

LAS GLUTATIÓN S-TRANSFERASAS EN *Aedes aegypti* RESISTENTE A PIRETROIDES Y DDT DE GUERRERO Y CHIAPAS

Neira Isabel Vázquez-Martínez¹, Felipe Dzul-Manzanilla², Alma D. López-Solis¹, Francisco Solis-Santoyo¹, Américo David Rodríguez-Ramírez¹ y Rosa Patricia Penilla-Navarro¹. ¹Centro Regional de Investigación en Salud Pública, INSP. C.P. 30700, Tapachula, Chiapas, México. ²Secretaría de Salud del Estado de Guerrero, C.P 39090, Chilpancingo, Guerrero.

RESUMEN. La resistencia a insecticidas es uno de los problemas que enfrentan los programas de control contra *Aedes aegypti*, por lo que es necesario monitorear constantemente los mecanismos que confieren la resistencia, así como los métodos para su detección temprana. Recientemente se han reportado mutaciones en el sitio blanco de los piretroides en poblaciones de *A. aegypti* de México resistentes a estos insecticidas, así como mecanismos basados en su metabolismo por las esterasas. Aquí presentamos evidencia de que las glutatión s-transferasas elevadas en colonias de mosquitos de Guerrero y Chiapas resistentes a piretroides y DDT, no metabolizan al DDT, lo que sugiere que estas enzimas están probablemente más involucradas en la defensa antioxidante de la detoxificación de los piretroides.

Palabras clave: resistencia a insecticidas, metabolismo del DDT, resistencia cruzada, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT. Insecticides resistance is one of the problems faced by control programs against *Aedes aegypti*, which makes necessary a constant monitor of resistance mechanisms as well as techniques for its early detection. Mutations in the target site of pyrethroids on the Mexican *A. aegypti* have been recently reported, as well as elevated esterases responsible for the metabolism of these insecticides in some field colonies. We present herein evidence that the elevated glutathione s-transferasas in the pyrethroid and DDT resistant colonies of the Guerrero and Chiapas state are not metabolizing DDT, but are probably more involved in the antioxidant defense of the pyrethroid detoxification.

Key words: insecticide resistance, DDT metabolism, cross resistance, *Aedes aegypti*.

Introducción

El dengue es la enfermedad más común transmitida por artrópodos (arbovirosis) (SSA, 2001) y es transmitida por el vector *Aedes aegypti*. Este vector ha alcanzado una distribución pantropical (SSA, 2001), por lo que la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2009) declaró que el dengue se presenta con miles de muertes en más de 100 países y aproximadamente dos mil millones de personas en riesgo.

Actualmente todavía no existe vacuna o tratamiento específico para el dengue, el control del vector sigue siendo la piedra angular de la prevención y control de brotes (Kamgang et al., 2011). Esto se ha basado en la aplicación del control químico para controlar las poblaciones del mosquito vector (Rodríguez, 2002; SSA, 2008), sin embargo el desarrollo de resistencia de *A. aegypti* a los insecticidas (WHO, 1992), hace más grave el problema del control.

Los dos mecanismos principales comúnmente asociados con la resistencia son genéticos (Martins et al., 2009): alteración en la actividad de las enzimas metabólicas y alteración en el sitio de acción de los insecticidas. El fenómeno de resistencia cruzada entre DDT y piretroides (Chadwick *et al.*, 1977) está dado por la mutación llamada kdr (knock down resistance) en los canales de sodio de las células nerviosas. Mientras que la resistencia causada por cambios en el metabolismo son debido a la elevada actividad enzimática de P⁴⁵⁰ monooxigenasas, glutatión-s-transferasa y esterasas, lo cual ha sido asociado con los altos niveles de resistencia en piretroides, organofosforados y carbamatos en mosquitos de *Anopheles* (Bisset *et al.*, 2002).

Recientemente se ha reportado la presencia de kdr en colonias de aedinos resistentes a piretroides tanto del estado de Guerrero como de Chiapas (Aponte, *et al.*, en prensa; García et al., 2009), así como el mecanismo de resistencia metabólica de los piretroides basado en esterasas (Flores *et al.*,

2005) en el estado de Baja California. Aquí presentamos evidencia de que las glutatión s-transferasas elevadas en las colonias de mosquitos resistentes a piretroides y DDT de Guerrero no metabolizan al DDT, lo que sugiere que estas enzimas están probablemente más involucradas en la defensa antioxidante de la detoxificación de los piretroides.

Materiales y Método

Área de estudio y colecta del material biológico: La Secretaría de Salud del Estado de Guerrero realizó colectas en diferentes localidades mediante ovitrampas en los municipios Hospital General, Caltitlán, Emiliano Zapata y Benito Juárez. En el estado de Chiapas fueron realizadas en el Panteón Municipal de Mazatán y en Cd. Hidalgo (una colecta intradomiciliaria en tanques).

Pruebas de susceptibilidad: Se realizaron pruebas de susceptibilidad de acuerdo a la OMS (WHO, 1998) en los mosquitos colectados en los diferentes sitios. Un grupo de 125 mosquitos fueron expuestos durante una hora en tubos de exposición que contenían papeletas impregnadas con permetrina a una concentración de 0.816, utilizando otro tubo como control que contenía una papeleta impregnada con aceite de oliva y solvente. A la hora de exposición se registró la cantidad de mosquitos derribados (knockdown), y fueron transferidos al tubo de espera, provisto en la parte superior con un algodón con agua de azúcar al 10%. La lectura de mortalidad se llevó a cabo a las 24 horas de exposición.

ELISA competitivo indirecto: Dos placas de 96 pozos fueron incubados con el conjugado hapteno BSA-DDT5 por toda la noche, al siguiente día las placas fueron lavadas por cuatro tiempos entre cada paso, después de cada incubación realizada (NaCl-Tween 20). El volumen final total usado en todos los pasos fue de 100 µl, todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Para la preparación de la curva (PBS y DDT) se realizaron ocho diluciones de 1/200.

Mientras tanto, se expusieron grupos de 23 mosquitos a DDT al 4%, los mosquitos sobrevivientes expuestos durante una hora con el insecticida fueron entonces analizados para calcular el DDT absorbido y sus metabolitos.

Cada una de las 23 muestras de mosquitos a analizar se homogeneizaron en 150 µl de PBS para las pruebas de metabolismo y pruebas bioquímicas. Para las pruebas de metabolismo, se colocaron alícuotas de 2.5 µl en tres pozos, a los que se les agregó PBS y los anticuerpos monoclonales contra DDT LIB-DDT 5.25 (placa 1), el cual reconoce al DDT y sus metabolitos y LIB-DDT 5.52 (placa 2), el cual reconoce específicamente al DDT. Las placas fueron nuevamente incubadas por una hora y posteriormente fue agregada inmunoglobulina de ratón e incubada por una hora.

Al concluir la hora de incubación, se agregó el sustrato y se observó inmediatamente la reacción colorimétrica. La reacción se llevó a cabo por 15 minutos, posteriormente fue agregado ácido sulfúrico para detener la reacción y se leyeron las absorbancias a una densidad óptica de 490-650nm.

Pruebas bioquímicas: Diez µl del homogeneizado se pasaron en duplicas a dos placas limpias para los ensayos de Gsts y proteínas generales. En cada placa se prepararon dos blancos conteniendo solo agua destilada.

Glutathion s-transferasas (Gsts). Se adicionaron a cada duplica 200 µl de la solución de glutatión reducido: Se disolvieron 0.06 gr de glutatión reducido en 20 ml de buffer Na₂HPO₄ 0.1M a un pH 6.5 y luego se agregó la solución de CDNB (1-cloro-2,4-dinitro benceno), disuelto

en 1 ml de metanol. La actividad enzimática se midió a 340 nm por 5 min. en un lector de microplacas Multiskan Spectrum de Thermo LabSystems.

Proteínas. Se adicionaron 300 μ l del reactivo de proteínas BIO Rad en una dilución 1:4 en agua destilada. Se incubó por 5 min. a temperatura ambiente y las absorbancias se midieron a 570 nm.

Para el análisis de los datos obtenidos se usaron pruebas T-Test independientes y los datos se graficaron en histogramas, ambos se realizaron en el programa SPSS versión 19.

Resultados

Pruebas de susceptibilidad. Los resultados revelaron niveles elevados de resistencia a permetrina y DDT en *A. aegypti* de las localidades analizadas. Los mosquitos de las localidades del estado de Guerrero presentaron mortalidades entre 2.0% y 15.3% para permetrina. Presentando mayor resistencia los mosquitos de Hospital General y Zapata con un 2.0% de mortalidad, seguidos por los de Benito Juárez y Lomas de Chapultepec con un 7% y 8.5% de mortalidad, y por último los de Caltitlán 15.3% de mortalidad. Los mosquitos de Zapata tuvieron una mortalidad del 2% con DDT.

Los porcentajes de mortalidad obtenidos en las dos cepas de mosquitos colectados en el estado de Chiapas mostraron que los de Cd. Hidalgo fueron más resistentes con un 2.6% de mortalidad que los colectados en Mazatán, cuya mortalidad media fue de 24.19%.

Para comprobar si las Gsts están relacionadas con el metabolismo del DDT en algunas de estas colonias de campo, se expusieron grupos de 23 mosquitos al DDT al 4%, resultando en la sobrevivencia de todos los mosquitos expuestos a una hora con el insecticida, estos mosquitos fueron entonces analizados para la presencia de DDT y sus metabolitos en ELISAS para determinar si existe una correlación con las cantidades de Gsts.

ELISAS. En Guerrero, en los mosquitos de Hospital General, solo un grupo de mosquitos de tres analizados, absorbió mayor cantidad de DDT (4999.39 ± 187.67 mmol de DDT) que la cepa susceptible (528.29 ± 122.52 mmol de DDT) ($P < 0.001$, Fig. 1), pero el metabolismo de DDT para los tres grupos (1038.83 ± 95.18 mmol de metabolitos) fue menor que el de la cepa susceptible (4092.09 ± 517.40 mmol de metabolitos) ($P < 0.001$, Fig. 2). Los mosquitos de Caltitlán, absorbieron ligeramente más DDT (935.27 ± 67.62 mmol de DDT) que la cepa susceptible, pero aún fueron diferentes significativamente ($P < 0.01$, Fig. 1). Estos mosquitos también metabolizaron el DDT (447.549 ± 37.40 mmol de metabolitos) en menor proporción que la cepa susceptible ($P < 0.001$, Fig. 2). En Chiapas, todos los mosquitos de Cd. Hidalgo absorbieron mayor cantidad de DDT que los de la cepa susceptible (6214.17 ± 238.65 mmol de DDT) ($P < 0.001$, Fig. 1, excepto por un mosquito), mientras que un grupo, de los dos analizados, metabolizaron mayor cantidad de DDT (6305.48 ± 543.98 mmol de metabolitos) que la cepa susceptible (4092.09 ± 517.40 mmol de metabolitos) ($P < 0.01$, Fig. 2). No se encontraron diferencias significativas entre el sexo de los mosquitos en el DDT absorbido y el metabolismo.

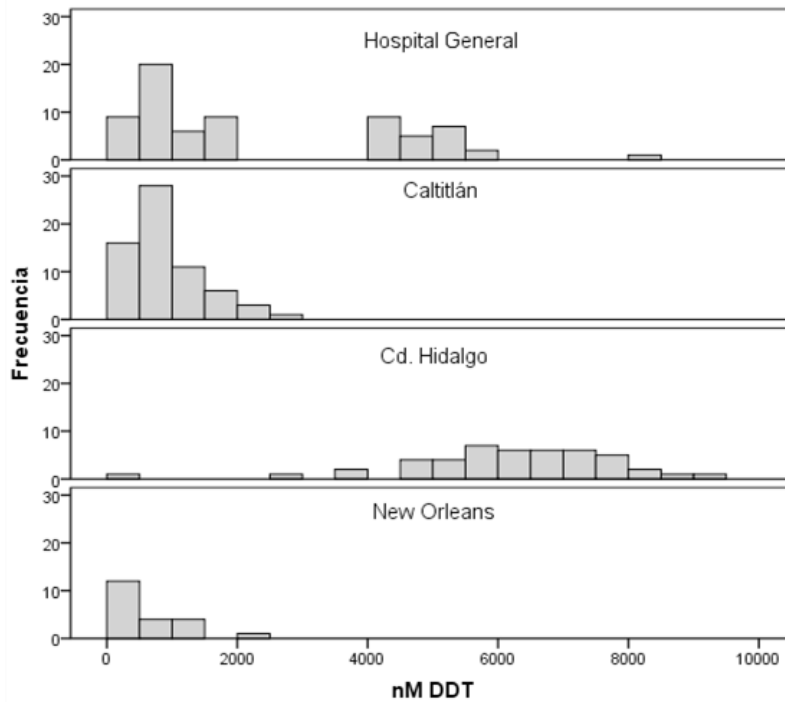


Figura 1. Histogramas de la cantidad de DDT absorbido por las colonias de mosquitos colectadas en tres localidades de Guerrero y Chiapas comparado con la colonia susceptible Nuevo Orleans, cuando se expusieron durante una hora al DDT al 4%.

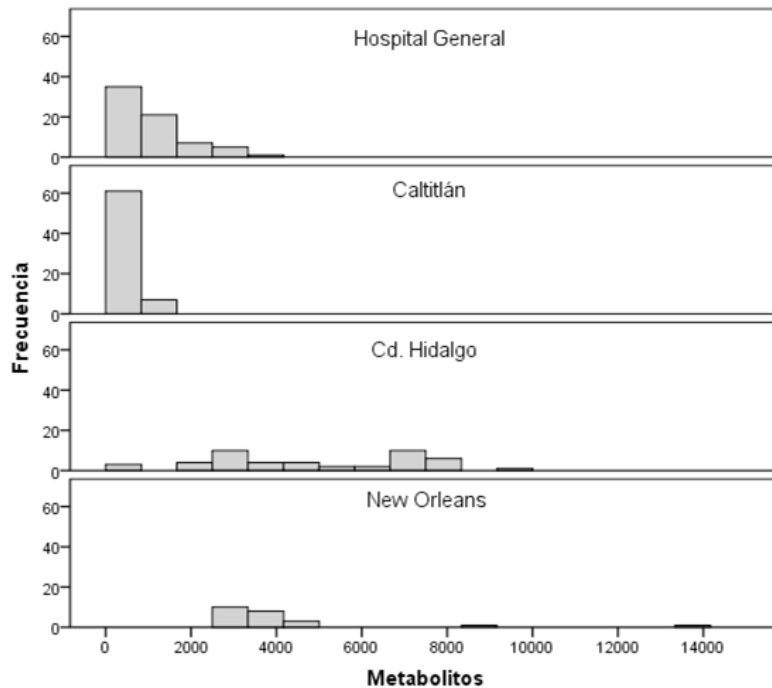


Figura 2. Histogramas de la cantidad de metabolitos y DDT detectados en las colonias de mosquitos colectadas en tres localidades de Guerrero y Chiapas comparado con la colonia susceptible Nuevo Orleans, cuando se expusieron durante una hora al DDT al 4%.

Concentración de Gsts. En Guerrero, tanto los mosquitos de Hospital General como los de Caltitlán presentaron una actividad enzimática estadísticamente más alta (5.59 ± 0.43 , 8.80 ± 0.23) que las de la cepa susceptible (2.13 ± 0.13) ($P < 0.001$, Fig. 3). Mientras que los mosquitos de Cd. Hidalgo, Chiapas aunque tuvieron menor actividad de Gsts que las localidades de Guerrero, también fueron estadísticamente superiores (3.13 ± 0.12) que la actividad de la cepa susceptible ($P < 0.001$, Fig.3).

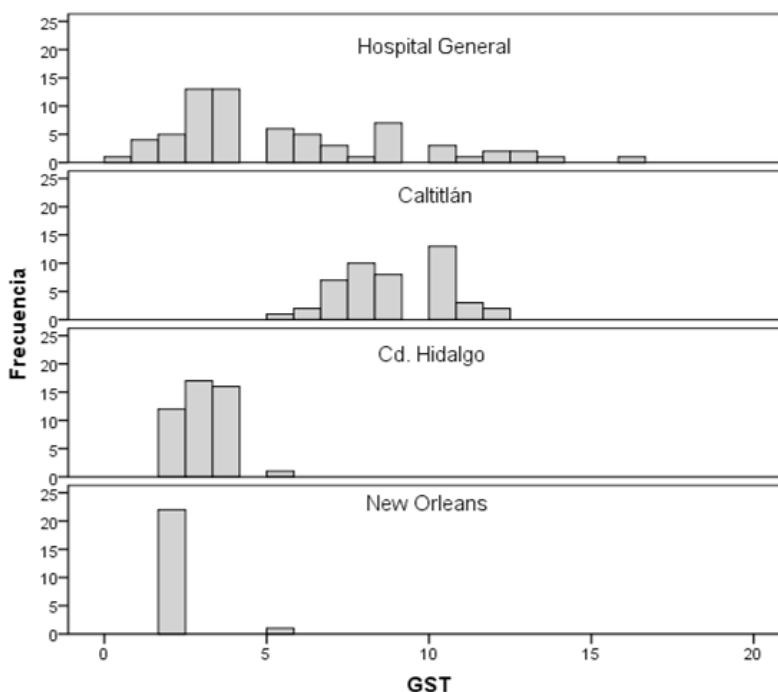


Figura 3. Histogramas de la cantidad de glutatión s-transferasas detectadas en las colonias de mosquitos colectadas en tres localidades de Guerrero y Chiapas comparado con la colonia susceptible Nuevo Orleans, cuando se expusieron durante una hora al DDT al 4%.

Discusión y Conclusiones

La resistencia a piretroides y DDT encontrados con las pruebas de susceptibilidad en las localidades de Guerrero analizadas, probablemente indiquen la presencia de resistencia cruzada por un mecanismo en común, ya que los niveles de resistencia son muy altos, y con nuestro trabajo logramos comprobar que no hay una resistencia basada en el metabolismo, al menos para el DDT en Hospital General y Caltitlán. Aunque en otros estudios como el de Flores *et al.* (2005) hayan encontrado que la resistencia a piretroides en *A. aegypti* de la península de Baja California, sea debido a una elevación en la concentración de esterasas, nuestros resultados sugieren que las Gsts elevadas en las poblaciones de Guerrero tienen que ver con la resistencia a piretroides, pero como agente antioxidante de defensa (Vontas *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que la resistencia cruzada entre DDT y piretroides en algunas poblaciones de *A. aegypti* de Guerrero es debido a la existencia de una mutación en el gen del canal de sodio (Aponte, *et al.*, en prensa). Por otro lado, García *et al.* (2009) reportaron que en las localidades de Mazatán y Cd. Hidalgo, Chiapas, *A. aegypti* presenta el gen de resistencia en los canales de sodio con una frecuencia de 16% y 15%, respectivamente. Sin embargo en otros

lugares como en África Central, Kamgang et al. (2011) reportaron que todas sus poblaciones de *A. aegypti* no presentaron resistencia cruzada con DDT, excepto para *A. albopictus* de Yuounde.

Nuestros resultados también demostraron que no hay una correlación entre la actividad elevada de las Gsts y el metabolismo del DDT, ya que los mosquitos de las localidades Hospital General y Caltitlán, presentaron Gsts elevadas pero no metabolismo, y los mosquitos de Cd. Hidalgo que presentaron metabolismo, no tuvieron niveles de Gsts considerablemente elevados.

Literatura Citada

- Aponte, A., Dzul-Manzanilla F., Penilla R. P., Che-Mendoza A., López A. D., Solis F. Manrique-Saide P., Ranson H., Lenhart A., McCall P. and Rodríguez A. D. 2012. Insecticide resistance: Metabolic mechanisms and point mutations on the target site of pyrethroids in *Aedes aegypti* populations from Guerrero state in Mexico. *Pesticide, Biochemical and Physiology*.
- Chadwick, P. R., Invest J. F., M. J. Bowron. 1977. An example of cross-resistance to pyrethroids in DDT-resistant *Aedes aegypti*. *Pestic Sci.* 15:112-120.
- Flores, A. E, Albedaña-Vázquez, W., Fernández, I. S., Badii, M. H., Loaiza, H. B., Ponce, G. G., Lozano, S. F., Brogdon, W.G., Black, W. C. IV., B. Beaty. 2005. Elevated α -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L) from Baja California, México. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 82 66-78.
- García, G. P., Flores, A. E., Fernández-Salas, I., Saavedra-Rodríguez, K., Reyes-Solis, G., et al. 2009. Recent Rapid Rise of a Permethrin Knock Down Resistance Allele in *Aedes aegypti* in México. *PLoS Negl Trop Dis* 3(10): e531.
- Martins, A. J., Lins, R. M., Linss, J. G., Peixoto, A. A., D, Valle. 2009. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 81:108-115.
- Organización Panamericana de la Salud. 2009. Actualización sobre la situación Regional del Dengue. 10 p.
- Rodríguez, J. D. 2002. Las enfermedades transmitidas por vector en México. *Rev Fac Med* 45(3):126-141.
- SSA. 2001. Programa de Acción: Enfermedades Transmitidas por Vector 29 p.
- SSA. 2008. Programa de Acción Específico 2007-2012 Dengue. 1a. ed. 56 p.
- Vontas, G. J. Small and J. Hemingway (2001) Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J*, 357, 65–72.
- WHO. 1992. Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control. In WHO Tech. Rep. Ser. 818: 1-55.