

Sección Médica

Nota científica

Efecto de inhibidores de anhidrasa carbónica en larvas de *Anopheles albimanus* (Diptera, Culicidae)

Effect of carbonic anhydrase inhibitors on *Anopheles albimanus* larvae (Diptera: Culicidae)

LEONARDO ROCHA O.^{1,2}, CAROLINA TORRES G.^{1,3}, MARÍA CORENA-McLEOD⁴,
IVÁN D. VÉLEZ B.^{1,5} y SARA M. ROBLEDO R.^{1,6}

Resumen: La anhidrasa carbónica (AC) cataliza la conversión reversible del CO₂ a bicarbonato y participa en mecanismos de alcalinización en el intestino de mosquitos. Se evaluó la toxicidad de cuatro inhibidores de anhidrasa carbónica (IAC): acetazolamida (AZM), metazolamida (MZM), etoxzolamida (ETX) y dorzolamida (DZA) en larvas de *Anopheles albimanus* por monitoreo de mortalidad 24, 48 y 72 horas post aplicación, a una concentración de 50 µg/ml diluido previamente en dimetil sulfoxido. Todos los IAC redujeron la población de larvas en proporciones variables. La ETX mostró la mayor toxicidad que las AZM, MZM y DZA alcanzando una mortalidad superior al 80% después de 24 horas y del 98% después de 72 horas de su aplicación. Nuestros resultados indican que de los IAC, la etoxzolamida, en particular, constituye un candidato valioso como una nueva alternativa de control de formas inmaduras de *An. albimanus*, considerado el vector primario de malaria en Colombia.

Palabras clave: Larvicida. Control de mosquitos. Vectores. Paludismo.

Abstract: Carbonic anhydrase (CA) catalyzes the reversible conversion of CO₂ to bicarbonate and participates in mechanisms of alkalization in the intestine of mosquitoes. The toxicity of four CA inhibitors (CAI): acetazolamide (AZM), methazolamide (MZM), ethoxzolamide (ETX) and dorzolamide (DZA) were evaluated in larvae of *Anopheles albimanus* by monitoring mortality 24, 48 and 72 hours post application, at a concentration of 50 µg/ml diluted in dimethyl sulfoxide previously. All IAC reduced the population of larvae in variable proportions. ETX showed the highest toxicity, achieving more than 80% mortality after 24 hours and 98% after 72 hours of application. The CAI, AZM, MZM and DZA showed less toxicity (<50% mortality). Our results indicate that the CAI, including ETX in particular, is a worthy candidate as an alternative for the control of *An. albimanus*, which is considered a primary vector of malaria in Colombia.

Key words: Larvicide. Mosquito Control. Vectors. Malaria.

Introducción

Anopheles (*Nyssorhynchus*) *albimanus* (Wiedemann, 1820) (Diptera: Culicidae) es uno de los vectores principales de *Plasmodium* de humanos en Centro y Sur América (Zimmerman 1992; Sinka *et al.* 2010; Montoya-Lerma *et al.* 2011). En Colombia, *An. albimanus* es considerado vector primario de malaria en áreas rurales y periurbanas de la Costa Pacífica y probablemente en la Costa Caribe (Gutiérrez *et al.* 2008). En el control de la malaria se presentan algunas limitaciones que incluyen el desconocimiento de actividades adecuadas para la protección y prevención de la transmisión; resistencia de algunas poblaciones de *Plasmodium* a los medicamentos de uso actual para el tratamiento de la malaria; errores en la aplicación de insecticidas o aun, resistencia de los vectores a los insecticidas; polución del medio ambiente y efectos adversos de los insecticidas en humanos y otros organismos (Georghiou y Taylor 1977, Olano *et al.* 1997; Hemingway y Ranson 2000; Carmona-Fonseca 2003, 2004; Nauen, 2007). Por esta razón, es fundamental la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en uso (Fonseca-González *et al.* 2010) y la susceptibilidad de los estadios inmaduros a los insecticidas.

El control de inmaduros es una estrategia más factible que el de los adultos, dado que limita la capacidad de dispersión de los mosquitos (Blanco *et al.* 2002). El control de formas inmaduras de anofelinos, requiere el conocimiento de las condiciones de calidad de agua que puede ocupar una especie (Sinka *et al.* 2010). Además, se debe conocer aspectos biológicos básicos que permitan el descubrimiento de blancos necesarios para el desarrollo de nuevos y mejores larvicidas. Un aspecto fundamental en larvas de mosquitos es la alcalinización, la cual es indispensable para la supervivencia (Corena *et al.* 2004). Las enzimas relacionadas con este proceso pertenecen a la familia de las anhidrasas carbónicas (AC), las cuales catalizan la conversión reversible del CO₂ a bicarbonato (Corena *et al.* 2002; Smith *et al.* 2007). La AC es inactivada por dos clases de compuestos: aniones complejos de metales y sulfonamidas no sustituidas, las cuales se unen al ión de zinc de las AC. Algunos de estos compuestos, como la acetazolamida (AZM) y metazolamida (MZM), en larvas de mosquitos como *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, *Cx. nigripalpus*, *Ochlerotatus taeniorhynchus*, *An. quadrimaculatus*, ocasionan un efecto letal variable de acuerdo con la especie (Corena *et al.* 2004). Sin embargo,

¹ PECET, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Carrera 53 # 61-30, Torre 2 Laboratorio 632, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia. ² M. Sc. Investigador PECET. lrocha94@yahoo.com. ³ M. Sc. Profesora, Universidad de Antioquia, Medellín. aniloract@gmail.com. ⁴ Ph. D. Directora World Solutions Against Infectious Diseases-WSAID, 4500 San Pablo Road, Jacksonville, FL 32224. pilarcorena@aol.com. ⁵ Ph. D. Profesor, Universidad de Antioquia, Medellín. Director del PECET. ivdvelez@pecet-colombia.org. ⁶ Post Doc. Profesora, Universidad de Antioquia, Medellín. Investigador PECET. srobledo@saludpublica.udea.edu.co. Autor para correspondencia.

hasta el momento se desconoce el efecto de estos compuestos en larvas de *An. albimanus*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto letal de cuatro IAC en larvas de esta especie, bajo condiciones de laboratorio.

Materiales y métodos

Mosquitos. Larvas de *An. albimanus*, cepa Cartagena (Carrillo *et al.* 1981), donada por el Instituto Nacional de Salud de Colombia, fueron criadas y mantenidas en el insectario del PECET, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales. En la cría se usaron bandejas plásticas con agua reposada y una combinación de levadura y peletizado para peces (1:1) como alimento. Los experimentos se desarrollaron a 27 ± 2 °C, ciclo de luz/oscuridad 12:12 y $75 \pm 10\%$ humedad relativa.

Compuestos. Los IAC: acetazolamida (AZM), matazolamida (MZM), etoxzolamida (ETX) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) y dorzolamida (DZA) (Merck Sharp & Dohme, Chibret, Francia) se obtuvieron comercialmente. Estos son medicamentos de uso humano empleados principalmente como diuréticos y en el tratamiento de enfermedades como el glaucoma. Todos los IAC se prepararon en dimetil sulfóxido (DMSO) al 0,5% (Sigma-Aldrich) (Corena *et al.* 2005). Como control positivo se incluyó un grupo de larvas tratadas con temefos (Abate® 1SG granulado) al 1%.

Bioensayos. Se realizaron de acuerdo con las guías establecidas para evaluación de larvicidas en laboratorio y campo OMS (2005). Veinte larvas de III estadio tardío o IV temprano se transfirieron a recipientes que contenían 100 ml de agua destilada. El experimento se repitió tres veces en días distintos empleando una concentración de 50 µg/ml para cada IAC. Esta concentración fue seleccionada de acuerdo con trabajos de Corena *et al.* (2004). Los controles utilizados consistieron en un grupo tratado con temefos a 50 µg /ml (control positivo), un grupo con DMSO al 0,5% (diluyente de los IAC) y un grupo sin tratamiento (control negativo). La lectura de la mortalidad se realizó a las 24, 48 y 72 horas post aplicación.

Criterio de toxicidad y análisis estadístico. La toxicidad de los IAC sobre las larvas se calculó de acuerdo con el porcentaje de mortalidad observada, y sus respectivos intervalos de confianza al 95%, en cada tiempo de evaluación. Se realizó corrección por fórmula de Abbot, cuando se encontró mortalidad en los controles entre el 5 y 20%. Se hizo una prueba de Shapiro Wilk para determinar normalidad y un test de Kruskal-Wallis para establecer si había diferencias significativas en los promedios de mortalidad entre los tratamientos. Luego, se aplicaron pruebas no paramétricas de comparaciones múltiple mediante el test de Tukey. Los niveles de significancia correspondieron con un valor $P < 0.05$. Se utilizó el programa Graph Pad Prism 5.

Resultados

El tratamiento de larvas *An. albimanus* con los IAC produjo una toxicidad variable siendo ETX el que mostró mayor toxicidad y mortalidad. Ésta fue mayor al 80% después de 24 horas de aplicación y después de 48 y 72 horas alcanzó su valor máximo de 98% (Fig. 1). Este porcentaje fue significativamente diferente ($P < 0,0001$), con respecto a los otros IAC y

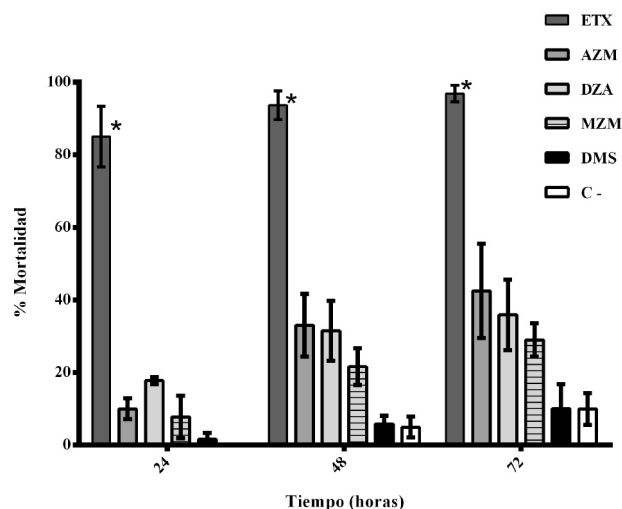


Figura 1. Mortalidad en larvas *An. albimanus* expuestas a los IAC en tres tiempos de evaluación (24, 48 y 72 postaplicación). Concentración 50 µg/ml. Valores promedio de tres ensayos experimentales incluyendo 420 larvas en cada uno. ETX= Etozolamida, AZM = Acetazolamida, DZA = Dorzolamida, MZM = Metazolamida, DMS = Dimetil sulfóxido, C- = Control sin compuestos, n=1260. * $P < 0,0001$.

el control sin tratamiento. En contraste, las mortalidades con AZM, MZM y DZA fueron menores al 60%. El control con DMSO no arrojó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. El control positivo registró una mortalidad de 100% en larvas 24 horas después de la aplicación (datos no mostrados).

Discusión

El efecto de mortalidad de algunos IAC sobre estadios inmaduros de insectos ha sido estudiado en pocas especies como *Ae. aegypti*, *An. quadrimaculatus*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. nigripalpus*, *Oc. taeniorhynchus* y *Ae. albopictus* (Corena *et al.* 2004). Nuestros hallazgos indican que la MZM produjo el menor efecto tóxico ($< 40\%$ mortalidad), contrario a lo encontrado por Corena *et al.* (2004), donde MZM causó una mortalidad del 80% en larvas del mismo género a una concentración similar a la utilizada en el presente estudio (10^{-4} M). La mortalidad en larvas se atribuye al desequilibrio en el pH del intestino medio y la inhibición de los procesos de transporte de iones (Corena *et al.* 2004). Las diferencias en el porcentaje de mortalidad para cada especie, pueden obedecer a un mecanismo de respuesta específico o la presencia de una familia particular de AC (Corena *et al.* 2004). Una de las formas de comprender mejor el efecto de los IAC, es el análisis de los productos de excreción liberados en el agua. Si bien este aspecto no se incluyó en este trabajo, sería interesante considerarlo para estudios futuros dado que se pueden esperar variaciones de acuerdo no solo con la especie sino con el estadio evaluado (Corena *et al.* 2004). El efecto tóxico de ETX (mortalidad cercana al 100%) después de 24 horas, es un resultado importante, comparable al efecto larvicida logrado por compuestos como el temefos®, utilizado en el control de *Ae. aegypti* y *An. nuneztovari* en condiciones laboratorio y campo (González y Palacio Mosquera, 2009; Maestre *et al.* 2009). La inclusión del temefos sirvió exclusivamente como un control positivo y no con el propósito de

establecer comparaciones con los IAC. ETX posee propiedades inhibitorias sobre el dominio soluble de la alfa-AC1 que se encuentra en *Ae. aegypti*, mostrando afinidad a nivel nanomolar (Fisher *et al.* 2006). Es muy probable que un dominio homólogo exista en *An. albimanus* y, por tanto, el efecto de ETX en larvas se observe en mayor medida. Además, de acuerdo con las propiedades físicas de la ETX, se indica que es un compuesto prácticamente insoluble en el agua, hecho que favorece su permanencia en la superficie del agua, lugar donde se alimentan y permanecen la mayor parte del tiempo las larvas del género *Anopheles* logrando de esta forma una mayor mortalidad.

Por otro lado, la ETX en los insectos produce un desequilibrio en el pH del intestino y además causa la inhibición de procesos de transporte de iones (Corena *et al.* 2004). Las propiedades letales de la ETX sobre la fisiología de las larvas propende su uso en el control, no sin antes considerar su efecto en organismos no blanco.

Según nuestros resultados la ETX es un compuesto importante que puede ser utilizado como una estrategia complementaria con las medidas de control. El alto porcentaje de mortalidad observado en larvas expuestas a ETX, señala que podría considerarse como un compuesto promisorio en la búsqueda de nuevos blancos larvicidas para *An. albimanus*.

Agradecimientos

A Evencio Mosquera por su valiosa ayuda en la cría del material biológico empleado en este estudio, a María Fernanda Flórez, María Alejandra Duque, Catalina Marín y Esteban Marín por su colaboración en la ejecución de los bioensayos. Este trabajo fue financiado por Colciencias y la Universidad de Antioquia.

Literatura citada

- BLANCO CASTRO, S. D.; COLOMBI, E.; FLORES, L. N.; CANALES, D. 2002. Aplicación del biolarvicida *Bacillus sphaericus*-2362 (Griseof) para el control de la malaria en un área de salud de la República de Honduras. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 54: 134-141.
- CARMONA-FONSECA, J. 2003. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca. Parte 1. *Iatreia* 16: 299-317.
- CARMONA-FONSECA, J. 2004. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca. Parte 2. *Iatreia* 17: 34-53.
- CARRILLO, M. P.; SUÁREZ, M. F.; MORALES, A.; ESPINAL, C. A. 1981. Colonización y mantenimiento de una cepa colombiana de *Anopheles albimanus*, Wiedemann, 1820 (Diptera: Culicidae). *Biomédica* 1: 64-66.
- CORENA, M. P.; SERON, T. J.; LEHMAN, H. K.; OCHRIETOR, J. D.; KOHN, A.; TU, C.; LINSE, P. J. 2002. Carbonic anhydrase in the midgut of larval *Aedes aegypti*: cloning, localization and inhibition. *The Journal of Experimental Biology* 205: 591-602.
- CORENA, M. P.; FIEDLER, M. M.; VANEKERIS, L.; TU, C.; SILVERMAN, D. N.; LINSE, P. J. 2004. Alkalization of larval mosquito midgut and the role of carbonic anhydrase in different species of mosquitoes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 137 (3): 207-225.
- CORENA, M.; VANEKERIS, L.; SALAZAR, M. I.; BOWERS, D.; FIEDLER, M. M.; SILVERMAN, D.; TU, C.; LINSE, P. J. 2005. Carbonic anhydrase in the adult mosquito midgut. *The Journal of Experimental Biology* 208: 3263-3273.
- FISHER, S. Z.; TARIKU, I.; CASE, N. M.; TU, C.; SERON, T.; SILVERMAN, D. N.; LINSE, P. J.; MCKENNA, R. 2006. Expression, purification, kinetic, and structural characterization of an alpha-class carbonic anhydrase from *Aedes aegypti* (AaCA1). *Biochimica et Biophysica Acta* 1764 (8): 1413-1419.
- FONSECA, I.; CÁRDENAS, R.; GÓMEZ, W.; SANTACOLOMA, L.; BROCHERO, H.; OCAMPÓ, C. B.; SALAZAR, M.; MCALLISTER, J.; BROGDON, W.; QUIÑONEZ, M. 2010. Dosis diagnósticas para vigilar la resistencia a insecticidas de los vectores de malaria en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 36: 54-61.
- GEORGHIU, G. P.; TAYLOR, C. E. 1977. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *Journal of Economic Entomology* 70 (3): 319-23.
- GONZÁLEZ, R.; PALACIO MOSQUERA, J. D. 2009. Evaluación de la susceptibilidad y persistencia de los insecticidas Temphos (Abate) y Temphos (Instarphos), con exposición de larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles nuñeztovari* (Diptera: Culicidae). *Vectors and Pest Magazine* 1: 23-26.
- GUTIÉRREZ, L. A.; NARANJO, N.; JARAMILLO, L. M.; MUSKUS, C.; LUCKHART, S.; CONN, J. E.; CORREA, M. M. 2008. Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic regions of Colombia. *Acta Trópica* 107 (2): 99-105.
- HEMINGWAY, J.; RANSON, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* 45: 371-391.
- MAESTRE, R.; REY, G.; DE LAS SALAS, J.; VERGARA, S. C.; SANTACOLOMA, L.; GOENAGA, S.; CARRASQUILLA, M. C. 2009. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a temefos en Atlántico-Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 35 (2): 202-205.
- MONTOYA-LERMA, J.; SOLARTE, Y. A.; GIRALDO-CALDERÓN, G. I.; QUINONES, M. L.; RUIZ-LÓPEZ, F.; WILKERSON, R. C.; GONZÁLEZ, R. 2011. Malaria vector species in Colombia - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106 (suppl. I): 223-238.
- NAUEN, R. 2007. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science* 63 (7): 628-633.
- OLANO, V.; CARRASQUILLA, G.; MÉNDEZ, F. 1997. Transmisión de la malaria urbana en Buenaventura, Colombia: aspectos entomológicos. *Revista Panamericana de Salud Pública* 1 (4): 287-294.
- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (WORLD HEALTH ORGANIZATION) OMS. 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.3.
- SINKA, M. E.; RUBIO-PALIS, Y.; MANGUIN, S.; PATIL, A. P.; TEMPERLEY, W. H.; GETHING, P. W.; VAN BOECKEL, T.; KABARIA, C. W.; HARBACH, R. E.; HAY, S. I. 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vectors* 3: 1-34.
- SMITH, K. E.; VANEKERIS, L. A.; LINSE, P. J. 2007. Cloning and characterization of AgCA9, a novel W-carbonic anhydrase from *Anopheles gambiae* Giles sensu stricto (Diptera: Culicidae) larvae. *Journal of Experimental Biology* 210: 3919-3930.
- ZIMMERMAN, R. H. 1992. Ecology of malaria vectors in the Americas and future directions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87 (suppl. III): 371-383.

Recibido: 5-jul-2012 • Aceptado: 18-ago-2013

Citación sugerida:

ROCHA O., LEONARDO; CAROLINA TORRES G.; MARÍA CORENA-McLEOD; IVÁN D. VÉLEZ B. y SARA M. ROBLEDÓ R. 2013. Efecto de inhibidores de anhidrasa carbónica en larvas de *Anopheles albimanus* (Diptera, Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología* 39 (2): 226-228.