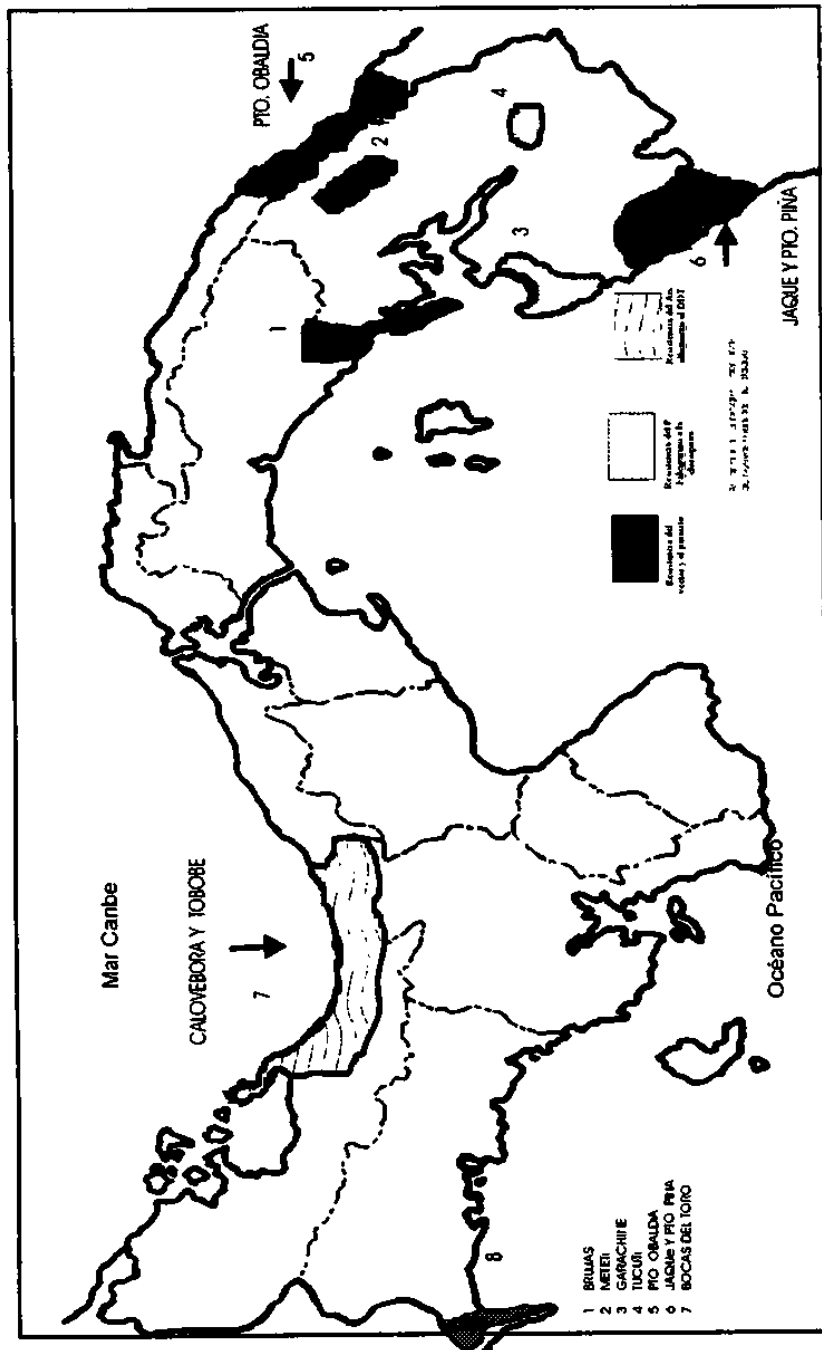
# Mapa No. 3 Regiones del País con Problemas Técnicos en la lucha Antimalárica SNEM, 1975



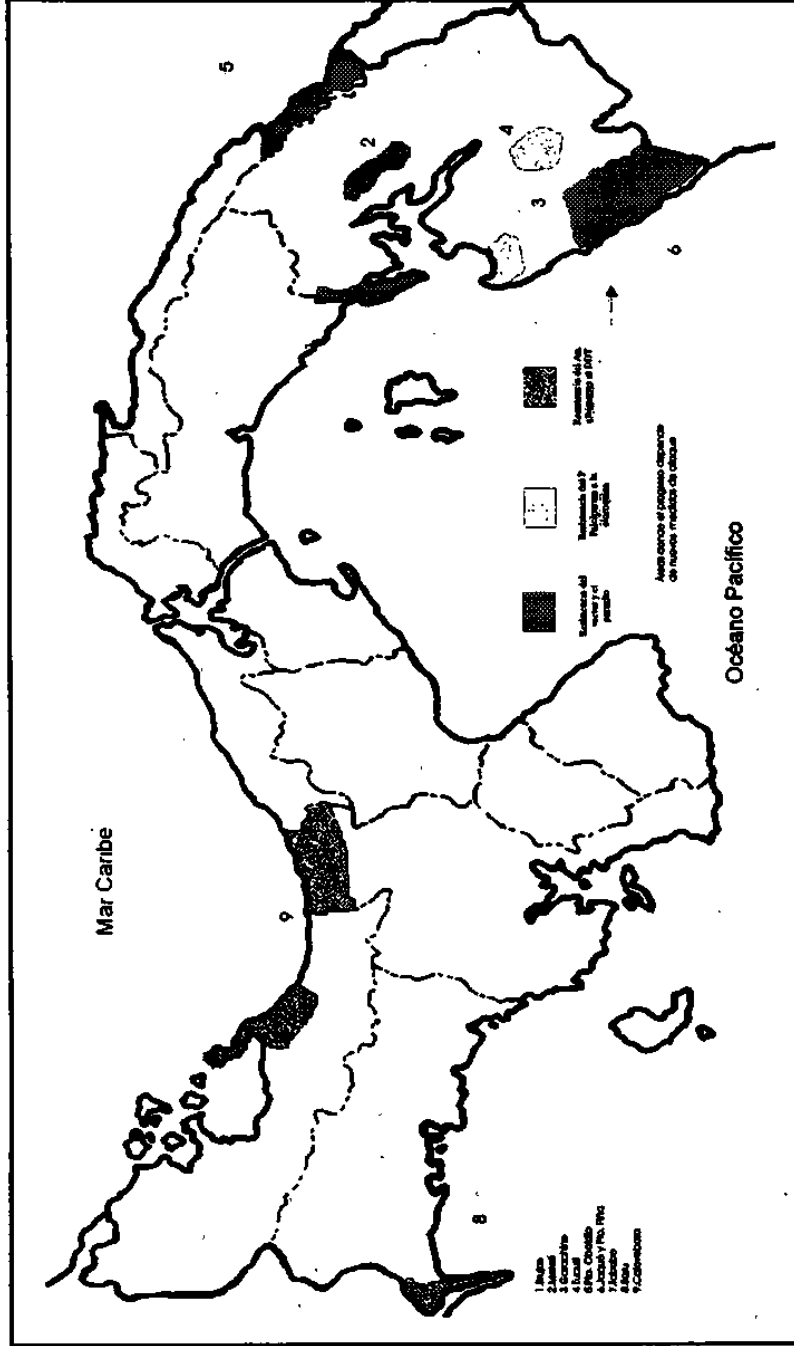
Mapa No. 4 Regiones del País con Problemas Técnicos en la Lucha Antimalárica  
SNEM, 1980



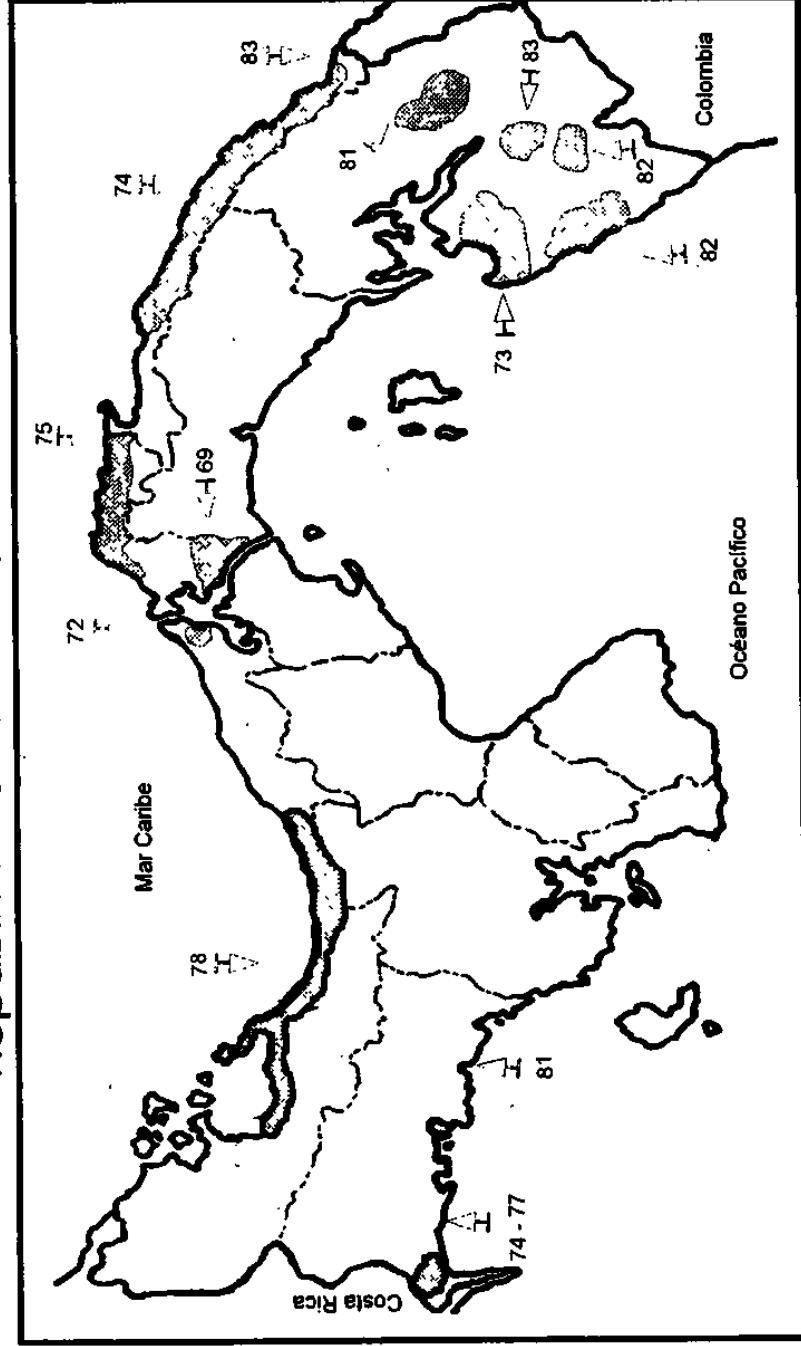
Mapa No. 5 Regiones del País con Problemas Técnicos en la Lucha Antimalárica  
 SNEM, 1982



Mapa No.6 Regiones del País con Problemas Técnicos en la Lucha Antimalárica  
 SNEM, 1985



Mapa No. 7 Cronología de Aparición de la Resistencia al DDT en *Anopheles albimanus* en la República de Panamá, 1969-1983.



**APENDICE G**

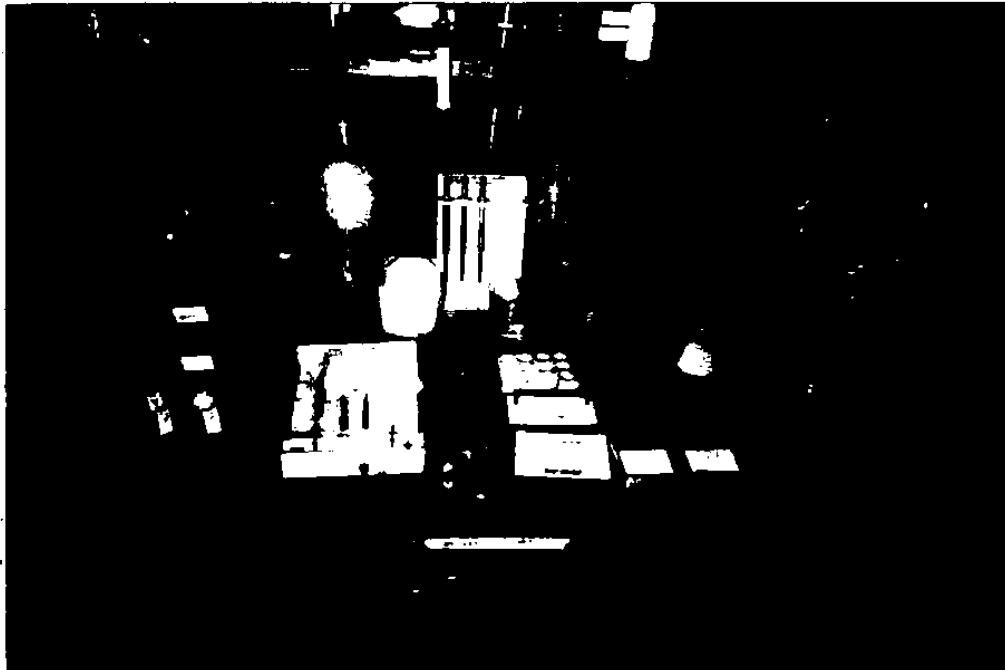


Foto N° 1. Aparato de electroforesis utilizado en los ensayos bioquímicos para determinar los niveles de esterases A y B.

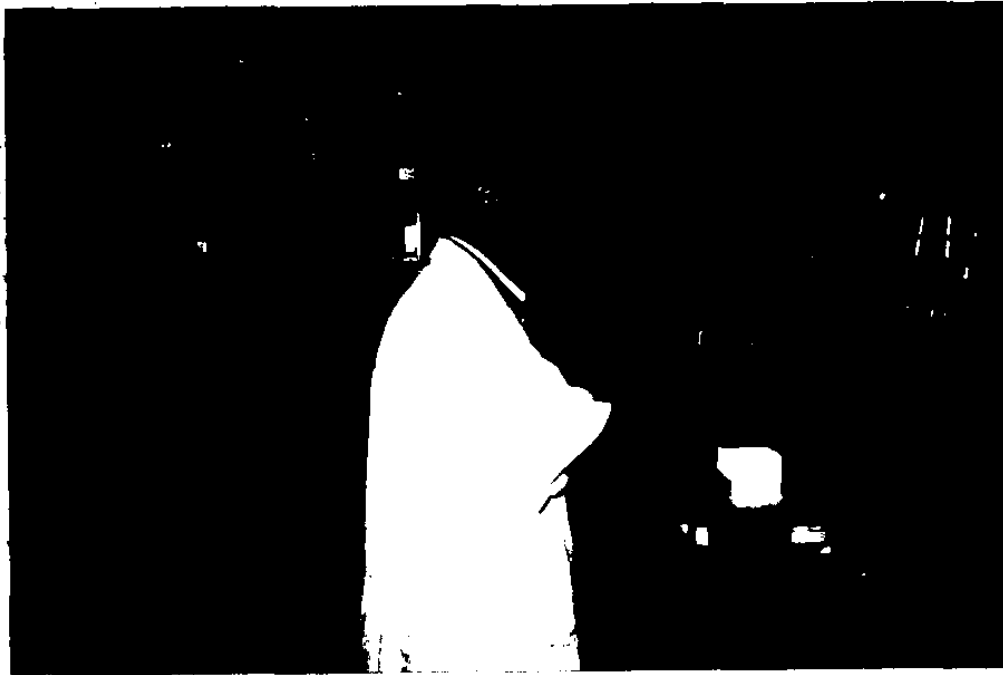


Foto N° 2. Inmersión de los geles de celulosa en el buffer Tris-glicina pH=8.5



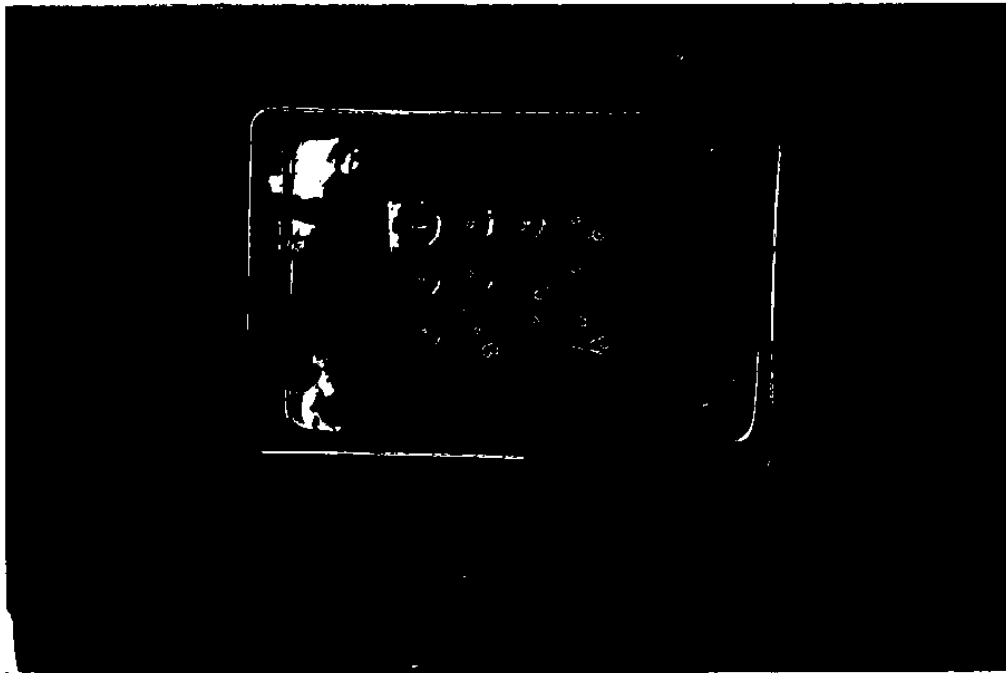


Foto N° 3. Homogenación de las muestras de *Anopheles albimanus* en solución buffer 0.1 M, con 10% de sùcrosa y azul de bromofenol.



**Foto N° 4.** Colocación de los homogenados de *An. albimanus* en gradilla especial para luego ser fijados en los geles.



**Foto N° 5.** Fijación de los homogenados de *An. albimanus* en los geles de celulosa.



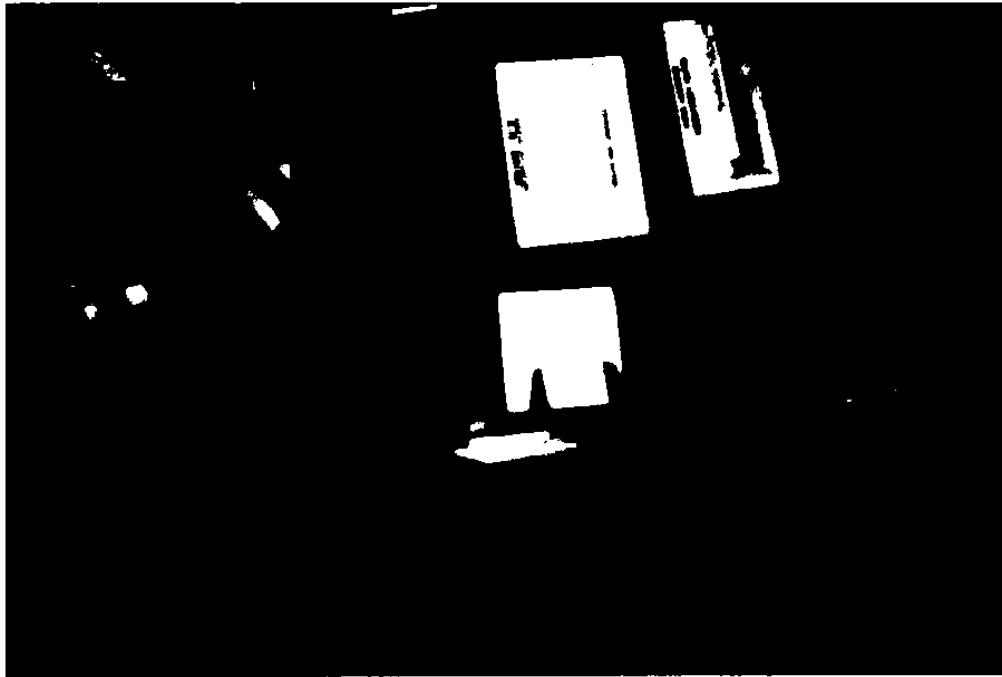
Foto N° 6. Colocación de los geles de celulosa en el aparato de electroforesis.



Foto N° 7. Adición de los substratos de las esterasas A y B, y el tinte Fast Blue RR Salt en los geles.



**Foto N° 8.** Adición del agar a los geles de celulosa para la fijación de la tinción de las bandas de esterases.



**Foto N° 9.** Medición de la movilidad electroforética de las bandas de esterases con un Vernier para determinar los Rf de cada banda.

STRATUSHE E-GLUEE II 02-17 06 1912-

INTEGRATE PERIOD IS 0.10 SECONDS OF 5 VOLTS.  
IMAGE CREATED ON TUE SEP 17 19:13:04 1996.

00

Foto N°10 Patrones enzimáticos de la esterasa A en  
muestras de **Anopheles albimanus** de la cepa de Barranco  
Montaña.



STPATRIGIE BULGRIE II 02 11 05 19111.50

INTEGRATE PERIOD IS 02 SECONDS OF 2 COPIES  
IMAGE CREDITED ON TUE SEP 17 12:10 1968

Foto N°11 Patrones enzimáticos de la esterasa A en  
muestras de *Anopheles albimanus* de la cepa de Puente  
Bayano.

STROBILIC EAGLEBYE II 08.17.78 19:44:27

INTERPATE PERIOD IS 0.16 SECONDS OF 5 COUNTS  
IMAGE CREATED ON TUE SEP 17 18:32:38 1978

Foto N°12 Patrones enzimáticos de la esterasa B en  
muestras de **Anopheles albimanus** de la cepa de Barranco  
Montaña.

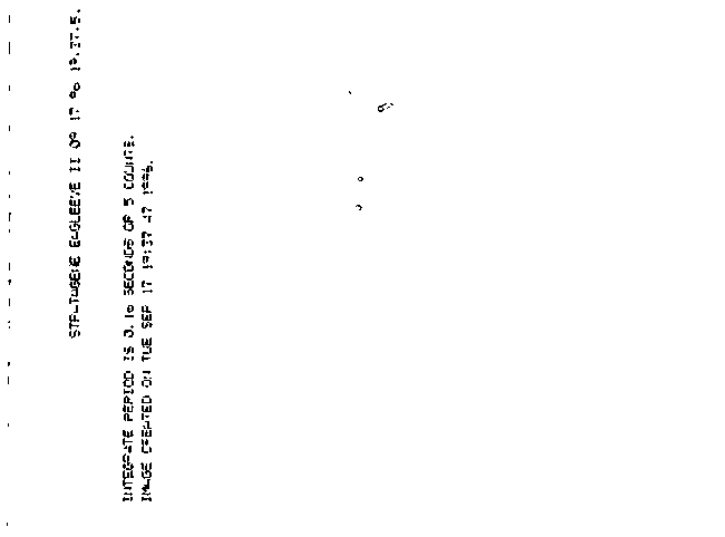


Foto N°13 Patrones enzimáticos de la esterasa B en muestras de *Anopheles albimanus* de la cepa de Puente Bayano.