

**Mecanismos de resistencia a insecticidas piretroides en *Aedes (Stegomyia)*
aegypti de Colombia, vector principal de los virus dengue, chikungunya y
Zika.**

Presentada por

ANGÉLICA APONTE HINCAPIÉ

Tesis presentada como requisito para obtener el título de Doctora en Ciencias
Biomédicas.

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD DEL VALLE

2017

Mecanismos de resistencia a insecticidas piretroides en *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Colombia, vector principal de los virus dengue, chikungunya y Zika.

ANGELICA APONTE HINCAPIE

Código 201300642

Directora de Tesis: Clara Beatriz Ocampo PhD. CIDEIM

Asesores: Rosa Patricia Penilla PhD. CRISP-INSP México

Américo David Rodríguez PhD. CRISP-INSP México

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD DEL VALLE

2017

DEDICATORIA

Dedico la culminación de este proceso a Dios por darme la fortaleza y herramientas para alcanzar este objetivo. A mi familia, a mi madre por brindarme apoyo y motivación en cada etapa de mi vida, a mis hermanos y sobrinos por acompañarme y ser parte de esta maravillosa familia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que han hecho parte de mi vida académica y profesional durante estos años.

Un especial agradecimiento a la Dra. Clara Beatriz Ocampo por todo el tiempo que me ha brindado, por sus valiosas sugerencias y experiencias de vida.

Al grupo de Biología y Control de vectores del CIDEIM (Julieth, Paola, Don Luis, María Isabel) y Mariana por su compañía y apoyo incondicional.

A la Dra. Rosa Patricia Penilla y al Dr. Américo David Rodríguez por todos estos años de apoyo desde que los conocí en septiembre del 2008. Al personal técnico del laboratorio de Resistencia a Insecticidas del CRISP, ha Alma y Paco por toda su ayuda.

Al CIDEIM (Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas) por abrirme sus puertas y brindarme todo este maravilloso conocimiento en investigación Biomédica.

Al Newton Fund (British Council) por otórgame la beca de movilidad para hacer la pasantía en la Universidad de Glasgow.

A la Universidad del Valle, en particular al posgrado en Ciencias Biomédicas, a mis compañeros de clase (Alejandro, Betty, Esperanza y Sonia), a todas las agencias financiadoras COLCIENCIAS (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), por el apoyo Brindado mediante la beca de estudios doctorado Nacional N° 567, Banco de la república, la red AEDES, Newton Fund y Fogarty.

A todos... Gracias totales!

ACTA DE APROBACIÓN

En la Ciudad de Santiago de Cali, en la Universidad del Valle, siendo las _____ horas del día ____ del mes de _____ del año 2018, se procedió a evaluar por los abajo firmantes, miembros de la comisión revisora de la Tesis doctoral **“Mecanismos de resistencia a insecticidas piretroides en *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Colombia, vector principal de los virus dengue, chikungunya y Zika”**, presentada por la estudiante ANGÉLICA APONTE HINCAPIE, Identificada con cédula N° 38.555.281, como requisito para aptar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas.

Después de intercambiar opiniones los miembros de la comisión evaluadora manifestaron su _____ de la tesis.

Presidente del jurado

Jurado 1

Jurado 2

Directora de tesis

PREFACIO

Durante 5 años el trabajo presentado en esta tesis fue desarrollado en la Unidad de Biología y Control de vectores del CIDEIM (Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas) . Los análisis bioquímicos se realizaron en el laboratorio de Resistencia a insecticidas del Centro Regional de Investigación Pública (CRISP) del Instituto Nacional de salud pública de México, finalmente los análisis proteómicos se realizaron en la Universidad de Glasgow, en los laboratorios de Glasgow Polyomics, durante la pasantía doctoral (agosto-diciembre 2016).

Publicaciones y trabajos presentados en congresos relacionados con la tesis.

Artículos en preparación

- A. Aponte, P. Penilla, A. López, F. Solís, A. Rodríguez, C. Ocampo. Mechanisms of Pyrethroids insecticide resistance *in Aedes aegypti* from Colombia.
- A. Aponte, R. Burchmore, A. Castillo, C. Ocampo. Proteomic analysis of the midgut and malpighian tubules of laboratory and field strains of *Aedes aegypti* from Colombia.

Oral

- Septiembre (6-7) 2017. Simposium “Omic Technologies for Research on Infectious Diseases. CIDEIM y Glasgow Polyomics, presentación oral ”Proteomic analysis of the Malpighian tubules and Midgut in *Aedes aegypti* resistant strains to Pyrethroids”. Cali, Colombia.

Póster

- Noviembre (20-22) 2017. XV Encuentro científico en el Instituto Nacional de Salud Pública, con el poster Mecanismos de resistencia a pirtroides *Aedes (Stegomyia) aegypti*, de Colombia” Bogota, Colombia.
- Febrero (13-17) 2017. The American mosquito Control Association (AMCA). Con el póster “Pyrethroids insecticide resistance in *Aedes aegypti*, vector of dengue, chikungunya and Zika viruses from Colombia” San Diego, California.

Becas

- Beca doctorado nacionales N° 567, Enero 2013- Diciembre 2017.
- Beca de movilidad transnacional como participante del proyecto "**Linking the power of -omic technologies to translational research on neglected tropical diseases**" financiado por el Newton Fund (British Council).

Financiación

Se obtuvo una financiación por parte de la Fundación Banco de la República, por valor de 15 millones de pesos, como investigador principal del proyecto N° 3787.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE CUADROS	14
ABREVIATURAS	16
ABSTRACT	18
RESUMEN	19
1. INTRODUCCIÓN	20
2. JUSTIFICACIÓN	24
3. OBJETIVOS	26
3.1. OBJETIVO GENERAL	26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4. ESTADO DEL ARTE	27
4.1. <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Díptera, Culicidae): Biología	27
4.2. Importancia médica de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> : Transmisión de Arbovirus	29
4.2.1. Arbovirus transmitidos por <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> : Dengue, chikungunya y Zika	30
4.2.2. Virus dengue	31
4.2.3. Virus chikungunya	32
4.2.4. Virus Zika.....	32
4.2.5. Casos de arbovirosis en Colombia	33
4.3. Diferentes estrategias de control para las poblaciones de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i>	34
4.4. Uso de los insecticidas en el control de las enfermedades transmitidas por vectores (ETV)	35
4.5. La resistencia a insecticidas en <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> en el mundo	36
4.6. Resistencia a los insecticidas piretroides y sus mecanismos en <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i>	38
4.6.1. Insecticidas piretroides	38
4.6.2. Mecanismo de acción de los insecticidas piretroides	40
4.6.3. Mecanismos de resistencia a insecticidas piretroides en <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i>	41
4.6.1. Resistencia metabólica	42
4.6.1.1. Enzimas carboxilesterasas	43
4.6.1.2. Enzimas glutatión S transferasa.....	43
4.6.1.3. Citocromos P ⁴⁵⁰	44
4.6.2. Resistencia molecular	45
4.7. Control de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> en Colombia	46

4.8. Resistencia a los insecticidas de uso en salud pública en Colombia	48
4.9. Manejo de la resistencia a piretroides y otros insecticidas.....	52
5. CAPÍTULO I	54
<i>Estado de la susceptibilidad a insecticidas piretroides (tipo I y II) en cepas de Aedes (Stegomyia) aegypti seleccionadas en el laboratorio y de poblaciones de campo.....</i>	54
5.1. Materiales y métodos.....	54
5.1.1 Obtención del material biológico	54
5.1.1.1. Cría en el laboratorio.....	54
5.1.1.2. Cepas de referencia	55
Proceso de selección de la resistencia.....	55
5.1.2. Bioensayos de botellas CDC	58
5.1.2.1. Pruebas en botellas CDC para la determinación de la línea base	58
5.1.2.2. Pruebas de susceptibilidad a insecticidas	59
5.1.2.3. Bioensayos de larvas de la OMS	60
5.2. Resultados.....	61
5.2.1. Bioensayos de CDC para la determinación de la línea base insecticidas piretroides y DDT	61
5.2.1.1. Insecticidas piretroides	61
5.2.1.2. Insecticida DDT (dicloro difenil tricloroetanol)	63
5.2.2. Pruebas de susceptibilidad a insecticidas piretroides	64
5.2.2.1 Estado de la susceptibilidad a permetrina.....	64
5.2.2.2. Estado de la susceptibilidad a deltametrina	65
5.2.2.3. Estado de la susceptibilidad a lambdacialotrina	66
5.2.3. Pruebas de susceptibilidad a insecticidas DDT, propoxur y malatión ...	67
5.2.3.1. Estado de la susceptibilidad a DDT	67
5.2.3.2. Estado de la susceptibilidad a propoxur.....	68
5.2.3.3. Estado de la susceptibilidad a malatión	69
5.2.3.4. Estado de la susceptibilidad a temefos	70
6. CAPÍTULO II	73
<i>Mecanismos bioquímicos de resistencia a piretroides: Niveles de actividad de las enzimas de detoxificación esterasas, glutatión S-transferasas (GSTs) y citocromos P⁴⁵⁰</i>	73
6.1. Materiales y métodos:.....	73
6.1.1. Ensayos bioquímicos	73
6.1.1.1. Preparación de las muestras:.....	73
6.1.1.2. Ensayo de proteínas	75
6.1.1.3. Ensayos de esterasas	76
6.1.1.4. Ensayo de glutatión-S-transferasa.....	78
6.1.1.5. Ensayo de monooxigenas- Citocromos P ⁴⁵⁰	79
6.1.2. Análisis estadísticos.....	80
6.2. Resultados.....	81

6.2.1. Actividad enzimática de alfa y beta esterasas.....	81
6.2.2. Actividad enzimática de paranitrofenil acetato	82
6.2.3. Actividad enzimática de las glutatión S transferasas.....	83
6.2.4. Contenido de los citocromos P ⁴⁵⁰	84
7. CAPÍTULO III	85
<i>Mecanismos moleculares de resistencia a piretroides: Detección de las mutaciones kdr Val1016Ile y Phe1534Cys</i>	85
7.1. Materiales y métodos	85
7.1.1. Genotipificación de las mutaciones kdr, Val1016Ile y Phe1534Cys	85
7.1.2. Manejo de los datos y análisis estadísticos:	90
7.1.3. Frecuencias alélicas de Val101Ile y Phe1534Cys.....	90
7.1.4. Frecuencias de los haplotipos dilocus	90
7.2. Resultados	91
7.2.1. Detección de mutaciones de kdr y frecuencias alélicas de Val101Ile y Phe1534Cys	91
7.2.2. Frecuencias de haplotipos de dilocus	92
8. CAPÍTULO IV	95
<i>Análisis proteómico de los túbulos de Malpighi e intestino medio en cepas de Aedes (Stegomyia) aegypti resistentes a piretroides.</i>	95
8.1. Materiales y métodos	95
8.1.1. Muestras biológicas	95
8.1.2. Disección de los túbulos de Malpighi (TM) y del intestino medio (IM)	96
8.1.3. Preparación de la muestra de proteínas: extracción y digestión con tripsina	97
8.1.4. Marcaje de los péptidos usando TMT6x Isobaric Mass Tags	98
8.1.5. Identificación de proteínas por el método de nanoflow HPLC electrospray-espectrometría de masas en tándem (nLC-ESI-MS / MS)	99
8.1.6. Análisis bioinformático e identificación de las proteínas	99
8.1.7. Expresión diferencial de las proteínas	100
8.1.8. Posibles asociaciones funcionales entre las proteínas identificadas	100
8.2. Resultados	101
8.2.1. Identificación de las proteínas de los túbulos de Malpighi y del intestino medio de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i>	101
8.2.2. Análisis de ontología génica “gen ontology (GO)” y asociaciones funcionales entre las proteínas identificadas	101
8.2.3. Expresión diferencial de las proteínas entre los diferentes fenotipos para resistencia a insecticidas piretroides.....	106
9. CAPÍTULO V	110
9.1. DISCUSIÓN.....	110
9.2. CONCLUSIONES	124
10. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	125
11. REFERENCIAS	129

13. ANEXOS	139
13.1. Anexo I. Formato del comité de ética.....	139
13.2. Anexo II Formato usado para los Ensayos CDC (Información confidencial de CIDEIM).....	141
13.3. Anexo III. Procedimiento para ensayos bioquímicos.....	142
13.4. Anexo IV. Cuantificación de la actividad enzimática de las esterasas, Glutión S transferasa y Citocromos P ⁴⁵⁰	144
13.5. Anexo V. Extracción de ADN usando Buffer de Pat's Roman.....	145
13.6. Anexo VI. Real Time PCR para detección de mutaciones kdr.....	146
13.7. Anexo VII. Mutaciones Kdr como mecanismo de resistencia al Dicloro fenil tricloretano (DDT).	150
13.8. Anexo VIII. Peptide labeling using TMT Isobaric Mass Tags preceded by in-solution digestion.....	155
13.9. Anexo IX. Proteínas identificadas en los túbulos de Malpighi e intestino medio de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> , usando Proteome discoverer.....	157
13.10. Anexo X. Escenarios de resistencia a insecticidas y propuestas para el manejo de la resistencia.....	182
13.10. Anexo XI. Presentación de resultados en eventos académicos	183

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i>	28
Figura 2. Principales pasos para una infección por arbovirus en <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i>	30
Figura 3. Países donde se han registrado resistencia a insecticidas piretroides y organofosforados (años 2006 a 2015)..	38
Figura 4. A. Estructura básica de los piretroides. B. Estructura química del piretroide tipo II cipermetrina.....	39
Figura 5. Estructura química de los insecticidas piretroides Tipo I y Tipo II.....	40
Figura 6. Estructura del canal de sodio dependiente de voltaje (VGSC) <i>Ae. aegypti</i>	40
Figura 7. Cromosomas (I, II y III) de <i>Ae. aegypti</i>	43
Figura 8. Representación gráfica del canal de sodio dependiente de voltaje de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> y las mutaciones kdr que confieren resistencia a piretroides	46
Figura 9. Mapa de la distribución de la resistencia a piretroides y sus mecanismos en <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> de Colombia 2008-2015.....	50
Figura 10. Localidades seleccionadas donde se colectaron <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> usados en el presente estudio.....	57
Figura 11. Línea base calculada para el insecticida permetrina.....	61
Figura 12. Línea base calculada para el insecticida deltametrina.....	62
Figura 13. Línea base calculada para el insecticida lambdacialotrina.....	62
Figura 14. Línea base calculada para el insecticida DDT.	63
Figura 15. Línea base de DDT con tres cepas de <i>Ae. aegypti</i> usadas como referencia para susceptibilidad (Rockefeller, New Orleans y Liverpool).	64
Figura 16. Resultados de los bioensayos de CDC para la permetrina (21,5 µg/ ml).	65

Figura 17. Resultados de los bioensayos de CDC para la deltametrina (6,25 µg/ml).....	66
Figura 18. Resultados de los bioensayos de CDC para la lambdacialotrina (6,25 µg/ml).....	67
Figura 19. Resultados de los bioensayos de CDC para DDT (2000 µg/ml).	68
Figura 20. Resultados de los bioensayos de CDC para Propoxur (12.5 µg/ml). ...	69
Figura 21. Resultados de los bioensayos de CDC para malatión (100 µg/ml).	70
Figura 22. Placa 1. Distribución de las muestras para homogenizado de los mosquitos usados en las pruebas bioquímicas.....	74
Figura 23. Distribución de las muestras en las placas que se usaron para las pruebas bioquímicas.....	75
Figura 24. Placa del ensayo bioquímico para medir cantidad de proteínas.	76
Figura 25. Ensayo bioquímico de las alfa y beta esterasas.	77
Figura 26. Ensayo bioquímico para medir actividad de enzimas esterasas con el sustrato paranitrofenil acetato.....	78
Figura 27. Ensayo para medir la actividad de las enzimas GSTs con el sustrato 1-cloro-2, 4- dinitrobenzeno (CDNB).....	79
Figura 28. Ensayo bioquímico para medir cantidad total de citocromo P ⁴⁵⁰ usando el ensayo de hemo-peroxidasa.....	80
Figura 29. Resultados de los ensayos bioquímicos usando alfa y beta naftil acetato.	81
Figura 30. Resultados de los ensayos bioquímicos usando el sustrato paranitrofenil acetato (pNPA).....	82
Figura 32. Resultados de los ensayos bioquímicos para citocromos P ⁴⁵⁰ Usando hemo peroxidasa.	
Figura 33. Condiciones de la PCR en tiempo real para la detección de la mutación Val1016Ile Val1016Ile.	86
Figura 34. Curvas "melting " para interpretación de los datos de la mutación kdr Val1016Ile.....	87

Figura 35. Condiciones de la PCR en tiempo real para la detección de la mutación Phe1534Cys.	88
Figura 36. Curvas "melting " para interpretación de los datos de la mutación kdr Phe1534Cys.	89
Figura 37. Categorías en la función Molecular de las proteínas identificadas en los túbulos de Malpighi y el intestino medio de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i>	102
Figura 38. Categorías de los procesos biológicos de las proteínas identificadas en los túbulos de Malpighi y el intestino medio de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i>	103
Figura 39. Asociaciones funcionales predichas para las proteínas identificadas en los túbulos de Malpighi y el intestino medio de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> ..	104
Figura 40. Asociaciones funcionales predichas para las proteínas agrupadas en una red del metabolismo del glutatión, relacionada con la resistencia a insecticida DDT.	105

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Resistencia a insecticidas piretroides y sus mecanismos en poblaciones de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> de Colombia (Años 2004-2017).	51
Cuadro 2. Dosis de los insecticidas piretroides usados para determinar la dosis diagnósticas (DD).	58
Cuadro 3. Resultados de los ensayos CDC de las cepas evaluadas. Porcentaje de mortalidad <80% del umbral del tiempo diagnóstico (TD) es consistente con resistencia a insecticidas.	72
Cuadro 4. Secuencia de iniciadores usados para la genotipificación de las mutaciones KDR.	85
Cuadro 5. Frecuencias alélicas de las mutaciones kdr Val1016Ile y Phe1535Cys en cepas seleccionadas en laboratorio y cepas de campo de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> de Colombia.	92
Cuadro 6. Genotipos dilocus de mutaciones kdr Val1016Ile y Phe1534Cys en cepas seleccionadas en el laboratorio y cepas de campo de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> de Colombia.	93
Cuadro 7. Frecuencias de los haplotipos dilocus en el loci 1016 y 1534 del canal de sodio de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> de cepas seleccionadas en el laboratorio y de campo de Colombia.	94
Cuadro 8. Clasificación de las muestras biológicas basada en los resultados de los bioensayos CDC, pruebas bioquímicas y mutaciones kdr.	96
Cuadro 9. Concentración de proteínas calculada para cada cepa usada para el análisis de espectrometría de masas en tándem (MS/MS).....	98

Cuadro 10. Proteínas agrupadas en el metabolismo del glutatión.	106
Cuadro 11. Número de proteínas diferencialmente expresadas entre los diferentes fenotipos y cepas. (RL: resistente de laboratorio; SL: susceptible de laboratorio; RC: resistente de campo; SC: susceptible de campo).....	107
Cuadro 12. Proteínas diferencialmente expresadas en las cepas resistentes de campo (Buga F ₁ + Yumbo F ₂) al ser comparadas con la cepa susceptible de campo (Medellín (AF) F ₁).....	108
Cuadro 13. Resumen de los mecanismos de resistencia a insecticidas piretroïdes encontrados.	128

ABREVIATURAS

CDC: "Centers for Disease Control and Prevention"
CDNB: 1,2-dicloro-4-nitrobenceno
CHIKV: Virus chikungunya
CIDEIM: Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas
CYP⁴⁵⁰: Citocromos P⁴⁵⁰
Cys: Cisteína
DD: Dosis diagnósticas
DDT: Dicloro difenil tricloroetano
DENV: Virus dengue
DT: Tiempo diagnóstico
ENE: Esterasas no específicas
ETV: Enfermedades de transmisión vectorial
FD: Fiebre dengue
GO: "Gen ontology"
GSH: Glutación reducido
GST: Glutación S-transferasa
GST ϵ 2: Glutación S-transferasa épsilon 2
HWE: Equilibrio de Hardy Weinberg
Ile: Isoleucina
IM: Intestino medio
INS: Instituto Nacional de Salud
Kdr: "Knockdown resistance" Resistencia de derribo
LC-MS, Liquid chromatography–mass spectrometry;
LD: Linkage disequilibrium- Desequilibrio de ligamiento
mg: miligramo
min: minuto
ml: mililitros
MS: Espectrometría de masas "mass spectrometry"
NA: Naftil acetato
nm: nanómetros
OMS: Organización Mundial de la Salud
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa "Polymerase chain reaction"
PECET: El Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tópicas
Phe: Fenilalanina
*p*NPA: Para-nitrofenil acetato
PYRs: Piretroides
RA: Razón de abundancia

TEAB, triethylammonium bicarbonate;
TM: Túbulos del Malpighi
TMBZ: 3,3',5,5' tetrametilbencidina
TMT: "tandem mass tag"
ULV: Ultrabajo volumen
Val: Valina
VGSC: Canal de sodio dependiente de voltaje "Voltage Gate Sodium Channel"
ZIKV: virus Zika
 α -NA: Alfa naftil acetato
 β -NA: Beta naftil acetato
 μ g: microgramos
 μ l: microlitros

ABSTRACT

Introduction: In Colombia *Aedes aegypti* is the main vector of arboviruses such as dengue, chikungunya and Zika. This urban mosquito has the capacity to develop multiple mechanisms to insecticide resistance which may affect vector control.

Objective: To identify the biochemical and molecular mechanisms associated with pyrethroid resistance in laboratory-selected strains (n=3) and field-collected strains (n=7) of *Ae. aegypti* from Colombia in order to propose strategies for the management of resistance to these insecticides

Methods: Three strains, selected in the laboratory for resistance to DDT, Propoxur and lambda-cyhalothrin, were compared with 7 field collected strains. Rockefeller strain was used as a susceptible control. CDC bioassays were performed to measure the susceptibility status to pyrethroids type I (permethrin) and II (Deltamethrin and lambda-cyhalothrin), and potential cross resistance with different types of insecticides, including organochlorine (DDT), carbamate (Propoxur) and organophosphate (Malathion). The enzymatic activity of esterases, Glutathione S transferases and cytochrome P⁴⁵⁰ was measured by biochemical tests. The detection of frequencies of *kdr* mutations Val1016Ile and Phe1534cys were determined through real-time PCR. A proteomic analysis of midgut and Malpighian tubules using high definition mass spectrometry was performed.

Results: Almost all strains were resistant to permethrin except 1 field strain and the laboratory-selected “DDT” strain. Three strains (selected “propoxur” and “Lambda-cyhalothrin” and 1 field strain) were resistant to both types of pyrethroids. All evaluated strains were resistant to DDT. Although we evidenced cross resistance between lambda-cyhalothrin and propoxur, all field-collected strains were susceptible to propoxur. There was no evidence of malathion resistance.

The main enzymatic mechanism observed in the resistant strains was GST. The *kdr* mutations were detected in all strains. The allelic frequencies of Cys1534 (ranged 0.44 to 0.99) were greater than for Ile1016 (0.02 to 0.72). The strains that had higher frequencies of both mutations were resistant to both type I and II pyrethroids insecticides. Finally the proteomic analyses confirmed the pathway Glutathione metabolism and additionally evidence an up regulation of translation and ribosomal proteins in resistant mosquitos.

Conclusion:

Pyrethroid resistance in *Ae. aegypti* from Colombia are mainly associated to increased GST enzymes and the high frequency of *Kdr* mutations. The up regulation of ribosomal proteins in the resistant strains may suggest increase protein turnover and/or altered gene expression.

Key words: *Aedes aegypti*, resistance, insecticides, enzymes, mutations.

RESUMEN

Introducción: En Colombia *Aedes aegypti* es el principal vector de los virus dengue, chikungunya y Zika. Este vector, adaptado al ambiente urbano, posee una alta capacidad de desarrollar mecanismos de resistencia a los insecticidas que pueden afectar el control vectorial.

Objetivo: Identificar los mecanismos enzimáticos y moleculares asociados a la resistencia a insecticidas piretroides en cepas seleccionadas en laboratorio (n=3) y cepas colectadas en campo de diferentes ciudades de Colombia *Ae.aegypti* (n=7), con el fin de proponer estrategias para el manejo de la resistencia a estos insecticidas

Métodos: Tres cepas, seleccionadas en el laboratorio para resistencia al DDT, Propoxur y lambdacialotrina, se compararon con 7 cepas colectadas en el campo. Se usó la cepa Rockefeller como control susceptible. Se realizaron bioensayos de CDC para medir el estado de susceptibilidad a los piretroides tipo I (permetrina) y II (deltametrina y lamdacialotrina) y potencial resistencia cruzada con diferentes tipos de insecticidas, incluyendo el organoclorado (DDT), carbamato (propoxur) y organofosforado (malatión). La actividad enzimática de esterasas, glutathion S transferasas y citocromo P⁴⁵⁰ se midió mediante pruebas bioquímicas. La detección de frecuencias de las mutaciones de kdr Val1016Ile y Phe1534Cys se determinaron mediante PCR en tiempo real. Un análisis proteómico de los túbulos de Malpighi e intestino medio fue realizado usando espectrometría de masas de alta definición.

Resultados: Todas las cepas fueron resistentes a la permetrina, con excepción de 1 cepa de campo y la cepa "DDT" seleccionada en el laboratorio. Tres cepas (seleccionadas "propoxur" y "Lambdacialotrina" y 1 cepa de campo) fueron resistentes a ambos tipos de piretroides (Tipo I y II). Todas las cepas evaluadas fueron resistentes al DDT. Evidenciamos resistencia cruzada entre lambdacialotrina y propoxur, sin embargo todas las cepas de campo fueron susceptibles a propoxur. No hubo de resistencia al malatión en ninguna cepa. El principal mecanismo enzimático observado en las cepas resistentes fue GSTs. Las mutaciones kdr se detectaron en todas las cepas. Las frecuencias alélicas de Cys1534 (0.44 a 0.99) fueron mayores que para Ile1016 (0.02 a 0.72). Las cepas que tenían frecuencias más altas de ambas mutaciones fueron resistentes a los insecticidas piretroides. Finalmente, el análisis proteómico confirmó la ruta metabólica del metabolismo del glutatión y evidencia adicional de la sobre-regulación en la traducción y las proteínas ribosómicas en los mosquitos resistentes.

Conclusión: resistencia a los piretroides en *Ae. aegypti* de Colombia se asocia principalmente a un aumento de las enzimas GSTs y a la alta frecuencia de las mutaciones Kdr. La sobre-regulación de las proteínas ribosómicas en las cepas resistentes puede sugerir un aumento en el recambio proteico y/o la expresión genética alterada.

Palabras claves: *Aedes aegypti*, resistencia, insecticidas, enzimas, mutaciones.

1. INTRODUCCIÓN

Los mosquitos del género *Aedes* son vectores de al menos 20 arbovirus que afectan actualmente la salud humana(1–5). Dentro de este género se encuentran las especies *Aedes (Stegomyia) aegypti* y *Aedes (Stegomyia) albopictus*. Estos mosquitos son considerados los vectores principales de los tres arbovirus más importantes que actualmente impactan la salud pública a nivel mundial, que son los virus dengue (DENV), virus chikungunya (CHIKV) y virus de Zika (ZIKV) (6–8). Siendo DENV el arbovirus de mayor importancia en el mundo, pues se ha estimado que ocurren aproximadamente 390 millones de infecciones de virus dengue al año, y al menos 12.500 muertes se presentan por año, la mayoría de ellas en niños(9).

Aedes (Stegomyia) aegypti es considerado el vector principal en Latinoamérica, mientras *Ae. albopictus* es el vector principal de estos arbovirus en Asia. Colombia no es ajena a esta situación, si bien contamos con la presencia de ambos vectores(10), *Ae. aegypti* es considerado el vector principal de DENV, CHIKV y ZIKV. Este mosquito altamente antropofílico y urbano, está distribuido en el territorio nacional en aproximadamente el 90% de las ciudades ubicadas por debajo de los 2.200 m.s.n.m. El riesgo de infección con estos arbovirus en Colombia, no solo aumentan con la presencia de los virus en el país, sino que los cambios demográficos, ambientales (cambio climático), y la urbanización no planificada, han favorecido la proliferación de esta especie en casi todos los ambientes domésticos.

Actualmente en el sistema de salud colombiano, para la profilaxis de estas arbovirosis, no se cuenta con medicamentos y a pesar que en seis países se ha licenciado la vacuna contra el DENV “Dengvaxia” desarrollada por Sanofi Pasteur (11), en Colombia no se encuentra aún disponible. Esto hace que la prevención y el control de las enfermedades ocasionadas por estos arbovirus, se base principalmente en el control de las poblaciones de los mosquitos vectores particularmente en *Ae. aegypti*.

En nuestro país el control de las poblaciones de *Ae. aegypti* es ejecutada por los programas de ETV (Enfermedades transmitidas por vectores) de las diferentes secretarías de salud. Dentro de estas actividades, podemos encontrar el control larvario y de adultos que se hace principalmente en épocas de brotes. Para el control larvario se usan insecticidas químicos como el temefos, reguladores de crecimiento, y bioinsecticidas derivados de bacterias o levaduras. En el control de los mosquitos adultos se usan diferentes clases de insecticidas, entre ellos los organofosforados (OP) como el malatión y los piretroides (PYR’s) como la permetrina y deltametrina.

Hoy en día, el uso del malatión ha disminuido por el rechazo de la comunidad a este insecticida debido a su fuerte olor, efecto corrosivo y sus posibles asociaciones con riesgo de cáncer en humanos (12–14), y se ha incrementado el

uso de los piretroides. Los piretroides son los únicos insecticidas recomendados por la OMS para el tratamiento de toldillos, paredes, cortinas y algunas prendas de vestir (15), ya que son seguros para el contacto cercano debido a que presentan menor toxicidad para los mamíferos. Adicional, tienen un efecto rápido y persistente sobre los mosquitos en dosis bajas, y son inodoros, por lo que los hace ideales para usarlos en fumigaciones a ultra bajo volumen (ULV) en los espacios públicos(16). Estas características hacen que estos insecticidas sean de primera línea para su uso en salud pública y los hogares.

Sin embargo, la resistencia a estos insecticidas ha sido progresivamente documentada, lo que estaría dificultando las acciones de control vectorial en aquellas regiones donde ha sido detectada (17–19). Los mecanismos enzimáticos y moleculares involucrados en la resistencia a los insecticidas PYRs en *Ae. aegypti*, incluyen a tres de los grupos principales de enzimas de detoxificación, que son las esterasas, los citocromos P⁴⁵⁰ y las glutatión S-transferasas (GST). Un segundo mecanismo es la alteración de los sitios blanco del insecticida conocido como *kdr* “knockdown resistance”. Este mecanismo de resistencia es causado por mutaciones en el gen que codifica el canal de sodio dependiente de voltage (VGSC) de los mosquitos, y reduce la unión del PYR con el sitio diana del insecticida en la proteína.

En Colombia se ha reportado la emergencia de resistencia a PYRs en varias poblaciones de *Ae. aegypti*. En el país, la Red de Vigilancia de la Resistencia a Insecticidas liderada por el Grupo de Entomología del Instituto Nacional de Salud (INS), es la entidad que se encarga de hacer un seguimiento de la resistencia a los insecticidas de uso en salud pública. El estado de la susceptibilidad de los vectores a los insecticidas, se estudia principalmente por medio de bioensayos utilizando las metodologías del CDC (20).

Si bien, estas pruebas permiten determinar las concentraciones y el tiempo que tarda el insecticida en actuar sobre los insectos, con este tipo de ensayo solo se puede tener un panorama general del estado de la susceptibilidad en los mosquitos de campo, pero no permite establecer el mecanismo de resistencia que está causando la pérdida de susceptibilidad. A pesar de los reportes de resistencia a insecticidas en el país, los mecanismos enzimáticos y moleculares que la sustentan aun no están bien caracterizados.

En Colombia existen varios estudios sobre resistencia a PYRs, que de manera independiente han identificado en *Ae. aegypti* algunos mecanismos bioquímicos y moleculares de la resistencia a piretroides. Entre los mecanismos enzimáticos descritos se incluyen la alteración en los niveles de los Citocromos P⁴⁵⁰(8) y de las Glutatión S-transferasas en particular la sobreexpresión de las *GSTe2*(21). Dos estudios puntuales han identificado los mecanismos de resistencia mediados por las mutaciones *kdr*. El primer estudio fue realizado por Maestre y colaboradores en 2014 en la región caribe (22), donde se registró la mutación *kdr*

Val1016Ile que confiere resistencia a los insecticidas piretroides en aquellos mosquitos que poseen esta mutación, y otro fue realizado en mosquitos de la ciudad de Sincelejo, en el cual se detectó la mutación Phe1534Cys en nueve individuos que fueron resistentes a deltametrina (23).

Por lo tanto, el objetivo del presente proyecto fue identificar los mecanismos enzimáticos y moleculares de resistencia a los insecticidas piretroides (permetrina, deltametrina y lambdacialotrina) en *Ae. aegypti* de campo pertenecientes a seis municipios y cuatro cepas seleccionadas en el laboratorio. En este estudio se incluyeron otros mecanismos que no habían sido evaluados o reportados previamente en el país, como la actividad de tres diferentes esterasas y de las GSTs, así como su expresión diferencial en las cepas resistentes. Adicionalmente se evaluaron las mutaciones kdr Val1016Ile y Phe1534Cys, que han sido asociadas con resistencia a piretroides en Latinoamérica. Finalmente se realizó por primera vez para *Ae. aegypti* de Colombia, un análisis proteómico usando espectrometría de masas de alta definición con el fin de identificar proteínas diferencialmente expresadas, que pudiesen estar relacionadas con la resistencia a insecticidas y que posiblemente estuviesen actuando como mecanismo de la misma.

Este estudio se realizó en seis localidades de diferentes sitios del país donde se tiene registro previo de que *Ae. aegypti* presenta resistencia a piretroides, y a su vez se utilizaron tres cepas de laboratorio que han sido presionadas continuamente a los insecticidas DDT, lambdacialotrina y propoxur, y que presentan resistencia a diferentes tipos de piretroides.

Las colonias de mosquitos de campo y su procesamiento nos permitieron conocer qué mecanismos de resistencia están asociados a piretroides en el país y la frecuencia de los genes de resistencia en las poblaciones estudiadas. Por otro lado, el estudio de las cepas de los mosquitos seleccionadas en nuestro laboratorio, que poseen un mecanismo de resistencia genético común, y que han sido presionados por más de 28 generaciones con un mismo insecticida, nos dieron un panorama acerca de cuáles son los mecanismo(s) que se seleccionan cuando una población de insectos es expuesta continuamente a un mismo insecticida.

Los insecticidas usados para seleccionar las cepas de laboratorio son importantes debido a que: el DDT fue el insecticida que más se utilizó en el pasado y por el cual persiste la resistencia de nuestras poblaciones de campo; y los insecticidas lambdacialotrina, (insecticida piretroide tipo II de última generación), y el propoxur (insecticida carbamato), que han sido usados frecuentemente en salud pública en el país.

Este trabajo nos permitió dar respuesta las siguientes preguntas ¿Cuál o cuáles mecanismos de resistencia se seleccionan en *Ae. aegypti* cuando hay una presión

de selección constante ejercida con un insecticida en particular (DDT, propoxur y lambdacialotrina)? ¿Son estos mecanismos los mismos o diferentes para cada una de las cepas seleccionadas y existen diferencias con las poblaciones de campo? ¿Existe resistencia cruzada con otros insecticidas?. Nuestras cepas de laboratorio fueron utilizadas como modelo biológico porque nos permitieron entender la evolución del fenómeno de la resistencia y servir como cepas de referencia.

Los resultados obtenidos permitirán actualizar el conocimiento sobre el estado de la susceptibilidad de *Ae. aegypti* a los insecticidas piretroides en el país. La información obtenida permitió conocer los mecanismos de resistencia presentes en las poblaciones de *Ae. aegypti* de campo y de las cepas seleccionadas en el laboratorio, al mismo tiempo, nuestros datos complementan los mecanismos que han sido previamente descritos en *Ae. aegypti*.

Al final de este estudio, se tienen más herramientas para proponer estrategias para el manejo de la resistencia a los piretroides en el país, basadas en los mecanismos que fueron detectados en cada una de las poblaciones estudiadas, esto con el fin de mantener su uso y eficacia y complementar con métodos alternativos en el control de los vectores de los arbovirus urbanos

2. JUSTIFICACIÓN

Durante la última década, Colombia ha sufrido múltiples epidemias de enfermedades causadas por diferentes arbovirus, principalmente aquellas ocasionadas por los virus DENV (4 serotipos DENV1 a DENV4), CHIKV y ZIKV. La ocurrencia de estas enfermedades se ha caracterizado por presentarse en brotes epidémicos, que han sobrepasado la capacidad de los servicios de salud pública para atender y controlar los casos ocasionados por estos virus.

Si bien Colombia es considerado un país hiper-endémico para dengue con la circulación de los cuatro serotipos del virus en casi todo el territorio y una media de infecciones de 97.000 casos/año. Durante los últimos siete años se han presentado brotes epidémicos de varias arbovirosis, particularmente DENV. Cabe recordar la gran epidemia de dengue durante el año 2010, donde se presentaron 157.152 casos (24) y posteriormente, durante el año 2013 se registraron 126.425 (25), lo que significó un aumento del 130% en los casos con respecto al año 2012 (26). Aunado a este panorama epidemiológico, la introducción del virus chikungunya en el año 2014 generó una epidemia que hasta el momento ha registrado más de 400 mil infecciones, y posteriormente en el año 2015 el virus de Zika llegó al país afectando aproximadamente a 100 mil personas (27–31).

Como parte de los planes de contingencia para estos brotes epidémicos, los programas encargados de las enfermedades transmitidas por vectores (ETV), han enfocado sus acciones en disminuir las poblaciones del vector *Ae. aegypti*. Estas acciones de control están basadas en las guías y protocolos del Ministerio de Salud y la Protección Social (MSPS) y del Instituto Nacional de Salud (INS) (32,33). Como producto de estos planes, se ha incrementado el uso de insecticidas, particularmente de los organofosforados como el temefos, el malatión y de los insecticidas piretroides (PYRs) como la permetrina, deltametrina y lambdacialotrina.

Sin embargo, el aumento en la frecuencia del uso de estos insecticidas, podría estar incidiendo en la aparición de la resistencia a estos compuestos, que aunado a los registros previos de resistencia a los insecticidas que han sido usados por los programas de ETV en los últimos años, podrían estar causando fallas en el control vectorial, y por ende favorecer de manera indirecta a la persistencia de las infecciones con estos tres arbovirus en el país.

Es por eso que la detección temprana de la resistencia a insecticidas es crucial para un manejo sostenible de los insecticidas de uso en salud pública que se encuentran disponibles en el mercado, en especial los piretroides. La detección temprana de los mecanismos bioquímicos y moleculares de la resistencia,

permiten identificar cuando se debe remover un insecticida y/o cambiar, antes de que estos mecanismos se fijen en las poblaciones y de esta forma, recuperar la susceptibilidad al producto. Estudiar los mecanismos que están involucrados en la resistencia a piretroides, cuándo y cómo estos se manifiestan, son preguntas fundamentales para entender el proceso y la dinámica de la resistencia en las poblaciones de vectores de enfermedades y se convierten en puntos clave para el diseño de estrategias de control.

La información obtenida en esta investigación nos permitió entender los mecanismos de resistencia a los PYRs presentes en *Ae. aegypti* de Colombia. Con este conocimiento, se sugieren estrategias del manejo de la misma, basadas en cada uno de los mecanismos de resistencia que aquí fueron encontrados. Esperamos que estos resultados fortalezcan la toma de decisiones por parte de las Secretarías de Salud y el Ministerio de Salud y Protección Social para desarrollar estrategias de mitigación de epidemias a través del uso de piretroides con base en el conocimiento. Así mismo, los resultados de este proyecto permitirán ser una línea base para el seguimiento de la resistencia en estas poblaciones y evaluar si las acciones que permiten observar una disminución de la misma.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar los mecanismos enzimáticos y moleculares asociados a la resistencia a insecticidas piretroides en poblaciones de *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Colombia, con el fin de proponer estrategias para el manejo de la resistencia de estos insecticidas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la susceptibilidad a insecticidas piretroides (tipo I y II) en poblaciones de *Ae. aegypti* en localidades de Colombia y de tres cepas seleccionadas en el laboratorio (lambdacialotrina, DDT y propoxur).

Indicador: * Porcentaje de mortalidad determinado para cada uno de los piretroides en las poblaciones evaluadas.

* Determinación del fenotipo (Resistente/Susceptible) en las cepas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* evaluadas.

2. Identificar los mecanismos enzimáticos (esterasas, citocromos P⁴⁵⁰, y GSTs) asociados a la resistencia a piretroides en las poblaciones estudiadas.

Indicador: Mecanismo(s) enzimático(s) asociado(s) a la resistencia identificado(s) para cada una de las poblaciones estudiadas.

3. Evaluar la presencia de las dos mutaciones *kdr* reportadas en la literatura que están asociadas a la resistencia a piretroides.

Indicador: Presencia y asociación como mecanismo de resistencia de las mutaciones Kdr Val1016Ile y Phe1534Cys evaluadas en las cepas.

4. Identificar y cuantificar proteínas diferencialmente expresadas en el túbulo de Malpighi e intestino medio de *Ae. aegypti* asociadas con la resistencia a insecticidas en tres cepas de laboratorio y tres cepas de campo con diferentes fenotipos (resistente/susceptible) a insecticidas piretroides.

Indicador: * Proteínas presentes en los túbulos de Malpighi e intestino medio identificadas.

* Proteínas diferencialmente expresadas en cepas resistentes a piretroides identificadas.

4. ESTADO DEL ARTE

4.1. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae): Biología

En Colombia *Aedes (Stegomyia) aegypti* es considerado el vector principal de la transmisión de los tres arbovirus de mayor importancia en salud pública; los virus dengue (DENV), Chikunguya (CHIKV) y Zika (ZIKV) (34). *Ae. aegypti* es considerado en Colombia una especie invasora. Proveniente de África, estos mosquitos han colonizado prácticamente todos los ambientes urbanos en aquellos municipios por debajo de más o menos 2.200 m.s.n.m (35).

Esta especie de mosquito es altamente antropofílica y urbana, exhibe una preferencia por los ambientes humanos, incluyendo aquellos sitios de oviposición artificiales (36). Esta especie se ha adaptado para colonizar diferentes contenedores con agua que le sirven como sitios de cría para los estadios inmaduros, como por ejemplo llantas, floreros, y tanques para el almacenamiento de agua, inclusive han colonizado sitios que antes no se consideraban como criaderos, ejemplo de estos son los sumideros de aguas lluvias y canales de lluvias (37).

Ciertas características genéticas en *Ae. aegypti*, le han conferido ventajas adaptativas sobre otros culícidos, una de las más importante es que sus huevos son resistentes a la desecación por varios meses (38). Se considera la especie de mosquito más fácil de colonizar en el laboratorio, y se ha utilizado para investigaciones detalladas sobre la biología de los mosquitos incluyendo morfología, fisiología, genética y competencia vectorial, y recientemente aplicaciones de evolución molecular (39).

Aedes (Stegomyia) aegypti tiene dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: fase acuática con tres formas evolutivas diferentes (huevo, larva y pupa) y una fase aérea o adulto (Figura 1).

Las hembras depositan sus huevos en las superficies interiores de los recipientes llenos de agua. Los huevos miden alrededor de un milímetro de largo, son inicialmente de color blanco, para tornarse negros con el desarrollo del embrión, que evoluciona en óptimas condiciones de temperatura y humedad en un lapso de dos a tres días. Con posterioridad a ese período, los huevos son capaces de resistir desecación y temperaturas extremas de hasta siete meses a un año. Entre 2- 3 días se presenta la eclosión de las larvas (40).

Las larvas inician un ciclo de cuatro estadios larvales (L1, L2, L3, L4), creciendo a lo largo de tres mudas desde un largo de un milímetro a los seis o siete milímetros finales. Estas larvas, que poseen como caracteres morfológicos típicos fuertes espículas torácicas laterales quitinizadas, peine de escamas unilinear en octavo

segmento y sifón con forma de oliva corta, que se destaca por su color negro; se alimentan con el zoo y fitoplancton de los recipientes que habitan(40). Las larvas L4 sufren la metamorfosis a pupas; este corresponde a la última etapa de maduración de la fase acuática.

Durante el estadio de pupa, los mosquitos sufren importantes cambios morfológicos. Este estadio corresponde a la última etapa de maduración de la fase acuática. La pupa no requiere alimentación y entre 28° y 32°C completa su desarrollo hasta la emergencia del adulto en uno a tres días. Las variaciones extremas de temperatura pueden dilatar o acelerar este período (40).

Los adultos mosquitos emergen de las pupas después de romper la cutícula del mesotórax. La sobrevivencia de los mosquitos adultos tiene un promedio de cuatro a ocho semanas, aunque puede variar por circunstancias climatológicas; la hembra sobrevive más tiempo que el macho y es más resistente a las variaciones de temperatura y humedad ambiental(40).

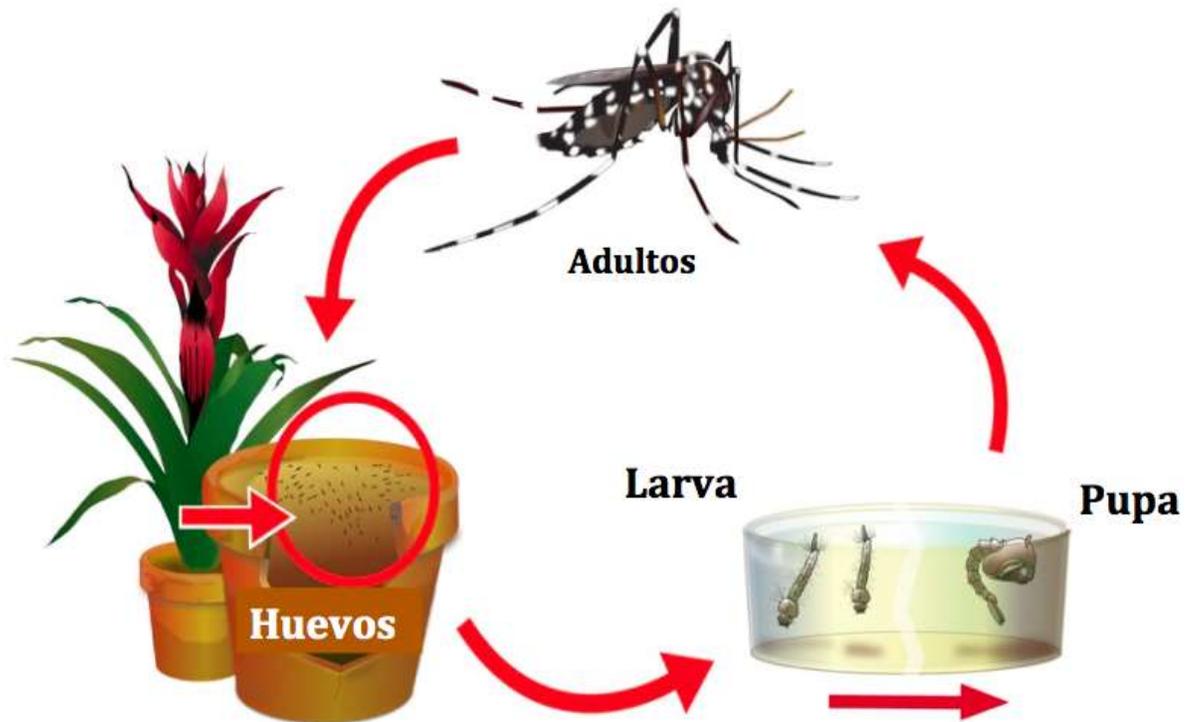


Figura 1. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti*. (<https://www.glacvcd.org/wp-content/uploads/2015/01/Aedes-Life-Cyce.jpg>)

4.2. Importancia médica de *Aedes (Stegomyia) aegypti*: Transmisión de Arbovirus

Se habla de arbovirus (*arthropod-borne virus*) para referirse a aquellos virus que requieren de la acción hematofágica de un artrópodo para la transmisión entre hospedadores. Entre estos artrópodos vectores, los mosquitos culícidos (Diptera: Culicidae) ocupan un lugar preferente debido a su hematofagia obligada, máxima adaptabilidad a múltiples ambientes en diferentes latitudes y altitudes (41) y en el caso de *Ae. aegypti*, su preferencia por coexistir en ambientes antropogénicos.

Los principales arbovirus que afecta a los humanos diseminados por *Ae. aegypti*, pertenecen a las familias, Flaviviridae (Yellow fever virus-YFV, DENV y ZIKV) y Togaviridae del género alfavirus como CHIKV, Mayaro, encefalitis equina venezolana (VEE) (1). Los arbovirus representan una amenaza sustancial para la salud humana en todo el mundo, estos patógenos pueden causar una variedad de presentaciones clínicas que van desde leves hasta aquellos que pueden amenazar la vida (42).

En recientes años la prevalencia de los virus transmitidos por vectores se ha expandido considerablemente, debido a la intensificación de los viajes transcontinentales (globalización) y migración humana. En regiones endémicas el número de casos aumentó, pero los casos también se propagaron a regiones donde los virus nunca existieron antes (5). Además los mosquitos han desarrollado resistencia a casi todos los insecticidas usados en salud pública, complicando aún más el control y eventual eliminación de las enfermedades transmitidas por vectores en áreas específicas (43).

Para que exista transmisión de los arbovirus, numerosos factores juegan un papel en la relación “vector-virus-hospedero humano”, en esta relación que es dinámica, los factores tales como la capacidad de un vector para adquirir y transmitir el virus, al igual que la susceptibilidad del huésped humano al virus que está siendo transmitido, deben coincidir en el espacio y tiempo para que los ciclos de transmisión empiecen (1,41). *Ae. aegypti* es un vector competente para transmitir al menos 20 arbovirus, inclusive se han encontrado mosquitos co-infectos con al menos dos arbovirus en el mismo individuo, dado su comportamiento altamente antropofílico y diurno hace que esta especie sea un importante vector para múltiples arbovirosis urbanas (1–5).

Las enfermedades más destacadas dentro de esta categoría serían las causadas por la infección de DENV, CHIKV y ZIKV. Estos arbovirus tienen un período de incubación extrínseco dentro del mosquito, que empieza cuando una hembra de *Ae. aegypti* se infecta del virus al ingerir sangre del huésped virémico. Posteriormente el virus infecta las células del intestino medio del mosquito y se inicia la replicación viral y propagación dentro del epitelio del intestino medio. El

virus se disemina desde el intestino medio hasta tejidos secundarios, posteriormente el virus infecta las glándulas salivales y finalmente el virus es liberado en los conductos salivales para la transmisión al inocular un huésped no infectado tras la realimentación de la hembra del mosquito infectado (Figura 2.) (44).

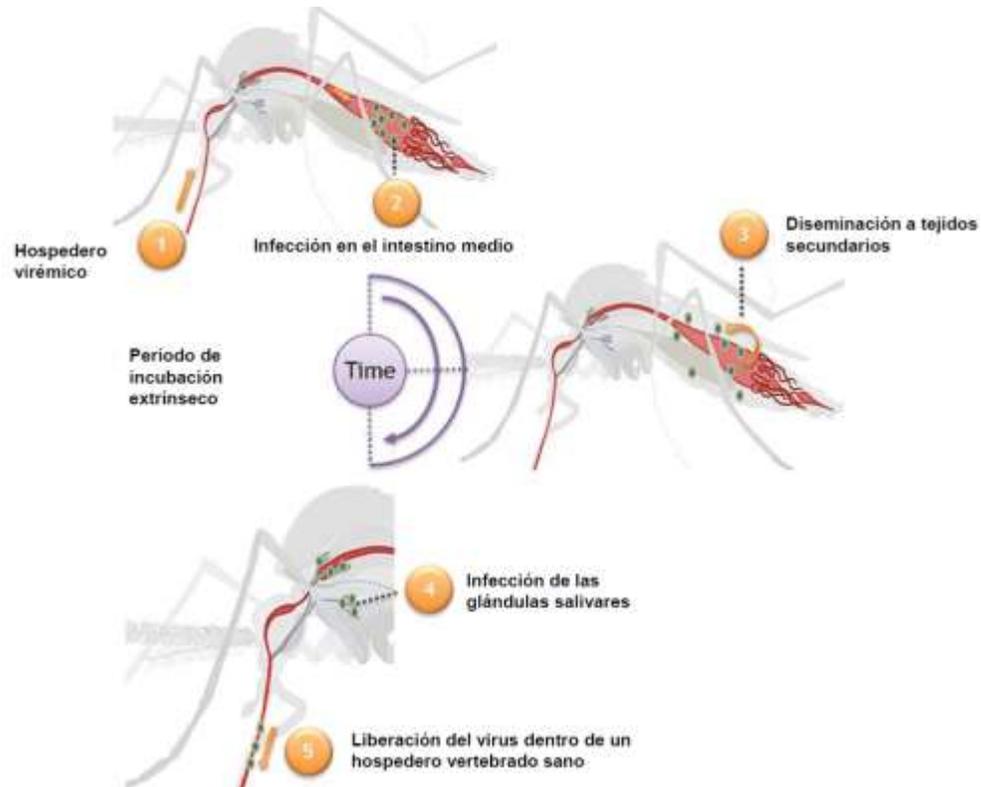


Figura 2. Principales pasos para una infección por arbovirus en *Aedes (Stegomyia) aegypti*.

4.2.1. Arbovirus transmitidos por *Aedes (Stegomyia) aegypti*: Dengue, chikungunya y Zika

La enfermedad más destacada dentro de las arbovirosis urbanas sería la fiebre de dengue, causada por la infección de del virus dengue (DENV -serotipos DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4). Los síntomas característicos que se presentan por la infección con DENV son: Cefalea intensa, dolores oculares, dolores en la parte baja de los muslos (5,45), esto hizo que se le conociera comúnmente como fiebre “quebrahuesos”. En algunos casos se presenta una sintomatología severa, que es una complicación potencialmente mortal porque cursa con extravasación de plasma, acumulación de líquidos, dificultad respiratoria, hemorragias graves o falla orgánica que potencialmente pueden llevar a la muerte (9).

En el caso de la enfermedad de chikungunya, que es causada por la infección del virus del mismo nombre, se conoce que este arbovirus, es capaz de producir artritis, aparentemente asociada a una reacción inmunitaria. La artritis por chikungunya virus es un problema de salud pública, pues el 12% de los infectados tendrán efectos residuales, inclusive por varios meses después de la post infección. Existen reportes de destrucción del metacarpo y osteoartritis en los tobillos, lo que produce un efecto incapacitante en las personas contagiadas, conllevando pues a pérdidas de movilidad y por consiguiente a pérdidas económicas por incapacidad laboral (46,47).

Los síntomas ocasionados por la infección con virus Zika se caracterizan por ser más variados, incluyendo la fiebre, sarpullido, dolor de cabeza, dolor retro- orbital, mialgia, artritis o artralgias, conjuntivitis y vómitos que son signos clínicos similares a la enfermedad del dengue y muchas otras enfermedades por ejemplo fiebres de chikungunya y Mayaro (48). La infección por virus Zika se ha asociado también a el síndrome de Guillain Barré en la Polinesia francesa, Brasil y Colombia (49–51) La transmisión del virus Zika de la madre al feto y la transmisión sexual han sido reportadas. La infección por el virus Zika durante el embarazo pueden causar microcefalia y otros defectos cerebrales graves en el feto y se ha asociado con otros resultados adversos durante el embarazo y parto (52).

4.2.2. Virus dengue

Los virus del dengue (familia Flaviviridae: género Flavivirus) son únicos entre los arbovirus, como miembros de este grupo que han evolucionado y se han adaptado completamente al huésped humano y su medio ambiente, eliminando esencialmente la necesidad de mantenimiento en el ciclo primitivo del bosque enzoótico. La fiebre del dengue es una enfermedad antigua que se extendió por todo el mundo gracias a la capacidad de su principal vector *Ae. aegypti* de adaptarse al ambiente urbano y dependencia de los seres humanos. (5,45).

Se sabe que la propagación de este virus a través del mundo se dio a mediados de los siglos XVIII y XIX gracias a la invención del transporte comercial, debido a la expansión de la industria naviera y expansión del comercio se estaban expandiendo (45). *Ae. aegypti* utilizaba el agua almacenada en los barcos como criaderos y podía mantener su ciclo biológico incluso en viajes largos, gracias a la capacidad que tienen sus huevos de resistir la desecación. Durante estos siglos las epidemias fueron infrecuentes, con intervalos de 10 a 40 años (53). En la actualidad el dengue es una de las enfermedades más frecuentes en los viajeros procedentes de zonas endémicas. Debido al gran volumen de viajes intercontinentales, la propagación del virus se ha ampliado a lugares donde antes no estaba presente presentándose cada vez más rápido brotes epidémicos (5,45,53).

Hay cuatro serotipos del virus dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) que son antigénicamente distintos, pero tienen la misma epidemiología y causan enfermedades similares en los seres humanos. Los cuatro serotipos del virus se

mantienen en un ciclo endémico en el que participan humanos y mosquitos *Ae. aegypti* en la mayoría de los centros urbanos de los trópicos(3,5,45,54). Los cuatro serotipos del virus DEN pueden ser endémicos en la misma población humana; en estos lugares generalmente, se asocian a manifestaciones clínicas leves (transmisión silenciosa) durante los períodos inter- epidémicos, pero causan epidemias asociadas con una enfermedad más grave cada 3-5 años(5).

4.2.3. Virus chikungunya

Chikungunya es un miembro del género Alphavirus, familia Togaviridae. Este virus históricamente se limitaba al Viejo Mundo y hay indicios de que el virus se originó en el África subsahariana, donde se cree que CHIKV fue mantenido en un ciclo de transmisión enzoótica entre primates no humanos y especies de mosquitos *Aedes* arbóreos (55).

En el año 2004, se reportó la primera emergencia por este virus en Kenia, luego rápidamente hubo una expansión global a diferentes regiones de África, Asia y varias islas en el Océano Índico, hasta que en 2011 se registró en zonas templadas en Europa (56). Aparentemente el factor que contribuyó a la aparición de CHIKV fue presumiblemente a través de viajeros infectados en zonas endémicas / epidémicas y al retornar a sus hogares en algunas zonas se estableció la transmisión autóctona.

En el año 2013 se registraron por primera vez casos autóctonos de CHIKV en Latinoamérica, exactamente en la isla San Martín ubicada en El Caribe, ocasionando un brote que rápidamente se dispersó por la región y se estableció por primera vez el ciclo urbano y autóctono de transmisión para posteriormente propagarse por todo El Caribe, Centro América, América del Sur y La Florida (57–59).

4.2.4. Virus Zika

El virus Zika (ZIKV, familia Flaviviridae, género Flavivirus) se aisló por primera vez de un mono *Rhesus* en el bosque Zika de Uganda en 1947. Desde entonces, expandió rápidamente su distribución geográfica y fue introducido en áreas donde previamente no existía(56); en 2007 este virus fue encontrado en otras partes de África y Asia (Micronesia), en 2013 en la Polinesia francesa, en 2014 en Nueva Caledonia.

En Brasil el virus fue introducido en 2014 y subsecuentemente asociado con casos de microcefalia. Se estima que un mínimo de 400.000 casos de infecciones por este arbovirus fueron reportados en 24 estados de Brasil(60). Posteriormente se presentó una pandemia en las Américas con 26 países y que registraban transmisión activa (4).

Si bien en la mayoría de los casos los signos y síntomas de la enfermedad eran leves, caracterizados en su mayoría por erupciones cutáneas, fiebre, dolores articulares y conjuntivitis; las infecciones recientes se han asociado a

enfermedades con complicaciones neurológicas o autoinmunes como el síndrome de Guillain Barré, microcefalia, complicaciones durante el embarazo y parto de las mujeres gestantes infectadas. (50,56,61)

4.2.5. Casos de arbovirosis en Colombia

En los últimos 3 años en Colombia, las enfermedades causadas por los arbovirus DENV, CHIKV y ZIKV, se han caracterizado por presentarse en brotes que han sobrepasado la capacidad de los servicios de salud pública para atender y controlar los casos ocasionados por estos virus.

Colombia es un país endémico para la circulación de todos los serotipos de DENV. En contraste las infecciones por CHIKV se registraron en el país por primera vez en el año 2014 y de ZIKV en el año 2015. Se han confirmado varios casos de co-infecciones con DENV, CHIKV y ZIKV (62) y la presencia de estos virus se ha registrado en al menos el 80% del territorio nacional (28).

Durante el año 2016 y hasta la semana epidemiológica 37 del año 2017, se habían registrado en el sistema de vigilancia epidemiológica (SIVIGILA) 124.591 casos de fiebre por dengue. En el año 2017 de los 20.769 casos registrados en el sistema de vigilancia, el 40,5 % correspondían a casos de dengue con signos de alarma (28,30).

Con respecto a chikungunya, en Colombia la infección por este virus se registró en el país por primera vez en junio del año 2014 (63,64); desde ese entonces los casos acumulados registrados por el SIVIGILA desde el año 2014 hasta la semana epidemiológica 37 del año 2017 son de 487.432 (27,28,30).

Las infecciones por ZIKV por su parte, se registraron por primera vez en territorio Colombiano en el mes de septiembre del año 2015, pero oficialmente en octubre el Instituto Nacional de salud, reconoce la presencia de este arbovirus en el país. Desde la introducción del virus en el año 2015 y hasta la semana epidemiológica 37 del año 2017, en el SIVIGILA se han reportado 109.454 casos. Las sintomatologías asociadas a la infección por ZIKV, como microcefalias, defectos congénitos y Guillain Barré se vienen registrando en el sistema de vigilancia como evento de registro obligatorio. En el país desde inicios del año 2016 a la semana epidemiológica 18 del 2017 se han confirmado 246 casos de microcefalias y otros defectos congénitos del Sistema Nervioso Central asociados a la infección por ZIKV y durante este año se han notificado 71 casos de Guillain Barré en 21 departamentos del territorio nacional (30)

Estas estadísticas nos permiten ver la magnitud del problema de las arbovirosis en el país y su afectación no solo en la población, sino la carga prestacional a los servicios de salud.

4.3. Diferentes estrategias de control para las poblaciones de *Aedes (Stegomyia) aegypti*

Las intervenciones de control de las poblaciones de *Ae. aegypti* las podemos dividir en dos grandes grupos: El control de los estadios inmaduros y el control de los adultos (65).

El método más utilizado para controlar los estadios inmaduros de *Ae. aegypti* es el tratamiento periódico de criaderos reales y aquellos que pueden ser potenciales sitios de cría, ya sea dentro o fuera de la vivienda (66). Dentro de las metodologías utilizadas para la reducción de los criaderos, encontramos programas de campañas sociales y educativas, acompañadas de manejo ambiental, que invitan a la comunidad para mantener limpias las paredes de los depósitos de agua y sus hogares limpios de objetos que podrían ser potenciales depósitos de agua (67).

Otras metodologías utilizadas para el control de *Ae. aegypti* en los criaderos están basadas en disminuir el número de larvas utilizando agentes biológicos, ya sean organismos depredadores como los copépodos y peces larvívoros, bacterias como *Bacillus thuringiensis* o como el Spinosad que es un insecticida derivado del *Saccharopolyspora spinosa* (68,69).

El uso de larvicidas químicos está ampliamente usado como principal método de control en los programas de ETV. El larvicida organofosforado (OP) temefos se utiliza comúnmente debido a su rentabilidad y aceptación de la comunidad (66). Otros larvicidas usados actualmente son los análogos sintéticos de la hormona de crecimiento de los mosquitos, entre estos se encuentran el novaluron, metopreno y pyriproxifen e inhibidores de la síntesis de la quitina como el diflubenzuron (65).

En cuanto al control de los mosquitos adultos, la premisa principal es que estas intervenciones de control reduzcan la densidad poblacional de los vectores, disminuyendo la probabilidad diaria de supervivencia de los mosquitos y el contacto de los vectores con los seres humanos, impactando así la transmisión del virus (70). Tenemos entonces dentro de estos métodos de control las fumigaciones espaciales (ULV o aéreas usando aviones), intradomiciliares (fumigaciones con niebla y rociado) y la protección personal usando materiales impregnados con insecticidas y los repelentes, preferiblemente con el uso de insecticidas residuales como los piretroides (16). Se podría decir que actualmente las intervenciones de control en la mayoría de países tropicales, se basan prácticamente en el uso de insecticidas químicos.

Sin embargo, la lucha contra las enfermedades transmitidas por vectores en las zonas tropicales y subtropicales, se ve amenazada por la evolución cada vez más rápida de la resistencia a los insecticidas usados en salud pública, debido a que el control vectorial se ha convertido en la piedra angular de la lucha contra las

enfermedades transmitidas por *Ae. aegypti*, por lo tanto herramientas de control alternativas deben ser incluidas en las estrategias de manejo de los vectores. La puesta en marcha de organismos modificados genéticamente o la transgénesis de insectos son un nuevo tipo de herramientas novedosas, sin embargo aún están en evaluación (65).

Dentro de este grupo de herramientas de control vectorial que se encuentran en desarrollo o evaluación, podemos mencionar aquellas logradas gracias a la bioingeniería que han desarrollado mosquitos que poseen ciertas características de interés como por ejemplo machos estériles, mosquitos transgénicos y mosquitos transfectados con bacterias endosimbiontes como *Wolbachia* (71,72). Estas nuevas metodologías tienen como objetivo reemplazar las poblaciones de mosquitos silvestres y en teoría interrumpir la transmisión de la enfermedad. Sin embargo a medida que la simple sustitución de una población de insectos es completada por una cepa deseada, se deben desarrollar estrategias que permitan el reemplazo de la población silvestre, debido a que la difusión de los transgenes o endosimbiontes no son propensos a propagarse a través de la población por sí solos, lo que requiere de mecanismos eficaces de accionamiento del gen, en presencia de algún estímulo y que este gen u organismo pueda ser transmitido a las siguientes generaciones, razón por la cual muchos de estas nuevos métodos de control resultan ser muy costosos para los programas de ETV (71).

4.4. Uso de los insecticidas en el control de las enfermedades transmitidas por vectores (ETV)

Las intervenciones de control de vectores con insecticidas son actualmente el pilar para reducir, al mínimo, la carga de las enfermedades transmitidas por artrópodos en todo el mundo(6). Se han hecho numerosos esfuerzos para introducir métodos ambientales, biológicos e inmunológicos de control vectorial. Sin embargo los insecticidas químicos son esenciales para la mayoría de los programas de control, sobre todo cuando no están disponibles medios alternativos de prevención de la transmisión de la enfermedad en épocas de epidemias (65). Sin embargo, el uso de estos productos químicos en una creciente escala ha llevado al desarrollo generalizado de la resistencia a insecticidas, como resultado de la selección de ciertos genes que confieren resistencia a las poblaciones de los vectores(73–75). El uso intensivo de insecticidas de síntesis orgánica utilizados para controlar artrópodos plaga y vectores de enfermedades ha dado lugar a resistencia a los pesticidas en más de 400 especies de artrópodos de importancia médica y agrícola (17,18,43).

Para el control de las enfermedades de transmisión vectorial (ETV) cuatro clases de insecticidas químicos han sido usados. Los organoclorados, como el diclorodifeniltricloroetano más conocido como DDT, que fue el primer insecticida sintético usado en las campañas de erradicación de la malaria (76) y control del

dengue (77). En el segundo grupo se tiene los organofosforados (OP); dentro de los organofosforados que se mas usan actualmente encontramos el temefos, que es el larvicida usado ampliamente para el control de los criaderos encontrados en las viviendas y en vía pública (66) y el insecticida malatión, usado para el control de los adultos, a través de fumigación a ultra bajo volumen (ULV) principalmente en épocas de brotes (78–80).

Los otros grupos de insecticidas usados son los carbamatos, entre ellos tenemos el bendicarb y propoxur y los piretroides (PYR) como la permetrina, lamdacialotrina, deltametrina y ciflutrina. Los insecticidas PYR representan el 25% del mercado de los insecticidas en el mundo y siguen siendo el pilar de los programas de control de vectores (16). El uso de insecticidas piretroides sin embargo ha ido en aumento, y el de los organoclorados y algunos de los compuestos organofosforados más tóxicos ha disminuido en los últimos años debido a los informes de resistencia y a la asociación de estos insecticidas con presencia de cáncer y afectación de otros organismos (76).

Debido a que los piretroides son seguros para el contacto cercano para los mamíferos y tienen un efecto rápido y persistente sobre los mosquitos en dosis bajas, los miembros de este grupo de insecticidas son en la actualidad los únicos recomendados para el tratamiento de toldillos, cortinas y superficies como las paredes y para las fumigaciones ULV y el rociado residual dentro de las viviendas (16).

4.5. La resistencia a insecticidas en *Aedes (Stegomyia) aegypti* en el mundo

En *Ae. aegypti*, la resistencia a insecticidas usados en salud pública ha sido ampliamente registrada en América Latina, África y Asia, gracias a diferentes estudios basados principalmente en bioensayos de susceptibilidad tanto en larvas como en adultos (18,19,76). Los datos de monitoreo de la resistencia a insecticidas disponibles a través de los estudios realizados por diversos investigadores han revelado que los niveles de resistencia a organofosforados y piretroides están aumentando en las diferentes poblaciones de *Ae. aegypti* (18).

Los primeros registros de resistencia a insecticidas en mosquitos fueron reportados en África, debido al amplio uso de DDT en este continente durante las campañas de erradicación de la malaria desde el año 1946; posteriormente más de 50 especies de vectores, incluyendo poblaciones de *Ae. aegypti* de varios países fueron encontradas altamente resistentes para este tipo de insecticida (8,76,81–83). Debido a la alta y persistente resistencia al DDT, en los programas de ETV el uso de este insecticida fue cambiado por otros insecticidas de diferente clase como los organofosforados, carbamatos y los piretroides de origen sintético como la permetrina, la deltametrina, la ciflutrina y la lamdacialotrina (76).

En el año de 1992, la OMS en el 15vo reporte sobre resistencia a insecticidas en vectores de enfermedades (17), describió en *Ae. aegypti* resistencia a diferentes clases de insecticidas en la región del Caribe y el continente americano, en aquel entonces continuaba la susceptibilidad para malatión, temefos y fenitrotión, insecticidas comúnmente utilizados en las campañas de control de dengue. Sin embargo a partir de 1995, se registró la emergencia de resistencia a malatión y temefos en esta zona (66,78,79,84).

Una revisión bibliográfica realizada en el año 2008 por Ranson y colaboradores brindó un panorama general de la resistencia a insecticidas en vectores de DENV, ellos describieron que la resistencia al temefos y a los piretroides se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, sin embargo resaltan que la mayoría de los estudios han sido realizados en Tailandia, India y Brasil (18).

La última actualización sobre la resistencia a insecticidas piretroides y organofosforados y su distribución a nivel global, fue publicada el 20 de julio del 2017(19). De acuerdo a los hallazgos de los investigadores, los reportes de resistencia se encuentran principalmente en África, América Latina y Asia, donde los insecticidas con mayor frecuencia de resistencia reportada nuevamente a temefos y piretroide deltametrina (Figura 3).

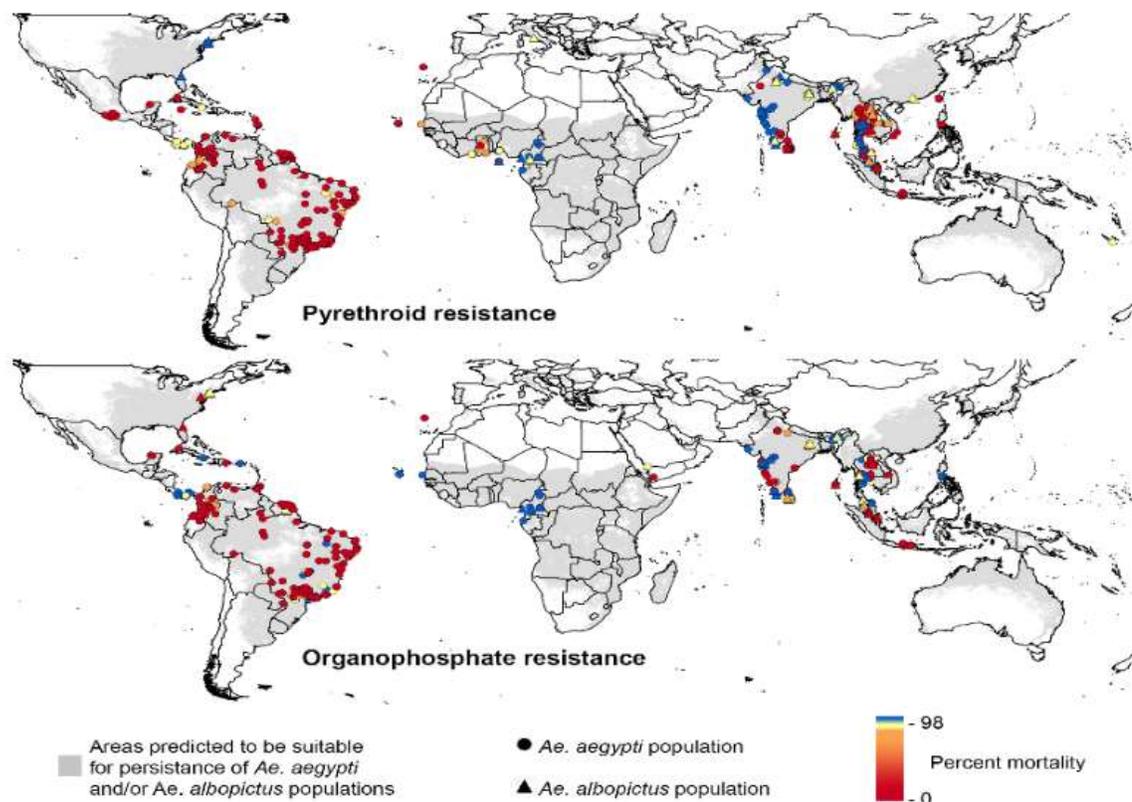


Figura 3. Países donde se han registrado resistencia a insecticidas piretroides y organofosforados (años 2006 a 2015). Modificado de C. Moyes & D. Weetmain. 2017 (19).

Estos estudios nos dan un panorama general de la amplia distribución y problema real de la resistencia a los insecticidas usados para el control de las enfermedades transmitidas por vectores a nivel mundial.

4.6. Resistencia a los insecticidas piretroides y sus mecanismos en *Aedes (Stegomyia) aegypti*

4.6.1. Insecticidas piretroides

Los piretroides (también conocidos como piretroides sintéticos) son insecticidas que se usan ampliamente en el control de los insectos de importancia agrícola, veterinaria y salud pública. Estos insecticidas son los análogos sintéticos de las piretrinas, que son insecticidas de origen botánico derivados de la flor del crisantemo "*Chrysanthemum cinerariifolium*". Los piretroides se originaron mediante sucesivas modificaciones isostéricas de la estructura química de las piretrinas (85).

Los piretroides se caracterizan por ser fotoestables, con alta actividad insecticida, baja toxicidad para los mamíferos y limitada persistencia en el suelo. Son usados ampliamente en salud pública porque son relativamente seguros para los humanos y su rápido efecto de derribo a dosis bajas (16).

El primero de estos compuestos usado en salud pública para el control de vectores de arbovirus fue el fenvalerato, que fue comercializado en 1978; hasta el momento se encuentran 42 ingredientes activos de piretroides, que difieren en su estructura química.

La mayoría de los piretroides son ésteres sintéticos derivados de las piretrinas; muchos de los insecticidas piretroides presentan un anillo ciclopropánico aunque otros carecen de este elemento. Estos compuestos son ciclopropano carboxy-esteres ácidos, con dos grupos metilo en el carbono (C) 2 y una cadena insaturada en C-3.

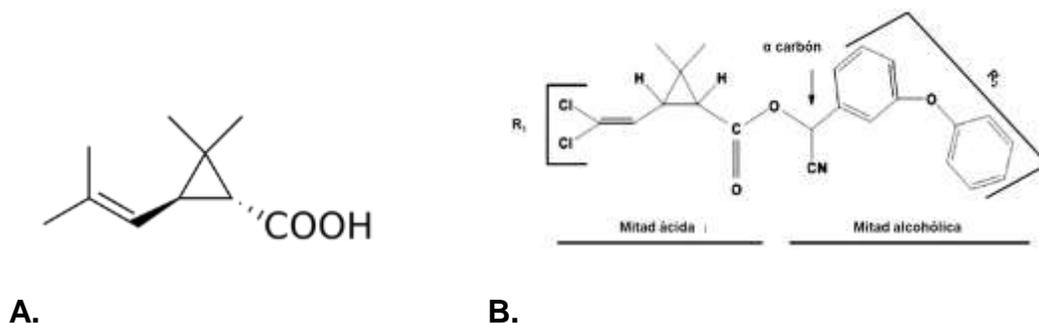
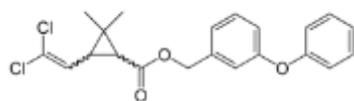


Figura 4. A. Estructura básica de los piretroides. B. Estructura química del piretroide tipo II cipermetrina. La estructura básica del piretroide consiste en una mitad ácida y otra mitad alcohólica. Los PYR tipo II también tienen un grupo ciano en el carbono α de la mitad alcohólica. Para los PYR tipo II el carbono α es un centro de quiralidad (86).

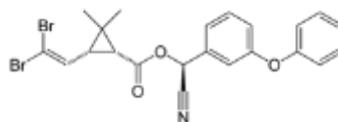
De acuerdo a la presencia o ausencia del grupo α - ciano en su carbono central, los piretroides pueden ser clasificados como tipo I o tipo II; en general el tipo I son ésteres de alcoholes primarios o secundarios que carece del grupo α - ciano en su estructura química, mientras que los PYR Tipo II son ésteres de alcoholes secundarios que tiene un grupo α - ciano-3-fenoxibencilo(87) (Figura 5).

Piretroide tipo I

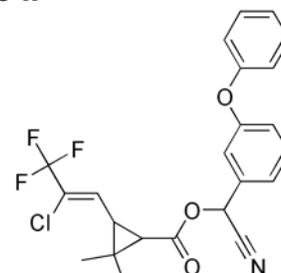


Permetrina

Piretroide tipo II



Deltametrina



Lambdacialotrina

Figura 5. Estructura química de los insecticidas piretroides Tipo I y Tipo II. (Tomado de <https://es.wikipedia.org/wiki/Piretroide>).

4.6.2. Mecanismo de acción de los insecticidas piretroides

Los insecticidas piretroides son ampliamente utilizados para el control de los mosquitos adultos, especialmente durante los brotes de arbovirus(88). Los PYRs ejercen efectos tóxicos sobre los mosquitos, alterando la función de los canales de sodio dependientes de voltaje o “Voltage Gate Sodium Channel”(VGSC); estas proteínas son esenciales para la señalización eléctrica adecuada en el sistema nervioso del mosquito (89).

Los piretroides promueven y prolongan la activación del VGSC al interactuar con dos sitios distintos en el canal que son los receptores de los piretroides (73).

Los canales de sodio de los insectos comprenden cuatro dominios homólogos (I - IV), cada uno de los cuales tiene seis segmentos (S) de extensión de membrana (S1 - S6) (Figura 6) (73).

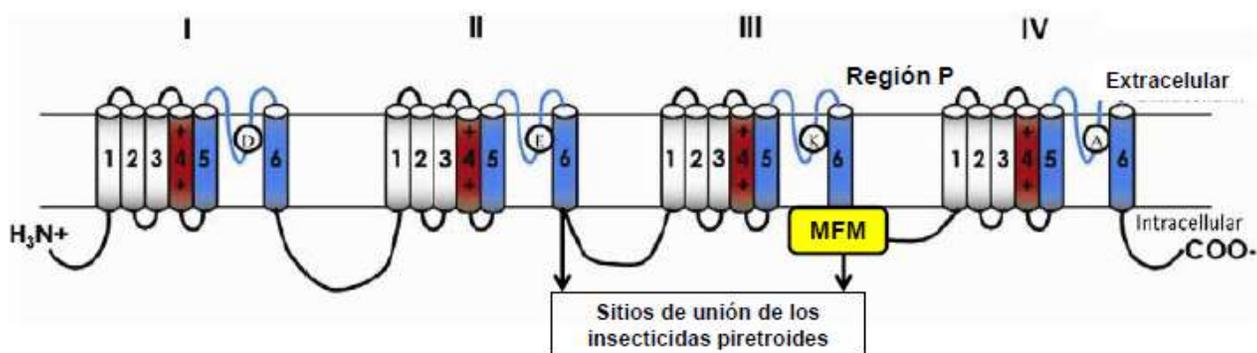


Figura 6. Estructura del canal de sodio dependiente de voltaje (VGSC) *Ae. aegypti*. La topología del canal de sodio que indica las características de secuencia que son críticas para la función de canal. El VGSC contiene cuatro repeticiones homólogas (I-IV), cada una de las cuales tiene seis segmentos transmembranales (S6). MFM es un motivo de metionina característico de los insectos (Figura modificada de Dong 2014 (73)).

Los segmentos S4 junto con los segmentos S1-S3 constituyen los módulos de detección de voltaje, mientras que S5, S6 y el bucle reentrante de la membrana (denominado región P), que conecta los segmentos S5 y S6, forman el módulo del poro (89). En respuesta a la despolarización de la membrana, los segmentos S4 se mueven hacia fuera, iniciando la apertura de los canales de sodio (es decir, la apertura de la puerta de activación). Este proceso se llama activación. La puerta de activación está situada en el extremo citoplasmático del poro, donde convergen los cuatro segmentos S6 (73,87,89,90).

Después de una breve apertura, el canal de sodio se inactiva. Esto se logra mediante el movimiento de una partícula de inactivación (formada principalmente por residuos en el ligando intracelular corto conectando los dominios III y IV), que ocluye físicamente el poro abierto. Tras la repolarización, el canal de sodio se recupera de la inactivación rápida y se desactiva (es decir, el cierre de la compuerta de activación) (87,89).

Los piretroides inhiben principalmente la desactivación y la inactivación de los canales, dando como resultado una apertura prolongada de los canales de sodio. Como consecuencia, los piretroides provocan el disparo repetitivo y la despolarización de la membrana nerviosa, interrumpiendo la señalización eléctrica en el sistema nervioso del insecto (91).

Los piretroides de tipo I carecen de un grupo α -ciano que está presente en la posición de alcohol fenilbencílico de los piretroides de tipo II. Los piretroides tipo I producen descargas repetitivas en respuesta a un único estímulo, mientras que los piretroides de tipo II provocan una despolarización de la membrana acompañada de una supresión del potencial de acción por lo que los hace más tóxicos para los insectos (91,92).

4.6.3. Mecanismos de resistencia a insecticidas piretroides en *Aedes (Stegomyia) aegypti*

La resistencia a insecticidas piretroides en *Ae. aegypti*, es un fenómeno genético complejo que opera a través de la herencia poligénica (74,75,93). Este fenómeno está definido como un cambio heredable en la susceptibilidad a los insecticidas, es decir la capacidad que tiene los mosquitos de resistir la dosis de los insecticidas que resultaría letal a la población (43). El desarrollo de la resistencia a los insecticidas es un proceso dinámico y complejo que depende directamente de factores genéticos, fisiológicos, conductuales y ecológicos de las plagas de artrópodos y depende indirectamente de los factores operacionales, incluidas las categorías de insecticidas utilizados, el tiempo de aplicación, la tasa, la cobertura y método (43,94)

Una población de mosquitos puede tener varios tipos de resistencia:

- Resistencia simple: Es decir un solo mecanismo de resistencia
- Resistencia múltiple: Varios tipos de resistencia simultánea

- Resistencia cruzada: Un único mecanismo de resistencia puede conferir resistencia a insecticidas de diferente grupo químico, pero que comparten el mismo sitio de acción. Ejemplo de la resistencia cruzada que se ha documentado es la que se ha encontrado entre el DDT y los piretroides, pues ambos insecticidas tienen el mismo sitio de acción (23,95,96).

La resistencia a insecticidas se considera una amenaza a la salud pública, pues la capacidad de los mosquitos para resistir los insecticidas representa un problema para la prevención de enfermedades por arbovirus como DENV, CHIKV y ZIKV. La detección y el monitoreo de las resistencias desarrolladas por las poblaciones de mosquitos naturales es esencial para permitir su manejo en el campo mientras no haya alternativas operativas para el uso de insecticidas (97).

Existen dos mecanismos principales de resistencia a piretroides. El primero es incremento en el metabolismo y excreción de los insecticidas por medio de las enzimas de detoxificación, particularmente por citocromos P⁴⁵⁰ y las GST (43) y el segundo mecanismo son las alteraciones en el sitio diana del insecticida conocida como mutaciones Kdr (81).

4.6.1. Resistencia metabólica

Tres familias de enzimas, los citocromos P⁴⁵⁰, glutatión S transferasas y las esterasas carboxy/colinesterasas están implicadas en el metabolismo de los insecticidas, ya que cada una de ellas cataliza un amplio rango de reacciones de detoxificación de los ingredientes activos de estos compuestos (98).

Actualmente se conocen unos 760 genes en los tres cromosomas de *Ae. aegypti* que codifican enzimas de desintoxicación, transportadores, receptores de neurotransmisores y canales de sodio (Figura 7). Cuarenta y nueve de estos genes codifican esterasas, 22 de ellos pertenecen a las alfa esterasas. Veinte seis genes codifican enzimas GST, en particular GST de los grupos épsilon y delta, relacionadas con resistencia al DDT (98–100). Se han identificado 160 genes pertenecen a los citocromos P⁴⁵⁰ (CYP); 41 de estos genes son candidatos como marcadores moleculares de la resistencia a los piretroides, ya que se han encontrado sobre-expresados en mosquitos resistentes a deltametrina (101,102).

Diferentes estudios utilizando qPCR, micro arreglos y el análisis del transcriptoma de *Ae. aegypti* resistentes a PYR'S, han confirmado que la alta actividad de los citocromos P⁴⁵⁰ está fuertemente asociada con la resistencia a este tipo de insecticidas y han identificado un conjunto de cuatro genes de citocromos (*CYP9J26*, *CYP9J27*, *CYP9J28* Y *CYP9J32*) que están implicados en el metabolismo de los insecticidas piretroides, por lo que podrían ser considerados como marcadores principales de resistencia a piretroides (103–106), Sin embargo

la mayoría de estos estudios se han realizado con cepas de *Ae. aegypti* seleccionadas en el laboratorio para ser resistentes y aún hay muy poca información sobre estas enzimas en poblaciones naturales.

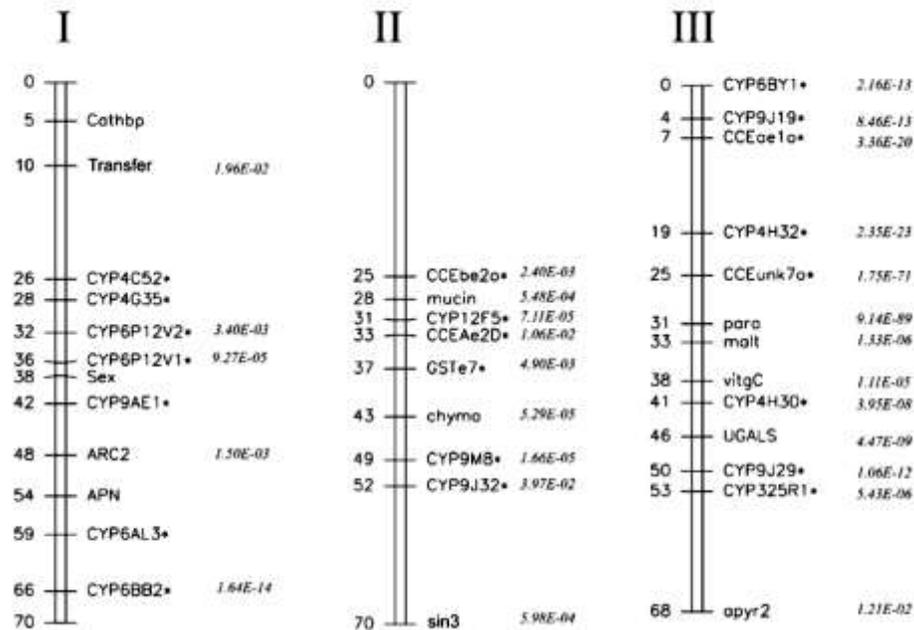


Figura 7. Cromosomas (I, II y III) de *Ae. aegypti*. En la figura se puede observar el mapa de ligamiento de los principales enzimas de detoxificación (citocromos P⁴⁵⁰s, esterasas y glutatión transferasas (GST) y marcadores de resistencia a insecticidas en asteriscos (*) (tomado de Saavedra *et al.*, 2008)(107)

4.6.1.1. Enzimas carboxilesterasas

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los ésteres carboxílicos, se ha encontrado que los cambios en sus niveles de expresión, es el mecanismo de resistencia que ocurre con mayor frecuencia en los insectos. Niveles altos de las enzimas esterasas se han asociado a la resistencia a los insecticidas organofosforados y piretroides (95).

Las esterasas son una familia de seis proteínas agrupadas en dos superfamilias denominadas alfa y beta esterasas. En *Ae. aegypti*, estas enzimas están codificadas por un grupo de genes en el mismo cromosoma, cada gen puede sufrir modificaciones que confieren resistencia al insecticida al inducir una sobre producción de estas enzimas o modificaciones estructurales que las hacen mas eficientes para detoxificar los compuestos (108).

4.6.1.2. Enzimas glutatión S transferasa

Las glutatión S-transferasas o GSTs, son enzimas involucradas en la desintoxicación de xenobióticos en muchos organismos. Estas enzimas

metabolizan una amplia gama de compuestos hidrófobos tóxicos, como, insecticidas y sustratos tóxicos endógenos. Estas enzimas catalizan la conjugación del glutatión al centro hidrofílico de las sustancias tóxicas, permitiendo el aumento de la solubilidad de los compuestos y por ende facilitar la posterior secreción de los productos formados en el proceso de descomposición de los insecticidas catalizado por estas enzimas (100)

Las GST se dividen en tres grupos principales dependiendo de su ubicación en la célula: citosólico, microsómico y mitocondrial. Las GST mitocondriales no se han encontrado en especies de insectos, incluidos los mosquitos. Las GST citosólicas en insectos se agrupan en seis tipos diferentes: Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Theta y Zeta. La mayoría de las GST involucradas en el metabolismo de xenobióticos en insectos pertenecen a la clase Delta y Epsilon. Las GST en insectos han estado implicadas en la resistencia a los insecticidas a través de su metabolismo directo, secuestro o protección contra efectos tóxicos secundarios como el aumento de lípidos peroxidación inducida por la exposición a insecticidas (96,98,100).

Más recientemente, también se ha inferido que las GST pueden desempeñar dos funciones diferentes en el metabolismo de los insecticidas, la primera al unir y secuestrar insecticidas y la segunda al proteger contra el estrés oxidativo cuando esto es un subproducto de la toxicidad por insecticidas como con los piretroides(109). Sin embargo, todavía se entiende muy poco sobre el rol de las GST y la resistencia a los insecticidas piretroides (75).

4.6.1.3. Citocromos P⁴⁵⁰

Los citocromos P⁴⁵⁰ también conocidos como monooxigenas de función múltiple están presentes en todos los insectos. Estas enzimas están involucradas en el crecimiento y desarrollo a través del procesamiento de ácidos grasos, hormonas y feromonas; en el metabolismo de productos de plantas secundarias y productos químicos sintéticos como los insecticidas(108). Los citocromos P⁴⁵⁰ son enzimas que contienen grupos hemo-tiolatos que están presentes en casi todos los organismos y están involucradas en el metabolismo de una amplia gama de moléculas (110). La mayoría de los P450 que están involucrados en procesos de desintoxicación se expresan en el retículo endoplasmático y catalizan la oxidación de xenobióticos o compuestos endógenos en presencia de su donante de electrones obligatorio (CPR) el NADPH-citocromo P450-reductasa y a veces el Cyt b5 (citocromo b5)(103,104,110)

Los citocromos P⁴⁵⁰ está implicados en muchos casos de resistencia metabólica a organofosforados, piretroides y DDT. Y estas enzimas se expresan principalmente en los tejidos del intestino, cuerpo graso, el tracto reproductivo y los tubos de Malpighi (103,106,108,110,111).

4.6.2. Resistencia molecular

En cuanto a la resistencia molecular, esta es el resultado de cambios estructurales en los sitios blancos de acción de los insecticidas PYRs y DDT en el sistema nervioso central del insecto, que induce a una menor afinidad por el insecticida(43). Ejemplo de este fenómeno son las mutaciones en el gen del canal de sodio dependiente de voltaje de los mosquitos (VGSC), conocidas como mutaciones *kdr*, mismas que se han identificado y han demostrado estar asociadas a la resistencia cruzada entre PYRs y DDT y que reduce la sensibilidad de los insectos a los insecticidas de este tipo(81,112–114).

Las mutaciones en el canal de sodio son un importante mecanismo de resistencia que se denomina: resistencia “Knockdown” o “kdr” y es el resultado de alteraciones en la proteína que conforma los canales de sodio dependiente de voltaje (73). Este canal es un poro formado por α -subunidades que consta de una sola cadena polipeptídica con cuatro dominios internos homólogos (I-IV), cada uno con seis hélices transmembranales (S1-S6). Los dominios se ensamblan en un poro acuoso central, bordeado por los S5- S6 linkers (P-loops)(73).

La secuencia del canal de sodio dependiente de voltaje (VGSC) está altamente conservada entre los animales, y debido a su papel fisiológico, hay pocas mutaciones viables en esta molécula (89). Sin embargo, se han encontrado insectos que poseen estas mutaciones y que les confieren resistencia al DDT y piretroides(81,115). El fenotipo *kdr* está asociado con la clásica sustitución leucina a fenilalanina (Leu1014Phe), numeración basada en la secuencia primaria del Na_v de *Musca domestica*. Esta mutación está ubicada en el segmento hidrofóbico 6 del dominio II (IIS6) y está relacionada con la resistencia a piretroides en varias especies de insectos (81,87). En mosquitos esta mutación ha sido relacionada con alta resistencia a piretroides en *Anopheles gambiae* de África, (43,116) y más recientemente en poblaciones de *Culex quinquefasciatus* de México(117).

En *Ae. aegypti* no se ha encontrado la sustitución clásica Leu1014Phe, sin embargo, se han reportado otras sustituciones en el dominio II en los segmentos hidrofóbicos S5 y S6 del canal de sodio: Gli923Val en cepas de Indonesia, Tailandia y Brasil, Leu982Trp en Vietnam, Val1016Gli en Tailandia (113,118) y las mutaciones Ile1011Met, Ile1011Val y Val1016Ile en cepas de Latinoamérica (81,112). En poblaciones de *Ae. aegypti* de América Latina, se han identificado las mutaciones Ile1011Met en Brasil, de las localidades de Belén y Río de Janeiro y en poblaciones de Venezuela, Panamá, Nicaragua, Costa Rica, Cuba, Colombia México y las islas del Caribe, donde se identificaron las mutaciones Ile1011Val, Val1016Ile y Phe1534Cys estas dos últimas asociadas con resistencia a piretroides en Latinoamérica (Figura 8) (22,23,79,88,119–124).

En *Ae. aegypti*, la mutación Val1016Ile fue descrita por primera vez en 2006, donde fue asociada con una alta resistencia al piretroide permetrina; posteriormente una segunda mutación, la Phe1534Cys también se encontró que estaba asociada con la resistencia a los piretroides y se correlacionó con la frecuencia de Val1016Ile (88).

La mutación Val1016Ile se produce por a un cambio en un nucleótido ($G \rightarrow A$) en la primera posición del codón 1016 del dominio II del VGSC; este simple cambio causa una sustitución del aminoácido valina a una isoleucina(112). La mutación Phe1534Cys está ubicada en el dominio III del VGSC, en el codón 1534, donde un cambio del nucleótido T a G, produce una sustitución del aminoácido fenilalanina a una cisteína (123).

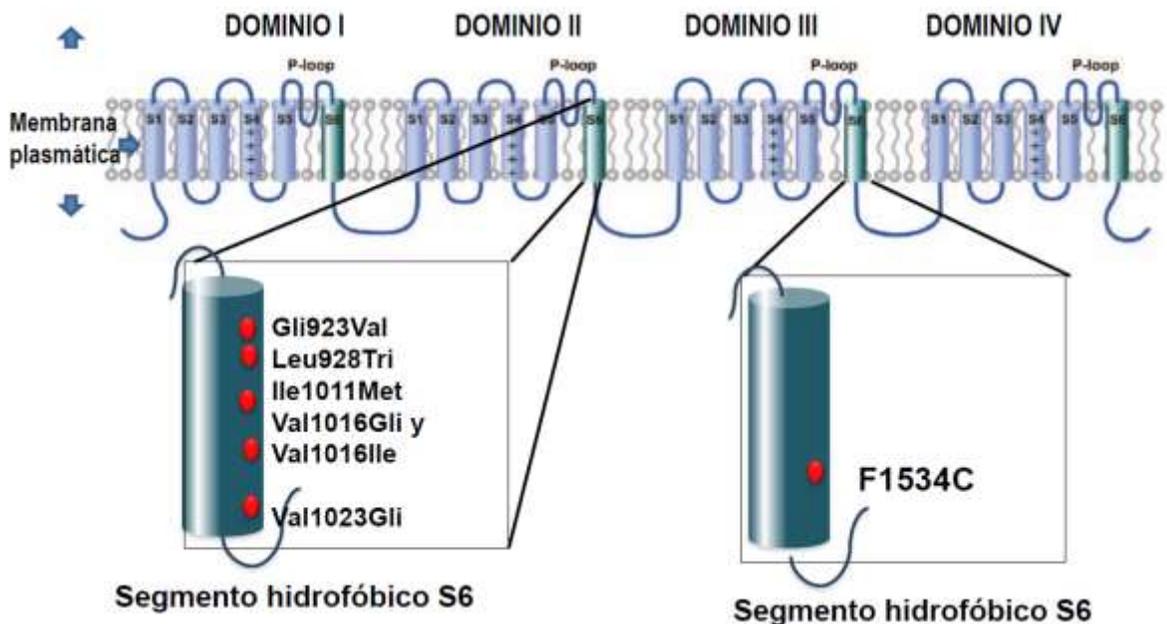


Figura 8. Representación gráfica del canal de sodio dependiente de voltaje de *Aedes (Stegomyia) aegypti* y las mutaciones kdr que confieren resistencia a piretroides.

4.7. Control de *Aedes (Stegomyia) aegypti* en Colombia

Desde los años 50s los programas de control de vectores han aplicado una serie de insecticidas en respuesta a las campañas de erradicación de la malaria y de *Ae. aegypti*; el primer insecticida en ser usado fue el DDT, suspendido posteriormente a finales de los años 90's, en parte por detectarse poblaciones resistentes a este compuesto (125). El primer reporte de resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti*, fue registrado en 1956 en la ciudad de Cúcuta donde se

identificaron poblaciones resistentes al DDT(126). Debido a la suspensión de este compuesto, los insecticidas organofosforados como el temefos, el malatión y el fenitrotión fueron incorporados como insecticidas para uso en salud pública; posteriormente, en el año 1996 se registró por primera vez resistencia al temefos en Cali (Valle del Cauca) (108). A partir de la década de los 90s se inició el uso de piretroides y se ha venido rotando la aplicación de diversas moléculas para el control de mosquitos: deltametrina, lambdacialotrina, ciflutrina, fenitrotión, malatión y pirimifos-metil (125).

En Colombia, debido a que en los últimos tres años las infecciones por DENV, CHIKV y ZIKA se han incrementado por brotes epidémicos en varios departamentos del país, los programas de control vectorial han intensificado sus acciones, orientadas en las guías sobre “Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión del dengue (2012)”(33), como también bajo los parámetros del “Plan nacional de respuesta frente a la introducción del virus CHIKV en Colombia (2014)”(32). Estas dos guías sugieren que para las intervenciones de control de vectores, se utilicen insecticidas adulticidas y larvicidas como los organofosforados malatión, fenitrotión, pirifos-metil y temefos. En el caso de aquellos municipios se haya detectado resistencia al insecticida temefos, se sugiere usar *Bacillus thuringiensis*, como método alternativo del control de los criaderos de *Aedes aegypti*. El uso de los insecticidas piretroides (PYRs) está recomendado en el caso de los toldillos impregnados para la protección del paciente en fase virémica y para control de los mosquitos adultos usando fumigación a ultra bajo volumen (ULV).

Estas guías están basadas de acuerdo a los resultados previos de estudios de resistencia a insecticidas en el país, donde se sugirió el uso del organofosforado malatión para el control del vector del dengue, debido a que fue el único insecticida al cual no se observó resistencia en el país (127). El malatión, es un insecticida que se ha usado en diversos países latinoamericanos, sin embargo su uso es complejo por el rechazo de las poblaciones debido a su fuerte olor y efecto corrosivo, aunado que también se conoce de la existencia de emergencia de resistencia en algunas poblaciones de *Ae. aegypti*. (12,78).

Actualmente el malatión fue eliminado del mercado europeo por la regulación de la comisión europea en 2009 (12) y la OMS ingresó al malatión en el grupo 2A por las "evidencias limitadas" de que produciría linfoma y cáncer de próstata en humanos (12–14). Estos hallazgos sugieren suspender el uso actual del malatión tanto en agricultura como en la salud pública y ser reemplazado por un insecticida con menor grado de toxicidad para los mamíferos y otros organismos vivos.

Entre los insecticidas de uso en salud pública, los piretroides son los que presentan menor toxicidad para los mamíferos, debido a que son seguros para el contacto cercano y tienen un efecto rápido y persistente sobre los mosquitos en dosis bajas (16). Además, son los únicos insecticidas recomendados para el

tratamiento de toldillos, paredes y diferentes materiales (15,16). Lo que hace que estos insecticidas sean de primera línea para su uso en salud pública y hogares. Sin embargo, se ha reportado la emergencia de resistencia a PYRs en varias poblaciones de *Ae. aegypti* del mundo (17,73,81,104,112,128) y en diversas localidades del país, (8,21,22,83,127,129) posiblemente asociada a la constante exposición a esta clase de insecticidas y/o a la resistencia cruzada con otros insecticidas como organofosforados o a la persistencia de resistencia al DDT, insecticida que se utilizó en las campañas antivectoriales por más de 50 años en las Américas(77).

En algunos países de Latinoamérica como México, el uso del malatión fue suspendido al inicio de los años 2000 y reemplazado por piretroides (Comunicación personal MsC. Felipe Dzul); a partir de este año se inició con el uso de piretroides sintéticos combinados con inhibidores de enzimas como elesbiol y butóxido de piperonilo, estos compuestos aumentan la eficacia de los piretroides al inhibir las enzimas de los mosquitos encargadas de detoxificar el ingrediente activo del insecticida en uso; igualmente se recomienda el uso de ciflutrina y bifentrina para aplicaciones a ULV, ya que este formulado es prácticamente inodoro, no mancha, no es corrosivo, no es dañino en personas, vida silvestre y medio ambiente; además, la exposición directa en personas no alérgicas es poco probable que ocasione reacciones adversas (15,16).

Si bien la resistencia a los insecticidas piretroides está presente en las poblaciones de los mosquitos vectores del país, el uso de éstos no se puede limitar, ya que es el producto de uso en los hogares y el que permitirá la introducción de nuevas estrategias de control como el uso de materiales impregnados y fumigaciones espaciales ULV con formulados en base acuosas. Además, los piretroides son menos contaminantes para los organismos y el medio ambiente, minimizando así el impacto de las fumigaciones sobre el mismo.

4.8. Resistencia a los insecticidas de uso en salud pública en Colombia

En Colombia, gracias a varios estudios en poblaciones de campo de *Ae. aegypti* se ha documentado la evidencia de que las poblaciones de esta especie pueda generar resistencia a casi todos los tipos de insecticidas usados en salud pública, incluyendo los organofosforados (que son los que actualmente se están usando) y a los piretroides(127). Se ha observado que este fenómeno varía dependiendo de las localidades y que hay una alta y generalizada resistencia al insecticida DDT, el cual no se usa en Salud Pública en el país desde hace más de 20 años. Otros hallazgos interesantes es que las poblaciones de mosquitos en el país, pueden expresar como mecanismos de resistencia las esterasas y las enzimas P⁴⁵⁰ en respuesta a la presión por estos insecticidas, al igual que otros mecanismos de resistencia asociados a piretroides que han sido evaluados en estudios puntuales

por otros investigadores como las enzimas GST's y las mutaciones Kdr (Tabla 1) (8,21,22,83,125,127)

Durante los años 2004 al 2008 se realizó un mapeo de la resistencia en *Ae. aegypti* de 12 departamentos de Colombia, donde se incluyeron insecticidas que han sido o no usados en salud pública. Este proyecto multicéntrico fue ejecutado por el Centro internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), El programa de Estudio y Control de enfermedades (PECET), la Universidad Nacional de Colombia, el Instituto Nacional de Salud (INS) y Secretarías Departamentales de Salud. Los resultados de este trabajo evidenciaron que en Colombia las poblaciones de *Ae. aegypti* pueden presentar resistencia a casi todos los tipos de insecticidas, incluyendo los organofosforados y los piretroides (127).

En este estudio se reportó que las poblaciones aun pertenecientes al mismo departamento, presentan diferentes grados de susceptibilidad, debido posiblemente a los mecanismos de resistencia asociados. Entre los principales hallazgos fue la detección de una alta resistencia al DDT en todas las poblaciones de *Ae. aegypti*; además varias poblaciones presentaron resistencia a los piretroides lambda-cialotrina, permetrina, etofenprox y deltametrina. Resistencia que puede ser producto de la reacción cruzada entre los piretroides y el DDT, ya que el ingrediente activo de ambos tipos de insecticidas, tiene como sitio de acción el canal de sodio dependiente de voltaje ubicado en las neuronas de los mosquitos(8,21,22,83,125,129) (Figura 6).

La resistencia cruzada entre el DDT y los piretroides puede estar asociada a dos mecanismos principalmente; el primero puede ser el aumento en la actividad de las enzimas GST y en particular la sobre expresión de la GST épsilon 2 (*GSTε2*), que se ha encontrado en cepas DDT resistentes que han sido estudiadas en Colombia(21), y el segundo mecanismo son las mutaciones Kdr. Al parecer en nuestras poblaciones este puede ser el principal mecanismo que explique este fenómeno; Maestre y colaboradores en el 2014 evaluaron siete poblaciones del Caribe Colombiano, donde se registró resistencia a los insecticidas permetrina, ciflutrina, deltametrina y lambda-cialotrina, y en estas poblaciones se reportó por primera vez para *Ae. aegypti* de Colombia la mutación Ile1016 en el gen del canal de sodio dependiente de voltaje (22).

Otro hallazgo interesante de estos estudios es que nuestras poblaciones de *Ae. aegypti* se presenta resistencia generalizada a la lambda-cialotrina (piretroide tipo II), este tipo de insecticida es usado en salud pública en el rociado residual intradomiciliar, como parte de las medidas de control para malaria y dengue en zonas endémicas (21,125), y que también es usado por las comunidades que aplican sistemáticamente aerosoles insecticidas adquiridos en el mercado y cuyo ingrediente activo es este compuesto (83).

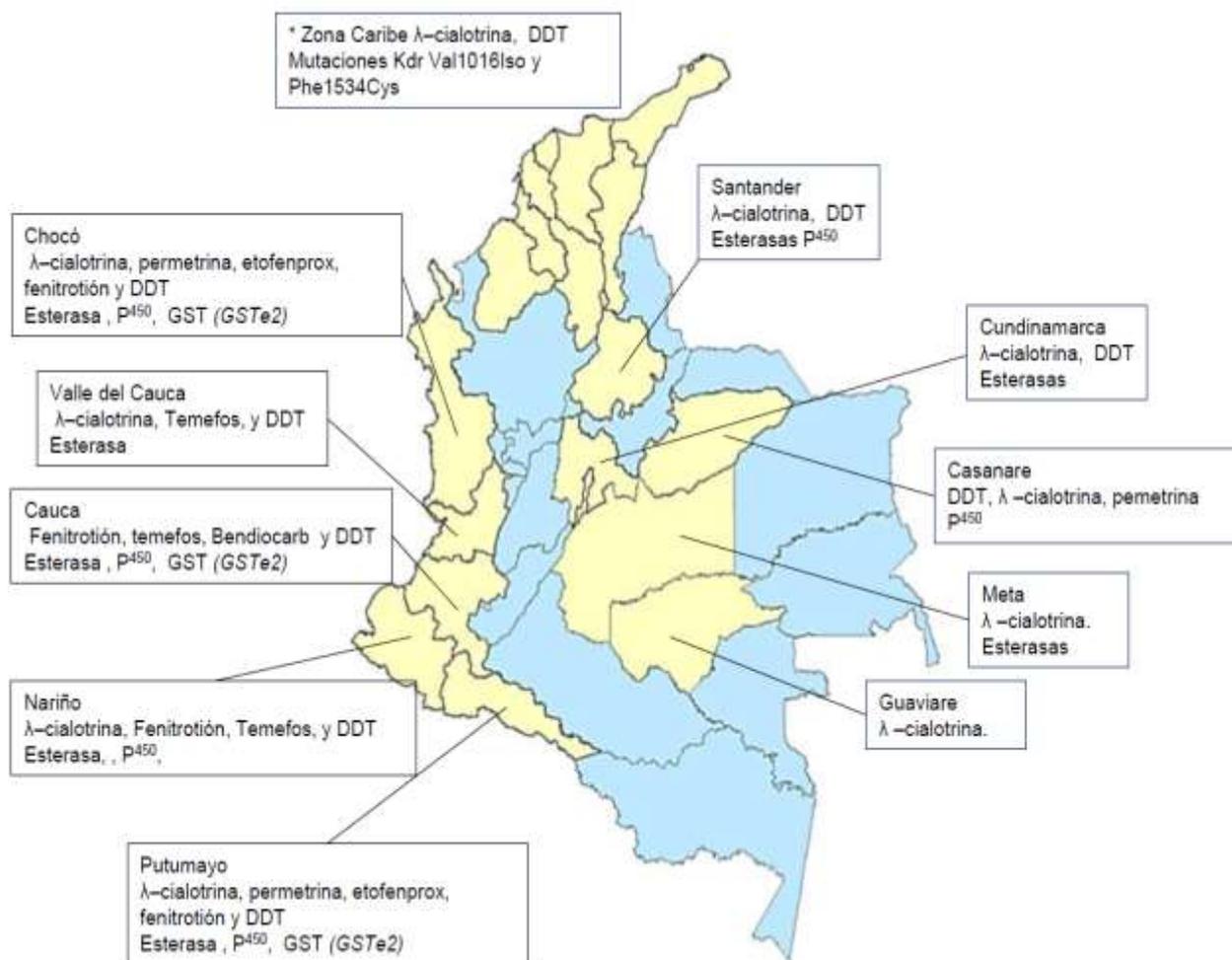


Figura 9. Mapa de la distribución de la resistencia a piretroides y sus mecanismos en *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Colombia 2008-2015 (8,21,22,83,126,127,129).

En aquellas poblaciones de mosquitos donde se ha observado la resistencia a este insecticida, posiblemente el mecanismo que está actuando, es el incremento de la actividad de las enzimas Citocromo P⁴⁵⁰, aunque otros autores han asociado la mutación kdr Phe1534Cys como mecanismo principal de resistencia a piretroides tipo II en poblaciones de *Ae. aegypti* de las Islas Caimán, México, Arabia Saudita, China, Indonesia, Tailandia y Jamaica; inclusive esta mutación es la más frecuente en poblaciones de Venezuela que han sido encontradas como resistentes a lambda-cyhalothrin (78,88,113,114,118,120,123,130).

A continuación en el cuadro 1, se describen los estudios que han reportado resistencia a piretroides en el país y sus potenciales mecanismos asociados.

Cuadro 1. Resistencia a insecticidas piretroides y sus mecanismos en poblaciones de *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Colombia (Años 2004-2017).

Departamento	Piretroide	Mecanismos de Resistencia	Referencia
Antioquia	Labdacialotrina, permetrina, ciflutrina, etofenprox	GST (GSTe2)	(21,127)
Atlántico	Labdacialotrina, deltametrina, permetrina, ciflutrina	Mutación kdr lle1016Val	(22,127)
Caquetá	Labdacialotrina, deltametrina		(83,127)
Casanare	Labdacialotrina, deltametrina, permetrina	Citocromo P ⁴⁵⁰	(127)
Cesar	Labdacialotrina, deltametrina, permetrina		(127)
Chocó	Labdacialotrina, permetrina, etofenprox	Citocromos P ⁴⁵⁰ , GST (GSTe2)	(21,125,127)
Cundinamarca	Labdacialotrina, deltametrina		(83,108,127)
Guainía	Labdacialotrina, deltametrina		(127),
Guaviare	Labdacialotrina		(127)
Huila	Labdacialotrina, deltametrina	Citocromo P ⁴⁵⁰	(8,108,127)
La Guajira	Labdacialotrina		(127)
Magdalena	Labdacialotrina		(127)
Meta	Labdacialotrina, permetrina	Citocromo P ⁴⁵⁰	(83,108,127)
Nariño	Labdacialotrina	Citocromo P ⁴⁵⁰	(8,108,127)
Norte de Santander	Labdacialotrina, deltametrina, permetrina		(127)
Putumayo	Labdacialotrina, permetrina, ciflutrina, etofenprox	Citocromo P ⁴⁵⁰ , GST (GSTe2)	(21,108,127)
Sucre	Deltametrina		(127)
Santander	Labdacialotrina	Citocromo P ⁴⁵⁰	(83,108,127)
Tolima	Labdacialotrina		(127)
Valle del Cauca	Labdacialotrina	Citocromo P ⁴⁵⁰	(2,8,108)
Sucre	Labdacialotrina	Mutación kdr Phe1534Cys	(23)

4.9. Manejo de la resistencia a piretroides y otros insecticidas

“La gestión eficaz de la resistencia a insecticidas solo es posible si se comprenden los mecanismos que sustentan el fenotipo resistente”.(107)

La vigilancia de la resistencia es un paso esencial en la gestión (manejo) de la resistencia a los insecticidas o MRI (IRM “Insecticide Resistance Management”), proporcionando datos base para la detección temprana de la resistencia, la planificación de programas alternativos de control y la selección de plaguicidas adecuados. Conocer el mecanismo de resistencia que está operando en las poblaciones resulta útil pues la selección de los insecticidas debería estar basada en la susceptibilidad de los mosquitos y del mecanismo de resistencia.

En *Ae. aegypti* los bioensayos de la OMS o de CDC (20) al igual que las pruebas bioquímicas (131), son las herramientas más ampliamente utilizadas para identificar el fenotipo de las poblaciones y el mecanismo enzimático asociado a la resistencia en una población de mosquitos en particular. Sin embargo cabe resaltar que existen mecanismos de resistencia a nivel genético, como las mutaciones en los sitios diana de los insecticidas y estas solo pueden ser detectadas por métodos de biología molecular. Estas metodologías no se encuentran disponibles en todas las secretarías de salud, razón por la cual un programa de vigilancia de la resistencia debería ser incorporando en las políticas de cada país, para que los programas de ETV realicen la vigilancia que se encuentra a su alcance y se cuente con el apoyo de los Institutos Nacionales de salud Pública o centros de investigación que tienen la capacidad de realizar técnicas de detección de la resistencia a nivel molecular (131,132).

Se han utilizado diversas estrategias para mantener la eficacia de los insecticidas en salud pública y agricultura; sin embargo no existe una solución mágica para eliminar la resistencia, pero existen varias estrategias útiles que podrían retrasar su propagación, al menos hasta que se disponga de nuevas clases de insecticidas y nuevas herramientas de control (133). Si bien existen varias estrategias de MRI en el marco del control de vectores, que se basan en el uso del rociado residual intradomiciliario (RRI) y los mosquiteros con insecticida de larga duración (MILD)(134), estas estrategias no son aplicables a dengue, chikungunya y Zika debido al comportamiento diurno de *Ae. aegypti*.

El MRI, comprende varias estrategias, una propuesta es la rotación, en la cual se utilizan insecticidas de dos o más clases, con modos de acción distintos, que se van alternando de año en año; el rociamiento en mosaico donde se utiliza un compuesto en una zona y otro en otra. Otro posible planteamiento es el uso de mezcla, donde se emplean dos o más insecticidas de clases diferentes en un solo producto o formulación para tener la seguridad de que el mosquito entrará en contacto con ambas clases al mismo tiempo (131).

En algunos ambientes, las estrategias de manejo de la resistencia pueden implementarse dentro del contexto más general del manejo integrado de vectores. Estas estrategias pueden tener diversos efectos sobre las poblaciones de vectores resistentes, como retrasar la aparición de resistencia, eliminando la presión de selección (por ejemplo, mediante rotaciones) o matando a los vectores resistentes al exponerlos a varios insecticidas por ejemplo, utilizando mezclas con inhibidores enzimáticos.

Los modelos matemáticos de las estrategias de manejo de la resistencia a insecticidas sugieren que una estrategia de rotación de dos o más pesticidas de diferentes grupos químicos puede reducir la tasa, o retrasar la aparición de la resistencia mientras que las frecuencias de genes de resistencia son muy bajas. La base de estos modelos es que, en ausencia de presión de selección individuos que llevan los genes de resistencia, ya sea en su estado homocigótico o heterocigótico están en desventaja selectiva para los homocigotos susceptibles (135,136)

Cuando se tiene conocimiento de que las poblaciones de mosquitos vectores son resistentes a los insecticidas usados en salud pública por los programas de ETV, se recomienda hacer lo siguiente (133):

- ✓ Si la dosis originalmente efectiva fracasa, no se debe aumentar la dosis ni el número de aplicaciones.
- ✓ Si hay historia de aplicaciones con DDT, se debe investigar los mecanismos de resistencia presentes en las poblaciones de mosquitos antes de usar los piretroides. Hay que recordar que el DDT y los piretroides comparten el *Kdr* como mecanismo de resistencia.
- ✓ No se recomienda mezclar los piretroides con otros insecticidas hasta que se conozcan los mecanismos de resistencia de la población.
- ✓ En caso de sospecha de resistencia a los PYR se debe restringir su uso a una sola generación por temporada.
- ✓ Si existe resistencia cruzada negativa entre piretroides y organofosforados. La rotación entre piretroides y organofosforados retrasan el desarrollo de resistencia.
- ✓ Si existe evidencia de resistencia, lo mejor es realizar programas de prevención y control dirigidos hacia la fase acuática de los mosquitos, tratando los criaderos con larvicidas biológicos, reguladores de crecimiento o el uso de metodologías alternas.

5. CAPÍTULO I

Estado de la susceptibilidad a insecticidas piretroides (tipo I y II) en cepas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* seleccionadas en el laboratorio y de poblaciones de campo

5.1. Materiales y métodos

5.1.1 Obtención del material biológico

El estudio se realizó en el laboratorio de entomología médica del Grupo de Biología y Control de Vectores que pertenece al Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) ubicado en la ciudad de Cali-Colombia.

Para desarrollar esta propuesta, se utilizaron once cepas de *Ae. aegypti* con diferentes orígenes, cuatro cepas de laboratorio (una susceptible y tres resistentes) y siete cepas de campo. Como control de susceptibilidad se utilizó la cepa Rockefeller y como control de resistencia se utilizaron tres cepas que han sido seleccionadas con diferentes insecticidas. Las siete cepas colectadas en campo pertenecen a diferentes localidades del país. Los huevos y las larvas de *Ae. aegypti* pertenecientes a estas cepas fueron transportadas hasta el laboratorio de entomología del Cideim en la ciudad de Cali.

A partir del material entomológico, se establecieron las colonias de *Ae. aegypti*, en condiciones de laboratorio y bajo todos los estándares de cría, con el propósito de obtener suficientes individuos para realizar los bioensayos de susceptibilidad y subsecuentes pruebas bioquímicas, moleculares y proteómicas.

5.1.1.1. Cría en el laboratorio

Los mosquitos pertenecientes a las cepas seleccionadas en el laboratorio y las cepas de campo, fueron criados bajo condiciones estándares de laboratorio: $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% humedad relativa y 12:12 (día: noche) ciclo de luz. Las larvas fueron mantenidas en contenedores plásticos a una densidad de 300 larvas /2L de agua. Las larvas eran alimentadas diariamente con 2 ml de una solución stock de hígado de res (DIFCOTM – 8g/400mL).

Una vez se observaban pupas, éstas eran retiradas de los contenedores de las larvas y eran depositadas en vasos de plásticos limpios que contenían aproximadamente 30 ml de agua; estos vasos eran introducidos en jaulas de emergencia diseñadas para tal efecto. Una vez los adultos emergen, estos eran alimentados con una solución azucarada al 10%, posteriormente se realizaba la alimentación con sangre, que se llevó a cabo con hámsteres debidamente

sedados, bajo todas las condiciones de ética animal (Resolución 8430 de 1993) y con la autorización del comité de ética del CIDEIM (Anexo I).

5.1.1.2. Cepas de referencia

Cepa de referencia susceptible: La cepa ROCKEFELLER de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ha sido mantenida bajo condiciones de laboratorio sin selección a insecticidas, fue suministrada por el CDC y es una de las cepas mundialmente utilizada como referencia de susceptibilidad. Esta cepa se caracteriza por ser completamente susceptible a los insecticidas piretroides, organofosforados y carbamatos.

Cepas de referencia de resistencia: En el laboratorio de entomología del CIDEIM contamos con tres cepas de *Ae. aegypti* que han sido seleccionadas con tres clases de insecticidas. Estas cepas han sido denominadas: cepa DDT, cepa propoxur, y cepa lambdacialotrina.

El origen de estas cepas data desde el año 2008, realizado como parte del proyecto “Evaluación del estado actual de la resistencia a insecticidas de los principales vectores de malaria, dengue y fiebre amarilla urbana en Colombia e iniciación de la red nacional de vigilancia de la resistencia a insecticidas” financiado por Colciencias.

Proceso de selección de la resistencia

El proceso de selección se inició a partir de una mezcla de mosquitos colectados en el Valle del Cauca y Huila, que mostraron resistencia a los insecticidas DDT, propoxur, fenitrotión, temefos o lambdacialotrina. La población mixta se dividió en tres grupos que fueron sometidos independientemente a exposiciones seriadas de DDT, propoxur y lambdacialotrina. La selección por fenotipo se llevó a cabo en generaciones alternas para permitir que la población se recuperara de cualquier limitación de la condición física debido a la endogamia o por la aparición de genes deletéreos.

El proceso de selección de las cepas en el laboratorio, se realizó utilizando la metodología descrita por Ocampo *et al.* 2011 (8) por medio de los bioensayos de CDC descrito por Brogdon(20) con algunas modificaciones. Este ensayo consistió en impregnar cuatro botellas “Wheaton” de 250 ml con un 1 ml de la solución del insecticida (insecticida grado técnico + etanol absoluto) que contenía la concentración a la cual se expusieron los mosquitos. Para asegurar que la botella quedara completamente impregnada, las botellas fueron rotadas de tal forma que todas sus paredes estuvieran expuestas al insecticida y se dejó evaporar el etanol en un lugar seco y oscuro para evitar la degradación de los insecticidas debido a la luz.

Una vez las botellas estaban listas, grupos de hembras y machos de *Ae. aegypti* de aproximadamente 3 a 5 días de edad, pertenecientes a cada una de las cepas fueron transferidos con un aspirador bucal, a las botellas previamente expuestas a los insecticidas con los que han sido seleccionados.

Para la cepa DDT, los mosquitos fueron expuestos durante 30 min a una concentración de DDT de 150 µg/ml; para la cepa propoxur la exposición fue de 40 min a una concentración de propoxur de 15 µg/ml; y para la cepa lambdacialotrina la exposición se realizó durante 10 min a una concentración de 6,25 µg/ml. Los adultos sobrevivientes fueron retirados cuidadosamente de las botellas y pasados a jaulas limpias, donde se les permitió alimentarse con sangre para obtener huevos (8).

Como resultado de este proceso de selección en el laboratorio se han obtenido las cepas DDT, propoxur y lambdacialotrina. La cepa DDT se caracteriza por ser resistente a DDT y lambdacialotrina. La cepa propoxur es resistente a propoxur y lambdacialotrina, y la cepa lambdacialotrina es altamente resistente a este insecticida y ha demostrado una fuerte resistencia cruzada con propoxur. Para este estudio se utilizaron las cepas DDT F₃₀, Propoxur F₂₉ y lambdacialotrina F₂₉.

Estas cepas de laboratorio se utilizaron como un modelo biológico, que permitan entender la evolución del fenómeno de la resistencia cuando poblaciones de mosquitos han sido presionados con el mismo insecticida durante varias generaciones.

Cepas de campo

Se evaluaron siete cepas de campo con previa información de resistencia a piretroides, obtenidas a partir de larvas colectadas en diferentes localidades pertenecientes a los departamentos del Valle del Cauca (ciudades Buga, Palmira, Yumbo y un barrio en Cali "Paso del Comercio"), Santander en la ciudad de Girón y de Medellín en el departamento de Antioquia (figura 10). Todas las localidades usadas para este estudio fueron seleccionadas porque tenían antecedentes de resistencia a los insecticidas usados en salud pública.

Los huevos de *Ae. aegypti* de los municipios Palmira y Yumbo fueron facilitados por la Dra. Maria Elena Cuellar del Laboratorio de Salud Pública del departamento del Valle del Cauca. Las muestras de Buga y Paso de Comercio (municipio de Cali), se obtuvieron a partir de larvas colectadas en criaderos artificiales por el equipo de CIDEIM, que fueron criadas bajo condiciones en el laboratorio para obtener las filiales 1 y 2.

Las muestras de Girón fueron colectadas en larvas, por los auxiliares del programa de ETV del municipio, y criadas en condiciones de laboratorio en la Universidad Industrial de Santander, sede Guatibará. Los huevos de la filial 1 de estos mosquitos fueron enviados al Laboratorio de Entomología del CIDEIM en Cali.

En el departamento de Antioquia, las muestras fueron facilitadas por la Secretaría de salud de Medellín. Huevos de *Ae. aegypti* fueron recolectadas en la ciudad usando ovitrampas, ubicadas en cinco barrios de la ciudad y que han sido sometidos a diferentes intensidades de fumigaciones con el insecticida malatión. Los huevos de mosquitos correspondientes a tres barrios (Versalles I, Picacho y la Colina) con fumigación frecuente, fueron puestos juntos, y los adultos obtenidos se llamaron cepa Medellín (AF); mientras que los huevos correspondientes a dos barrios (Villanueva y Altos del Poblado) con historia de baja fumigación, se pusieron a eclosionar juntos, y se llamaron Medellín (BF).

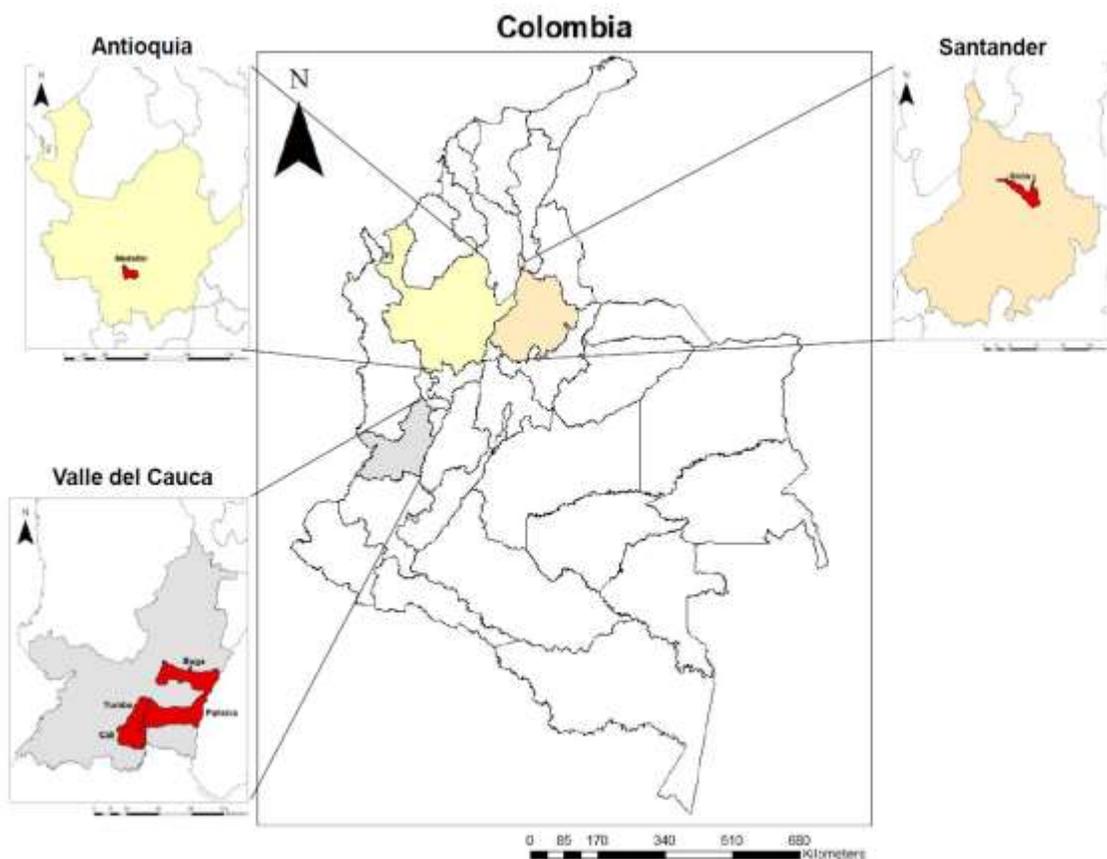


Figura 10. Localidades seleccionadas donde se colectaron *Aedes (Stegomyia) aegypti* usados en el presente estudio.

5.1.2. Bioensayos de botellas CDC

5.1.2.1. Pruebas en botellas CDC para la determinación de la línea base

Se utilizaron las dosis diagnósticas (DD) de piretroides y del DDT previamente calculadas en estudios de Colombia (8,22,83,129). Con el fin de comprobar si estas dosis podían ser usadas en nuestro estudio o se debían ajustar, tres diferentes concentraciones de los insecticidas piretroides fueron evaluadas (tabla 2). La concentración 2 correspondía a la DD que ha sido usada por el Instituto Nacional de Salud en la vigilancia de la resistencia a insecticidas de los mosquitos vectores en Colombia y por otros investigadores (8,21,83,127).

Las dosis diagnósticas (DD) corresponden a las dosis mínimas a las que se produjo una mortalidad del 99-100% en la cepa de referencia (Rockefeller) durante el período de tiempo más corto.

Cuadro 2. Dosis de los insecticidas piretroides usados para determinar la dosis diagnósticas (DD).

Insecticida	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3
Permetrina	12 µg/ml	21,5 µg/ml	31 µg/ml
Deltametrina	3 µg/ml	6,25 µg/ml	9,3 µg/ml
Lambdacialotrina	3 µg/ml	6,25 µg/ml	9,3 µg/ml

Para el insecticida DDT se evaluaron nueve concentraciones, debido a que con la DD de 150 µg/ml que es la usada por el INS no logró el 100% de la mortalidad en la cepa Rockefeller, por lo tanto se tuvo que determinar de nuevo la DD (posiblemente el lote del reactivo estándar varía su eficacia o el isómero del insecticida no fue el adecuado). Se tomó como DD aquella dosis a la cual se alcanzó el 90% de la mortalidad en la cepa Rockefeller, pues no se pudo alcanzar el 100% de la mortalidad usando este insecticida. Las concentraciones evaluadas para DDT fueron de 100, 150, 200, 300, 400, 600, 1000, 1300 y 2000 µg/ml.

El cálculo de las dosis diagnósticas (DD) y los umbrales de resistencia en el tiempo diagnóstico (TD), se obtuvieron a partir de los ensayos CDC de botellas impregnadas(20), utilizando como referencia la cepa susceptible Rockefeller.

Las botellas se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Brogdon & Chan (20), usando como solvente etanol. Las botellas fueron impregnadas como se describió anteriormente (página 54). Cada evaluación consistió en cuatro botellas impregnadas con 1 ml del tratamiento (concentración del insecticida + etanol absoluto) y una botella control impregnada solamente con 1ml de etanol absoluto. Todas las concentraciones de los insecticidas fueron evaluadas por triplicado.

De 15 a 20 hembras de mosquitos fueron introducidas en cada una de las botella impregnadas con las concentraciones que serían evaluadas. El número de mosquitos muertos o vivos se registró a intervalos de 5 min durante una hora (anexo II), aquellos mosquitos incapaces de volar o mantener una postura erguida en la superficie de la botella fueron considerados muertos.

Los resultados de las pruebas CDC son expresados en porcentajes de mortalidad a las dosis diagnósticas. Se construyeron gráficas de tendencia, donde el eje Y representaba la mortalidad y el X ,el tiempo de exposición.

5.1.2.2. Pruebas de susceptibilidad a insecticidas

El estado de susceptibilidad a los insecticidas piretroides, DDT, propoxur y malatión, en las cepas seleccionadas en el laboratorio y de campo, fue determinado por medio de bioensayos en botella CDC, usando para los piretroides y DDT las dosis diagnósticas (DD) previamente calculadas y para malatión y propoxur las DD usadas por la red de vigilancia de la resistencia a insecticidas del INS.

Los insecticidas evaluados fueron:

- **Permetrina (21,5 µg/ml)** Chem Service (Lote 3373000, N-12848-250MG)
- **Deltametrina (6,25 µg/ml)** SIGMA (Lote SZ13C059XV)
- **Lambdacialotrina (6,25 µg/ml)** Chem Service (Lote 3123900, N-12307-100MG)
- **DDT (2000 µg/ml)** Chem Service (Lote 3871600, N-11567-250MG) Mixture p-p' & o,p'
- **Propoxur (12,5 µg/ml)** Chem Service (Lote 3050100, N-11128-250MG)
- **Malatión (100 µg/ml)** Chem Service (Lote 3494600, N-1246-100MG)

Para estas pruebas se usaron hembras de 3 a 5 días post emergencia y alimentadas solamente con solución azucarada. Con un aspirador bucal se introdujeron entre 15 a 20 mosquitos en botellas "Wheaton" de 250 ml, impregnadas con la correspondiente dosis del insecticida a evaluar. Cada prueba consistió en cuatro botellas impregnadas con 1 ml de la preparación del insecticida y una botella control impregnada con 1 ml de etanol. Cada prueba se hizo por triplicado para obtener al final aproximadamente entre 120-300 mosquitos evaluados por insecticida y por cepas o población.

Al ser expuestos a las dosis diagnósticas, se registró el número de mosquitos muertos o vivos a intervalos de 5 min durante 1 h (ver formato anexo 2). Después de la exposición a 60 min, todos los mosquitos fueron transferidos a un vaso

plástico libre del insecticida y fueron alimentados con una solución azucarada al 10% en una mota de algodón. La mortalidad a las 24 horas post-exposición también se registró, con el objetivo de observar el fenómeno de derribo, lo que nos podría indicar la presencia del mecanismo de kdr.

El estatus de resistencia se evaluó de acuerdo al criterio: mortalidad entre el 98 – 100% indica que la población de mosquitos evaluada es susceptible; mortalidad menor o igual al 80% se considera que la población es resistente y mortalidades entre 97-80% requiere confirmación del mecanismo de resistencia, por lo que los resultados de las pruebas CDC se correlacionan con los resultados de las pruebas bioquímicas y moleculares (20).

Se usó la fórmula de Abbott para corregir la mortalidad observada de las pruebas de bioensayos en el caso que las mortalidades en el control se encontraran entre 5-20%. Si las mortalidades eran superiores, esta prueba se descartaba y se repetía nuevamente (20).

$$\frac{\% \text{ de mortalidad de la prueba} - \% \text{ mortalidad del control}}{100 - \% \text{ mortalidad del control}} \times 100$$

Con los resultados de los bioensayos de CDC, se realizaron gráficas de tendencia, donde el eje Y representa el porcentaje de mortalidad (eje Y) contra el tiempo (eje X). Estos resultados se expresan como el % de mortalidad con las DD al tiempo diagnóstico y basado en el umbral definido para la cepa susceptible (Rockefeller).

Los porcentajes de mortalidad obtenidos se presentaron en una cuadro, las filas representan las localidades evaluadas y las columnas los porcentajes de mortalidad obtenidos de acuerdo al insecticida evaluado.

5.1.2.3. Bioensayos de larvas de la OMS

Los bioensayos de larvas se realizaron con temefos obtenido de Chem Service® (West Chester, PA, EE. UU.) Siguiendo el protocolo de la OMS (137). El estado de susceptibilidad al larvicida temefos se evaluó en larvas de tercer y cuarto instar de *Ae. aegypti* de las cepas seleccionadas en el laboratorio y de las cepas colectadas en campo, utilizando la dosis de diagnóstico calculada en el laboratorio. La dosis diagnóstica fue de 0,012ppm. Veinte larvas, depositadas en vasos desechables limpios que contenían 100 ml de agua declorada, fueron expuestas a esta dosis y los resultados se expresaron como las tasas de mortalidad 24 h después de la exposición a temefos.

5.2. Resultados

5.2.1. Bioensayos de CDC para la determinación de la línea base insecticidas piretroides y DDT

5.2.1.1. Insecticidas piretroides

La dosis diagnóstica (DD) calculada para el insecticida permetrina fue de 21,5 µg/ml y el tiempo diagnóstico (TD) fue de 45 min (Figura 11). Esta dosis coincide con la reportada en los estudios previos. Sin embargo el TD fue diferente, ya que para nuestro estudio fue de 45 min, mientras el observado anteriormente fue de 15 min.

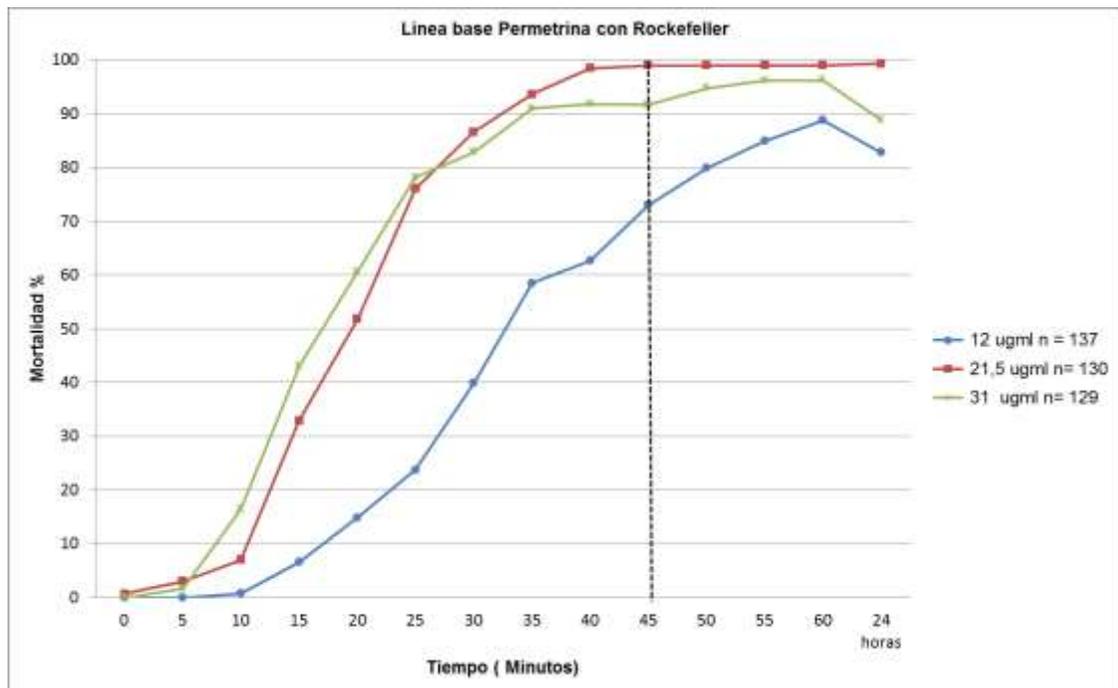


Figura 11. Línea base calculada para el insecticida permetrina.

Las dosis diagnósticas calculadas para deltametrina (figura 12) y lambdacialotrina (figura 13), coincidieron con la dosis usada por el INS, sin embargo el TD fue más largo para ambos insecticidas (40 min). El TD usado por el INS para deltametrina es de 30 min, mientras que para lambdacialotrina ha sido de 15 min.

A pesar de que los tiempos diagnósticos no coincidieron con los calculados para otros estudios, las DD siguen siendo las mismas. Para nuestro estudio usamos los TD calculados por nosotros, ya que es el tiempo en el cuál se obtuvo una mortalidad del 99- al 100 % en la cepa Rockefeller que usamos como referencia de susceptibilidad.

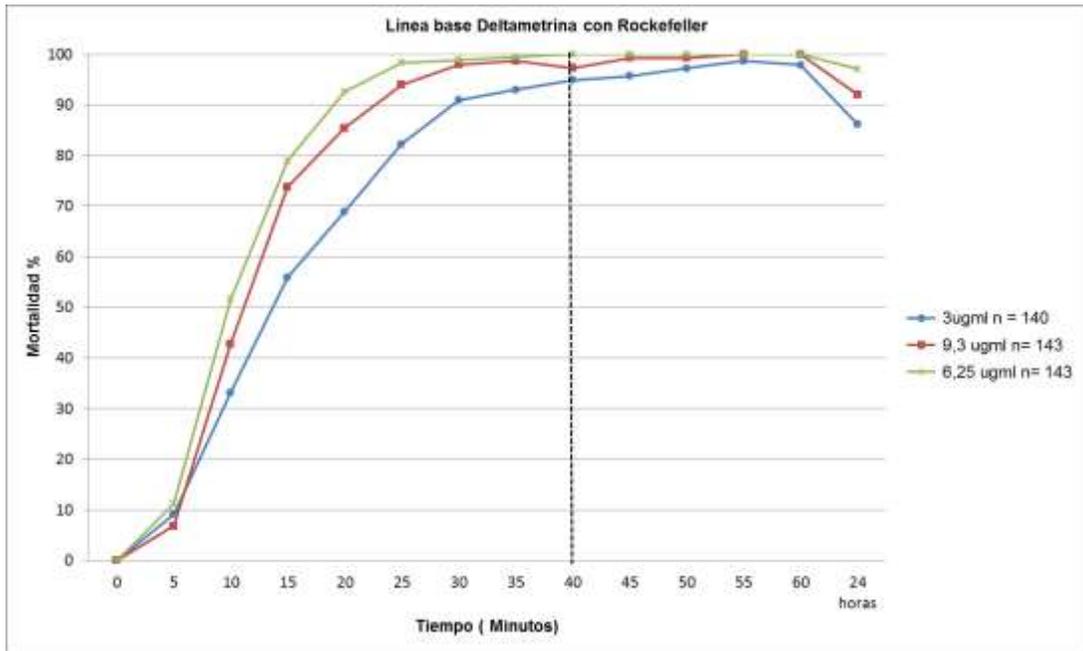


Figura 12. Línea base calculada para el insecticida deltametrina.

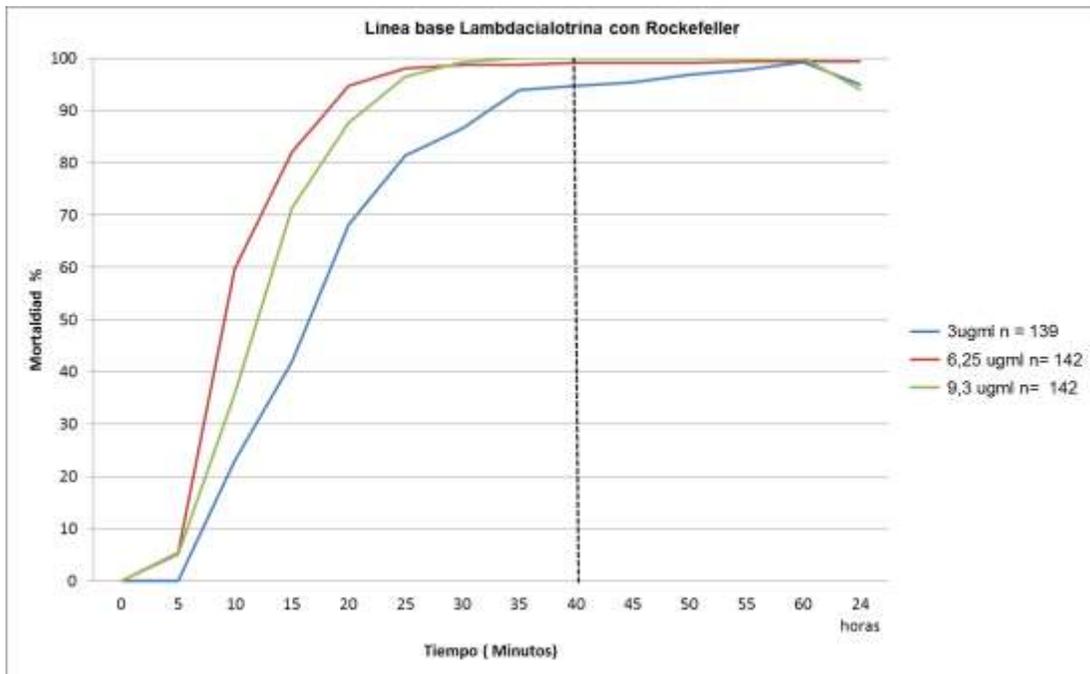


Figura 13. Línea base calculada para el insecticida lambdacialotrina.

5.2.1.2 .Insecticida DDT (dicloro difenil tricloroetanol)

Nueve concentraciones de DDT fueron evaluadas debido a que con la DD usada por el INS que es de (150 µg/ml), se obtuvo una mortalidad muy inferior a la esperada (30% de mortalidad) al tiempo diagnóstico usado por el INS que es de 30 min.

Para la determinación de la DD para el DDT, las dosis evaluadas fueron aumentadas gradualmente, con el fin de encontrar aquella que produjera el 100% de mortalidad en la cepa Rockefeller, sin embargo esto no fue posible. La mayor mortalidad (90%), se obtuvo con una dosis máxima de (2000 µg/ml); se decidió entonces dejar esta dosis como DD, ya que debido al volumen limitado la concentración del insecticida grado técnico que se estaba evaluando, no era posible obtener una concentración mayor a esta.

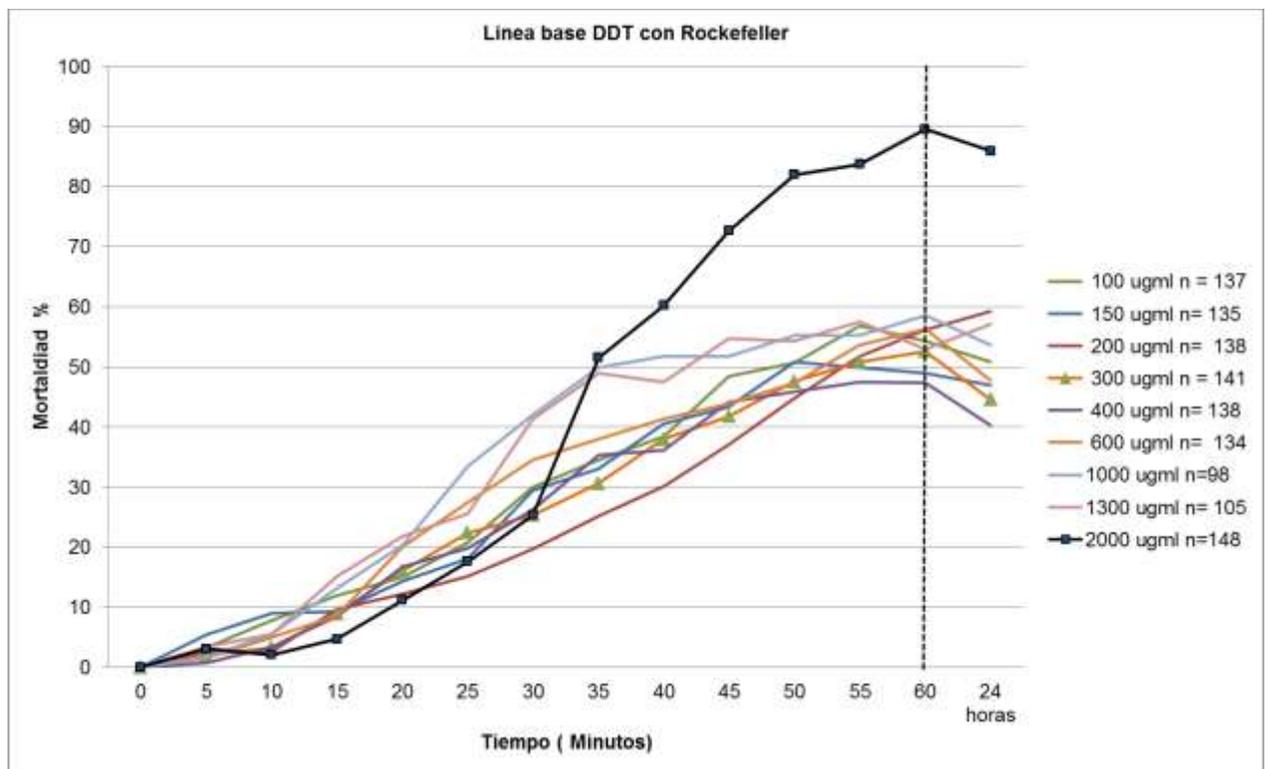


Figura 14. Línea base calculada para el insecticida DDT.

Con el fin de comprobar la efectividad del producto en otras cepas de referencia susceptibles; la concentración de 2000 µg/ml, fue evaluada en las cepas Liverpool y New Orleans (figura 15), estas dos cepas de laboratorio han sido usadas como referencia de susceptibilidad en estudios de resistencia a insecticidas en varios países del mundo (101,102,112,114,123,138)

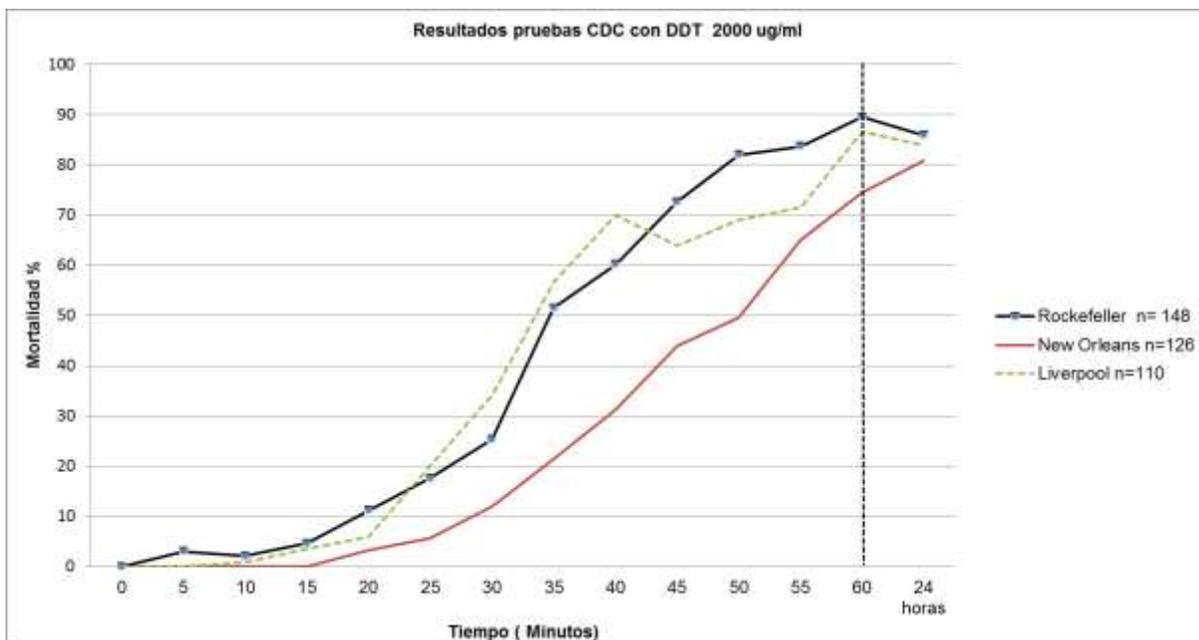


Figura 15. Línea base de DDT con tres cepas de *Ae. aegypti* usadas como referencia para susceptibilidad (Rockefeller, New Orleans y Liverpool).

Lo que se observó es que a la concentración de 2000 µg/ml para DDT, las otras dos cepas de referencia evaluadas, obtuvieron mortalidades inferiores a la cepa Rockefeller. La cepa Liverpool obtuvo una mortalidad de 86.6%, mientras que la cepa New Orleans obtuvo 74.5 %. Estos resultados nos permitieron observar que la cepa Rockefeller era más susceptible a este insecticida cuando se compara con las otras dos cepas de referencia de susceptibilidad que se han usado a nivel mundial.

5.2.2. Pruebas de susceptibilidad a insecticidas piretroides

Los resultados de los bioensayos CDC para medir la susceptibilidad a permetrina, deltametrina y lambdacialotrina se muestran en las figuras 16, 17 y 18 respectivamente.

5.2.2.1 Estado de la susceptibilidad a permetrina

La mayoría de las cepas fueron resistentes a este piretroide tipo I, excepto Medellín (AF) F₂; seguida de la cepa DDT F₃₀ que mostró una susceptibilidad reducida a este insecticida (figura 16). Como se puede observar en la gráfica, los mosquitos de campo que mayor resistencia mostraron para permetrina fueron los pertenecientes a Girón F₁ y la cepa de laboratorio más resistente fue la cepa lambdacialotrina F₂₉.

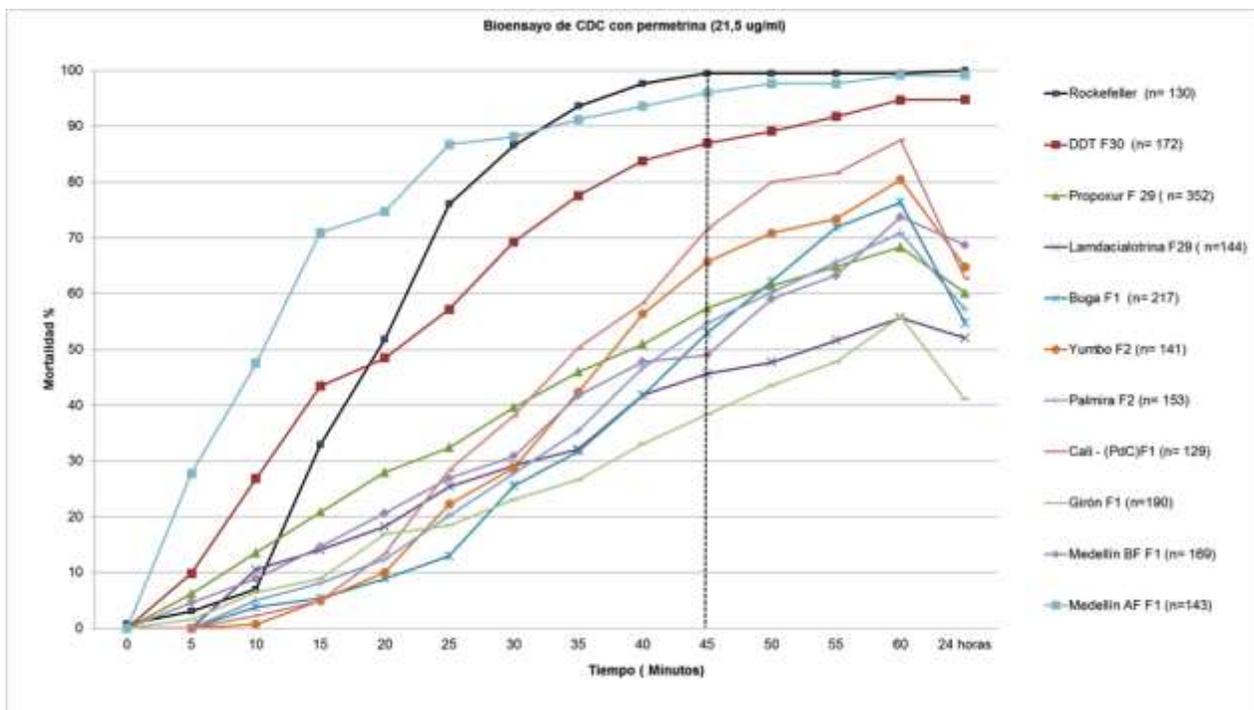


Figura 16. Resultados de los bioensayos de CDC para la permetrina (21,5 µg/ ml). Las tasas de mortalidad por debajo del 80% del (TD) (líneas verticales) son consistentes con resistencia al insecticida evaluado.

5.2.2.2. Estado de la susceptibilidad a deltametrina

Como se puede observar en la gráfica 17, Medellín (BF) F₂ fue la cepa de campo más resistente a este insecticida y tuvo el menor porcentaje de mortalidad a este tiempo (51%). Por otro lado todas las cepas seleccionadas de laboratorio fueron resistentes a este piretroide. Los porcentajes de mortalidad en la cepas de campo se encontraron entre 81.5% a 94.0%, de acuerdo a los criterios de determinación de resistencia, estas poblaciones han perdido susceptibilidad y se requiere confirmación del mecanismo de resistencia.

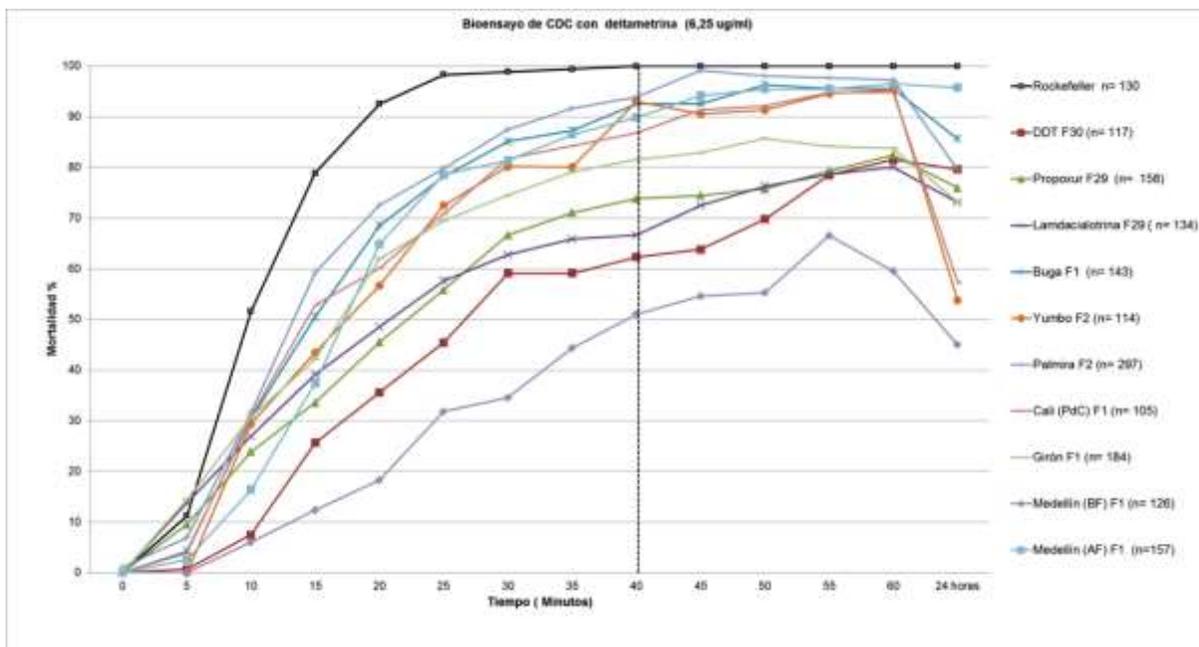


Figura 17. Resultados de los bioensayos de CDC para la deltametrina (6,25 µg/ml). Las tasas de mortalidad por debajo del 80% del (TD) (líneas verticales) son consistentes con resistencia al insecticida evaluado.

5.2.2.3. Estado de la susceptibilidad a lambdialotrina

Las poblaciones de campo Palma F₂ y Cali- (PdC) F₂ tuvieron la mayor tasa de mortalidad para este insecticida (91,9 y 91,5%), respectivamente (gráfica 18). Girón F₁ y Medellín (BF) F₂ fueron las cepas de campo mas resistentes a este insecticida. La cepa de laboratorio lambdialotrina F₂₉ registró la menor tasa de mortalidad en el tiempo diagnóstico.

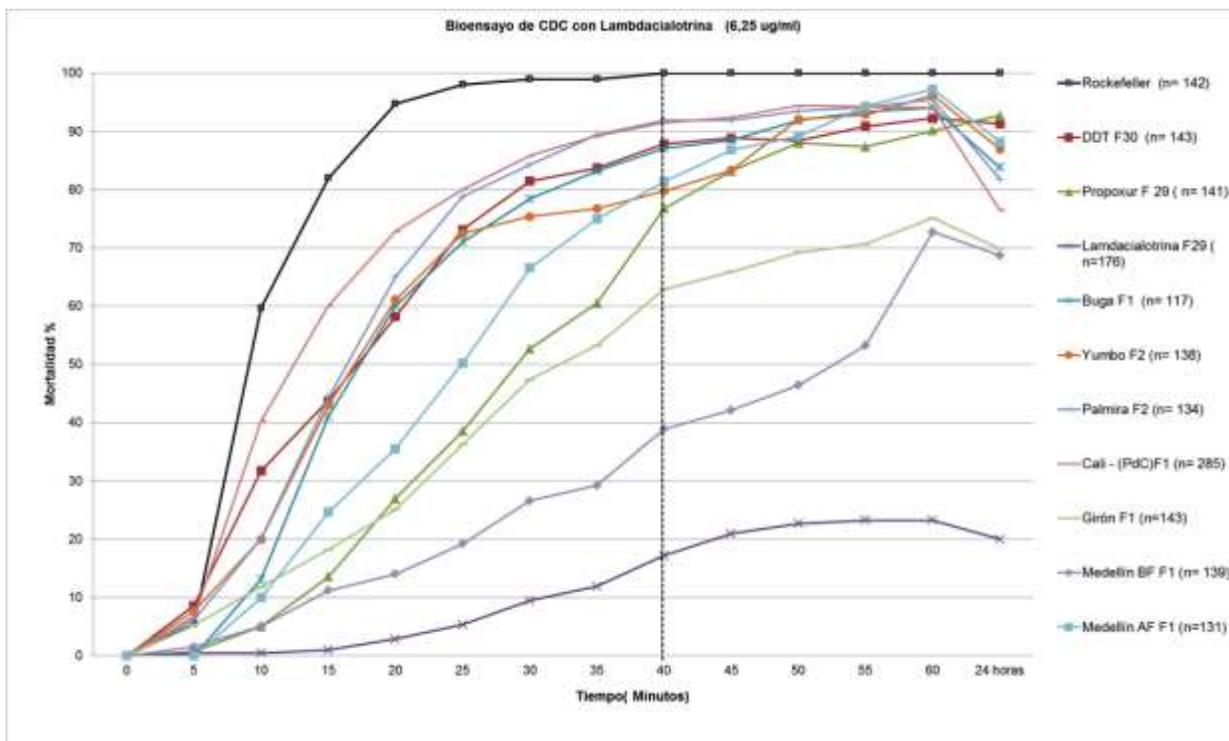


Figura 18. Resultados de los bioensayos de CDC para la lambdacialotrina (6,25 $\mu\text{g/ml}$). Las tasas de mortalidad por debajo del 80% del (TD) (líneas verticales) son consistentes con resistencia al insecticida evaluado.

5.2.3. Pruebas de susceptibilidad a insecticidas DDT, propoxur y malatión

5.2.3.1. Estado de la susceptibilidad a DDT

El estado de la susceptibilidad a este insecticida se evaluó usando la DD calculada anteriormente (2000 $\mu\text{g/ml}$), con la cual se alcanzó el 90% de la mortalidad en la cepa Rockefeller. Las cepas seleccionadas en el laboratorio obtuvieron los mayores porcentajes de mortalidad. La cepa DDT presentó una mortalidad del 80%, seguida por lambdacialotrina (78%) y propoxur del 58%.

Las poblaciones de campo presentaron mortalidades por debajo del 50%, estas oscilaron entre el 42% al 0%. Siendo Medellín BF F₁ la cepa de campo más resistente, ya que ningún mosquito expuesto a la DD murió.

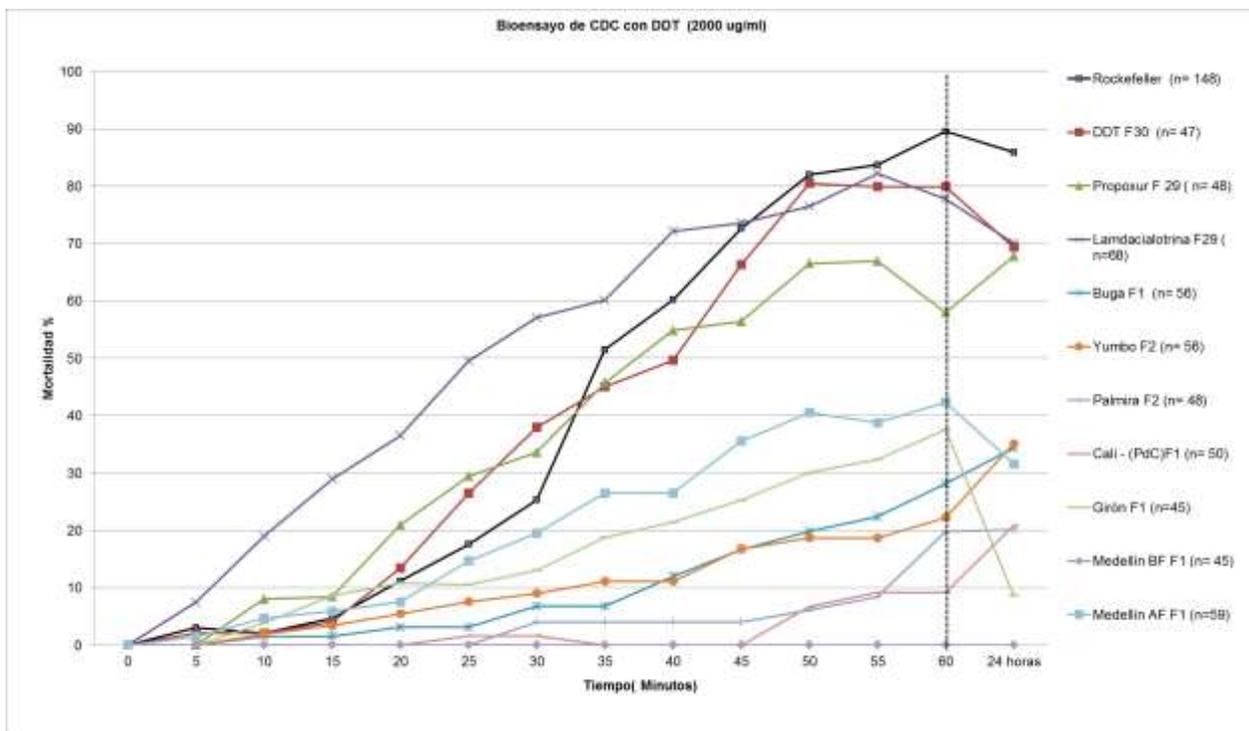


Figura 19. Resultados de los bioensayos de CDC para DDT (2000 µg/ml). Las tasas de mortalidad por debajo del 80% del (TD) (líneas verticales) son consistentes con resistencia al insecticida evaluado.

5.2.3.2. Estado de la susceptibilidad a propoxur

Todas las cepas de laboratorio fueron resistentes a este insecticida, de las cuales la cepa lambdaialotrina fue la que mostró mayor resistencia. Solo una cepa de campo (Cali- (PdC) F₂) mostró pérdida de susceptibilidad a este insecticida. En contraste, seis de siete poblaciones de campo mostraron una alta susceptibilidad a este insecticida (figura 14).

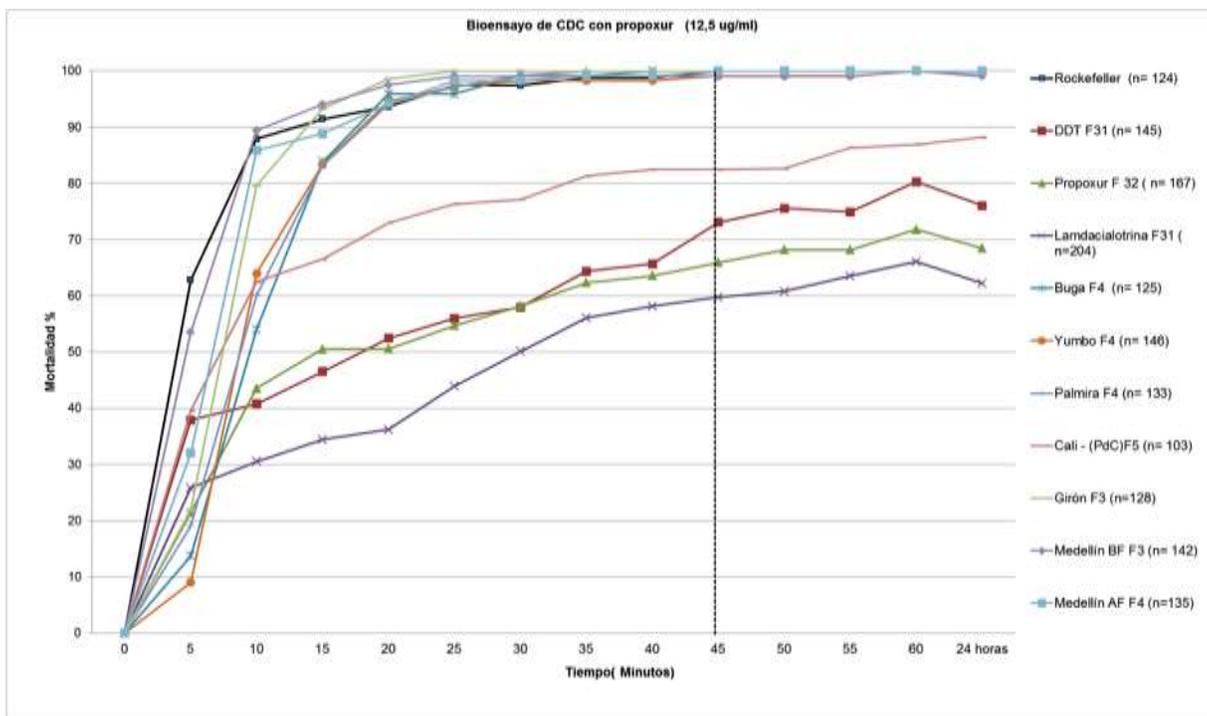


Figura 20. Resultados de los bioensayos de CDC para Propoxur (12.5 µg/ml). Las tasas de mortalidad por debajo del 80% del (TD) (líneas verticales) son consistentes con resistencia al insecticida evaluado.

5.2.3.3. Estado de la susceptibilidad a malatión

Como se puede observar en la gráfica 21, todas las cepas registraron mortalidades por encima del 80%. Algunas cepas inclusive registraron el 100% de mortalidad antes del tiempo diagnóstico estimado (45 min). Las cepas propoxur, Yumbo F₂, Cali- (PdC) F₂, y Medellín (BF) F₁ fueron susceptibles a este insecticida.

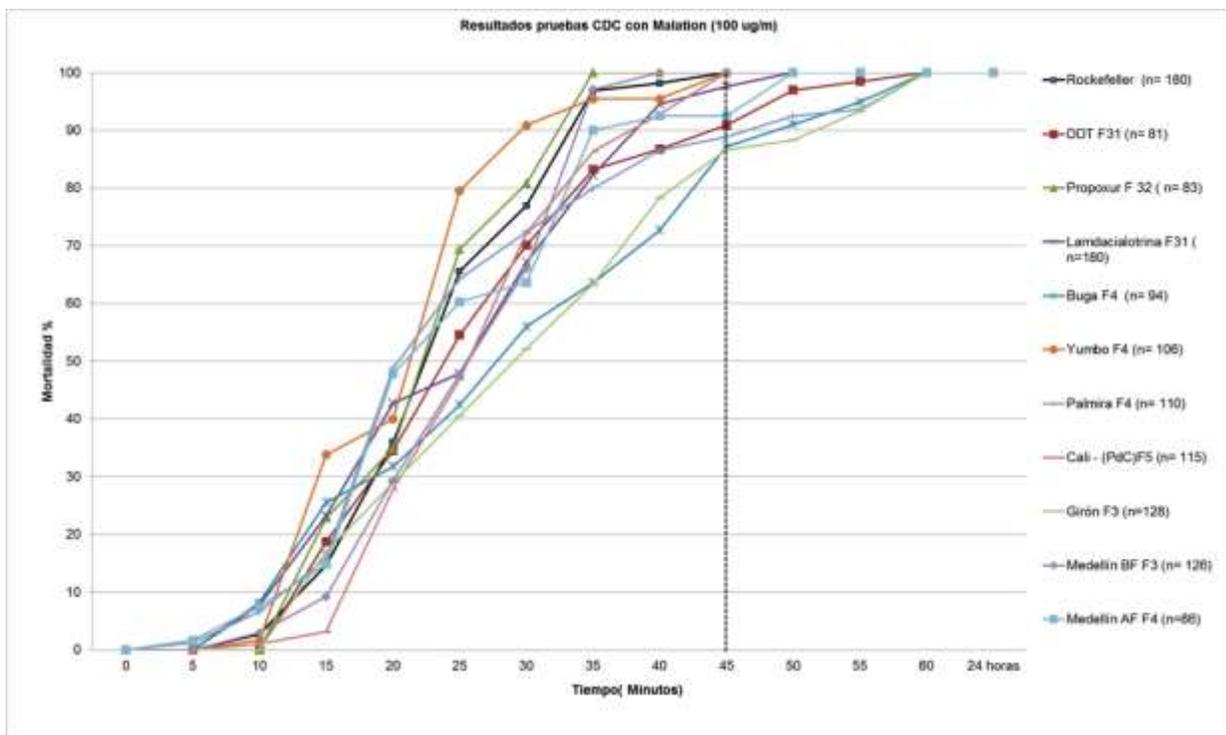


Figura 21. Resultados de los bioensayos de CDC para malatión (100 µg/ml). Las tasas de mortalidad por debajo del 80% del (TD) (líneas verticales) son consistentes con resistencia al insecticida evaluado.

5.2.3.4. Estado de la susceptibilidad a temefos

La mayoría de las cepas evaluadas fueron susceptibles a este larvicida, excepto la cepa Palmira que fue resistente, registrando un porcentaje de mortalidad de 43,7 a las 24 horas post-exposición (Cuadro 3).

Resumen:

En el cuadro 3, se observa el resumen de los porcentajes de mortalidad observados al TD en los bioensayos con botellas de CDC de las cepas evaluadas. Se observó que las cepas seleccionadas en el laboratorio, propoxur F₂₉ y lambdacialotina F₂₉ fueron resistentes a los tres insecticidas piretroides evaluados y al DDT (Tabla 3).

La cepa DDT F₃₀ mostró pérdida de susceptibilidad a permetrina, DDT y al malatión, pero fue susceptible a propoxur.

La cepa de laboratorio propoxur F₂₉ fue resistente a todos los piretroides. Aunque esta cepa ha sido seleccionada con propoxur (un insecticida carbamato), mostró resistencia cruzada con permetrina, deltametrina, lambdacialotrina y DDT. En contraste fue completamente susceptible a malatión.

La cepa lambdacialotrina mostró ser resistente a casi todos los insecticidas evaluados. Registró resistencia cruzada al DDT y propoxur, y una leve pérdida de la susceptibilidad al malatión.

En cuanto a las cepas de campo, solo Medellín (AF) F₂ fue susceptible a permetrina, en contraste las otras seis cepas de campo fueron resistentes a este insecticida. La cepa Medellín (BF) F₁ fue resistente a los tres insecticidas piretroides evaluados y obtuvo los porcentajes de mortalidad más bajos, seguida por los mosquitos de Girón F₁ y Yumbo F₂. La mayoría de las cepas de campo registraron pérdida de susceptibilidad a los piretroides, pero se presentó una alta susceptibilidad para el insecticida propoxur, pues seis de las siete cepas fueron susceptibles a este insecticida, excepto la cepa de Cali.

Tres cepas de campo fueron susceptibles a malatión; en contraste hubo pérdida de susceptibilidad a este insecticida en las cepas de Buga, Palmira, Medellín AF y Girón, siendo esta última la que presentó una menor tasa de mortalidad. Solo se encontró una cepa de campo resistente al temefos (Palmira), registrando una alta resistencia para este insecticida.

Cuadro 3. Resultados de los ensayos CDC de las cepas evaluadas. Porcentaje de mortalidad <80% del umbral del tiempo diagnóstico (TD) es consistente con resistencia a insecticidas.

Cepas/Población	% de mortalidad al tiempo diagnóstico (TD)- (n)						
	Permetrina	Deltametrina	Lambdacialotrina	DDT	Propoxur	Malatión	Temefos
	21,5 µg/ml DT 45 min	6,25 µg/ml DT 40 min	6,25 µg/ml DT 40 min	2000 µg/ml DT 60 min	6,25 µg/ml DT 45 min	6,25 µg/ml DT 45 min	0,0012 ppm
Cepas de laboratorio							
Rockefeller	99 (130)	100 (130)	100 (142)	90 (148)	100 (124)	100 (180)	100 (80)
DDT F ₃₀	87 (172)	62,28 (117)	87,8 (143)	80 (47)	73,1 (145)	90,9 (81)	100 (80)
Propoxur F ₂₉	57,4 (352)	73,8 (158)	76,7 (141)	58 (48)	66 (167)	100 (83)	100 (80)
Lambdacialotrina F ₂₉	45,6 (144)	66,6 (134)	17,2 (176)	72,1 (68)	59,8 (204)	97,7 (180)	
Poblaciones de campo							
Buga F ₁	52,9 (217)	92,6 (143)	87,1 (117)	28,1 (56)	100 (125)	87,2 (94)	100 (80)
Yumbo F ₂	65,7 (141)	93,0 (114)	79,8 (138)	22,2 (56)	99,2 (146)	100 (106)	100 (80)
Palmira F ₂	76,6 (153)	94,0 (297)	91,9 (134)	19,8 (48)	100 (133)	88,9 (110)	43,7 (80)
Cali- (PdC) F ₂	71,6 (129)	86,8 (105)	91,5 (285)	9,2 (50)	82,5 (103)	100 (115)	100 (80)
Girón F ₁	38,3 (190)	81,5 (184)	62,9 (143)	37,6 (45)	100 (128)	86,7 (128)	100 (80)
Medellín (BF) F ₂	48,9 (169)	51,0 (126)	38,9 (139)	0 (45)	99,1 (142)	100 (126)	100 (80)
Medellín (AF) F ₂	98 (143)	89,9 (157)	81,4 (131)	42,3 (59)	100 (135)	92,5 (86)	100 (80)

En **rojo** mortalidades correspondientes a **resistencia**. En **negrilla** mortalidades correspondientes a **susceptibilidad** a los insecticidas evaluados en el presente estudio.

6. CAPÍTULO II

Mecanismos bioquímicos de resistencia a piretroides: Niveles de actividad de las enzimas de detoxificación esterasas, glutatión S-transferasas (GSTs) y citocromos P⁴⁵⁰

6.1. Materiales y métodos:

6.1.1. Ensayos bioquímicos

Para determinar el mecanismo enzimático involucrado en la resistencia a los insecticidas piretroides en las cepas de laboratorio y poblaciones de campo, la actividad de esterasas (α y β esterasas y para-nitrofenil acetato esterasas), glutatión S-transferasas y la cantidad de citocromo P⁴⁵⁰ fueron medidas usando la metodología descrita por Penilla *et al.*, 1998 y Ocampo *et al.*, 2011 (8,131).

Los ensayos bioquímicos fueron realizados en hembras de tres días de edad de *Ae. aegypti*, pertenecientes a cada una de las poblaciones evaluadas. Se utilizaron las filiales F₃₀ para DDT y F₂₉ para lambdacialotrina y propoxur; mientras que algunas cepas de campo fueron analizadas en las filiales 1 ó 2. Para determinar la actividad de las enzimas esterasas se usaron los sustratos alfa y beta naftil y para-nitrofenil acetato (pNPA). La actividad de las GSTs se midió usando el sustrato CDNB (1,2-dicloro-4-nitrobenzeno), y la cantidad total de citocromo P⁴⁵⁰ fue estimada usando el ensayo de hemo-peroxidasa (131) (ver anexo III).

6.1.1.1. Preparación de las muestras:

Se seleccionaron hembras adultas de *Ae. aegypti* al azar y se anestesiaron con frío, luego en una placa de fondo redondo de 96 pozos, en las las filas A, B, C y D se colocaron en cada pozo y de manera individual los mosquitos que serían analizados, excepto para el pozo D12 que queda libre. En cada uno de los pozos de las filas A, B, C y D se adicionaron 50 μ l de agua tridestilada, a continuación con un macerador de plástico, los mosquitos se maceraron de manera manual, evitando el derrame del homogeneizado de la muestra (figura 22). Se utilizó un macerador limpio por cada mosquito. Una vez los macerados de los mosquitos estaban lo suficientemente homogeneizados, se agregaron 150 μ l de agua tridestilada enjuagando la punta del macerador. El procedimiento de macerado se realizó sobre una placa de hielo para evitar la degradación de los tejidos.

Cada una de las placas fue marcada con la siguiente información: **clave de la muestra, cepa de mosquitos, nombre de la enzima evaluando, fecha de congelación y del análisis, y número de repetición.**

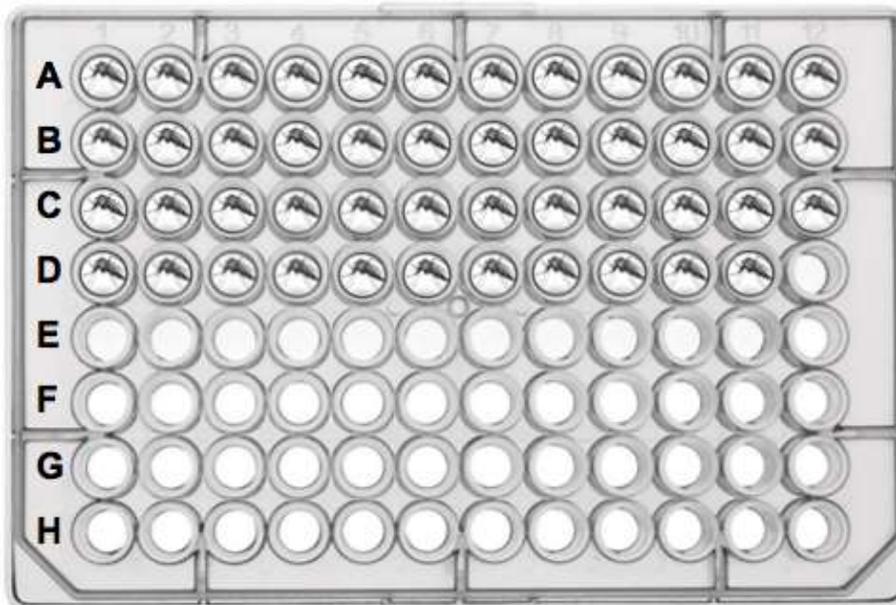


Figura 22. Placa 1. Distribución de las muestras para homogeneizado de los mosquitos usados en las pruebas bioquímicas.

Al realizar los ensayos bioquímicos, usando una pipeta multicanal de 12 canales, la distribución de las muestras se realizó de la siguiente manera: a las filas A y B de las placas que se usaron para las pruebas bioquímicas se agregó el homogeneizado de la fila A de la placa 1.

Filas C y D se agregó el homogeneizado de la fila B de la placa 1.

Filas E y F se agrega el homogeneizado de la fila C, y filas G y H se agregó el homogeneizado de la fila D de la placa 1. Esta distribución corresponde a duplicados de los homogeneizados para cada mosquito. Los pozos G12 y H12 se dejaron como blancos en cada una de las pruebas bioquímicas (figura 23).



Figura 23. Distribución de las muestras en las placas que se usaron para las pruebas bioquímicas.

6.1.1.2. Ensayo de proteínas

Para el ensayo de proteínas se usaron 10 μ l del homogeneizado de los mosquitos. La distribución de las muestras se realizó como se indicó en la figura 23. Para estas pruebas se usaron placas transparentes de fondo plano.

A cada pozo de la placa se añadieron 300 μ l de solución de reactivo de proteína BIO Rad, preparada como dilución 1: 4 en agua destilada siguiendo las instrucciones del fabricante. Se prepararon dos blancos para cada placa (pozos G12 y H12), con 10 μ l de agua destilada y 300 μ l de la solución 1:4 de BIO Rad. Las muestras se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y la reacción se leyó a 570 nm. Se calcularon valores de proteína en mg por 10 μ l del homogeneizado para mosquitos individuales a partir de las curvas estándar de absorbancia de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (Figura 24).

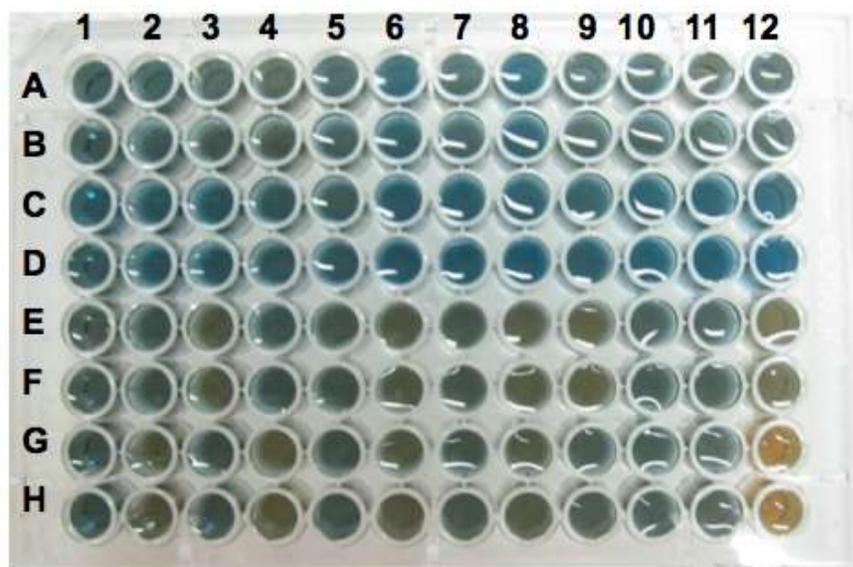


Figura 24. Placa del ensayo bioquímico para medir cantidad de proteínas.

6.1.1.3. Ensayos de esterasas

Alfa y beta esterasas

Para los ensayos de esterasas alfa y beta se usaron 20 μ l del homogenizado de los mosquitos. La distribución de las muestras se realizó como se indicó en la figura 23. Para estas pruebas se usaron placas transparentes de fondo plano.

En las filas A, C, E y G de las placas se agregaron 200 μ l de la solución de α naftil acetato o NA preparadas de la siguiente manera: 100 μ l de 30 mM α -NA en acetona en 10 ml de 0,02 M buffer fosfato disódico (Na_2HPO_4) pH 7,2. En las filas B, D, F y H (dejar los pozos G12 y H12 libres como blanco), se agregaron 200 μ l de solución β -NA (preparada igual que α -NA), cambiando el alfa por el beta naftil acetato.

La reacción enzimática se dejó desarrollar durante 30 min a temperatura ambiente, luego se agregaron 50 μ l de solución de tinción "fast blue" (22.5 mg de "fast blue" en 2,25 ml de agua destilada), y 5,25 ml de laurilsulfato de sodio al 5% diluido en buffer fosfato 0,1M a pH 7,0 fue añadido a cada pozo para detener la reacción enzimática.

La actividad enzimática se leyó a 570 nm en un lector de ELISA (Thermo Labsystem, multiskan spectrum). Los niveles de absorbancia para mosquitos individuales se compararon con curvas estándar de absorbancia para concentraciones conocidas de α -naftol y β -naftol, respectivamente. Estas curvas fueron calculadas y estandarizadas en el laboratorio del Centro Regional de Investigaciones en Salud Pública (CRISP).

Los resultados se informaron como μmoles del producto formado / minuto / mg de proteína.

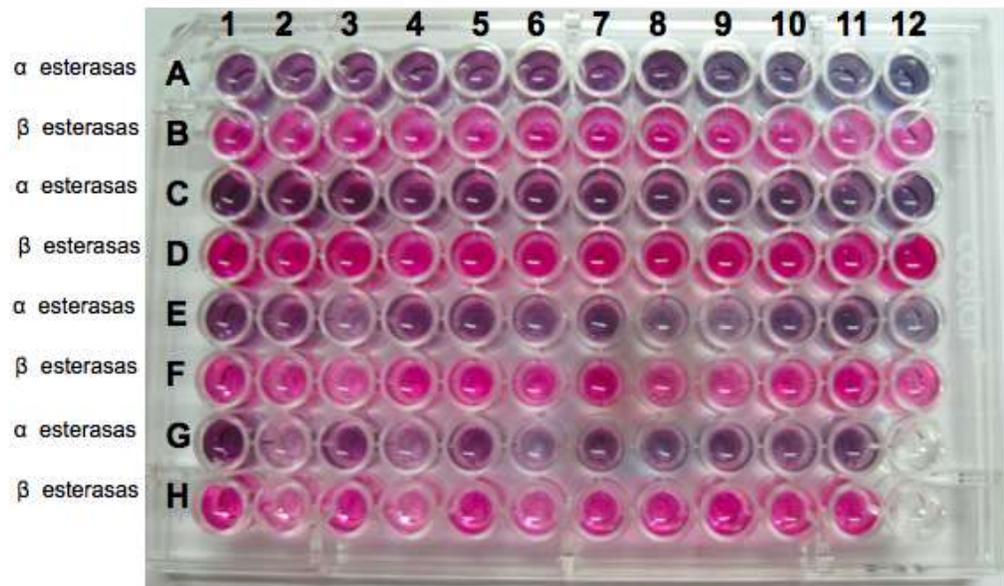


Figura 25. Ensayo bioquímico de las alfa y beta esterasas. En las filas A, C, E y G se observa la reacción colorimétrica para las alfa esterasas, en las filas B, D, F y H para las beta esterasas.

Para-nitrofenil acetato (pNPA)

Para este ensayo se usaron $10 \mu\text{l}$ del homogeneizado de los mosquitos en cada pozo por dúplica. La distribución de las muestras se realizó como se indicó en la figura 23.

A cada uno de los pozos se le agregaron $200 \mu\text{l}$ de la solución de paranitrofenil acetato (pNPA) preparada de la siguiente manera: 100 mM pNPA en acetonitrilo disuelto en buffer fosfato disódico (Na_2HPO_4) a 50 mM pH 7,4, en volumen de 1:100. Una vez se agregó la solución de pNPA a todos los pozos, la actividad enzimática se midió a 405 nm durante 2 min (figura 26). La actividad de pNPA por individuo se informó como μmol de producto formado / minuto / mg de proteína.

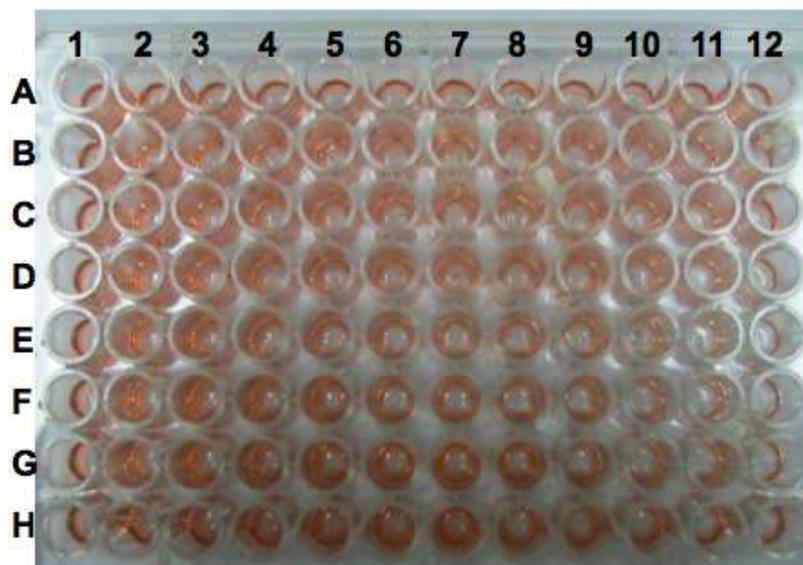


Figura 26. Ensayo bioquímico para medir actividad de enzimas esterasas con el sustrato paranitrofenil acetato.

6.1.1.4. Ensayo de glutatión-S-transferasa

Para este ensayo se usaron 10 μ l del homogeneizado de los mosquitos en cada pozo por duplicado. La distribución de las muestras se realizó como se indicó en la figura 23.

A cada pozo se le agregaron 200 μ l de la solución GSH/CDNB, el GSH (glutatión reducido preparado a 10 mM en buffer fosfato disódico (Na_2HPO_4) a 01 M, pH 6,5. El 1-cloro-2,4-dinitrobeneno (CDNB) fue preparado a 63 mM diluido en metanol (figura 27).

La actividad enzimática se midió a 340 nm durante 5 min. La actividad de GSTs por individuo se informó como mmol de CDNB conjugado / minuto / mg de proteína, utilizando coeficientes de extinción publicados y corregidos para la longitud de la trayectoria de la actividad de la enzima GST. El nivel de actividad de GST se relaciona con la capacidad de metabolizar el insecticida DDT(99,100,139).

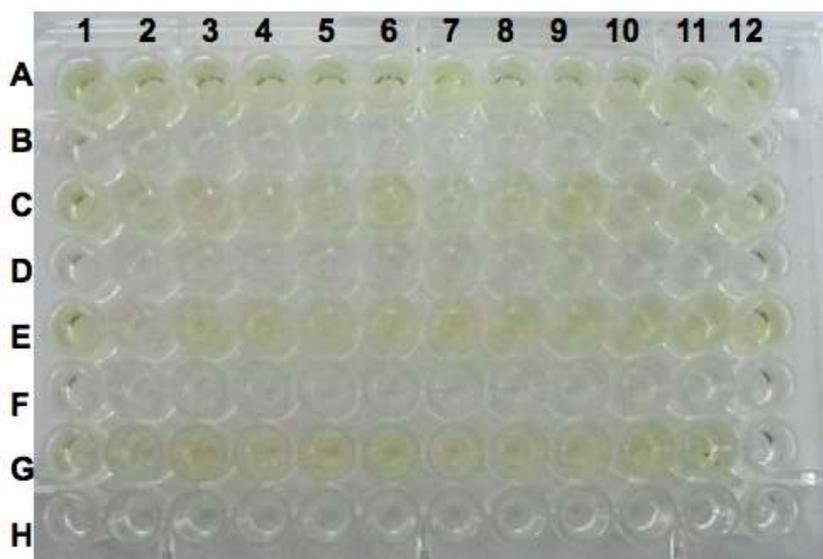


Figura 27. Ensayo para medir la actividad de las enzimas GSTs con el sustrato 1-cloro-2, 4- dinitrobencono (CDNB).

6.1.1.5. Ensayo de monooxigenas- Citocromos P⁴⁵⁰

La cantidad total de citocromo P⁴⁵⁰ en cada mosquito se calculó usando el ensayo de hemo-peroxidasa Brogdon (140) modificado por Penilla et al., 1998 (131). Para este ensayo se usaron 20 µl del homogeneizado de los mosquitos en cada pozo por duplicado. La distribución de las muestras se realizó como se indicó en la figura 23.

A cada pozo se le añadieron 80 µl de buffer de fosfato dipotásico (K₂HPO₄) a 0,625 M y pH 7,2 y 200 µl de la solución 3,3',5,5' tetrametilbencidina diluida en metanol absoluto (0,01 g en 5 ml, respectivamente). Luego se mezcló con 15 ml de buffer de acetato de sodio (NaC₂H₃O₂) a 0,25 M y pH 5,0 (TMBZ).

Se adicionaron a cada pozo 25 µl de peróxido de hidrógeno al 3% y la mezcla se dejó durante 2 h a temperatura ambiente para permitir que corriera la reacción. Se prepararon dos controles (pozos G12 y H12) con 20 µl de agua destilada y 200 µl de la solución TMBZ más 25 µl de H₂O₂ al 3%. Después de las dos horas la absorbancia fue leída a 650 nm y los valores se compararon con una curva estándar de absorbancia para concentraciones conocidas de citocromo P⁴⁵⁰. Los valores se informaron como pmol de citocromo P⁴⁵⁰ / mg de proteína.

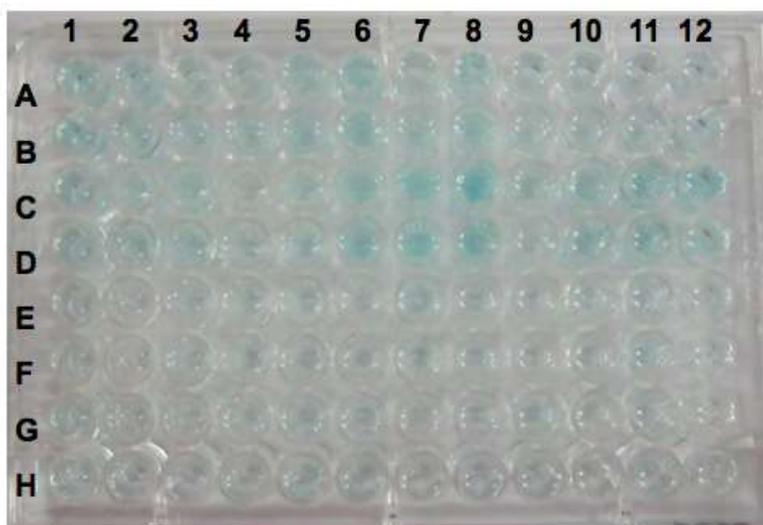


Figura 28. Ensayo bioquímico para medir cantidad total de citocromo P⁴⁵⁰ usando el ensayo de hemo-peroxidasa.

6.1.2. Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de normalidad para observar el comportamiento de los datos; en caso de normalidad se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y/ o en el caso de que los datos no fueran paramétricos se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis. Para detectar diferencias significativas en las concentraciones de las enzimas, se aplicó un test de Dunnet de comparaciones múltiples entre las medianas de las actividades enzimáticas de las cepas de laboratorio y poblaciones de campo contra la cepa de referencia susceptible Rockefeller (control). La actividad de las enzimas en las cepas evaluadas se consideró elevada si era mayor que la actividad de la cepa de control Rockefeller (valor de p es <0,05). Todos los análisis se calcularon con un nivel de significancia de α **0,05**, usando el software SPSS 21©.

Los resultados de los ensayos bioquímicos fueron presentados por medio de diagramas "boxplot" cajas y alambre de la mediana y la desviación estándar de los datos. En el eje Y se graficaron las actividades de las esterasas a partir de la cantidad de μmol de producto formado/ min/ mg de proteína. Para la prueba de GSTs en el eje Y se relaciona la cantidad en mmol de el sustrato CDNB (1,2-dicloro-4-nitrobencono conjugado/ min/ mg de proteína. Para el ensayo de citocromos P⁴⁵⁰, el eje Y representa la cantidad total de citocromo P⁴⁵⁰ en pmol/mg proteína. El eje X de los diagramas corresponde al nombre de las localidades.

6.2. Resultados

6.2.1. Actividad enzimática de alfa y beta esterasas

Las medianas y desviaciones estándar de los niveles de actividad enzimática para las alfa (α) y beta (β) esterasas se muestran en la figura 29 y anexo IV. La actividad de las alfa esterasas se encontró significativamente elevada en las cepas DDT F₃₀, Yumbo F₂ y Medellín (BF) F₂ (prueba de Dunnett $P < 0,000$) comparadas contra la cepa susceptible Rockefeller.

Las Beta esterasas se encontraron significativamente elevadas sólo en DDT F₃₀ al ser comparadas con la cepa susceptible Rockefeller (prueba de Dunnett $P < 0,00$). La cepa DDT F₃₀ presentó la actividad media más alta de las esterasas con los dos sustratos, α y β naftil acetato ($0,00068 \pm 0,0003$ y $0,00083 \pm 0,0004$), respectivamente .

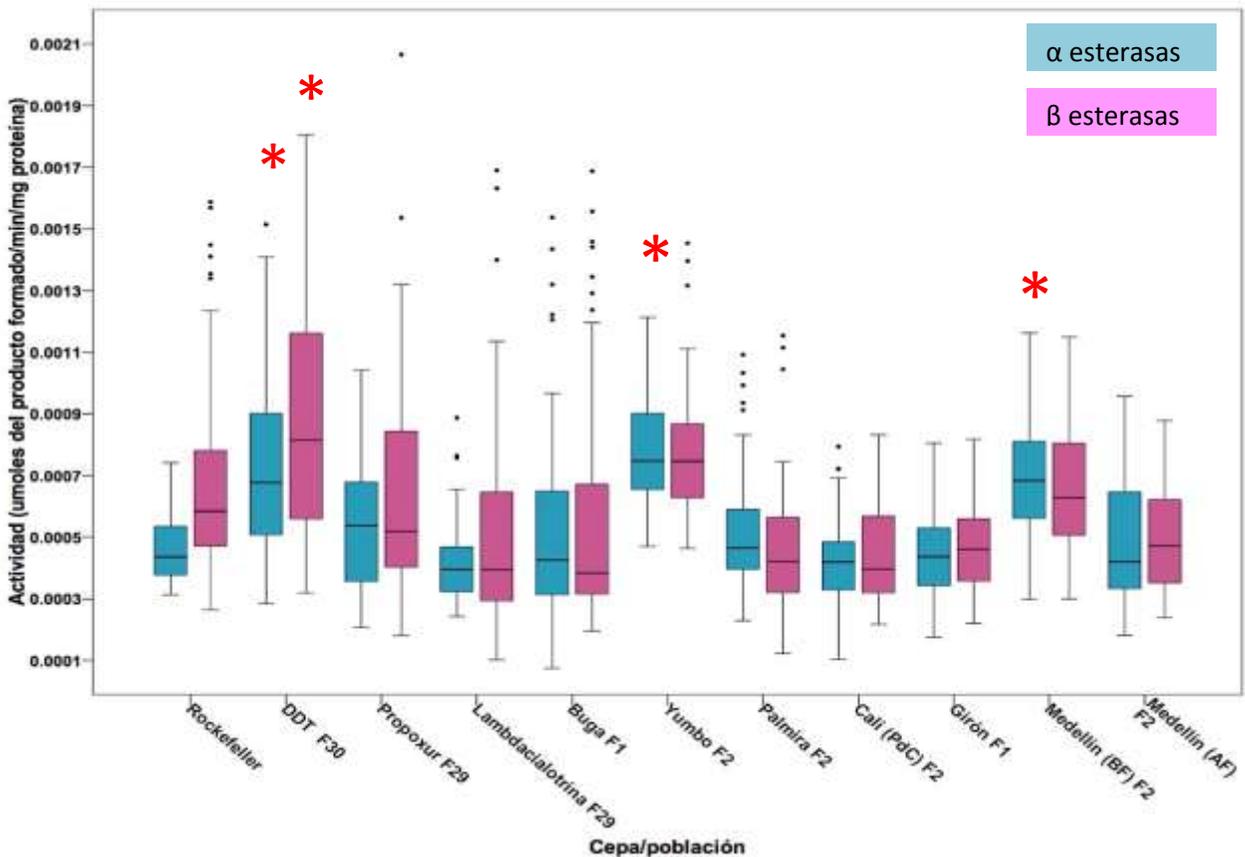


Figura 29. Resultados de los ensayos bioquímicos usando alfa y beta naftil acetato. *Cepas de *Ae. aegypti* con elevada actividad enzimática (estadísticamente significativas) comparada con la cepa Rockefeller ($P < 0,05$).

6.2.2. Actividad enzimática de paranitrofenil acetato

Se encontraron diferencias significativas en la actividad de las esterasas con el sustrato (pNPA) solo en la población de Girón F₁, ya que esta fue la única cepa con una actividad mayor que la cepa Rockefeller (figura 30). Se observó también que las actividades enzimáticas con este sustrato, en la cepa lambda-dialotrina y Medellín (BF) F₂ se encontraron disminuidas en contraste con la cepa Rockefeller ($P < 0,000$), indicando una baja actividad de esta enzima en estas dos poblaciones.

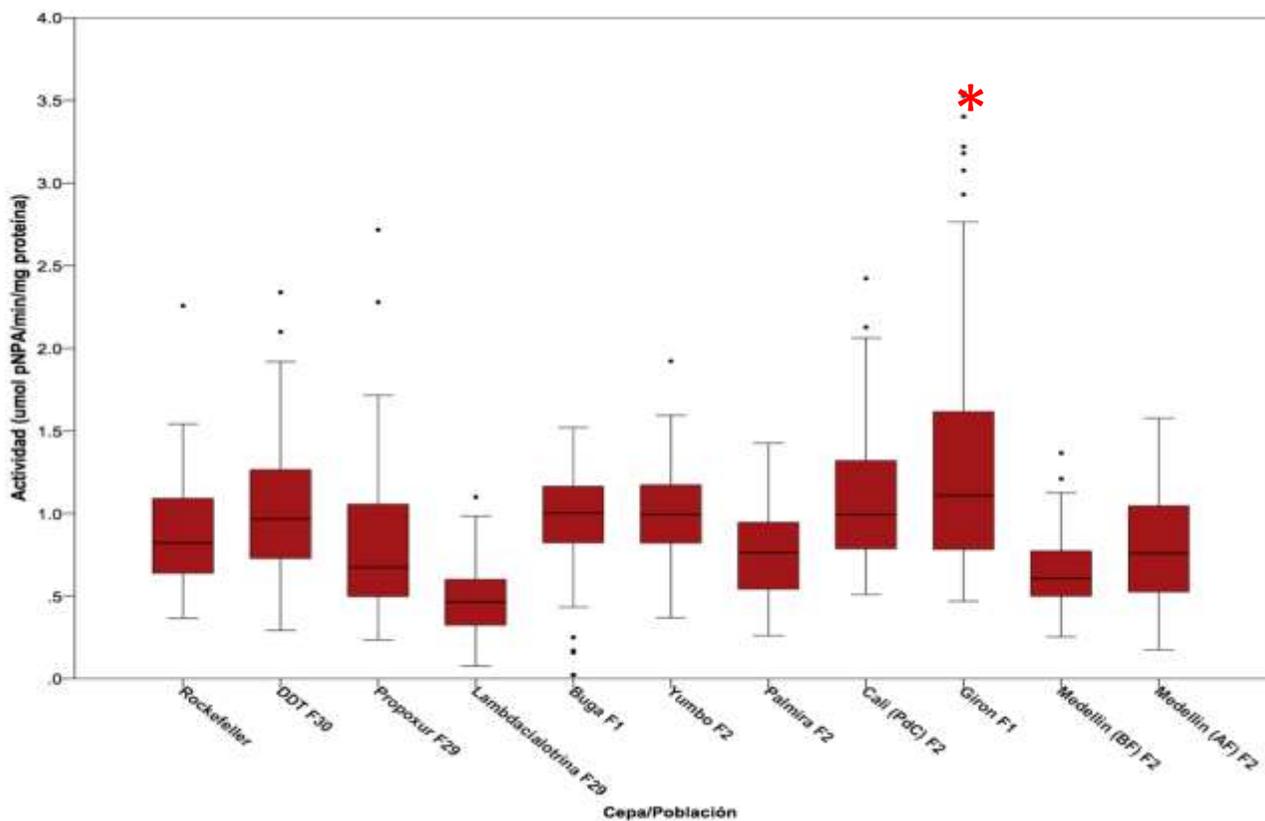


Figura 30. Resultados de los ensayos bioquímicos usando el sustrato paranitrofenil acetato (pNPA). *Cepas de *Ae. aegypti* con elevada actividad enzimática (estadísticamente significativas) comparada con la cepa Rockefeller ($P < 0,05$).

6.2.3. Actividad enzimática de las glutatión S transferasas

La actividad de las glutatión S-transferasas fueron significativamente elevadas en siete de todas las cepas analizadas. La cepa propoxur fue la única cepa de laboratorio con una actividad elevada. Los mosquitos de Yumbo F₂ presentaron la mayor actividad media de las GSTs (3,988±1,56), seguido de Buga F₁ con (2,951±2,38) de mmol CDNB conjugado / minuto / mg de proteína (figura 31).

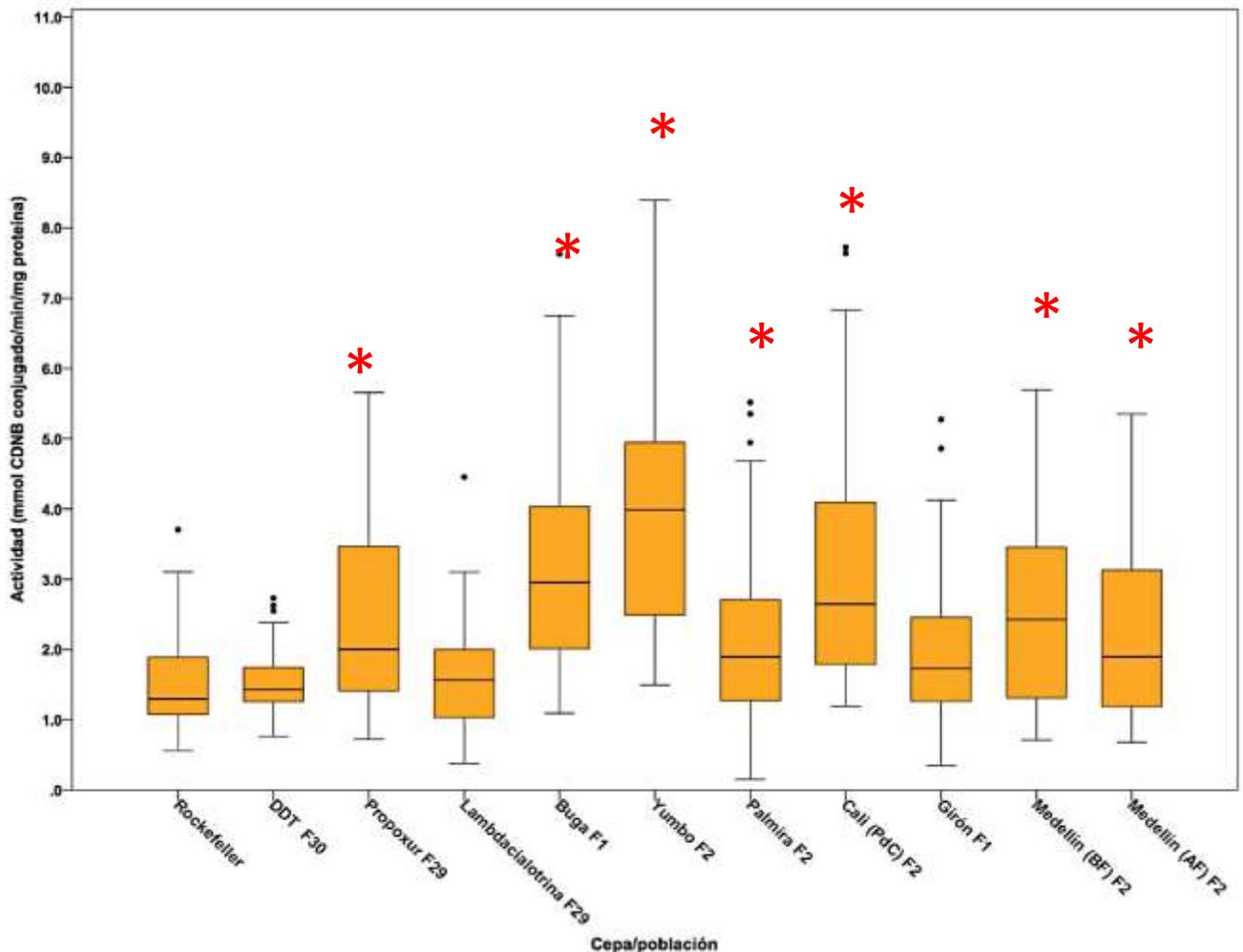


Figura 31. Resultados de los ensayos bioquímicos de Glutatión S transferasa GST usando el sustrato Clorodinitrobenzeno (CDNB). *Cepas de *Ae. aegypti* con elevada actividad enzimática (estadísticamente significativas) comparada con la cepa Rockefeller ($P < 0,05$).

6.2.4. Contenido de los citocromos P⁴⁵⁰

El contenido medio de citocromos P⁴⁵⁰ fue significativamente mayor en solo dos de las cepas evaluadas Yumbo F₂ y Medellín (BF) F₂, con un valor de 0,0018±0,0004 mmol de P⁴⁵⁰ y 0,0014±0,001, respectivamente (prueba de Dunnett P <0,000). No se observaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de esta enzima en la mayoría de las cepas evaluadas (figura 32).

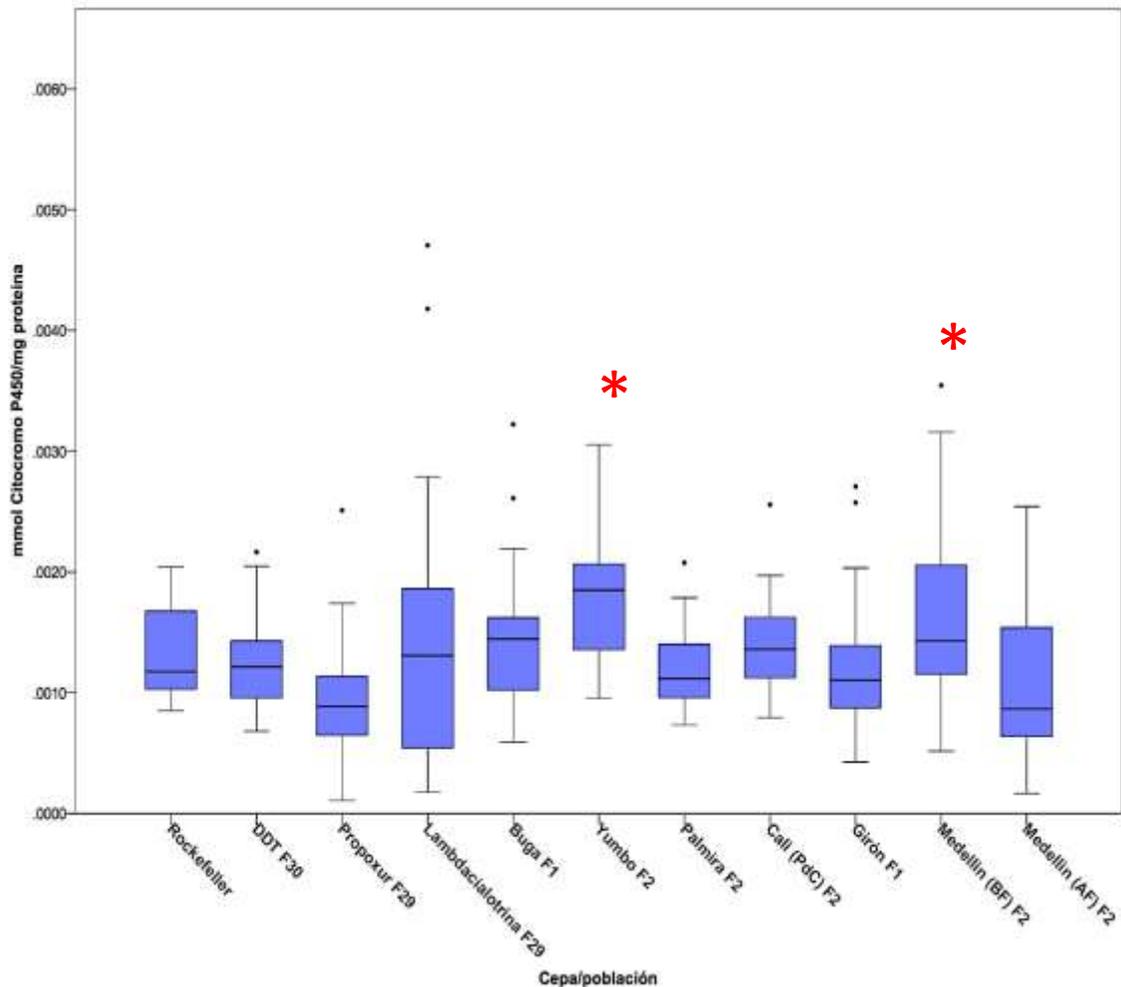


Figura 32. Resultados de los ensayos bioquímicos para citocromos P⁴⁵⁰ Usando hemo peroxidasa. *Cepas de *Ae. aegypti* con elevada actividad enzimática comparada con la cepa Rockefeller (P <0,05).

7. CAPÍTULO III

Mecanismos moleculares de resistencia a piretroides: Detección de las mutaciones *kdr* Val1016Ile y Phe1534Cys

7.1. Materiales y métodos

7.1.1. Genotipificación de las mutaciones *kdr*, Val1016Ile y Phe1534Cys

Cincuenta y cuatro mosquitos adultos hembras, de cada una de las cepas fueron seleccionadas al azar, y se utilizaron para realizar la genotipificación para las mutaciones *kdr* Val1016Ile y Phe1534Cys. A cada mosquito se le extrajo el ADN utilizando el protocolo adaptado de Greg Floor y William Engels (1983), facilitado por el laboratorio de resistencia a insecticidas del Centro Regional de Investigación en Salud Pública de México (Anexo V). Posteriormente la concentración y calidad del ADN obtenido se midió en un NanoDrop.

Inicialmente cada uno de los mosquitos seleccionados fue tipificado para la mutación Val1016Ile y posteriormente para la Phe1534Cys, una vez la metodología fue estandarizada en el laboratorio del CIDEIM.

La detección de las mutaciones Val1016Ile y Phe1534Cys se realizó por medio PCR en tiempo real, usando los iniciadores Val1016f, Ile1016f, Ile1016r, Cys1534+, Phe1534+ y 1534- (cuadro 4.) y siguiendo los protocolos descritos por Saavedra *et al.*, 2007 y Yanola *et al.*, 2011 (112,120,138), con algunas modificaciones en los tiempos de corrida de la PCR (Anexo VI).

Cuadro 4. Secuencia de iniciadores usados para la genotipificación de las mutaciones KDR.

Mutación	Nombre del iniciador	Secuencia 3'-5'
Val1016Ile	Val 1016f	GCGGGCAGGGCGGGCGGGGGCGGGGCCACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG
	Ile1016f	GCGGGCACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA
	Ile1016r	TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC
Phe1534Cys	CYS 1534+	GCGGGCAGGGCGGGCGGGGGCGGGGCCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATGTG
	Phe 1534+	GCGGGCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATATT
	1534-	TCTGCTCGTTGAAGTTGTCGAT

Para esta PCR en tiempo real se utilizó el SYBR Green PCR master Mix (Applied biosystems 4309155), que contiene una enzima polimerasa que requiere de 10 min a 95°C para su activación.

La determinación del genotipo de ambas mutaciones se hizo por el análisis de las curvas de desnaturalización “melting curve”; estas curvas se realizaron entre 65°C a 95°C, con un incremento de 0,2°C o 0,5 °C cada 10 o 5 seg. Para la interpretación de los datos se observaron las curvas de melting obtenidas a partir de cada muestra. Los datos fueron exportados a hojas de Excel y se construyó una base de datos que contenía el genotipo de cada uno de los mosquitos evaluados por cada cepa del estudio.

- **Genotipificación para la mutación Val1016Ile**

Para la detección de la mutación Val1016Ile, se siguió el protocolo descrito por Saavedra *et al.*, 2007 (112), con algunas modificaciones (figura 33).

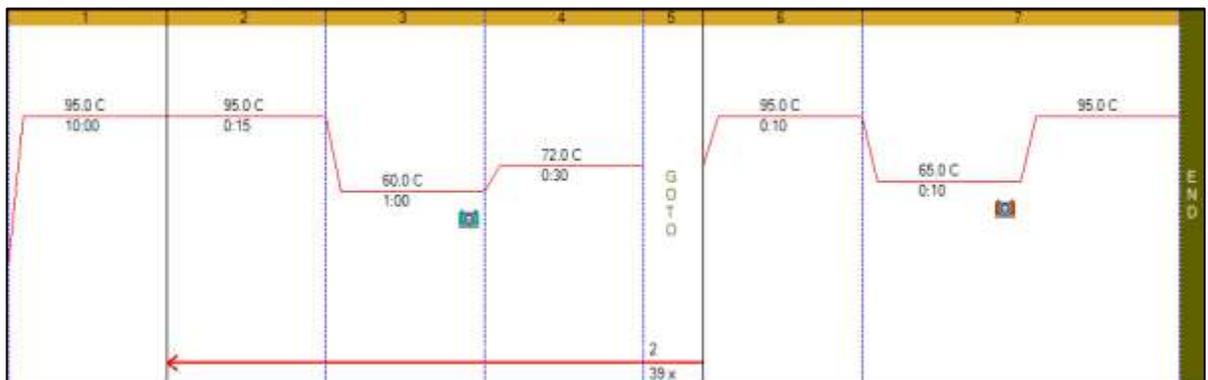


Figura 33. Condiciones de la PCR en tiempo real para la detección de la mutación Val1016Ile.

Los pasos de la PCR se describen a continuación:

1. 95.°C for 10:00 (activación de la enzima)
 2. 95. °C for 0:15
 3. 60. °C for 1:00
- + Plate Read
4. 72. °C for 0:30
 5. GO TO 2, 39 more times
 6. 95. °C for 0:10
 7. Melt Curve 65. °C to 95. °C, increment 0,2 °C, 0:10 + Plate Read
- END

Para interpretar los datos, se observaron los picos obtenidos a partir de la curva "melting" obtenida en la PCR de tiempo real (figura 34).

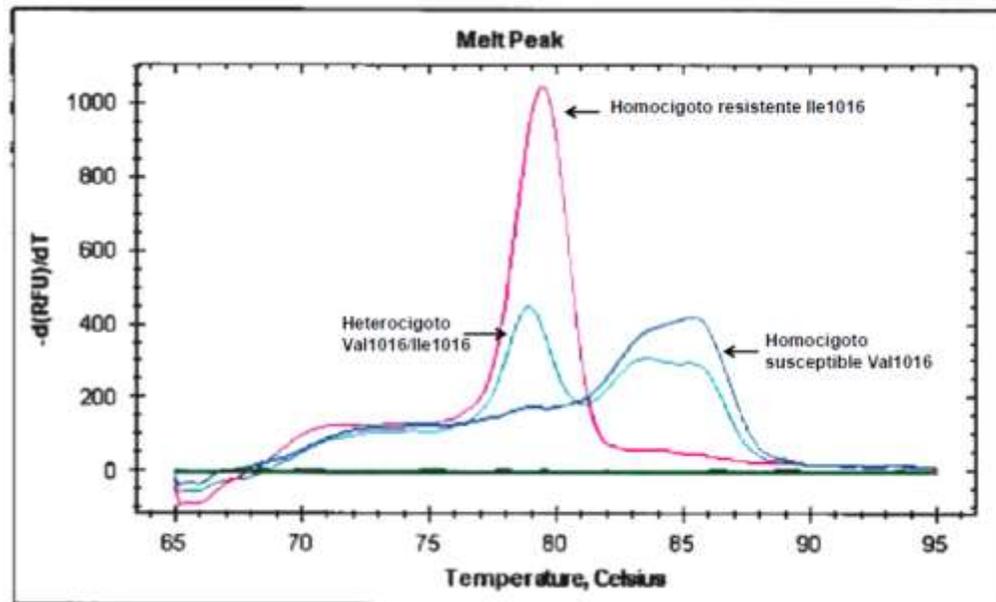


Figura 34. Curvas "melting" para interpretación de los datos de la mutación kdr Val1016Ile.

Cada posible pico en la curva de "melting" corresponde a:

- Un simple pico a $\pm 79^{\circ}\text{C}$ corresponde al producto amplificado por los iniciadores "cortos" (Ile1016f e Ile1016r), los cuales son específicos para el alelo A (ATA que codifica para una isoleucina es decir fenotipo mutante).
- El pico de $\pm 85^{\circ}\text{C}$ corresponde al producto amplificado por el iniciador "largo" (Val1016f), el cual es específicos para el alelo G (GTA que codifica para una valina es decir fenotipo silvestre).

En las muestras, para interpretar los tres diferentes genotipos posibles, se observó la curva por encima del umbral determinado para la corrida de PCR.

- Alelo AA, corresponde a uno pico a $\pm 79^{\circ}\text{C}$, esto es para un homocigoto Ile1016 – Mutante-resistente
- Alelo GG, corresponde a uno pico $\pm 85^{\circ}\text{C}$, esto es para un homocigoto Val1016- Silvestre- susceptible
- Alelo AG, corresponde a ambos picos presentes $\pm 79^{\circ}\text{C} + \pm 85^{\circ}\text{C}$, esto es para una heterocigoto (figura 34.).

- **Genotipificación para la mutación Phe1534Cys**

Para la detección de la mutación Phe1534Cys, se siguió el protocolo descrito por Yanola *et al.*, 2011(138), con algunas modificaciones (Figura 35).

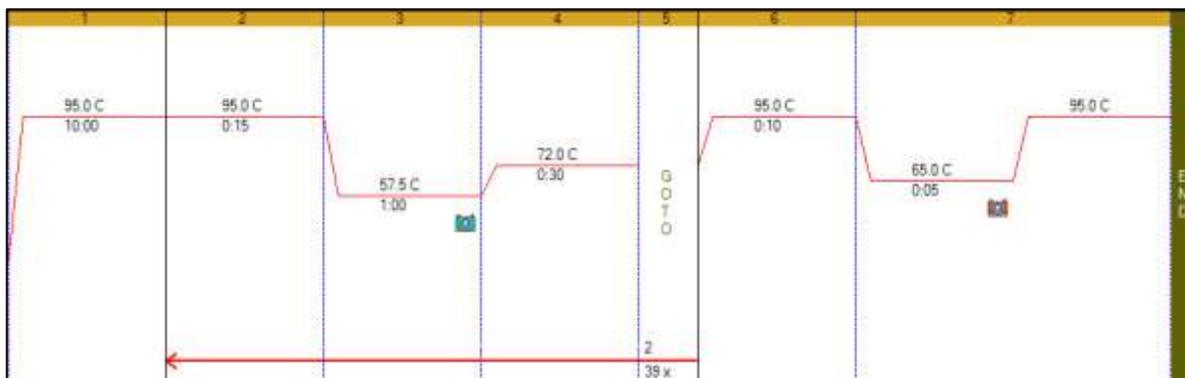


Figura 35. Condiciones de la PCR en tiempo real para la detección de la mutación Phe1534Cys.

Los pasos de la PCR se describen a continuación:

1. 95°C for 10:00 (activación de la enzima)
2. 95°C for 0:15
3. 57.5°C for 1:00
+ Plate Read
4. 72°C for 0:30
5. GOTO 2, 39 more times
6. 95°C for 0:10
7. Melt Curve 65°C to 95°C, increment 0,5°C
0:05 + Plate Read

Las curvas de desnaturalización para la mutación Phe1534Cys se realizaron entre 65°C a 95°C, pero con un incremento de 0.5°C cada 5 segundos.

Cada posible pico en la curva de melting corresponde a:

- Un simple pico a $\pm 80^{\circ}\text{C}$ corresponde al producto amplificado por los iniciadores “cortos” (Phe 1534+ y 1534 +), los cuales son específicos para el alelo T (TTC que codifica para una fenilalanina es decir para el fenotipo silvestre).

- El pico de $\pm 85^{\circ}\text{C}$ corresponde al producto amplificado por el iniciador "largo" (Cys1534+), el cual es específicos para el alelo G (TGC que codifica para una cisteína es decir fenotipo mutante).

En las muestras, para interpretar los tres diferentes genotipos posibles, se observó la curva por encima del umbral determinado para la corrida de PCR.

- Alelo TT, corresponde a uno pico a $\pm 80^{\circ}\text{C}$, esto es para un homocigoto para Phe1534– Silvestre-susceptible
- Alelo GG, corresponde a uno pico $\pm 85^{\circ}\text{C}$, esto es para un homocigoto Cys1534 - Mutante- resistente
- Alelo TG, corresponde a ambos picos presentes $\pm 80^{\circ}\text{C} + \pm 85^{\circ}\text{C}$, esto es para una heterocigoto (figura 36.)

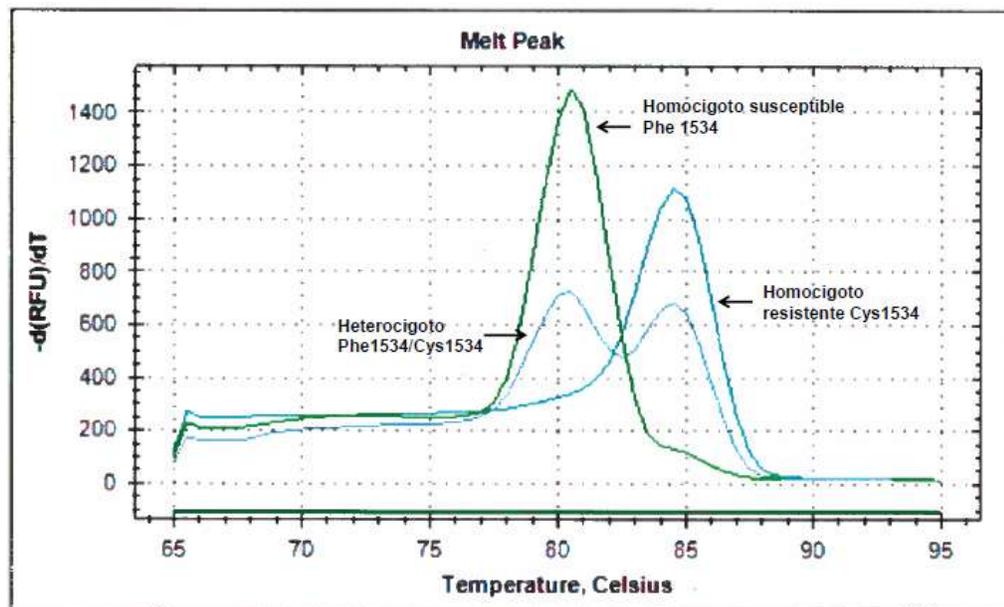


Figura 36. Curvas "melting " para interpretación de los datos de la mutación kdr Phe1534Cys.

Los controles positivos y negativos se incluyeron en cada reacción de tiempo real PCR, el ADN de mosquitos susceptibles de la cepa Rockefeller, fue usado como control del homocigotos silvestres (Val1016Val y Phe1534Phe), y un control positivo de la cepas mutantes correspondientes a mosquitos de campo F_1 de las ciudades de Tapachula (estado de Chiapas), Mérida (estado de Yucatán) y Zihuatanejo (estado de Guerrero) todos de México, fueron utilizados como referencia de homocigotos para las mutaciones (Ile1016Ile y Cys1534Cys). Los ADN de estos mosquitos fueron donados por la estudiante de doctorado Farah Zamira Vera Maloof, de Colorado State University, Fort Collins- Colorado. Un

control negativo que contenía solo agua fue incluido en cada corrida de PCR para descartar contaminación de los reactivos y falsas amplificaciones.

7.1.2. Manejo de los datos y análisis estadísticos:

La frecuencia de los alelos de las mutaciones encontradas se calculó mediante la constante de equilibrio de Hardy-Weinberg. Para interpretar los datos se calculó la frecuencia del alelo en cada población de mosquitos a partir de la fórmula $p^2+2pq+q^2=1$.

Donde p corresponde a los homocigotos mutantes, q a los homocigotos silvestres y pq a los heterocigotos:

$$\text{Frecuencia del alelo} = \frac{1 * (\text{heterocigotos}) + 2 * (\text{homocigotos})}{2 * (\text{total de mosquitos analizados})}$$

7.1.3. Frecuencias alélicas de Val101Ile y Phe1534Cys

Las frecuencias alélicas de cada mutación se calcularon sumando la frecuencia genotípica de los heterocigotos más la frecuencia alélica de los homocigotos multiplicados por dos y divididos por el número de muestras evaluadas (n). Para cada uno de los alelos de las mutaciones *kdr* el cálculo se obtuvo de la siguiente manera:

Frecuencia alélica de Val1016 = $p = \frac{AG + 2(GG)}{2n}$

Frecuencia alélica de Ile1016 = $q = \frac{AG + 2(AA)}{2n}$ o Val-1 = Ile

Frecuencia alélica de Phe1534 = $p = \frac{TG + 2(TT)}{2n}$

Frecuencia alélica de Cys1534 = $q = \frac{TG + 2(GG)}{2n}$ o Phe-1 = Cys

El cálculo de equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó usando dos calculadoras online: <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml> and www.dr-petrek.eu/documents/HWE.xls.

7.1.4. Frecuencias de los haplotipos dilocus

Debido a que hay cuatro potenciales dilocus haplotipos de 1016/1534:

- Val1016/Phe1534 (VF) “susceptible”,
- Val1016/Cys1534 (VC)
- Ile1016/Phe1534 (IF)
- Ile1016/Cys1534 (IC) “resistente”(88) .

Se construyó una tabla de 3 x 3 donde se consignó el tamaño de muestra total por cada cepa y el número de mosquitos por cada uno de los nueve posibles genotipos dilocus, clasificados de la siguiente manera:

- Val1016/Phe1534
- Val1016/Cys1534
- Ile1016/Phe1534
- Ile1016/Cys1534
- Val1016/Phe-Cys1534
- Val-Ile1016/Phe1534
- Val-Ile1016/Phe-cys1534
- Ile1016/Phe-Cys1534
- Val-Ile1016/Cys1534.

Las frecuencias de cada haplotipo dilocus por cepa se calculó por medio de la herramienta web “CubeX”(141) <http://www.oege.org/software/cubex/>.

7.2. Resultados

7.2.1. Detección de mutaciones de kdr y frecuencias alélicas de Val101Ile y Phe1534Cys

Las mutaciones kdr Ile1016 y Cys1534 se encontraron en todas las cepas evaluadas con frecuencias variables, incluyendo la cepa susceptible Rockefeller (tabla 5). En todas las muestras, el intervalo de frecuencias alélicas de Ile1016 varió entre 0,02-0,72, y las frecuencias alélicas de Cys1534 entre 0,44-0,99. Las frecuencias de Cys1534 fueron mayores que Ile1016 en todas las muestras. El alelo Cys1534 estuvo cerca de la fijación en tres de las 11 cepas evaluadas (lambdacialotrina F₂₉, Yumbo F₂ y Palmira F₂) con frecuencias de 0,99.

La cepa de laboratorio lambdacialotrina F₂₉, tuvo la frecuencia más alta para ambas mutaciones, para Ile1016 fue 0.72 y para Cys1534 fue 0.99. Las cepas de campo con mayor frecuencia para ambas mutaciones fueron Medellín (BF) F₂ (0,71-0,82) y Yumbo F₂ (0,69-0,99) para Ile1016 y Cys1534 respectivamente.

Medellín (AF) F₂ tuvo la frecuencia más baja para Ile (0,02) al igual que para Cys (0,44). Las frecuencias observadas en esta cepa fueron similares a la cepa Rockefeller. Esta cepa fue la más susceptible para todos los piretroides evaluados, llegando inclusive a ser la única cepa de campo susceptible para permetrina (PYR tipo I).

Los homocigotos tipo silvestre Val1016/Val1016 (GG) fueron predominantes en la mayoría de las cepas evaluadas. Este genotipo se encontró en el 61% de las muestras. En contraste, los heterocigotos Val/Ile (GA) se encontraron ausentes en la mayoría de las muestras. Se encontró una muestra heterocigótica (genotipo GA) en propoxur F₂₉ al igual que en Medellín (AF) F₂ (cuadro 5).

Por otra parte, el genotipo heterocigoto Phe1534/Cys1534 (TG) y los mutantes homocigotos Cys1534/Cys1534 (GG) fueron los más frecuentes en todas las muestras evaluadas. Mientras que el homocigoto para el fenotipo de tipo salvaje Phe1534/Phe1534 (TT) se encontró solo en tres cepas de las 11 evaluadas.

Cuadro 5. Frecuencias alélicas de las mutaciones kdr Val1016Ile y Phe1535Cys en cepas seleccionadas en laboratorio y cepas de campo de *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Colombia.

Cepas/Población	Val1016Ile							Phe1535Cys						
	n	Genotipo			Frecuencia Alélica		HWE	n	Genotipo			Frecuencia Alélica		HWE
		GG	GA	AA	Val 1016	Ile 1016			TT	TG	GG	Phe 1534	Cys 1534	
Cepas de laboratorio														
Rockefeller	48	46	0	2	0,96	0,04	0,000*	47	26	1	20	0,56	0,44	0,000*
DDT F ₃₀	51	46	0	5	0,9	0,1	0,000*	50	2	16	32	0,2	0,8	1,000
Propoxur F ₂₉	54	36	1	17	0,68	0,32	0,000*	54	0	3	51	0,03	0,97	0,834
Lambdacialotrina F ₂₉	54	15	0	39	0,28	0,72	0,000*	54	0	1	53	0,01	0,99	0,945
Población de Campo														
Buga F ₁	52	38	0	14	0,73	0,27	0,000*	54	0	13	41	0,12	0,88	0,315
Yumbo F ₂	53	15	0	34	0,31	0,69	0,000*	54	0	1	53	0,01	0,99	0,945
Palmira F ₂	50	23	0	27	0,48	0,52	0,000*	54	0	1	53	0,01	0,99	0,945
Cali (pdC) F ₂	54	41	0	13	0,76	0,24	0,000*	54	0	28	26	0,26	0,74	0,010*
Girón F ₁	54	25	0	29	0,46	0,54	0,000*	54	0	6	48	0,06	0,94	0,666
Medellín (BF) F ₂	51	15	0	36	0,29	0,71	0,000*	54	0	19	35	0,18	0,82	0,117
Medellín (AF) F ₂	53	52	0	1	0,98	0,02	0,000*	54	18	24	12	0,56	0,44	0,462
Total muestras	574	352	1	216				583	46	113	424			

GG homocigoto susceptible para Val1016; GA heterocigoto Val1016/Ile1016; AA homocigoto resistente para Ile1016.

TT homocigoto susceptible para Phe1534; TG heterocigoto Phe1535/Cys1534; GG homocigoto resistente para Cys1534.

* Si $P < 0.05$ no es consistente con el equilibrio de Hardy Weinberg (HWE).

7.2.2. Frecuencias de haplotipos de dilocus

Todos los mosquitos evaluados fueron genotificados para ambos loci. El tamaño y el número de muestras de los nueve genotipos dilocus (tres genotipos 1016 x

tres genotipos 1534) se muestran en la cuadro 6.

Se encontró que 205 mosquitos evaluados expresaron ambas mutaciones (doble homocigotos mutantes). Lambdacialotrina F₂₉ y Medellín BF F₂ fueron las cepas con la mayoría de los mutantes homocigotos dobles (Ile/Ile + Cys/Cys), al contrario se encontró que los homocigotos tipo silvestres para ambos alelos (Val/Val + Phe/Phe) estaban ausentes en ocho de las 11 cepas evaluadas.

Los genotipos dilocus (Val/Ile + Phe/Cys), (Val/Ile + Phe/Phe) e (Ile/Ile + Phe/Phe) estaban ausentes en todas las muestras, lo que podría sugerir que la heterocigocidad para estas mutaciones podría tener una implicación en el fitness de los mosquitos y, por lo tanto, en estas poblaciones los mosquitos heterocigotos no se están seleccionando o sobreviviendo.

Cuadro 6. Genotipos dilocus de mutaciones kdr Val1016Ile y Phe1534Cys en cepas seleccionadas en el laboratorio y cepas de campo de *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Colombia.

Cepa/ Poblaciones	n	Val/Val			Val/Ile			Ile/Ile		
		Phe/ Phe	Phe/ Cys	Cys/ Cys	Phe/ Phe	Phe/ Cys	Cys/ Cys	Phe/ Phe	Phe/ Cys	Cys/ Cys
Cepas de laboratorio										
Rockefeller	47	26	1	18	0	0	0	0	0	2
DDT F ₃₀	46	2	14	25	0	0	0	0	0	5
Propoxur F ₂₉	54	0	3	33	0	0	1	0	0	17
Lambdacialotrina F ₂₉	54	0	1	14	0	0	0	0	0	39
Poblaciones de campo										
Buga F ₁	53	0	13	26	0	0	0	0	0	14
Yumbo F ₂	50	0	0	14	0	0	0	0	1	35
Palmira F ₁	50	0	0	23	0	0	0	0	1	26
Cali (PdC) F ₂	53	0	23	17	0	0	0	0	5	8
Girón F ₂	53	0	6	18	0	0	0	0	0	29
Medellín (BF) F ₂	51	0	11	4	0	0	0	0	6	30
Medellín (AF) F ₂	52	18	23	10	0	0	0	0	1	0
Total de muestras	563	46	95	202	0	0	1	0	14	205

Las frecuencias de los cuatro posibles haplotipos dilocus 1016/1534 fue calculada basada en la metodología descrita por Vera-Maloof *et al.*, 2015(88). El haplotipo Val1016/Phe1534, denominado (VF) es considerado "susceptible", en contraste el haplotipo Ile1016/Cys1534 (IC) es considerado "resistente". Los haplotipos Val/Cys (VC) e Ile/Phe (IF) no presentan denominación (Cuadro 7).

Cuadro 7. Frecuencias de los haplotipos dilocus en el loci 1016 y 1534 del canal de sodio de *Aedes (Stegomyia) aegypti* de cepas seleccionadas en el laboratorio y de campo de Colombia.

Cepas/ Poblaciones	Tamaño de muestra	Frecuencias de haplotipos			
		Val1016/ Phe1534 (VF)	Val1016/ Cys1534 (VC)	Ile1016/ Phe1534 (IF)	Ile1016/ Cys1534 (IC)
Cepas de laboratorio					
Rockefeller	47	0,5638	0,3936	0,0	0,0426
DDT F ₃₀	46	0,1957	0,6957	0,0	0,1087
Propoxur F ₂₉	54	0,0278	0,6481	0,0	0,3241
Lambdacialotrina F ₂₉	54	0,0093	0,2685	0,0	0,7222
Poblaciones de campo					
Buga F ₁	53	0,1226	0,6132	0,0	0,2642
Palmira F ₁	50	0,0	0,4694	0,0102	0,5204
Yumbo F ₂	50	0,0	0,28	0,01	0,71
Cali (PdC) F ₂	53	0,217	0,5377	0,0472	0,1981
Girón F ₂	53	0,0566	0,3962	0,0	0,5472
Medellín (BF) F ₂	51	0,1078	0,1863	0,0588	0,6471
Medellín (AF) F ₂	52	0,5673	0,4135	0,0096	0,0096
		Susceptible		Resistente	

Como se puede observar en el cuadro 7, el haplotipo más frecuente que se encuentra en las muestras evaluadas fue el haplotipo Ile1016/Cys1534 (IC), que corresponde a la mayoría de los dobles homocigotos mutantes (fenotipo resistente) presentó una frecuencia de 0,37 en general. Las cepas lambdacialotrina F₂₉ y Yumbo F₂ presentaron las frecuencias mas altas para este haplotipo (0,72- 0,71) respectivamente.

El haplotipo Val1016/Cys1534 (VC), presentó frecuencias entre (0,18 – 0,69). La cepa DDT F₃₀ presentó la frecuencia de VC mas alta (0.69) seguida de la cepa propoxur F₂₉ (0,64), mientras que la cepa Medellín (BF) F₂ presentó la frecuencia de este haplotipo mas bajo.

El haplotipo Ile/Phe (IF) fue el menos frecuente, estuvo ausente en seis de las 11 cepas evaluadas, seguido por el haplotipo Val/Phe (VF), que estuvo ausente en las poblaciones de Palmira y Yumbo. Estos resultados se deben posiblemente a la

carencia de homocigotos para ambos alelos en la mayoría de las poblaciones.

8. CAPÍTULO IV

Análisis proteómico de los túbulos de Malpighi e intestino medio en cepas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* resistentes a piretroides.

Los resultados de este objetivo se obtuvieron gracias a la pasantía realizada en el laboratorio de proteómica de Glasgow Polyomics en la Universidad de Glasgow. Esta pasantía hizo parte de un proyecto colaborativo entre Glasgow Polyomics y el CIDEIM, llamado "Linking the power of -omic technologies to translational research on neglected tropical diseases" financiado por el Newton Fund (del British Council).

Para el análisis de los datos se contó con el apoyo de los doctores Richard Burchmore (Glasgow Polyomics) y Andrés Castillo (Universidad del Valle).

8.1. Materiales y métodos

8.1.1. Muestras biológicas

El material biológico fue seleccionado basado en los resultados de bioensayos CDC, de las pruebas bioquímicas y de las mutaciones kdr. Se seleccionaron las cepas de laboratorio y de campo que presentaron similitudes en sus mecanismos de resistencia. Teniendo en cuenta esto, tres cepas de laboratorio y tres de campo con diferente fenotipo de susceptibilidad / resistencia a permetrina fueron seleccionadas para los análisis proteómicos.

Inicialmente se clasificó a las cepas por "origen", el primer grupo corresponde a las "cepas de laboratorio" y el otro grupo corresponde a las "poblaciones de campo". Dentro de cada grupo se clasificó a las cepas por fenotipo (resistente o susceptible).

Los experimentos fueron llevados a cabo con hembras adultas de 2-5 días de edad alimentadas con azúcar, con diferentes fenotipos para resistencia a insecticidas piretroides. Las cepas de laboratorio (DDT F₃₀ y lambda-dialotrina F₂₉) y las poblaciones de campo (Buga F₁ y Yumbo F₂) fueron consideradas resistentes, mientras que las cepas Rockefeller y Medellín AF₂ se usaron como cepas susceptibles (tabla 8).

Para identificar las proteínas diferencialmente expresadas, se realizaron comparaciones de las abundancias relativas de las proteínas encontradas en los diferentes grupos. Inicialmente la abundancia de las proteínas encontradas en las

cepas de laboratorio-resistentes (DDT F₃₀ + lambdacialotrina F₂₉) se compararon con la cepa susceptible Rockefeller. Las poblaciones de campo consideradas resistentes (Buga F₁ + Yumbo F₂) se compararon con la cepa Medellín AF F₁ que fue susceptible a permetrina. También se realizaron comparaciones múltiples entre cada una de las cepas, usando todas las combinaciones posibles.

Cuadro 8. Clasificación de las muestras biológicas basada en los resultados de

Cepa/Población	FENOTIPO (Basados en resultados ensayos CDC)			MECANISMO ENZIMÁTICO (actividad de enzimas de detoxificación)			MECANISMO MOLECULAR (frecuencia de alelo mutante)	
	Permetrina	Deltametrina	Lambdacialotrina	alfa esterasas	GST	CYP P ⁴⁵⁰	ILE 1016	CYS 1534
Cepa de laboratorio								
Rockefeller	Susceptible	Susceptible	Susceptible				0,04	0,44
DDT F ³⁰	Pérdida	Resistente	Pérdida	ALTA			0,1	0,8
Lambdacialotrina F ²⁹	Resistente	Resistente	Resistente				0,72	0,99
Población de campo								
Buga F ¹	Resistente	Pérdida	Pérdida		ALTA		0,27	0,88
Yumbo F ²	Resistente	Pérdida	Resistente	ALTA	ALTA		0,69	0,99
Medellín (AF) F ¹	Susceptible	Pérdida	Pérdida		ALTA		0,02	0,44

los bioensayos CDC, pruebas bioquímicas y mutaciones kdr.

8.1.2. Disección de los túbulos de Malpighi (TM) y del intestino medio (IM)

Los mosquitos fueron anestesiados con frío en hielo. La disección se realizó sobre pilas de hielo para conservar el frío y evitar la descomposición de los tejidos. La disección se realizó usando buffer PBS esterilizado a pH 7,4. Inicialmente se sujetó el tórax con agujas entomológicas y fue separado del abdomen, posteriormente se separó el intestino medio y los túbulos de Malpighi. Con el fin de garantizar la integridad y limpieza de los intestinos medios y los túbulos de Malpighi, se retiraron las ovariolas y el divertículo. Una vez disectados los tejidos, éstos se transfirieron a un tubo de crio-conservación, manteniéndolos en hielo mientras se procedía a disectar todas las muestras. En cada tubo de crio-conservación se colocaron pooles de 20 y 25 muestras correspondientes a los túbulos e intestinos medios juntos. Inmediatamente se completaba el número de mosquitos disectados, los tubos fueron almacenados en nitrógeno líquido hasta ser enviados a Glasgow Polyomics, conservando siempre la cadena de frío.

8.1.3. Preparación de la muestra de proteínas: extracción y digestión con tripsina

Dos tubos de crio- preservación se seleccionaron al azar por cada cepa y población evaluada; a cada uno se les agregaron 100 µl de buffer de lisis SDT (SDS al 4% (p/v), Tris/HCL 100 mM, pH 7,6 y DTT 0,1 M). Las muestras se lisaron mecánicamente usando un macerador de plástico estéril y un homogeneizador de tejidos eléctrico durante un minuto. Las muestras lisadas se calentaron a 95°C durante 3-5 min y después se sometieron tres veces a sonicación por un minuto cada vez, y posteriormente se centrifugaron a 16.000 x g durante 5 min. El sobrenadante que contiene las proteínas se transfirió a un tubo eppendorf estéril.

Posteriormente las proteínas en el sobrenadante se precipitaron con 100% de acetona fría (4x volumen de muestra), los tubos se agitaron en un vórtex e incubaron durante 1 h a -20°C. Luego los tubos se centrifugaron durante 10 min a 13.000 x g y el sobrenadante se descartó. El material precipitado se lavó dos veces con 4 veces el volumen de acetona fría al 80% y se centrifugó a 13.000 x g por 10 min. Se descartó de nuevo el sobrenadante y el gránulo obtenido en el fondo del tubo se secó durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se re-suspendieron en 160 µl buffer de lisis SDT (SDS al 0,1% (p / v), Tris / HCL 100 mM, pH 7,6, DTT 0,1 M) para medir la concentración de las proteínas en cada tubo.

La concentración de proteína se midió mediante el ensayo de Bradford (106) (Bio-Rad, EE.UU.) usando como estándares de concentración albumina de suero bovino (BSA) (Merck) (cuadro 9). Una vez calculada la concentración de proteínas en cada tubo, se tomó la cantidad correspondiente a 20 µg de proteínas para cada muestra y se realizó la digestión de las proteínas con tripsina usando el kit de digestión de proteína (FASPTM) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y con algunas modificaciones.

Cuadro 9. Concentración de proteínas calculada para cada cepa usada para el análisis de espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Concentración esperada	Absorbancia sin corregir	Absorbancia corregida	concentración calculada mg/ml o ug / ul	µg de proteínas totales
BSA 0.1	0,4807	0,1833	0,118	19,016
BSA 0.2	0,6083	0,3109	0,221	35,422
BSA 0.3	0,6987	0,4013	0,294	47,045
BSA 0.4	0,8489	0,5515	0,414	66,358
BSA 0.5	0,9295	0,6321	0,479	76,721
Blanco	0,2974	0,00	-0,028	-4,551
Rockefeller	0,4827	0,1853	0,12	19,273
DDT F ₃₀	0,6428	0,3454	0,249	39,858
Lambdacialotrina F ₂₉	0,6281	0,3307	0,237	37,968
Buga F ₁	0,5883	0,2909	0,205	32,851
Yumbo F ₂	0,5791	0,2817	0,197	31,668
Medellín (AF) F ₁	0,7159	0,4185	0,307	49,257

Para cada muestra, el sobrenadante que contenía 20 µg (calculado) de proteínas digeridas se transfirió a una placa de Elisa con fondo en forma de V y se secaron al vacío en una microcentrífuga SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, modelo SPD1010). La placa fue cubierta con papel aluminio y guardada a -20 °C para posteriormente realizar el marcaje de los péptidos resultantes de la digestión de las proteínas con las etiquetas de marcaje de masa “**Isobaric Mass Tags**” y realizar el análisis de espectrometría de masas.

8.1.4. Marcaje de los péptidos usando TMT6x Isobaric Mass Tags

Las muestras digeridas se marcaron con el kit de marcaje de masas de TMT6x de (Thermo scientific 90061) siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones (ver anexo VIII). Inicialmente las muestras que fueron digeridas y secadas al vacío se re-suspendieron en 25 µl de TEAB (bicarbonato de trietilamonio) a 100 mM y se añadieron 18 µl del reactivo marcador TMT a cada una de las muestras. La reacción se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 8 µl de HCl -hidroxilamina al 5% a las muestras e incubaron durante 15 min para detener la reacción de marcaje. Todas las muestras se combinaron en cantidades iguales en un tubo nuevo eppendorf. El volumen que contenía 6 µg de mezcla de la muestra se colocó en una placa de 96 pozos de fondo en forma de V y se secó al vacío en una microcentrífuga SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, modelo SPD1010). Para el análisis de

cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) se utilizó el volumen de la muestra correspondiente a 3 µg de las proteínas en las muestras marcadas.

8.1.5. Identificación de proteínas por el método de nanoflow HPLC electropray- espectrometría de masas en tándem (nLC-ESI-MS / MS)

Las muestras de péptidos se analizaron mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS) usando un espectrómetro de masas Orbitrap Elite MS (Thermo Scientific). Los péptidos analizados fueron inicialmente separados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un sistema de elución por gradiente, estos péptidos se desalinizaron y se concentraron durante 4 min en una columna cromatográfica “trampa” seguido de un gradiente de acetonitrilo (en ácido fórmico al 0,01% v/v). Para la columna analítica se utilizó un caudal de disolvente fijo de 0,3 µl/min. El disolvente de la columna “trampa” fluye a una velocidad fija de 25 µl/min utilizando acetonitrilo al 1% con ácido fórmico al 0,01% v/v. Las identificaciones (ID gen) de proteínas se asignaron utilizando el motor de búsqueda Mascot (v2.5.1). Las secuencias de los péptidos de las proteínas en la muestra se confrontaron con las proteínas depositadas en la base de datos del “National Center for Biotechnology Information “NCBI -Genbank.

8.1.6. Análisis bioinformático e identificación de las proteínas

El procesamiento de los archivos de datos .raw obtenidos de la espectrometría de masas se llevó a cabo utilizando el software comercialmente disponible “Proteome Discoverer” v. 2.1.1.21 de Thermo Scientific, teniendo como criterios los siguientes parámetros: digestión “enzima tripsina”, sitios de escisión perdidos “4”, longitud del péptido mínimo “6”, longitud máxima del péptido “144”, número mínimo de secuencias de péptidos “1” y tolerancia de masa del precursor 10 ppm. Se establecieron como modificaciones dinámicas la oxidación de metionina, acetilación del (N-término) carbamida- metilación en (C) y como modificaciones estáticas “TMT6plex” en cualquier N-terminal y carbamida-metilación en (C).

Todos los datos fueron buscados en las bases de datos usando como motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science, UK), los péptidos obtenidos por la espectrometría de masas fueron confrontados contra la base de datos de proteínas del NCBI para *Aedes (Stegomyia) aegypti* y para las anotaciones de las proteínas en las bases de datos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (SwissProt TaxID = 7159) y *Aedes (Stegomyia) aegypti* (TrEMBL TaxID = 7159).

Anotaciones de “gen ontology” (GO) correspondientes a procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares de proteínas de *Ae. aegypti* fueron obtenidos a partir de la base de datos del GO (<http://www.geneontology.org>). Información de anotaciones para las familias de

proteínas (Pfam;) e identificación de los genes de la base de “Entrez” se asignaron de acuerdo a los resultados utilizando el software Proteome Discoverer”.

8.1.7. Expresión diferencial de las proteínas

Para evaluar la expresión diferencial de las proteínas en las diferentes cepas evaluadas, se calculó la tasa de abundancia de cada una de las proteínas en las seis cepas evaluadas y luego se realizó un análisis de razón de abundancia entre las diferentes cepas evaluadas con el fin de encontrar las proteínas sobre expresadas en las cepas resistentes con respecto a las cepas susceptibles. Se consideró como el primer umbral en el “fold change” o razón de abundancia 1,5 y el umbral del último cambio 7,5 veces. Todos los resultados se exportaron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel.

Los análisis para evaluar la expresión diferencial entre los diferentes fenotipos y cepas fueron los siguientes:

1. Muestras de laboratorio: fenotipo vs fenotipo:
resistentes (DDT + lambda-dialotrina) vs susceptible (Rockefeller).
2. Muestras de campo : fenotipo vs fenotipo:
resistentes (Yumbo + Buga) vs susceptible (Medellín AF)
3. Muestras de laboratorio: cepa vs cepa:
DDT (resistente) vs Rockefeller (susceptible)
Lambda-dialotrina (resistente) vs Rockefeller (susceptible)
4. Muestras de campo: Población vs población
Yumbo (resistente) vs Medellín AF (susceptible)
Buga (resistente) vs Medellín AF (susceptible)
Yumbo vs Buga
5. Muestras de laboratorio vs muestras de campo (resistentes): cepa vs población
lambda-dialotrina vs Yumbo
DDT vs Yumbo
lambda-dialotrina vs Buga
DDT vs Buga

8.1.8. Posibles asociaciones funcionales entre las proteínas identificadas

Las proteínas identificadas se analizaron en términos de posibles redes de asociación funcional proteína- proteína usando el servidor STRING 10.5 (<http://www.string-db.org>). Para el análisis de estas interacciones se tuvieron en cuenta los siguientes criterios: puntaje mínimo requerido para la interacción (0,900), máximo de interacciones mostradas (5), recursos activos de interacciones (experimentos, bases de datos, co- expresión y vecindad génica). Para facilitar el análisis de las posibles interacciones, en las gráficas sólo se tuvieron en cuenta

aquellas proteínas que estaban ligadas a un nodo, fueron eliminadas del gráfico las proteínas que no estaban representadas en ningún nodo de interacción.

8.2. Resultados

8.2.1. Identificación de las proteínas de los túbulos de Malpighi y del intestino medio de *Aedes (Stegomyia) aegypti*.

Usando el software Proteome Discover, 438 proteínas fueron identificadas para ambos tejidos, 28 de las cuales tenían una modificación de acetilación en su extremo N-terminal. El número de proteínas identificadas representa casi el 1.3% de la cantidad total predicha en los genes activos para el genoma de *Ae. aegypti* (Anexo IX) (73).

Varias proteínas relacionadas con la detoxificación de los insecticidas piretroides y DDT fueron encontradas en los tejidos analizados, entre las cuales se encuentran tres citocromos P⁴⁵⁰ y seis proteínas pertenecientes a la familia de las glutatión S transferasas. Los citocromo identificados fueron CYP6Z9, CYP6AG3 y CYP9J10 y las GST (GSTD1, GSTS1, GSTe4, GSTX1, GPXH1 y GSTe2).

8.2.2. Análisis de ontología génica “gen ontology (GO)” y asociaciones funcionales entre las proteínas identificadas

De acuerdo al análisis del “gen ontology (OG)” para la función molecular, la mayoría de las proteínas en estos tejidos son enzimas que participan en actividades catalíticas, en la unión de nucleótidos y de iones metálicos. (figura 37).

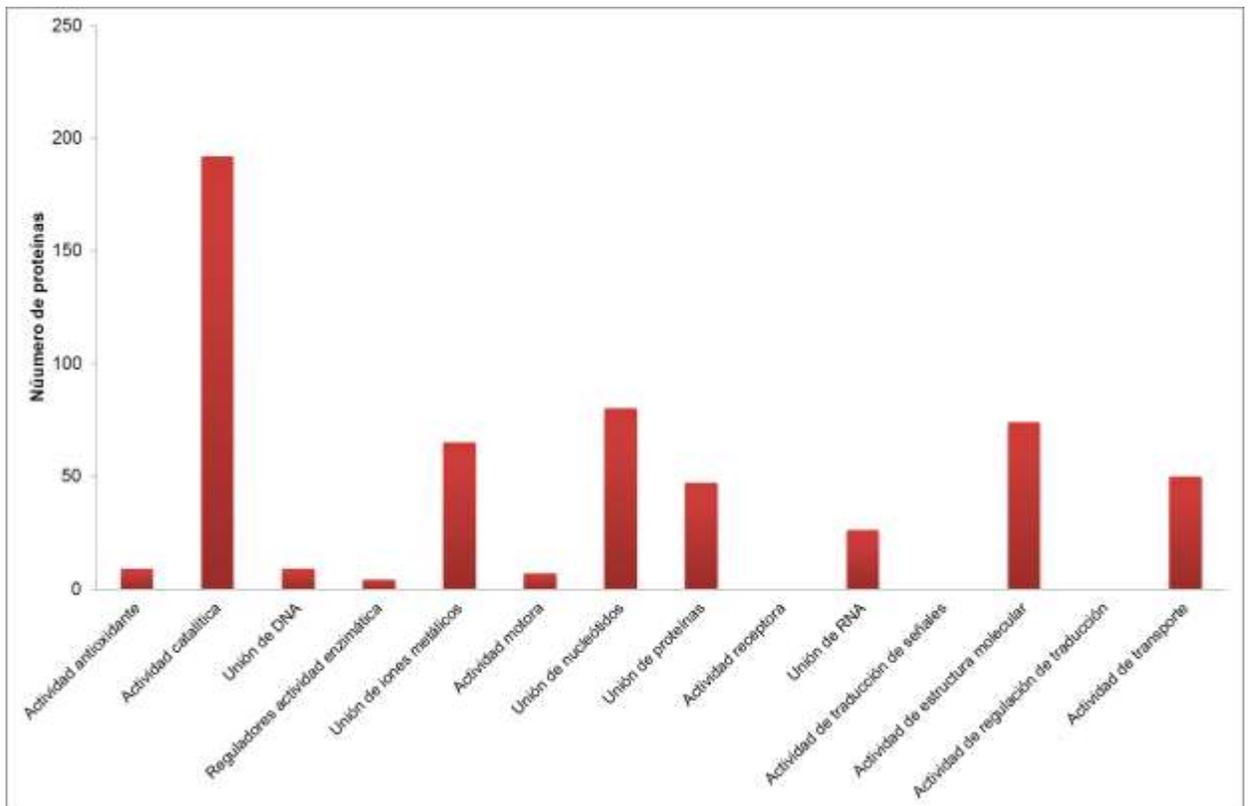


Figura 37. Categorías en la función molecular de las proteínas identificadas en los túbulos de Malpighi y el intestino medio de *Aedes (Stegomyia) aegypti*. Las categorías se obtuvieron de anotaciones de “Gen ontology” GO (<http://www.geneontology.org/page/go-database>).

El análisis del GO de los procesos biológicos identificó 12 categorías en las cuales estas proteínas podrían estar agrupadas (figura 38). Los grupos más abundantes corresponden a proteínas implicadas en el metabolismo de aminoácidos (63%), transporte (17%), regulación del proceso biológico (6%), organización celular y biogénesis (6%) y otros (8%).

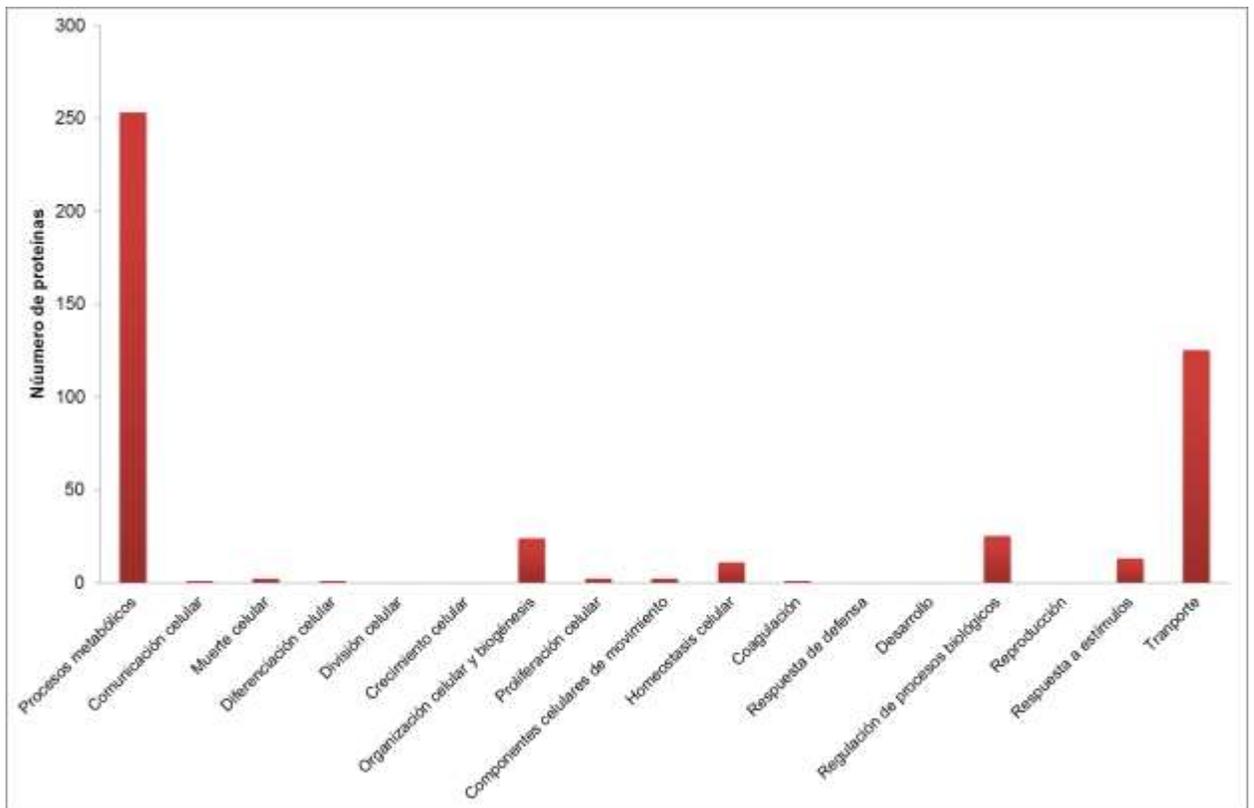


Figura 38. Categorías de los procesos biológicos de las proteínas identificadas en los túbulos de Malpighi y el intestino medio de *Aedes (Stegomyia) aegypti*. Las categorías se obtuvieron de anotaciones del “gen ontology” GO (<http://www.geneontology.org/page/go-database>).

Debido a que la mayoría de las proteínas encontradas en los TM y el IM se asociaron con el metabolismo de aminoácidos, refleja las altas actividades metabólicas en estos tejidos. Al realizar el análisis de posibles relaciones proteicas funcionales de las 438 proteínas identificadas en ambos tejidos en todas las cepas, el análisis de redes reveló cinco grupos consistentes de asociaciones funcionales entre estas proteínas (figura 39).

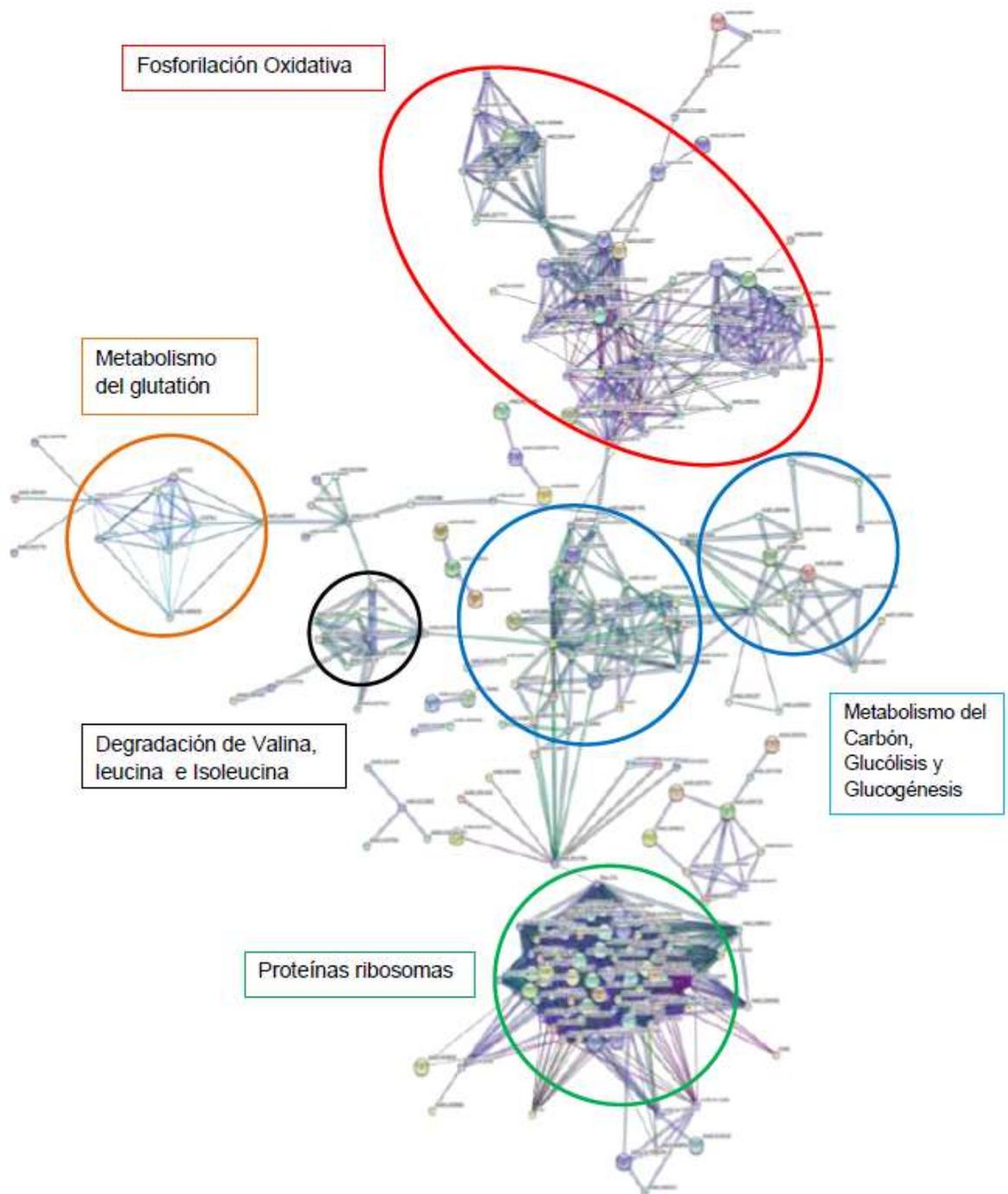


Figura 39. Asociaciones funcionales predichas para las proteínas identificadas en los túbulos de Malpighi y el intestino medio de *Aedes (Stegomyia) aegypti*. Las redes fueron realizadas usando la base de datos de STRING 10.5. Para la construcción se tuvo en cuenta: > 5 interacciones, experimentos, bases de datos, co- expresión y vecindad génica.

El mayor grupo (indicado en verde) corresponde a 61 proteínas implicadas en la estructura ribosomal y traducción, seguido de 48 proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa (grupo rojo); la tercera red de mayor importancia está relacionada con el metabolismo del carbón (35 proteínas) asociada a la red conformada por las proteínas que intervienen en la glucólisis y glucogéogénesis. Una cuarta red (grupo negro) está relacionada con nueve proteínas que degradan los aminoácidos valina, leucina e Isoleucina; finalmente 12 proteínas fueron agrupadas en una red del metabolismo del glutatión (figura 40).

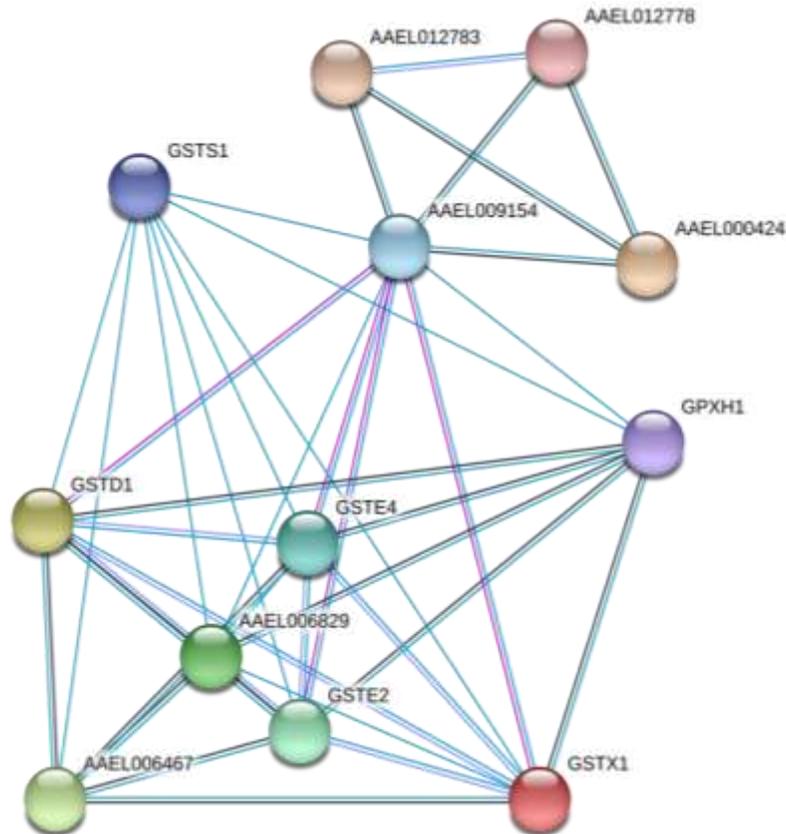


Figura 40. Asociaciones funcionales predichas para las proteínas agrupadas en una red del metabolismo del glutatión, relacionada con la resistencia a insecticida DDT.

De estas 12 proteínas agrupadas en el metabolismo del glutatión, seis eran GSTs (Cuadro 10). La presencia de estas GSTs podría tener algún papel en el mecanismo de resistencia al insecticida DDT en *Ae. aegypti*. En Colombia la resistencia al DDT ha sido alta en todas las poblaciones, y varios estudios han relacionado la actividad de las GSTs como el mecanismo enzimático probable asociado con esta resistencia (8,21,99,126).

Cuadro 10. Proteínas agrupadas en el metabolismo del glutatión.

Nº	Nombre de la proteína	VectorBase DB Nº
1	Alcohol dehydrogenase	AAEL006467
2	Microsomal glutathione s-transferase	AAEL006829
3	Glutathione synthetase	AAEL009154
4	Protease m1 zinc metalloprotease	AAEL012778
5	Leucine aminopeptidase	AAEL000424
6	Protease m1 zinc metalloprotease	AAEL012783
7	GSTS1 - Glutathionetransferase	AAEL011741-PA
8	GSTX1 - Glutathionetransferase	AAEL000092-PA
9	GSTe2 - Glutathionetransferase	AAEL007951-PA
10	GSTD1 - Glutathionetransferase	AAEL001061-PA
11	GPXH1 - Glutathione peroxidase	AAEL012069-PB
12	GSTe4 - Glutathionetransferase	AAEL007962-PA

8.2.3. Expresión diferencial de las proteínas entre los diferentes fenotipos para resistencia a insecticidas piretroides.

El análisis de comparación entre la expresión de proteínas de las muestras provenientes de cepas consideradas resistentes contra las susceptibles (tabla 11), demostró que en las cepas seleccionadas en el laboratorio (DDT + lambdacialotrina) la expresión diferencial de las proteínas al comparar ambos fenotipos (resistente vs susceptible) fue mínima, sólo una proteína sobre-expresada se encontró en las cepas resistentes; que corresponde a una proteína estructural de la cutícula identificada como “cuticular pupal 78E_ AAEL008289-PA”.

Las comparaciones entre cada una de las cepas, mostraron que la expresión diferencial de las proteínas en las cepas de laboratorio es muy poca. En el caso de DDT F₃₀ vs Rockefeller, solo una proteína fue sobre-expresada, esta proteína identificada con el VectorBase DB No (AAEL012618-PA) corresponde a una proteína hipotética conservada.

Al comparar la cepa lambdacialotrina F₂₉ contra la cepa Rockefeller, también se encontró una sola proteína diferencialmente expresada, esta proteína fue identificada como “cuticular pupal 78E”, con VectorBase DB No _ AAEL008289-PA.

Cuadro 11. Número de proteínas diferencialmente expresadas entre los diferentes fenotipos y cepas. (RL: resistente de laboratorio; SL: susceptible de laboratorio; RC: resistente de campo; SC: susceptible de campo).

Origen	N° de proteínas	
	Sobre-expresadas	Bajo-expresadas
RL (DDT F ₃₀ + Lambdacialotrina F ₂₉) vs SL (Rockefeller)	1	1
RC (Buga F ₁ + Yumbo F ₂) vs SC (Medellín (AF) F ¹)	60	32
Cepa vs cepa		
Laboratorio		
DDT F ₃₀ vs Rockefeller (RL vs SL)	1	2
Lamdacialotrina F ₂₉ vs Rockefeller (RL vs SL)	1	1
Lamdacialotrina F ₂₉ vs DDT F ₃₀ (RL vs RL)	3	2
Campo		
Yumbo F ₂ vs Medellín (AF) F ₁ (RC vs SC)	97	145
Buga F ₁ vs Medellín (AF) F ₁ (RC vs SC)	11	4
Yumbo F ₂ vs Buga F ₁ (RC vs RC)	100	168
Laboratorio vs Campo		
Rockefeller vs Medellín (AF) F ₁ (SL vs SC)	5	10
Lamdacialotrina F ₂₉ vs Yumbo F ₂ (RL vs RC)	135	90
Lamdacialotrina F ₂₉ vs Buga (RL vs RC)	23	52
DDT F ₃₀ vs Yumbo F ₂ (RL vs RC)	148	93
DDT F ₃₀ vs Buga F ₁ (RL vs RC)	18	39

En contraste, al realizar las comparaciones entre las poblaciones de campo, se observó mayor variabilidad en cuanto a la cantidad de proteínas expresadas diferencialmente. Cuando se comparó a las cepas resistentes de campo (Buga F₁ + Yumbo F₂) contra la cepa susceptible de campo (Medellín (AF) F¹), se encontraron 60 proteínas sobre expresadas en las resistentes de campo.

El 67% (40/60) correspondían a enzimas relacionadas con la traducción y con la estructura del ribosoma. Cada una de estas 60 proteínas, fue identificada usando las secuencias obtenidas en el análisis de LC-MS y fueron comparadas con las bases de datos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* depositadas en el NCBI por medio de un pBLST (tabla 12). A pesar de realizar una búsqueda en las bases de datos disponibles para *Ae. aegypti*, cuatro proteínas no pudieron ser indentificadas. Entre ellas tenemos las proteínas AAEL017516-PA y AAEL016982-PA; cabe

resaltar que éstas fueron las proteínas que fueron mayormente expresadas diferencialmente en las cepas resistentes de campo.

Cuadro 12. Proteínas diferencialmente expresadas en las cepas resistentes de campo (Buga F₁ + Yumbo F₂) al ser comparadas con la cepa susceptible de campo (Medellín (AF) F₁).

N°	Nombre de la proteína	VectorBase DB No	Razón de abundancia (RA)
1	60 ribosomal protein L21	AAEL017516-PA	2,698
2	AAEL016982-PA	AAEL016982-PA	2,477
3	Vitellogenin-A1	AAEL010434-PA	2,235
4	60S ribosomal protein L37	AAEL017198-PA	2,127
5	Ribosomal protein l35a, putative	AAEL000823-PA	2,099
6	Histone H1, putative	AAEL015464-PA	2,022
7	60S ribosomal protein L34	AAEL009341	2,015
8	AAEL002178-PA, partial -conserved hypothetical protein	AAEL002178-PA, partial	2,00
9	60S ribosomal protein L44 L41, putative	AAEL003942-PA	1,973
10	AAEL017516-PB	AAEL017516-PB	1,972
11	Histone H3,3	histone H3,3 [<i>Homo sapiens</i>]	1,887
12	60S ribosomal protein L36	AAEL000010-PB	1,884
13	Ribosomal protein L15	ribosomal protein L15	1,862
14	Histone H4 replacement, isoform C	histone H4 [<i>Drosophila melanogaster</i>]	1,839
15	40S ribosomal protein S15/S22	AAEL009151-PA	1,81
16	Serine palmitoyltransferase	AAEL000706-PA	1,795
17	Histone H2A	AAEL007609-PA	1,794
18	60S ribosomal protein L37	AAEL013272	1,777
19	60S ribosomal protein L5	AAEL004325	1,75
20	ribosomal protein L19	ribosomal protein L19	1,719
21	60S ribosomal protein L13a, partial	60S ribosomal protein L13a, partial	1,709
22	60S ribosomal protein L6	AAEL008188-PA	1,704
23	40S ribosomal protein S8	AAEL008103	1,692
24	40S RIBOSOMAL PROTEIN S6	AAEL000032	1,689
25	40S ribosomal protein S26	AAEL002832-PA	1,687
26	Histone H2B	AAEL015674-PA	1,671
27	Microsomal glutathione s-transferase	AAEL006829-PA	1,653
28	60S ribosomal protein L18	AAEL008481	1,652
29	CYTB gene product (mitochondrial)	AAEL018685	1,647

N°	Nombre de la proteína	VectorBase DB No	Razón de abundancia (RA)
30	40S ribosomal protein S14	AAEL005266-PA	1,636
31	Mitochondrial ATP synthase lipid binding protein precursor	AAEL012740-PA	1,632
32	60S ribosomal protein L24	AAEL008329-PA	1,621
33	AAEL004151-PD Protein ribosomal	AAEL004151-PD	1,613
34	60S ribosomal protein L21	60S ribosomal protein L21	1,605
35	Histone H2A	AAEL003669-PA	1,603
36	60S ribosomal protein L7a	AAEL005722-PA	1,596
37	40S ribosomal protein S23	AAEL012686-PA	1,595
38	AAEL003750-PB	AAEL003750-PB	1,595
39	Troponin I	AAEL010850-PA	1,589
40	60S ribosomal protein L11	AAEL012944-PB	1,587
41	60s ribosomal protein l38	AAEL005451-PA	1,585
42	60S ribosomal protein L13	60S ribosomal protein L13	1,572
43	40S ribosomal protein S9	AAEL001759-PA	1,569
44	60S ribosomal protein L27a	60S ribosomal protein L27a [<i>Aedes albopictus</i>]	1,563
45	40S ribosomal protein S2	AAEL010168-PA	1,562
46	60S ribosomal protein L7	AAEL012585-PB	1,546
47	Ribosomal protein L3	ribosomal protein L3	1,544
48	40S ribosomal protein S5	AAEL013625-PD	1,544
49	40S ribosomal protein S4	40S ribosomal protein S4	1,54
50	Putative RNA-binding protein	putative RNA-binding protein	1,533
51	40S ribosomal protein S11	AAEL002372-PB	1,532
52	60S ribosomal protein L4	AAEL009994-PA	1,531
53	60S ribosomal protein L22	AAEL007771-PB	1,531
54	60S ribosomal protein L9	AAEL007699-PA	1,522
55	Methionine aminopeptidase 2	methionine aminopeptidase 2	1,516
56	Sodium/potassium-dependent ATPase beta-2 subunit	AAEL010783-PA	1,516
57	60S ribosomal protein L35	60S ribosomal protein L35	1,515
58	60S ribosomal protein L2/L8	AAEL000987-PA	1,513
59	Aminopeptidase N	aminopeptidase N	1,513
60	heat shock protein	AAEL014843-PA	1,506

9. CAPÍTULO V

9.1. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el estado de la susceptibilidad a los principales insecticidas piretroides, carbamatos y organofosforados que han sido utilizados en los programas de control de vectores de las arbovirosis urbanas en Colombia. La finalidad es brindar un conocimiento más detallado de los mecanismos de resistencia a insecticidas que operan en cada una de las poblaciones de *Ae. aegypti* evaluadas. Este conocimiento permitirá facilitar la toma de decisiones en términos de uso de insecticidas a nivel municipal. Estos resultados nos permitieron observar al mismo tiempo los principales mecanismos enzimáticos y moleculares de resistencia a los insecticidas presentes en las poblaciones de *Ae. aegypti* colectadas en campo durante los años 2014-2015. Las cepas seleccionadas en el laboratorio nos sirvieron como modelo biológico pues nos permitieron obtener un mejor entendimiento de los mecanismos de resistencia que aparecen cuando una población de mosquitos es expuesta durante un largo periodo de tiempo al mismo compuesto.

Los bioensayos CDC, las pruebas bioquímicas y la detección de las mutaciones *kdr* nos permitieron reconocer comportamientos diferenciales entre poblaciones inclusive las pertenecientes a un mismo municipio, lo cual obedece a diferencias locales determinadas por la variabilidad genética de la especie y por la presión de selección ejercida por las medidas de control químico focal para el control de los vectores de arbovirosis urbanas (129). Estos resultados demuestran entonces que las poblaciones de *Ae. aegypti* en un área urbana están en flujo genético continuo y que pueden responder a la presión de selección focal incluidos los insecticidas y los xenobióticos encontrados en el medio ambiente (2).

Bioensayos CDC

El estado de la susceptibilidad se determinó usando los bioensayos CDC(20). Las dosis diagnósticas calculadas fueron las mismas usadas por la Red de vigilancia de la resistencia del INS(127) y otros investigadores (8,21,83,129). Sin embargo, antes de realizar los bioensayos en nuestro estudio, las dosis diagnósticas (DD) y el cálculo del tiempo diagnóstico (TD) se volvieron a estandarizar con nuestra cepa de referencia susceptible Rockefeller. Esto debido al uso de nuevos lotes de insecticidas que pudiesen interferir en la interpretación de los resultados.

En general encontramos que las DD coincidían con las usadas por el INS, pero se observó una variación en los TD para todos los insecticidas piretroides. Los tiempos diagnósticos para permetrina usados en otros estudios fueron de 15 minutos, en este estudio el tiempo aumentó a 45 minutos. Para deltametrina y lambdacialotrina, ambos TD eran 30 y 15 minutos respectivamente, nuestro TD

calculado para estos insecticidas fue de 40 minutos para ambos. Las variaciones observadas pueden ser producto de los lotes de insecticidas evaluados. Es por esto que se sugiere siempre estandarizar las dosis diagnóstico en este tipo de estudio y se recomienda siempre usar la cepa de referencia susceptible como control cuando se corrigen las líneas base de los insecticidas a evaluar.

Diversas investigaciones sobre el estado de susceptibilidad a los insecticidas usados en salud pública en Colombia, se han realizado por medio de los bioensayos CDC, debido a que son más accesibles que los bioensayos de la OMS. Los bioensayos de la OMS requieren de tubos y papeles impregnados que son provistos por esta entidad y en ocasiones la llegada de estos insumos es tardía y en algunos casos llegan vencidos. Es por esto que los bioensayos de CDC se han utilizado como una metodología para hacer vigilancia del estado de la resistencia en los vectores de diversas enfermedades.

Los bioensayos CDC son más fácil de usar debido a que solo se requiere de la compra del ingrediente activo del insecticida y de las botellas Wheaton que pueden ser usadas múltiples veces. Cabe resaltar que lo importante para este ensayo es la impregnación de las botellas y su posterior limpieza para evitar residuos de los insecticidas que puedan alterar los resultados. Es por eso entonces que los bioensayos CDC son una buena metodología que pueden aplicar las secretarías de salud para realizar el monitoreo de la susceptibilidad de los vectores de enfermedades a los insecticidas usados por los programas de control vectorial.

Estado de la susceptibilidad a los insecticidas piretroides, carbamatos y organofosforados

Los resultados de este estudio mostraron que la resistencia a los insecticidas piretroides en particular a la permetrina, sigue siendo un fenómeno persistente en las poblaciones de *Ae. aegypti*. De acuerdo con los bioensayos CDC, la mayoría de las cepas de laboratorio al igual que las poblaciones de campo evaluadas, fueron resistentes al piretroide tipo I- permetrina, excepto la población de campo Medellín AF y la cepa DDT F₃₀ que fueron las únicas cepas susceptibles a este piretroide.

Los insecticidas piretroides cuyo ingrediente activo es la permetrina, no se han usado en Colombia para el control de dengue en salud pública (125), por lo que es interesante que 6/7 poblaciones evaluadas fueran resistentes a este insecticida. La resistencia a permetrina ha sido documentada también en *Ae. aegypti* de los departamentos de la región Caribe(22), del Casanare (129), Chocó y Putumayo. En estos dos últimos departamentos, la pérdida de susceptibilidad de *Ae. aegypti* a esta molécula se ha asociado más al uso de la permetrina en los toldillos impregnados de larga duración en los programas del control de la malaria y como ingrediente activo común encontrado en los insecticidas de uso doméstico y

agrícolas (129). Estudios previos por Fonseca –Gonzales *et al.* (21) en el año 2006 encontraron que poblaciones de *Ae. aegypti* pertenecientes a tres municipios del departamento de Antioquia fueron susceptibles a permetrina. En nuestro estudio se encontró que la cepa Medellín AF fue susceptible a todos los insecticidas piretroides, en contraste con la cepa Medellín BF que fue resistente a los tres piretroides. En este municipio que pertenece al departamento de Antioquia los mosquitos de estas cepas fueron colectados en barrios de la ciudad con una historia diferente en el uso constante del insecticida malatión. Los mosquitos de la cepa Medellín AF pertenecen a barrios con una historia del uso constante del malatión por aproximadamente 20 años(80), donde los porcentajes de mortalidad a este insecticida han bajado relativamente poco (92.5); por el contrario los mosquitos de la cepa Medellín BF pertenecen a barrios donde el malatión no ha sido usado, y es 100% eficiente en los mosquitos de esa población. Es interesante entonces observar el comportamiento tan diferente de las poblaciones de *Ae. aegypti* inclusive dentro de un mismo municipio.

En cuanto al estado de susceptibilidad al insecticida deltametrina, se encontró que las tres cepas seleccionadas en el laboratorio y solo una población de campo fueron resistentes a este insecticida. En Colombia la resistencia y la susceptibilidad a deltametrina no tienen un patrón de distribución fijo. Por ejemplo se han registrado poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes en los departamentos del Meta, Casanare, Atlántico, Cesar y Huila (8,22,129). Poblaciones de *Ae. aegypti* susceptibles a este insecticida se han reportado en los departamentos de Antioquia, Chocó, Cundinamarca, Caquetá, Casanare, Cauca, Guaviare, Meta, Nariño, Santander, Putumayo y Valle del Cauca (8,83,129). Por lo que se puede observar de esta distribución y de nuestros resultados es que la susceptibilidad a la deltametrina está más generalizada que la resistencia, razón por la cual se podría pensar en continuar el uso de este insecticida en algunos de los programas de control vectorial, siempre y cuando se compruebe en cada localidad la susceptibilidad de los vectores a este compuesto.

En nuestro estudio de las 10 poblaciones evaluadas, cinco cepas fueron consideradas resistentes para lambdacialotrina, entre estas tenemos dos cepas de laboratorio y tres cepas de campo. En las otras cinco cepas se observó una disminución de la susceptibilidad a este insecticida (80% <mortalidad< 99-100%). En Colombia se ha encontrado que la lambdacialotrina es el insecticida piretroide tipo II al cual los vectores tienen mayor resistencia en el país (125,142).

La lambdacialotrina fue el insecticida que se usó en los programas de control vectorial después de que el DDT fuera suspendido en el país; el uso de la lambdacialotrina se intensificó en las campañas contra el dengue y contra la malaria en algunos departamentos de Colombia (21,83,129,142). La resistencia observada a la lambdacialotrina puede ser producto del uso intensivo de este insecticida piretroide en estos dos programas de control desde los años 90's y

posiblemente debido a la resistencia cruzada que se puede generar al usar por más de 50 años el DDT en las campañas anti vectoriales.

En Colombia el fenómeno de la resistencia generalizada al DDT ha sido ampliamente documentada (8,83,127,142). Esto fue observado también en nuestros resultados, ya que todas las cepas de campo fueron altamente resistentes al DDT incluso con mortalidades más bajas cuando se comparan con las cepas que han sido seleccionadas en el laboratorio. La alta resistencia al DDT en *Ae. aegypti* es un fenómeno que no solo ha sido documentado ampliamente en el país sino que también a nivel mundial(17,18,76,81).

En resumen los resultados mostraron que la mayoría de las poblaciones de campo son resistentes a permetrina, pero algunas mantienen un patrón de susceptibilidad a los piretroides deltametrina y lambdaialotrina. Caso contrario sucedió con las cepas seleccionadas en el laboratorio donde se pudo observar que las cepas Propoxur F₂₉ y Lambdaialotrina F₂₉ presentaron resultados similares, pues ambas fueron resistentes a los tres piretroides evaluados. Esto nos hace pensar que el proceso de selección con propoxur o lambdaialotrina estaría generando un mecanismo de resistencia que confiere resistencia cruzada entre ambos tipos de insecticidas.

Los bioensayos CDC con propoxur y malatión mostraron que todas las cepas de campo fueron susceptibles a ambos insecticidas. Sin embargo se encontró que las tres cepas seleccionadas en el laboratorio fueron resistentes a propoxur pero susceptibles a malatión indicándonos que entre las cepas de laboratorio no hay mecanismos de resistencia que generen resistencia cruzada entre propoxur y malatión. En Colombia son pocas las poblaciones que han presentado resistencia a ambos insecticidas (8,142); de manera general, en anteriores estudios se ha documentado la susceptibilidad al malatión en poblaciones de *Ae. aegypti* del país, a pesar de que este insecticida se ha usado con frecuencia en los programas de control de vectores, especialmente durante los brotes de DENV por medio de fumigaciones ULV la susceptibilidad a este insecticida persiste en las poblaciones de *Ae. aegypti* en Colombia(21).

Mecanismos de resistencia enzimáticos: Enzimas de detoxificación esterases, GST y Citocromos P⁴⁵⁰

Los análisis bioquímicos mostraron que la actividad de las enzimas de detoxificación de los insecticidas en las cepas y poblaciones estudiadas fue variable. Tanto las enzimas esterases como los citocromos P⁴⁵⁰ se encontraron elevadas en muy pocas cepas y poblaciones, en contraste las GST se observaron elevadas en siete de las 11 cepas y poblaciones evaluadas. En particular las cepas seleccionadas en el laboratorio no presentaron un aumento significativo en la actividad de estas enzimas, pues se observó que solo la cepa DDT F₃₀ fue la

única con actividad elevada de las esterasas y ninguna cepa de laboratorio registró un aumento de los CYPs P⁴⁵⁰.

Las enzimas alfa esterasas se encontraron elevadas en dos cepas de campo (Yumbo y Medellín BF), mientras que las beta esterasas solo en la cepa Propoxur. La actividad de las esterasas con el sustrato paranitrofenil solo se encontró elevada en una cepa de campo (Girón). En anteriores estudios en Colombia, se observó que los altos niveles de las enzimas esterasas estaban más asociadas a la resistencia a los organofosforados principalmente al temefós (8,95). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los ésteres carboxílicos y se ha encontrado que los cambios en sus niveles de expresión son el mecanismo de resistencia que ocurre con mayor frecuencia en los insectos. Dado que todas las poblaciones evaluadas fueron susceptibles al malatión y solo la cepa Palmira fue resistencia al temefós, se sugiere que esta enzima en las poblaciones con actividad elevada no está participando en la resistencia a estos insecticidas.

Los citocromos P⁴⁵⁰ solo se encontraron elevados en las cepas de campo Yumbo y Medellín BF; ambas poblaciones fueron resistentes a permetrina y deltametrina. De las cepas seleccionadas en el laboratorio ninguna registró un aumento de la actividad de esta enzima. Los citocromos P⁴⁵⁰ se han encontrado aumentados en poblaciones resistentes a piretroides, relacionándolos como mecanismos de resistencia en estas poblaciones. Estas enzimas contienen grupos hemo-tiolatos y están presentes en casi todos los organismos donde están involucradas en el metabolismo de una amplia gama de moléculas, incluidos los insecticidas piretroides (110). La mayoría de los P⁴⁵⁰ que están involucrados en procesos de desintoxicación catalizan la oxidación de xenobióticos a través de una reacción monooxigenasa, que modifica la estructura química de los insecticidas para hacerlos más solubles, el cambio estructural hace que el insecticida se pueda conjugar con ácidos orgánicos permitiendo la eliminación de estos compuestos a través de la diuresis del mosquito (86,111).

Diferentes perfiles enzimáticos de las esterasas y CYPs P⁴⁵⁰ han sido descritos en las poblaciones de campo de Colombia a lo largo de los años. Por ejemplo Ocampo & Wesson durante los años 2000-2001 encontraron una disminución de las esterasas en las poblaciones de Cali, pero se observó que algunas de estas mismas poblaciones aumentaron los CYPs P⁴⁵⁰ con tan solo un año de diferencia(2). Durante el año 2009 en un estudio con poblaciones de *Ae. aegypti* del departamento del Casanare las enzimas esterasas se encontraron disminuidas cuando se compararon con la cepa susceptible Rockefeller, pero todas presentaron citocromos P⁴⁵⁰ elevados. En este estudio todas las poblaciones evaluadas fueron resistentes a permetrina y lambda-cialotrina (129).

Ocampo *et al.*, encontraron que en mosquitos *Ae. aegypti* de localidades de Huila, Cauca, Nariño y Valle del Cauca presentaban enzimas esterasas elevadas(8). Sus resultados podrían estar reflejando la respuesta de los mosquitos debido al uso

intensivo que tenía el temefos desde 1980 y del malatión en los programas de control de dengue durante los años 90s(125) y posterior década hasta la introducción de los piretroides como insecticidas de primera línea en el control vectorial.

En *Ae. aegypti* de la costa caribe colombiana, Maestre entre los años 2010-2011 no encontró actividades alteradas de las enzimas de detoxificación a pesar de que los mosquitos presentaban resistencia a los piretroides que se evaluaron, indicando que el mecanismo de kdr era el responsable principal de la resistencia a los piretroides deltametrina, ciflutrina y permetrina en estas poblaciones (22). Nuestros resultados sugieren que las esterasas al igual que los citocromos P⁴⁵⁰ no son los mecanismo enzimáticos más predominantes en las poblaciones de campo en el período que estamos evaluando y por lo tanto no son los mecanismos principales que confieren la resistencia a los piretroides tipo I y II en las cepas que de Yumbo y Medellín.

La variabilidad en el comportamiento de las enzimas esterasas y citocromos P⁴⁵⁰ que se ha observado a través de los años en diferentes estudios podría deberse al cambio en los patrones de fumigación, pues el uso de malatión se vio reducido y se incrementó el uso de los piretroides como adulticidas. igualmente el uso del temefos en el control larvario se disminuyó debido a los reportes previos de resistencia a este organofosforado (66), por lo que en muchas secretarías de salud se optó por usar larvicidas de origen biológico como *Bacillus thuringiensis* o algunos inhibidores de crecimiento y de la síntesis de la quitina

La actividad de las GST se encontró elevada en siete de las 11 cepas evaluadas, observándose un incremento en una de las cepas seleccionadas en el laboratorio (Propoxur F₂₉) y seis cepas de campo. Las glutatión S transferasas, están asociadas con la desintoxicación y resistencia a los insecticidas DDT (Diclorodifeniltricloroetano) (96,98–100). Se ha documentado que esta clase de GSTs juegan un papel muy importante en conferir resistencia al DDT y particularmente en Colombia son las GST epsilon 2 (GSTe2) las que se han encontrado relacionadas con la resistencia al DDT en el país (8,21,99,126). La presencia de estas GSTs podría tener algún papel en la regulación y en el mecanismo de resistencia en las poblaciones de *Ae. aegypti* en Colombia no solo para el DDT si no que podrían estar desempeñando algún papel en la resistencia a los piretroides, particularmente a la permetrina, o podrían ser producto del aumento del uso de piretroides como lambdacihalotrina para el control de las formas adultas del vector.

Lumjuan *et al.*, (2011) encontraron que tanto las GSTe2 como las GSTe7 están implicadas en la resistencia a deltametrina (96). Si bien la manera como las GSTs confieren resistencia a los piretroides aún no está dilucidada, se cree que las GSTs pueden ayudar a proteger contra el estrés oxidativo inducido por los piretroides, gracias a una actividad predominantemente peroxidasa en presencia

de los piretroides(109). Nuestros datos sugieren que la alta actividad de las GSTs podrían estar ayudando a conferir resistencia a los insecticidas piretroides, ya que de las seis cepas de campo que presentaron la actividad de las GSTs elevada, tenían en común que cinco fueron resistentes a permetrina, una fue resistente a deltametrina y dos fueron resistentes a lambdacialotrina.

Otros resultados interesantes que se observaron en los ensayos bioquímicos es que las cepas seleccionadas en el laboratorio no presentaron un aumento de los CYPs P⁴⁵⁰ y los mecanismos enzimáticos no se han visto favorecidos en el proceso de selección del laboratorio. Cabe resaltar que en el año 2008 (8), Ocampo y colaboradores realizaron un análisis bioquímico de las esterasas y citocromos de las cepas seleccionadas en el laboratorio que en este estudio utilizamos, pero en las filiales F₁ y F₆. Los resultados en ese estudio demostraron que no había diferencias significativas en estas enzimas al ser comparadas con la cepa Rockefeller. Veintitrés generaciones después del proceso de selección con el insecticida DDT, se observó que la selección aumentó la actividad de las esterasas alfa y beta, a pesar de que se esperaba un aumento de las GSTs con este insecticida. La selección con el insecticida propoxur solo generó un aumento en las GSTs y la selección con lambdacialotrina no generó ningún cambio en el perfil enzimático, a pesar de que se esperaba un aumento en los CYPs P⁴⁵⁰.

De acuerdo a los resultados de las filiales F₁ y F₆ de ese estudio y los de éste estudio (F₂₉) de la cepa seleccionada con lambdacialotrina, los citocromos no fueron seleccionados como mecanismo de resistencia a los insecticidas piretroides, y a pesar de que la cepa lambdacialotrina fue altamente resistente a los insecticidas piretroides y al DDT, la selección con este insecticida no generó la selección de ningún mecanismo enzimático, lo que nos sugiere que la resistencia en esta cepa está mediada principalmente por las mutaciones kdr.

Mecanismos moleculares de resistencia: Mutaciones kdr

La presencia de las mutaciones kdr Val1016Ile y Phe1534Cys se observó en todas las poblaciones evaluadas, incluida la cepa de referencia Rockefeller (aunque en bajas frecuencias), a pesar de que esta cepa es susceptible a todos los insecticidas evaluados. La frecuencia para la mutación Ile1016Val encontrada en el presente estudio estuvo en un rango entre (0,02-0,72) y la frecuencia de la mutación Phe1534Cys se encontró entre 0,44 a 0,99, indicando que esta última mutación es más frecuente y se encuentra casi fijada en la mayoría de las cepas evaluadas.

Las mutaciones en el canal de sodio son un importante mecanismo de resistencia que se denomina resistencia “Knockdown” o “kdr” y es el resultado de alteraciones en la proteína que conforma los canales de sodio dependiente de voltaje (VGSC) de los mosquitos (73). Esta proteína es el sitio de acción de los insecticidas piretroides y del DDT. La mutación Val1016Ile se produce por un cambio en un

nucleótido (G→A) en la primera posición del codón 1016 del dominio II del VGSC; este simple cambio causa una sustitución del aminoácido valina a una isoleucina (112). La mutación Phe1534Cys está ubicada en el dominio III del VGSC, en el codón 1534, donde un cambio del nucleótido T→G, produce una sustitución del aminoácido fenilalanina a una cisteína (123). Al presentarse estos cambios el sitio de unión del insecticida cambia y por ende el piretroide no puede unirse al canal, lo que produce una reducción en la susceptibilidad al ingrediente activo.

La mutación Val1016Ile fue descrita por primera vez en el año 2006 en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Latinoamérica, donde se le asoció a la resistencia permetrina en aquellos individuos homocigotos para esta mutación (112,124). Esta mutación se ha encontrado ampliamente distribuida en el continente americano, pues se ha reportado la presencia de la misma en poblaciones de *Ae. aegypti* de México (88,112,124,143), Islas Caimán (123), Martinica y Guadalupe (79), Jamaica (144), Brasil (121,122) y Venezuela (120).

En Colombia el primer reporte de la mutación Val1016Ile se registró en poblaciones del Caribe en el año 2014, donde la frecuencia alélica de Ile1016 fue de (0.07-0.35). En estas poblaciones se observó una gran cantidad de individuos heterocigotos Val/Ile y de homocigotos Val/Val. Un análisis de correlación entre estas frecuencias y las razones de resistencia (RR) mostraron que la mutación Val1016Ile estaba relacionada con resistencia deltametrina, ciflutrina y permetrina, pero no para lambda-cialotrina y DDT (22). Posteriormente, en un estudio en poblaciones de *Ae. aegypti* del departamento del Quindío en el año 2015 la frecuencia del alelo Ile1016 se encontró baja (0,02-0,05), cabe resaltar que en estas poblaciones de mosquitos no se observaron homocigotos mutantes Ile/Ile y muy pocos heterocigotos Val/Ile (145), indicando que en estas poblaciones el mecanismo kdr no estaba presente. En nuestros resultados encontramos que en la mayoría de mosquitos ambos alelos están en mayor frecuencia en homocigosidad, que corresponde a individuos homocigotos silvestres Val/Val (n=352), seguidos por los homocigotos mutantes Ile/Ile (n= 216) y solo un individuo de la cepa Propoxur F₂₉ fue heterocigoto Val/Ile.

En las poblaciones de *Ae. aegypti* de México la mutación Val1016Ile ha registrado un rápido incremento en la frecuencia y dispersión en las poblaciones de mosquitos de este país. Se ha observado un aumento de las frecuencias desde 0,0 a 0,7 en tan solo siete años (88,124) sugiriéndonos que la mutación Val1016Ile se transmite fácilmente. García *et al.*, 2009 (124), sugirieron que el rápido aumento de las frecuencias del alelo mutante Ile1016 se ve favorecido en aquellas poblaciones donde el alelo silvestre Val1016 es parcialmente dominante y donde se ha observado un alto número de individuos heterocigotos Val/Ile, pues al parecer la heterocigosidad confiere resistencia al insecticida permetrina, permitiendo entonces que los mosquitos sobrevivan, y el aumento del alelo Ile1016 se vea favorecido por la sobrevivencia de los individuos heterocigotos, que rápidamente pueden producir prole homocigotos Ile/Ile (88,124). Indicando que

esta mutación al conferir resistencia a los insecticidas piretroides permite una ventaja de los individuos que la poseen, y les permite heredar esta característica a la siguiente generación, produciendo un rápido aumento en la población de individuos mutantes y altamente resistentes, hasta que la mutación se fije en estas poblaciones.

Con respecto a la mutación Phe1534Cys, se observó que las frecuencias alélicas de Cys1534 fueron mayores que para el alelo Ile1016. En nuestros resultados se destaca la ausencia de homocigotos tipo silvestre Phe/Phe (n=46) y en contraste se observó una gran cantidad de individuos homocigotos Cys/Cys (n=424). Esta mutación se encontró fija en la cepa de laboratorio *Lambdacialotrina F²⁹* y en las cepas de campo de Yumbo y Palmira (Valle del Cauca) con frecuencias de 0,99. Hasta el momento, en Colombia esta mutación solo se había reportado en nueve individuos de Sucre (23), donde todos los mosquitos analizados fueron heterocigotos, en contraste con nuestros resultados, donde se evidenció una gran cantidad de individuos homocigotos (Cys/Cys) para esta mutación.

La mutación Phe1534Cys fue descrita en el año 2009 en poblaciones resistentes a permetrina y se le asoció como mecanismo de resistencia “Knockdown” para este insecticida (123,130) y en poblaciones de Islas Caimán también se le asoció con resistencia al DDT (123). Esta mutación ubicada en el dominio IIS6 del canal de sodio ha sido reportada en varios países de Asia (114,146,147), Oriente Medio (114) y en Latinoamérica (79,88,120,121,123,144,148).

Las frecuencias alélicas de Cys1534 fueron mayores que para el alelo Ile1016 este mismo patrón se ha documentado en otras poblaciones de *Ae. aegypti*. Por ejemplo en las poblaciones de Venezuela el alelo Cys1534 se ha encontrado casi o fijo en varias poblaciones, con un rango de frecuencia entre (0,35-1,00). En Islas Caimán la frecuencia de este alelo se reportó entre 0,57-1,00 (123), al igual que en las Islas Guadalupe y San Martín donde los rangos estuvieron entre 0,92-0,98 y recientemente en Jamaica se encontró que este alelo estaba fijo en todas las poblaciones de *Ae. aegypti* estudiadas.

Vera- Maloof y colaboradores (88) plantearon la hipótesis de que el alelo Cys1534 aparece rápidamente en las poblaciones y su frecuencia se incrementa mucho más rápido que Ile1016 y que la resistencia a los piretroides requiere de la evolución secuencial de estas dos mutaciones. Las mutaciones en los dominios II y III se sinergizan de modo que los mutantes dobles Ile1016/Cys1534 (IC) tienen mayor resistencia a los piretroides que aquellos mutantes que solo tienen una mutación *kdr*(88).

El análisis de las frecuencia de los haplotipos para ambas mutaciones, evidenciaron que el haplotipo Ile1016/Cys1534 (IC), donde los individuos son homocigotos para ambas mutaciones, fue el más común (n=205) con frecuencias haplotípicas encontradas en las poblaciones de 0,0096 a 0,72, siendo la cepa

Lambdacialotrina F₂₉ quien presentó la frecuencia mas alta. En contraste el haplotipo Ile1016/Phe1534 (IF) estuvo casi extinto en las poblaciones, solo 14 individuos presentaron este haplotipo con frecuencias entre 0,0 a 0,005, estos datos coinciden con los obtenidos por Vera-Maloof et al, donde el haplotipo Ile1016/Phe1534 fue raramente detectado en *Ae. aegypti* de México (88).

Solo dos cepas de nuestro estudio presentaron una alta susceptibilidad al insecticida permetrina, Rockefeller y Medellin AF. Ambas cepas presentaron una frecuencia alélica de Cys1534 de 0,44 pero una baja frecuencia de Ile1016 (0,04 y 0,02) respectivamente. El haplotipo Ile1016/Cys1534 (IC) en la cepa Rockefeller tuvo frecuencia de 0,04 (n=2) y en Medellín AF la frecuencia fue de 0,0096 (n=1). Estos resultados pueden sugerir que la sola presencia de la mutación Cys1534 no fue suficiente para generar resistencia a la permetrina en ambas cepas.

En el año 2010 la mutación Cys1534 también fue asociada con resistencia al DDT en poblaciones del Caribe. Nuestros datos sugerían que posiblemente la presencia de esta mutación en la cepa Rockefeller, era la causante de la baja mortalidad con el insecticida DDT que estábamos detectando en los bioensayos CDC. Para comprobar esta hipótesis se realizó un análisis con el fin de determinar si la presencia de la mutación en los individuos sobrevivientes a la exposición con DDT les confería la resistencia. Al realizar el análisis de Fisher ($p=0,0156$) y posterior Chi² ($p=0,0221$), ninguna de las pruebas dio significativa, por lo que estos datos nos sugieren que la presencia de esta mutación por si sola tampoco confiere resistencia al DDT. Sin embargo es necesario realizar otro tipo de análisis pues el número de individuos evaluados en esta prueba fue pequeño (n=42) y solo se consideraron individuos de la cepa Rockefeller y no se pudo evaluar en una cepa de campo (ver anexo VII).

En cuanto a las cepas de referencia seleccionadas con lambdacialotrina y propoxur, las frecuencias de ambas mutaciones kdr fueron altas, siendo la cepa Lambdacialotrina F₂₉, la que obtuvo las frecuencias alélicas más altas de ambas mutaciones (0,72 para Ile1016 y 0,99 para Cys1534) al ser comparada con las demás cepas evaluadas. Cabe resaltar que en esta cepa, no se observó una actividad enzimática alterada y el único mecanismo de resistencia detectado fue kdr; esta cepa fue altamente resistente a todos los insecticidas piretroides, al DDT y al propoxur.

El hecho que la cepa Lambdacialotrina F₂₉ fuera resistente a propoxur y que solo se detectara como mecanismo de resistencia las mutaciones kdr, sugiere que posiblemente estas mutaciones pueden conferir resistencia a este insecticida, que es un carbamato y cuyo sitio de acción no es el canal de sodio. Pero es necesario confirmar estos hallazgos, o es posible la existencia de otros mecanismos no evaluados que confieran resistencia cruzada entre el propoxur y los priteroides. Al observar las frecuencias alélicas de Ile1016 y Cys1534 en la cepa Propoxur F₂₉, se encontró que las frecuencias de ambos alelos tenían altas frecuencias (0,32 y

0,97 respectivamente). El propoxur al igual que otros insecticidas carbamatos tiene como mecanismo de resistencia la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y se desconoce que tengan como sitio de acción el canal de sodio de los mosquitos. Se requieren futuros estudios para entender el papel que los genes Kdr puedan tener en la resistencia a propoxur.

Sin embargo Saavedra en el año 2007(112) en el primer estudio de las mutaciones Ile1016 en poblaciones de América Latina, encontró que en mosquitos de *Ae. aegypti* de Santiago de Cuba que fueron seleccionadas con el insecticida propoxur durante 14 generaciones, la frecuencia del alelo Ile1016 aumentó de 0.033 en la cepa original a 0,40 en la cepa seleccionada con propoxur llamada “F₁₄ propoxur”, y que esta cepa F₁₄ propoxur mostró resistencia a los piretroides. La explicación más parsimoniosa que los investigadores brindaron es que el alelo Ile1016 está ligado a un loci condicionado por la resistencia a propoxur y que la selección con este insecticida conduce a un rápido aumento de este alelo vinculado a kdr.

En el presente estudio se encontró que la cepa propoxur F₂₉, fue resistente a los tres insecticidas piretroides evaluados, presentando resistencia cruzada con permetrina, deltametrina y lambdacialotrina al igual que con el DDT. Esta cepa solo presentó actividad de las GSTs elevadas y la presencia de ambas mutaciones kdr, por lo que estos datos sugieren que tanto las actividades elevadas de la GSTs junto con las mutaciones kdr sí podrían estar cumpliendo un papel en la resistencia a propoxur y que la selección con este insecticida favorece la aparición de mutaciones kdr.

Análisis proteómico de los túbulos de Malpighi e intestino medio

El análisis proteómico realizado en los tejidos de túbulos de Malpighi e intestino medio de las diferentes cepas analizadas permitió identificar 438 proteínas, la mayoría de ellas se asociaron con funciones catalíticas y con el metabolismo de los aminoácidos, lo que confirma el papel metabólico que cumplen ambos tejidos en los mosquitos. El intestino medio de los mosquitos tiene una función digestiva secretora y de absorción; secreta enzimas digestivas y absorbe los nutrientes al realizarse una alimentación, ya sea con azúcar o con sangre (149,150). Por su parte los túbulos “renales” de Malpighi, en los mosquitos hembra, juegan un papel importante en la diuresis post- alimentación con sangre, ya que este es un tipo de sistema secretor y osmoregulador, que elimina el exceso de iones y agua de la hemolinfa de los mosquitos después de una alimentación sanguínea (151).

En la mayoría de los artrópodos que se alimentan de sangre, el intestino medio juega un papel crucial porque es el tejido primario involucrado en el procesamiento de la sangre. Es responsable no solo de la digestión y la absorción de nutrientes, sino que también es el primer sitio de contacto por patógenos potenciales como

virus, parásitos y bacterias (152). Adicional a esto, tanto el intestino medio como los túbulos de Malpighi, cumplen una función muy importante en la detoxificación de los xenobióticos, incluidos los insecticidas(151,153).

Ingham y colaboradores (2014), realizaron un análisis del transcriptoma de cuatro partes del cuerpo de *Anopheles gambiae* de cepas resistentes y susceptibles a todas las clases de insecticidas. El análisis de los transcriptos se realizó por separado en los túbulos de Malpighi, el intestino medio, el resto del abdomen y el remanente de todo el mosquito. Los investigadores encontraron que tanto en los túbulos de Malpighi, como el intestino medio se observó un enriquecimiento general en la transcripción de genes de las cuatro principales familias de genes de detoxificación (carboxilesterasas, glutatión S-transferasas, UDP glucornyltransferasas y citocromos P⁴⁵⁰) (110,153,154). También se ha encontrado que los túbulos de Malpighi en mosquitos no alimentados con sangre se caracterizan por la expresión de transcritos asociados con secreción / diuresis de líquido, transportadores de iones, canales de agua, subunidades H⁺ -ATPasa de tipo V, enzimas de desintoxicación xenobiótica, por ejemplo citocromos P⁴⁵⁰, glutatión S-transferasas, transportadores de casetes de unión a AT y metabolismo de purinas (110,150,151).

En el presente estudio varias proteínas relacionadas con resistencia insecticidas fueron identificadas en el análisis proteómico en ambos tejidos, entre ellas dos citocromos P⁴⁵⁰ que han sido asociados a resistencia a permetrina en *Ae. aegypti* (98,103,104,155). Estos citocromos fueron identificados como CYP9J10 (AAEL006798) y CYP6Z9 (AAEL009129). En *Ae. aegypti* los citocromos de la subfamilia CYP9J y CYP6 se han relacionado con resistencia a permetrina y deltametrina (106). En particular los citocromos de la subfamilia CYP9J como por ejemplo los CYP9J24, CYP9J28 Y CYP9J32, este último se ha encontrado sobre expresado en cepas de *Ae. aegypti* resistentes a permetrina y deltametrina(106). Uno de los citocromos identificados en el análisis proteómico fue el P9J10 – (AAEL006798), si bien esta enzima no se encontró sobre-expresada en nuestras cepas resistentes; en otros estudios la misma enzima se ha encontrado sobre-expresada en poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes a permetrina de países como Tailandia, México, Isla Caimán y Cuba (98,103,106).

El citocromo CYP6Z9 (AAEL009129) que también fue identificado en los análisis proteómico, pero tampoco se encontró sobre-expresado en nuestras cepas resistentes; en otros estudios se le ha relacionado con resistencia a piretroides debido a su capacidad de ayudar a metabolizar estos insecticidas. Bariami y colaboradores (2012) encontraron que en la cepa resistente llamada “Caimán”, el CYP6Z9 se encontraba sobre-expresado; esta cepa fue colonizada a partir de larvas de *Ae. aegypti* de la Isla Caimán y se caracteriza por ser altamente resistente al DDT, permetrina y deltametrina (103). Posteriormente en el año 2013, en un estudio usando modelamiento *in silico* y ensayos *in vivo*, usando la expresión del CYP6Z en levadura, se pudo demostrar el papel que este citocromo

puede estar cumpliendo en conferir resistencia al ser capaz de metabolizar metabolitos derivados de los piretroides (110).

Al realizar el análisis de las posibles asociaciones funcionales, usando el software libre STRING 10.5 y teniendo como base las 438 proteínas encontradas en los túbulos de Malpighi y el intestino medio, se pudo observar una red de interacciones del metabolismo del glutatión, conformada por 12 proteínas de las cuales seis pertenecen a las GSTs: GSTD1; GSTS1, GSTe4, GSTX1, GPXH1 y GSTe2. La alta actividad de las GST coincidió con los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, donde siete de las 11 cepas evaluadas presentaron una actividad elevada de las GSTs. En los insectos las GST han sido clasificadas en seis clases (Delta, Épsilon, Omega, Sigma, Theta y Zeta), las más abundantes encontradas en los mosquitos son Delta y Épsilon, estas dos GSTs corresponden a casi el 65% encontradas en los dípteros(96,100,156), siendo las GST de la clase de Épsilon la que se asocia más comúnmente con la resistencia a insecticidas (96,156).

En *Aedes (Stegomyia) aegypti* las GSTs GSTe2, GSTe4 y GSTe7(157), se han encontrado en poblaciones resistentes a piretroides, pero se resalta que las GST Épsilon 2 son muy eficientes para metabolizar el DDT y la expresión elevada de estas enzimas se ha encontrado en poblaciones resistentes a DDT y piretroides de Tailandia, México y en Colombia, en poblaciones de *Ae. aegypti* de algunos municipios de Antioquia, Chocó y Putumayo(21,96,98,100,155,156). Otras proteínas que se encontraron en estos dos tejidos que se sospecha pueden estar relacionadas con resistencia a insecticidas fue un Transportador ABC (AAEL008134)(103) y una aldehído deshidrogenasa (AAEL011756)(157).

El análisis de la expresión diferencial de las proteínas entre las cepas resistentes contra las cepas susceptibles, demostró que las cepas (DDT, lambda-dialotrina y Rockefeller) que han sido seleccionadas en el laboratorio fueron más homogéneas que las cepas de campo (Yumbo, Buga y Medellín AF) de acuerdo a la razón de la abundancia (RA) de las proteínas (cuadro 11). Estos resultados pueden deberse a que las cepas de laboratorio han sido mantenidas bajo las mismas condiciones ambientales o a la endogamia sufrida durante su proceso de colonización. Al comparar los datos de los análisis proteómicos con las pruebas bioquímicas, se encontró que la cepa DDT solo presentó actividad aumentada de las esterasas, sin embargo estos datos no se observaron en el análisis de expresión diferencial en el estudio proteómico, ya que la única proteína diferencialmente expresada (RA 1.62) en la cepa DDT al compararla con la cepa Rockefeller, se identificó como (AAEL012618-PA) que corresponde a una proteína hipotética conservada.

Por su parte la cepa lambda-dialotrina que fue resistente a todos los piretroides, de acuerdo a los ensayos bioquímicos no generó ningún mecanismo enzimático, en el estudio proteómico, solo se encontró una proteína sobre-expresada al compararla con la cepa Rockefeller (susceptible), esta correspondió a una

proteína cuticular pupal (AAEL012618-PA), aunque no se encontraron datos que demuestren el papel de esta proteína en conferir resistencia a piretroides, la sobre-expresión de ciertas proteínas cuticulares se les ha relacionado con resistencia a insecticidas(158). En cepas resistentes de *Anopheles stephensi*, *Culex pipiens pallens*, *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* la sobre-expresión de genes que codifican proteínas cuticulares se ha asociado a resistencia a insecticidas.(158–161). El engrosamiento de la cutícula se ha considerado como un mecanismo de resistencia a los insecticidas, ya que estos al ser compuestos lipofílicos penetran al insecto a través de la cutícula, el engrosamiento cuticular dificulta que el ingrediente activo entre al sistema circulatorio y nervioso del insecto y por lo tanto con la cantidad del insecticida para alcanzar el sitio objetivo dentro del mosquito (159).

En cuando al análisis de la expresión diferencial de las proteínas entre las cepas de campo resistentes (Yumbo + Buga) vs la cepa susceptible de campo (Medellín AF), se encontraron 60 proteínas sobre- expresadas en las cepas resistentes. La sobre-expresión de estas proteínas fue determinado usando como umbral de sobre expresión (>1,5 “razón de abundancia”). En el análisis se encontró que el 61% (37/60) fueron proteínas ribosomales, seguidas por 6 histonas y 6 proteínas que no pudieron ser identificadas, debido a que no se encontró información en las bases de datos consultadas.

En la actualidad el papel de las proteínas ribosomales y su asociación a la resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti*, no se ha dilucidado. Varios estudios con *Culex pipiens pallens* (otro mosquito perteneciente a la clase díptera), encontraron que varios genes ribosomales fueron sobre expresados en *Cx. pipiens* resistentes a deltametrina, entre ellas la RPL22 localizada en la subunidad grande del ribosoma 60S (162,163). Posterior a estos estudios, otras proteínas ribosomales han sido encontradas en *Cx. pipiens* resistentes a deltametrina, entre ellas están la proteína RPS29 de la subunidad 40S ribosoma (164,165) y la RPL39 de la subunidad 60S (166). En contraste, Li y colaboradores encontraron que en *Cx. pipiens quinquefasciatus* hubo una correlación negativa entre la expresión de las proteínas ribosomales en mosquitos resistentes a lamdacialotrina (167).

Las proteínas ribosomales conforman los ribosomas, que son macromoleculares altamente conservadas, responsables de la síntesis de proteínas en las células. Existen aproximadamente 80 proteínas ribosómicas diferentes y están presentes en las células eucariotas, estas proteínas regulan procesos de transcripción y traducción específicos de un gen (168,169). Además, las células eucariotas producen variantes alternativas de ribosomas para adaptarse a las condiciones cambiantes y a la necesidad del organismo en respuesta a un estímulo particular(168). Datos bioquímicos y proteómicos han demostrado que las diferentes proteínas ribosómicas se producen en diferentes condiciones; es decir, la composición de las proteínas ribosomales varía entre los tejidos, estados de desarrollo o como respuesta a estímulos externos (170). Al observar en nuestras

cepas resistentes a piretroides, que una gran cantidad de proteínas ribosomales se encuentren sobre expresadas en los mosquitos resistentes, nos podría estar indicando un aumento en el recambio proteico o la expresión genética alterada en estas cepas, en respuesta al fenotipo resistente o las condiciones ambientales a los cuales estos mosquitos de campo han estado expuestos.

9.2. CONCLUSIONES

- La resistencia a insecticidas piretroides en poblaciones de *Ae. aegypti* en Colombia están mediadas por múltiples mecanismos. Durante el período del estudio en el que se recolectaron las muestras de las poblaciones de campo (2014-2015), se detectó como mecanismos principales de resistencia a piretroides, la alta actividad de las enzimas GSTs (en particular las GSTe2) y la presencia de las mutaciones kdr Val1016Ile y Phe1534Cys. Esto confirma que la resistencia a insecticidas piretroides es multifactorial y que es un fenómeno genético.(74,75,93). Los mecanismos de resistencia pueden variar en el tiempo en respuesta a los insecticidas aplicados por los programas de control. Estos mecanismos aparecen como respuesta a la presión de selección ejercida por los insecticidas usados, razón por la cual se debe realizar un seguimiento constante de estos mecanismos a través del tiempo.
- Los múltiples mecanismos que están asociados a resistencia a los insecticidas piretroides en las poblaciones de Colombia, además de que es evidente la variabilidad espacial de la resistencia, requiere la implementación de estrategias apropiadas dependiendo del o los mecanismo(s) encontrado(s) en cada localidad. Los resultados de este estudio resaltan la importancia de tener un panorama actual sobre el estado de la resistencia a los insecticidas usados en salud pública para el control de *Ae. aegypti* y de la identificación de los mecanismos de resistencia subyacentes. Este estudio permitió observar diferencias en los mecanismos asociados a la resistencia en las localidades evaluadas, como también identificar cambios en los mecanismos en las localidades que habían sido previamente evaluadas en otras investigaciones. Nuestros resultados demuestran la importancia de la evaluación periódica de la resistencia y sus mecanismos para identificar las potenciales estrategias para su manejo.
- Debido a la variabilidad de los mecanismos de resistencia encontrados en el presente estudio una estrategia apropiada de manejo de la resistencia debe incluir rotaciones de insecticidas con diferentes modos de acción, el uso de inhibidores enzimáticos o métodos alternativos que no estén basados en el uso de químicos de la misma clase o incluso medidas no

químicas, con el fin de retrasar o revertir la resistencia a las pocas moléculas evaluadas y recomendadas por la OMS para ser usadas en el control de las ETVs, extendiendo así la vida útil de esos ingredientes activos.

- Los resultados de este estudio resaltan la importancia de tener un panorama actual sobre el estado de la resistencia a los insecticidas usados en salud pública para el control de *Ae. aegypti* y de la identificación de los mecanismos de resistencia subyacentes. Por ello, resulta evidente la necesidad de un monitoreo sistemático de la resistencia a insecticidas en las áreas de mayor transmisión de arbovirosis y con mayor uso de insecticidas. Se sugiere entonces a las secretarías de salud y a los grupos de ETV, que las estrategias del manejo de la resistencia a los piretroides, incluyan la rotación de los insecticidas, el uso de inhibidores enzimáticos, el control larvario usando biolarvicidas y/o reguladores de crecimiento, inclusive abre la posibilidad de usar nuevos enfoques basados en la biotecnología para controlar las poblaciones de *Ae. aegypti* y así disminuir la probabilidad de la transmisión de DENV, CHIKV y ZIKV en nuestro país.

10. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

- De acuerdo a nuestros datos, las mutaciones *kdr* (Val1016Ile + Phe1534Cys) y la sobre expresión de la *GSTe2*, podrían ser usados como marcadores de resistencia en poblaciones de campo de *Ae.aegypti* de Colombia.
- Se recomienda realizar la detección de otras mutaciones *kdr* que puedan estar asociados a la resistencia a piretroides en poblaciones de campo de *Ae. aegypti*. Esto con el fin de obtener un panorama general de las frecuencias de estas mutaciones en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Colombia.
- Usando la técnica de secuenciación completa del genoma o “whole genome sequencing”, se podría analizar diferencias genéticas (polimorfismos) entre las poblaciones resistentes y las susceptibles que pudiesen estar cumpliendo un papel en la resistencia a los piretroides y otros insecticidas usados en salud pública.
- Con el fin de aprovechar los resultados obtenidos en este trabajo, se sugiere evaluar otros mecanismos de resistencia a piretroides. Existe un micro arreglo llamado “Aedes detox chip”, que permite identificar entre 204 a 235 genes de detoxificación en *Ae. aegypti* y podrían ser usados para

comparar los perfiles de expresión en poblaciones susceptibles y resistentes. Posteriormente los genes sobre-expresados en las poblaciones resistentes se podrían validar por medio de qPCR cuantitativa y así poder encontrar algunos genes candidatos como marcadores moleculares de resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti* del país.

Manejo de la resistencia a los insecticidas piretroides en Colombia

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de los mecanismos de resistencia en poblaciones de *Ae. aegypti* de Colombia (Cuadro 13), se encontraron los posibles escenarios de resistencia a los insecticidas usados en salud pública (Anexo).

Escenario 1. Las mutaciones *Kdr*, en particular la Val1016 podrían estar fijada o cerca de la fijación en la población, haciendo el uso de insecticidas piretroides ineficaz en los programas de control. Este es el caso de las poblaciones de Yumbo y Medellín BF donde se sugiere que el uso de los piretroides sea restringido y que los métodos de control se enfoquen en el control larvario. En caso de brote si es estrictamente necesario, se sugiere realizar fumigación ULV con malatión, debido a la susceptibilidad a este insecticida presentada por las poblaciones de mosquitos.

Escenario 2. El segundo escenario sería la presencia de ambos mecanismos anteriormente descritos, las mutaciones *Kdr* Val1016Ile y Phe1534Cys (frecuencia de la mutación Val1016Ile baja) y enzimas de detoxificación (Esterasas + GST + CYP P⁴⁵⁰).

Debido a la presencia de la mutación *kdr* Ile1016 que confiere resistencia a los piretroides tipo I y de las enzimas que puedan estar ayudando a la resistencia. Se propone que la posible solución a este escenario sería el uso de insecticidas piretroides tipo II u organofosforados, con inhibidores de las enzimas que están participando en la resistencia.

Dependiendo de los mecanismos enzimáticos encontrados en las poblaciones de los mosquitos, se pueden usar los siguientes inhibidores:

- S.S.S-tributil fosforotriato (DEF), el cual inhibe la actividad de las esterasas
- Butóxido de Piperonilo (PBO), el cual inhibe la actividad de las oxidasas
- Etacrínico sódico (EA), maleato de dietilo (DM) y clorfenethol (CF), los cuales inhiben la actividad de la glutatión s-transferasa.

Bajo este precepto se proponen dos escenarios en la presencia de ambos mecanismos:

Escenario 2.1. Mecanismo de resistencia *Kdr* + las 3 principales enzimas de detoxificación (Esterasas, GST y CYP⁴⁵⁰) como en el caso de Yumbo y Medellín BF, se sugiere el uso de larvicidas de origen biológico para el control

larvario (se recomienda *Bacillus thuringiensis*) o inhibidores de la síntesis de la quitina. En caso de brote se sugiere realizar fumigación ULV con malatión y una mezcla de los inhibidores de las enzimas GST y citocromos P⁴⁵⁰.

Escenario 2.2. Mecanismo de resistencia Kdr + GST, como en el caso de Buga, Palmira, Cali y Medellín AF se recomienda el uso de un insecticidas piretroides tipo II (Deltametrina o lambdacialotrina), con una combinación de etacrínico sódico (EA) o maleato de dietilo (DM) y/o clorfenethol (CF), los cuales inhiben la actividad de la glutatión s -transferasa.

Escenario 3. El último escenario podría presentar solo resistencia de tipo metabólica, para la cual el manejo adecuado sería el uso de insecticidas piretroides con una combinación de inhibidores específicos. Este es el caso de Medellín AF, que no presentó frecuencias alélicas altas de la mutación kdr Val1016Ile, pero si una actividad de las GST elevadas, por lo cual en estas poblaciones se podría usar para fumigaciones ULV piretroides tipo II + inhibidores de las GST. También se sugiere el control larvario con temefos, *Bacillus thuringiensis* o inhibidores de la síntesis de la quitina.

Cuadro 13. Resumen de los mecanismos de resistencia a insecticidas piretroides encontrados.

Cepa/ Población	Fenotipo			Mecanismo enzimático			Mecanismo molecular		Análisis proteómico
	Permetrina	Deltametrina	Lambdacialotrina	Esterasas	GST	CYP P450	ILE 1016	CYS 1534	
Cepa de laboratorio									
Rockefeller	Susceptible	Susceptible	Susceptible				0,04	0,44	PROTEINA ESTRUCTURAL CUTICULAR - CUTICULAR PUPAL 78E
DDT F ₃₀	Pérdida	Resistente	Pérdida	ALTAS			0,1	0,8	PROTEINA ESTRUCTURAL CUTICULAR - CUTICULAR PUPAL 78E
Propoxur F ₂₉	Resistente	Resistente	Resistente		ALTA		0,32	0,97	
Lambdacialotrina F ₂₉	Resistente	Resistente	Resistente				0,72	0,99	PROTEÍNA ESTRUCTURAL CUTICULAR
Población de campo									
Buga F ₁	Resistente	Pérdida	Pérdida		ALTA		0,27	0,88	PROTEÍNAS RIBOSOMALES, SERINE PALMITOLYTRANSFERSA, MICROSOMAL GST, TROPONIN I, METHIONINE AMINOPEPTIDASE, HEAD SHOCK PROTEIN
Yumbo F ₂	Resistente	Pérdida	Resistente	ALTAS	ALTA	ALTA	0,69	0,99	PROTEÍNAS RIBOSOMALES, SERINE PALMITOLYTRANSFERSA, MICROSOMAL GST, TROPONIN I, METHIONINE AMINOPEPTIDASE, HEAD SHOCK PROTEIN
Palmira F ₂	Resistente	Pérdida	Pérdida		ALTA		0,52	0,99	
Cali (pdC) F ₂	Resistente	Pérdida	Pérdida		ALTA		0,24	0,74	
Girón F ₁	Resistente	Pérdida	Pérdida	ALTAS			0,54	0,94	
Medellín (BF) F ₂	Resistente	Resistente	Resistente		ALTA	ALTA	0,71	0,82	
Medellín (AF) F ₂	Susceptible	Pérdida	Pérdida		ALTA		0,02	0,44	GLUTATION PEROXIDASA GPX CYP6AG3

11. REFERENCIAS

1. Conway MJ, Colpitts TM, Fikrig E. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annu Rev Virol* . 2014;1(1):71–88.
2. Ocampo CB, Wesson DM. Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71(4):506–13.
3. Brady OJ, Golding N, Pigott DM, Kraemer MUG, Messina JP, Reiner RC, et al. Global temperature constraints on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* persistence and competence for dengue virus transmission. *Parasit Vectors* . 2014;7(1):338.
4. Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):1–11.
5. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*. 2002;33(4):330–42.
6. Karunamoorthi K, Yirgalem A. Insecticide Risk Indicators and Occupational Insecticidal Poisoning in Indoor Residual Spraying. *Heal Scope* . 2012;1(4):163–70.
7. Karunamoorthi K, Sabesan S. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Disease with Special Reference to Mosquitoes : A Potential Threat to Global Public Health. *Heal Scope Int Quarerly J*. 2013;2(1):4–18.
8. Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J, Brogdon W. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Trop* . 2011;118(1):37–44.
9. Bhatt S, Gething P, Brady O, Messina J, Farlow A, Moyes C. The global distribution and burden of dengue. *NIH-PA Author Manuscr Nat*. 2012;496(7446):504–7.
10. Carvajal JJ, Honorio NA, Díaz SP, Ruiz ER, Asprilla J, Ardila S, et al. Detección de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en el municipio de Istmina, Chocó, Colombia. *Biomédica* . 2016;36(3):438–46.
11. Ferguson NM, Rodríguez-Barrquer I, Dorigatti I, Mier-y-Teran-Romero L, Laydon DJ, Cummings DAT. Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. *Science (80-)* . 2016;353(6303):1033–6.
12. Dusfour I, Thalmensy V, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Girod R. Multiple insecticide resistance in *aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(3):346–52.
13. Sriitharan J, Demers PA, Harris SA, Cole DC, Peters CE, Villeneuve PJ, et al. Occupation and risk of prostate cancer in Canadian men: A case-control study across eight Canadian provinces. *Cancer Epidemiol*. 2017;48:96–103.
14. Bonner MR, Williams BA, Rusiecki JA, Blair A, Beane Freeman LE, Hoppin JA, et al. Occupational exposure to terbufos and the incidence of cancer in the Agricultural Health Study. *Cancer Causes Control*. 2010;21(6):871–7.
15. WHO. PESTICIDES APPLICATION AND THEIR APPLICA For the control of vectors. *World Heal Organ* . 2006;1(6):125.
16. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP. Safety of Pyrethroids for Public Health Use. *World Heal Organ*. 2005;
17. La Organización Mundial de la Salud (OMS). Vector Resistance to Insecticides. 15th Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Vol. 818, World Health Organisation Technical Report Series. 1992. p. 1–62.
18. Ranson H, Burhani J, Lumjuan N, Black, IV WC. Review Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA*. 2008;1–12.

19. Moyes C, Vontas J, Martins A, Ng L, Koou S, Dusfour I. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. PLoS Negl Trop Dis. 2017;1–20.
20. Brogdon, William G., Chan A. Instrucciones para la Evaluación de la Resistencia a Insecticida en V mediante del Ensayo Biológico de la -. 2010;1–28.
21. Fonseca-González I, Quiñones ML, Lenhart A, Brogdon WG. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. Pest Manag Sci. 2011;67(4):430–7.
22. Maestre-Serrano R, Gomez-Camargo D, Ponce-Garcia G, Flores AE. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. Pestic Biochem Physiol . 2014;116:63–73.
23. Atencia MC, Pérez M de J, Jaramillo MC, Caldera SM, Cochero S, Bejarano EE. Primer reporte de la mutación F1534C, asociada con resistencia cruzada a DDT y piretroides, en *Aedes aegypti* de Colombia. Biomédica . 2016;36(3).
24. SIVIGILA. Ministerio de la Protección Social, Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública (SIVIGILA). Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 53. Epidemiológica, Sem. 2011;2011:1–14.
25. SIVIGILA. Ministerio de la Protección Social, Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública (SIVIGILA). Boletín Epidemiológico Semanal No 51 2013. 2013;2013:25.
26. Instituto Nacional de Salud. Semana epidemiológica número 51 de 2012. 2012;2012:1–12.
27. Municipal SDS. BOLETÍN EPIDEMIOLOGICO No. 11 SEMANA EPIDEMIOLOGICA No. 44. 2016;(11).
28. Pública IN de S. Boletín Epidemiológico Semana 52-2016. Bol Epidemiol . 2016;
29. Cali S de S municipal de S de. Boletín Epidemiológico. Bol Epidemiol. 1994;18(2):1–4.
30. Salud IN de SP. Boletín Epidemiológico Semana 37-2017. Bol Epidemiol . 2016;1–26. Available from: [http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn Epidemiolgico/2017 Boletín epidemiológico semana 37.pdf](http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/BoletnEpidemiolgico/2017%20Boletn%20epidemiolgico%20semana%2037.pdf)
31. Salud IN de. Semana epidemiológica | número 02 de 2017 | 08 Enero - 14 enero 2017.
32. Ministerio de salud y protección social. Plan nacional de respuesta frente a la introducción del virus chikungunya en Colombia. Inst Nac Salud. 2014;1:1–20.
33. Ministerio de la Protección Social IN de S y OP de la S. Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de dengue. Guía Vigil entomológica y Control dengue . 2012;1–124.
34. Paploski IAD, Rodrigues MS, Mugabe VA, Kikuti M, Tavares AS, Reis MG, et al. Storm drains as larval development and adult resting sites for *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Salvador, Brazil. Parasit Vectors . 2016;9(1):419.
35. Suárez MF, Nelson MJ. Registro de altitud del aedes aegypti en Colombia. Biomédica . 1981;1(4):225.
36. Giraldo-calderón GI, Pérez M, Morales C a, Ocampo CB. Evaluación del triflumurón y la mezcla de *Bacillus thuringiensis* más *Bacillus sphaericus* para el control de las formas inmaduras de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en sumideros en Cali , Colombia. Biomédica . 2008;224–33.
37. González Obando R, Gamboa F, Perafán O, Suárez MF, Montoya Lerma J. Experience of an entomological analysis of the breeding sites of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in Cali, Colombia. Rev Colomb Entomol. 2007;33(2):148–56.

38. Clemons A, Haugen M, Flannery E, Tomchaney M, Kast K, Jacowski C, et al. *Aedes aegypti*: An emerging model for vector mosquito development. *Cold Spring Harb Protoc.* 2010;5(10).
39. Severson DW, Knudson DL, Soares MB, Loftus BJ. *Aedes aegypti* genomics. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004;34(7):715–21.
40. Nelson M. *Aedes aegypti*: Biology and Ecology . OPS, 1986; 1986.
41. Marí RB, Peydró RJ. Situación actual en espacial y eco-epidemiología de las arbovirosis transmitidas por mosquitos culícidos (Diptera: Culicidae). *Rev Esp Salud Publica.* 2010;84(3):255–69.
42. Mayer S V, Tesh RB, Vasilakis N. the Emergence of Arthropod-Borne Viral Diseases: a Global Prospective on Dengue, Chikungunya and Zika Fevers. *Acta Trop .* 2016;166:155–63.
43. Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol .* 2000;45:371–91.
44. Canning J, Bandyopadhyay S, Biswas P, Aslund M. World ' s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher.
45. Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. 1998;11(3):480–96.
46. Ali Ou Alla S, Combe B. Arthritis after infection with Chikungunya virus. *Best Pract Res Clin Rheumatol .* 2011;25(3):337–46.
47. Soumahoro M-K, Gérardin P, Boëlle P-Y, Perrau J, Fianu A, Pouchot J, et al. Impact of Chikungunya virus infection on health status and quality of life: a retrospective cohort study. *PLoS One .* 2009;4(11):e7800.
48. Kool JL, Ph D, Lanciotti RS, Ph D, Pretrick M, Dubray C, et al. Duffy Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia *NEJM* 2008. 2009;2536–43.
49. Parra B, Lizarazo J, Jiménez-Arango JA, Zea-Vera AF, González-Manrique G, Vargas J, et al. Guillain-Barré Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia. *N Engl J Med .* 2016;375(16):1513–23.
50. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastere S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill .* 2014;19(9):7–9.
51. Larocca RA, Abbink P, Peron JPS, de A. Zanotto PM, Iampietro MJ, Badamchi-Zadeh A, et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature .* 2016;536(7617):474–8.
52. Pacheco O, Beltrán M, Nelson C a, Valencia D, Tolosa N, Farr SL, et al. Zika Virus Disease in Colombia - Preliminary Report. *N Engl J Med .* 2016;1–10.
53. Gubler DJ. Epidemic dengue / dengue hemorrhagic fever as a public health , social and economic problem in the 21st century. *TRENDS Microbiol.* 2002;10(2):100–3.
54. Urdaneta-Marquez L, Failloux AB. Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infect Genet Evol .* 2011;11(2):253–61.
55. Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, et al. Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates. *J Virol .* 2010;84(13):6497–504.
56. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect .* 2014;20(10):O595–6.
57. Leparc-Goffart I, Nougairède A, Cassadou S, Prat C, De Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *Lancet.* 2014;383(9916):514.
58. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, et al.

- Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(5):764–7.
59. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res.* 2015;120:32–9.
 60. Ayres CFJ. Identification of Zika virus vectors and implications for control. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(3):278–9.
 61. Moreira J, Peixoto TM, Machado de Siqueira A, Lamas CC. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 2017.
 62. Villamil-Gomez WE, Gonzalez-Camargo O, Rodriguez-Ayubi J, Zapata-Serpa D, Rodriguez-Morales AJ. Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. *J Infect Public Health.* 2016;9(5):684–6.
 63. Mattar S, Miranda J, Pinzon H, Tique V, Bolaños A, Aponte J, et al. Outbreak of chikungunya virus in the north caribbean area of colombia: Clinical presentation and phylogenetic analysis. *J Infect Dev Ctries.* 2015;9(10):1126–32.
 64. Iaiton-Donato K, Usme-Ciro JA, Rico A, Pardo L, Martinez C, Salas D, Ardila S PA. Analisis filogenetico del virus Chikungunya en Colombia: Evidencia de seleccion purificadora sobre el gen E1. *Biomedica.* 2016;36:25–34.
 65. Achee NL, Gould F, Perkins TA, Reiner RC, Morrison AC, Ritchie SA, et al. A Critical Assessment of Vector Control for Dengue Prevention. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(5):1–19.
 66. Grisales N, Poupardin R, Gomez S, Fonseca-Gonzalez I, Ranson H, Lenhart A. Temephos Resistance in *Aedes aegypti* in Colombia Compromises Dengue Vector Control. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(9).
 67. Heintze C, Garrido MV, Kroeger A. What do community-based dengue control programmes achieve? A systematic review of published evaluations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(4):317–25.
 68. Ballenger-Browning KK, Elder JP. Multi-modal *Aedes aegypti* mosquito reduction interventions and dengue fever prevention. *Trop Med Int Heal.* 2009;14(12):1542–51.
 69. Argueta AL, Valle J, Marina CF. Efectos ovicida y larvicida del spinosad en *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae). *Rev Colomb Entomol.* 2011;37(2):269–72.
 70. Townson H, Nathan MB, Zaim M, Guillet P, Manga L, Bos R, et al. Exploiting the potential of vector control for disease prevention. *Bull World Health Organ.* 2005;83(12):942–7.
 71. Medlock J, Luz PM, Struchiner CJ, Galvani AP. The Impact of Transgenic Mosquitoes on Dengue Virulence to Humans and Mosquitoes. *Am Nat.* 2012;174(4):565–77.
 72. Carvalho DO, McKemey AR, Garziera L, Lacroix R, Donnelly CA, Alphey L, et al. Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(7):1–15.
 73. Dong K, Du Y, Rinkevich F, Nomura Y, Xu P, Wang L, et al. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem Mol Biol.* 2014;50(1):1–17.
 74. French-Constant RH, Daborn PJ, Le Goff G. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet.* 2004;20(3):163–70.
 75. French-Constant RH. The molecular genetics of insecticide resistance. *Genetics.* 2013;194(4):807–15.
 76. Van Den Berg H. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environ Health Perspect.* 2009;117(11):1656–63.

77. Rodríguez Cruz R. Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Rev Cubana Med Trop* . 2002;54(3):189–201.
78. Francis S, Karla SR, Perera R, Paine M, Black WC, Delgoda R. Insecticide resistance to permethrin and malathion and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from St. Andrew Jamaica. Vol. 12, PLoS ONE. 2017.
79. Goindin D, Delannay C, Gelasse A, Ramdini C, Gaude T, Faucon F, et al. Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). *Infect Dis Poverty* . 2017;6(1):38.
80. Cadavid JM, Londoño M, Milán S, Yepes H, Almanza R, Rúa-uribe GL. Susceptibilidad al insecticida malation en *Aedes aegypti* de Medellín , Colombia. *Rev Salud Publica Medellín*. 2011;5(62):99–106.
81. Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, et al. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol*. 2003;17:87–94.
82. Kawada H. Ddt and Pyrethroid Resistance in *Aedes Aegypti* (L .) and *Aedes Albopictus* (Skuse): Past , Present , and future 2017. 32-83 p.
83. Santacoloma Varón L, Chaves Córdoba, Bernardo, Brochero H. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. *Rev Panamericana Salud Publica* . 2010;27(1):66–73.
84. Conde M, Orjuela LI, Castellanos CA, Herrera-Varela M, Licastro S, Quiñones ML. Evaluación de la sensibilidad a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Caldas, Colombia, en 2007 y 2011. *Biomédica* . 2014;35(1):43–52.
85. Schleier III JJ, Peterson RKD. Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides. *Green Trends Insect Control*. 2011;94–131.
86. Scollon EJ, Starr JM, Godin SJ. In vitro metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome p450 isoforms. *Drug Metab ...* . 2009;37(1):221–8.
87. Soderlund DM. Molecular Mechanisms of Pyrethroid Insecticide Neurotoxicity: Recent Advances. 2013;86(2):165–81.
88. Vera-Maloof FZ, Saavedra-Rodriguez K, Elizondo-Quiroga AE, Lozano-Fuentes S, Black IV WC. Coevolution of the Ile1,016 and Cys1,534 Mutations in the Voltage Gated Sodium Channel Gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(12):1–22.
89. Dong K. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci*. 2007;7(1):17–30.
90. Du Y, Nomura Y, Satar G, Hu Z, Nauen R, He SY, et al. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *Proc Natl Acad Sci* . 2013;110(29):11785–90.
91. Wakeling EN, Neal AP, Atchison WD. Pyrethroids and Their Effects on Ion Channels. 2012;Ch.
92. Casida JE. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environ Health Perspect*. 1980;VOL.34(February):189–202.
93. Wang W, Lv Y, Fang F, Hong S, Guo Q, Hu S, et al. Identification of proteins associated with pyrethroid resistance by iTRAQ-based quantitative proteomic analysis in *Culex pipiens pallens*. *Parasit Vectors* . 2015;8(1):1–11.
94. Zhu F, Lavine L, O'Neal S, Lavine M, Foss C, Walsh D. Insecticide resistance and

- management strategies in urban ecosystems. *Insects*. 2016;7(1):1–26.
95. Rodríguez MM, Bisset J, Ruiz M, Soca A. Cross-Resistance to Pyrethroid and Organophosphorus Insecticides Induced by Selection with Temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J Med Entomol* . 2002;39(6):882–8.
 96. Lumjuan N, Rajatileka S, Changsom D, Wicheer J, Leelapat P, Prapanthadara L aied, et al. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol*. 2011;41(3):203–9.
 97. Faucon F, Gaude T, Dusfour I, Navratil V, Corbel V, Juntarajumnong W, et al. In the hunt for genomic markers of metabolic resistance to pyrethroids in the mosquito *Aedes aegypti*: An integrated next-generation sequencing approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(4):1–20.
 98. Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, et al. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2008;38(1):113–23.
 99. Enayati AA, Ranson H, Hemingway J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol*. 2005;14(1):3–8.
 100. Lumjuan N, Stevenson BJ, Prapanthadara L aied, Somboon P, Brophy PM, Loftus BJ, et al. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem Mol Biol*. 2007;37(10):1026–35.
 101. Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*. 2007;316(June):1718–23.
 102. Navratil V, Faucon F, Dusfour I, Gaude T, Navratil V, Boyer F, et al. Unravelling genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing Unravelling genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted se. 2015;(August):1347–59.
 103. Bariami V, Jones CM, Poupardin R, Vontas J, Ranson H. Gene amplification, abc transporters and cytochrome p450s: Unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6).
 104. Stevenson BJ, Pignatelli P, Nikou D, Paine MJ. Pinpointing P450s associated with pyrethroid metabolism in the dengue vector, *Aedes aegypti*: Developing new tools to combat insecticide resistance. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(3):1–8.
 105. David J-P, Faucon F, Chandor-Proust A, Poupardin R, Riaz MA, Bonin A, et al. Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing. *BMC Genomics* . 2014;15(1):174.
 106. David J-P, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJ. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* . 2013;368(1612):1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3538419/>
 107. Saavedra-Rodriguez K, Strode C, Suarez AF, Salas IF, Ranson H, Hemingway J, et al. Quantitative trait loci mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*. 2008;180(2):1137–52.
 108. Maestre-Serrano R. World ' s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher Susceptibility Status of *Aedes aegypti* to Insecticides in Colombia. In *Pest Engineering*, Dr. Farzana Perveen (Ed.); 2012.
 109. VONTAS JG, SMALL GJ, HEMINGWAY J. Glutathione S-transferases as

- antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J*. 2001;357(1):65–72.
110. Chandor-Proust A, Bibby J, Régent-Kloeckner M, Roux J, Guittard-Crilat E, Poupardin R, et al. The central role of mosquito cytochrome P450 CYP6Zs in insecticide detoxification revealed by functional expression and structural modelling. *Biochem J*. 2013;455(1):75–85.
 111. Lertkiatmongkol P, Jenwitheesuk E, Rongnoparut P. Homology modeling of mosquito cytochrome P450 enzymes involved in pyrethroid metabolism: insights into differences in substrate selectivity. *BMC Res Notes*. 2011;4(1):321.
 112. Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, et al. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*. 2007;16(6):785–98.
 113. Hamid PH, Prastowo J, Widyasari A, Taubert A, Hermosilla C. Knockdown resistance (kdr) of the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* population in Denpasar, Bali, Indonesia. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):283.
 114. Al Nazawi AM, Aqili J, Alzahrani M, McCall PJ, Weetman D. Combined target site (kdr) mutations play a primary role in highly pyrethroid resistant phenotypes of *Aedes aegypti* from Saudi Arabia. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):161.
 115. Lol JC, Castellanos ME, Liebman K a, Lenhart A, Pennington PM, Padilla NR. Molecular evidence for historical presence of knock-down resistance in *Anopheles albimanus*, a key malaria vector in Latin America. *Parasit Vectors*. 2013;6:268.
 116. Martinez-Torres DEA. Molecular characterization of pyrethroid knockdown (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*. 1998;7(June 1997):179–84.
 117. Ponce G, Sanchez IP, Garcia SM, Torrado JM, Lozano-Fuentes S, Lopez-Monroy B, et al. First report of L1014F kdr mutation in *Culex quinquefasciatus* in Mexico. *Insect Sci*. 2016;23(6):829–34.
 118. Plernsub S, Saingamsook J, Yanola J, Lumjuan N, Tippawangkosol P, Sukontason K, et al. Additive effect of knockdown resistance mutations, S989P, V1016G and F1534C, in a heterozygous genotype conferring pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):417.
 119. Aguirre-Obando OA, Martins AJ, Navarro-Silva MA. First report of the Phe1534Cys kdr mutation in natural populations of *Aedes albopictus* from Brazil. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):160.
 120. Alvarez LC, Ponce G, Saavedra-Rodriguez K, Lopez B, Flores AE. Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest Manag Sci*. 2015;71(6):863–9.
 121. Chapadense FGG, Fernandes EKK, Lima JBP, Martins AJ, Silva LC, da Rocha WT, et al. Phenotypic and genotypic profile of pyrethroid resistance in populations of the mosquito *aedes aegypti* from Goiânia, Central West Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(5):607–9.
 122. Collet ML, Frizzo C, Orlandin E, Rona LDP, Nascimento JC, Montano MAE, et al. Frequency of the Val1016Ile mutation on the kdr gene in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in south Brazil. *Genet Mol Res*. 2016;15(4).
 123. Harris AF, Rajatileka S, Ranson H. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(2):277–84.
 124. García GP, Flores AE, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, et al. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance

- allele in *Aedes aegypti* in Mexico. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(10).
125. Ronald M, Doris G. Dengue: Epidemiología, Políticas Públicas Y Resistencia De Vectores a Insecticidas. R E V I S T A C I E N C I A S B I O M É D I C A S. 2013;4(2):302–17.
 126. Santacoloma L, Chaves B, Brochero HL. Estado de la susceptibilidad de poblaciones naturales del vector del dengue a insecticidas en 13 localidades de Colombia. Biomédica. 2012;32:333–43.
 127. Instituto Nacional de Salud. Instituto Nacional de Salud. Informe epidemiológico “Red de vigilancia de la resistencia a insecticidas de uso en salud pública en Colombia 2004-2014.” Inst Nac Salud. 2014;27.
 128. Kasai S, Komagata O, Itokawa K, Shono T, Ng LC, Kobayashi M, et al. Mechanisms of Pyrethroid Resistance in the Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti*: Target Site Insensitivity, Penetration, and Metabolism. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(6).
 129. Roldan S Ardila, L Santacoloma HB. Estado de la susceptibilidad a insecticidas de uso en salud Pública en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento del Casanare, Colombia. Biomedica. 2013;33(3).
 130. Chang C, Shen WK, Wang TT, Lin YH, Hsu EL, Dai SM. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol. 2009;39(4):272–8.
 131. Penilla RP, Rodriguez AD, Hemingway J, Torres JL, Arredondo-Jimenez JI, Rodriguez MH. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in Mexico. Med Vet Entomol. 1998;12(3):217–33.
 132. Brogdon WG, McAllister JC. Insecticide resistance and vector control. Emerg Infect Dis. 1998;4(4):605–13.
 133. WHO global malaria program. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors. World Heal Organ Press. 2012;13.
 134. Kelly-Hope L, Ranson H, Hemingway J. Lessons from the past: managing insecticide resistance in malaria control and eradication programmes. Lancet Infect Dis. 2008;8(6):387–9.
 135. Georghiou GP. Management of Resistance in Arthropods. Pest Resist to Pestic. 1983;769–70.
 136. Georghiou GP. Principles of insecticide resistance management. Phytoprotection. 1994;75(4):51–9.
 137. WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Heal Organ. 2005;1–41.
 138. Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Somwang P, Prapanthadara L. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. Trop Med Int Health. 2011;16(4):501–9.
 139. Dowd AJ, Steven A, Morou E, Hemingway J, Vontas J, Paine MJ. A simple glutathione transferase-based colorimetric endpoint assay for insecticide detection. Enzyme Microb Technol. 2009;45(2):164–8.
 140. Brogdon WG, McAllister JC, Vulule J. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. J Am Mosq Control Assoc. 1997;13(3):233–7.
 141. Gaunt TR, Rodríguez S, Day IN. Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web

- tool “CubeX.” *BMC Bioinformatics* . 2007;8(1):428.
142. MAESTRE S R, REY V G, DE LAS SALAS A J, VERGARA S C, SANTACOLOMA V L, GOENAGA O S, et al. Susceptibility status of *Aedes aegypti* to insecticides in Atlántico (Colombia). *Rev Colomb Entomol* . 2010;36(2):242–8.
 143. Aponte HA, Penilla RP, Dzul-Manzanilla F, Che-Mendoza A, López AD, Solis F, et al. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. *Pestic Biochem Physiol* . 2013;107(2):226–34.
 144. Francis S, Karla SR, Perera R, Paine M, Black WC, Delgoda R. Insecticide resistance to permethrin and malathion and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from St. Andrew Jamaica. *PLoS One*. 2017;12(6):1–13.
 145. Aguirre-obando OA, Bona ACD, L JED, Navarro-silva MA. Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera : Culicidae) from Colombia. 2015;32(February):14–22.
 146. Kawada H, Higa Y, Futami K, Muranami Y, Kawashima E, Osei JHN, et al. Discovery of Point Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel from African *Aedes aegypti* Populations: Potential Phylogenetic Reasons for Gene Introgression. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(6):1–21.
 147. Kawada H, Higa Y, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Nguyen TY, et al. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(10):1–7.
 148. Aponte HA, Penilla RP, Dzul-Manzanilla F, Che-Mendoza A, López AD, Solis F, et al. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. *Pestic Biochem Physiol*. 2013;107(2):226–34.
 149. Foster W a. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annu Rev Entomol*. 1995;40:443–74.
 150. O'Donnell MJ, Spring JH. Modes of control of insect Malpighian tubules: Synergism, antagonism, cooperation and autonomous regulation. *J Insect Physiol*. 2000;46(2):107–17.
 151. Esquivel CJ, Cassone BJ, Piermarini PM. A *de novo* transcriptome of the Malpighian tubules in non-blood-fed and blood-fed Asian tiger mosquitoes *Aedes albopictus*: insights into diuresis, detoxification, and blood meal processing. *PeerJ* . 2016;4:e1784.
 152. Sanders HR, Evans AM, Ross LS, Gill SS. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2003;33(11):1105–22.
 153. Ingham VA, Jones CM, Pignatelli P, Balabanidou V, Vontas J, Wagstaff SC, et al. Dissecting the organ specificity of insecticide resistance candidate genes in *Anopheles gambiae*: known and novel candidate genes. *BMC Genomics* . 2014;15(1):1018.
 154. Poupardin R, Riaz MA, Vontas J, David JP, Reynaud S. Transcription profiling of eleven cytochrome p450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito *aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*. 2010;19(2):185–93.
 155. Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pestic Biochem Physiol* . 2012;104(2):126–31.
 156. Lumjuan N, McCarroll L, Prapanthadara LA, Hemingway J, Ranson H. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti* White star. *Insect Biochem Mol Biol*. 2005;35(8):861–

- 71.
157. Lumjuan N, Wicheer J, Leelapat P, Choochote W, Somboon P. Identification and characterisation of *Aedes aegypti* aldehyde dehydrogenases involved in pyrethroid metabolism. PLoS One. 2014;9(7):1–8.
 158. Seixas G, Grigoraki L, Weetman D, Vicente JL, Silva AC, Pinto J, et al. Insecticide resistance is mediated by multiple mechanisms in recently introduced *Aedes aegypti* from Madeira Island (Portugal). PLoS Negl Trop Dis. 2017;(under revision).
 159. Nkya TE, Akhouayri I, Kisinza W, David J-P. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. Insect Biochem Mol Biol . 2013;43(4):407–16.
 160. Riaz MA, Chandor-Proust A, Dauphin-Villemant C, Poupardin R, Jones CM, Strode C, et al. Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector *Aedes aegypti*. Aquat Toxicol . 2013;126:326–37.
 161. David J-P, Coissac E, Melodelima C, Poupardin R, Riaz M, Chandor-Proust A, et al. Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. BMC Genomics . 2010;11(1):216.
 162. Wu HW, Tian HS, Wu GL, Langdon G, Kurtis J, Shen B, et al. *Culex pipiens pallens*: Identification of genes differentially expressed in deltamethrin-resistant and -susceptible strains. Pestic Biochem Physiol. 2004;79(3):75–83.
 163. He J, Sun H, Zhang D, Sun Y, Ma L, Chen L, et al. Cloning and characterization of 60S ribosomal protein L22 (RPL22) from *Culex pipiens pallens*. Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol . 2009;153(2):216–22.
 164. Sun H, Sun L, He J, Shen B, Yu J, Chen C, et al. Cloning and characterization of ribosomal protein S29, a deltamethrin resistance associated gene from *Culex pipiens pallens*. Parasitol Res. 2011;109(6):1689–97.
 165. Yu J, Hu S, Ma K, Sun L, Hu H, Zou F, et al. Ribosomal protein S29 regulates metabolic insecticide resistance through binding and degradation of CYP6N3. PLoS One. 2014;9(4):1–10.
 166. Tan W, Sun L, Zhang D, Sun J, Qian J, Hu X, et al. Cloning and overexpression of ribosomal protein L39 gene from deltamethrin-resistant *Culex pipiens pallens*. Exp Parasitol. 2007;115(4):369–78.
 167. Li CX, Guo XX, Zhang YM, Dong Y De, Xing D, Yan T, et al. Identification of genes involved in pyrethroid-, propoxur-, and dichlorvos- insecticides resistance in the mosquitoes, *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae). Acta Trop . 2016;157:84–95.
 168. Sun J, Li C, Wang S. The up-regulation of ribosomal proteins further regulates protein expression profile in female *Schistosoma japonicum* after pairing. PLoS One. 2015;10(6):1–15.
 169. Lindström MS. Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation. Biochem Biophys Res Commun . 2009;379(2):167–70.
 170. Gilbert W V. Functional specialization of ribosomes? Trends Biochem Sci . 2011;36(3):127–32.
 171. dos Santos Paduan K, Araújo JP, Ribolla PEM. Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. Genet Mol Biol. 2006;29(2):391–5.

13. ANEXOS

13.1. Anexo I. Formato del comité de ética.



1

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN PARA EL MANEJO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN CIEIA / CIDEIM

ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTOS

Válida **EXCLUSIVAMENTE** para ser presentada ante COLCIENCIAS a la CONVOCATORIA PARA PROYECTOS DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN EN SALUD – 2014 (No. 657-2014).

Este documento quedará registrado en acta de reunión ordinaria del CIEIA / CIDEIM

TÍTULO DEL PROYECTO: "MECANISMOS MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A PIRETROIDES EN POBLACIONES DE *Aedes Aegypti* DE COLOMBIA"

Sometido por: CLARA BEATRIZ OCAMPO. Bióloga PhD.

Fecha en que fue sometido: junio 4 de 2014

El CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES MEDICAS (CIDEIM), ha establecido el Comité Institucional de Ética de Investigación para el manejo de animales de experimentación (CIEIA), el cual está regido por la Ley 84 del 27 de diciembre de 1989 del Ministerio de Salud de Colombia, en la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia; y por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud

Este Comité **certifica que:**

1. Ha revisado de manera expedita los siguientes **documentos** del proyecto:

- a. (X) Protocolo de investigación
- b. (X) Consideraciones éticas
- c. (X) Certificado de aprobación del Comité Técnico-Científico

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes **miembros** del Comité (nombre y representación)

RAFAEL HAMBURGER, Md. V. Esp.
Presidente CIEIA / CIDEIM

3. El Comité considera que las **medidas** que están siendo tomadas para proteger a los animales en experimentación son adecuadas.

4. El Comité **informará** inmediatamente a las directivas institucionales:

- a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
- b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
- c. Lesiones o sufrimiento causados a los animales no reportados por el Investigador

10. El **investigador principal deberá** informar al Comité:

- a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité
- b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los animales y otros.
- c. Informar cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
- d. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.



Firma: 
 Nombre: RAFAEL HAMBURGER A
 Título: Md. Veterinario Zoofecnista
 Capacidad representativa: **Presidente**
 Comité Institucional de Ética de Investigación con animales en Experimentación CIEIA / CIDEIM

Firma: 
 Nombre: Jackeline Bravo Chamorro
 Capacidad representativa: **Secretaria Ejecutiva**
 Comité Institucional de Ética de Investigación con animales en Experimentación CIEIA / CIDEIM

*Recibido 9/06/2014
 Asesor a Apaza St.*

13.2. Anexo II Formato usado para los Ensayos CDC (Información confidencial de CIDEIM)

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE MOSQUITOS ADULTOS A INSECTICIDAS METODOLOGIA BOTELLAS CDC - ATLANTA

Fecha de la prueba: _____ Hora de la prueba: _____ Responsable: _____

Tipo de insecticida: _____ Nombre del insecticida: _____ Concentración: _____

Especie de mosquito: _____ Bioensayo N°: _____ Fecha de impregnación botella: _____

Fecha de expiración: _____ No. de usos de la botella impregnada: _____ No. de insectos por botella: _____

Temp. Máxima: _____ Humedad Relativa: _____ Edad mosquitos: _____

Minutos	RÉPLICA 1		RÉPLICA 2		RÉPLICA 3		RÉPLICA 4		CONTROL	
	VIVOS	MUERTOS	VIVOS	MUERTOS	VIVOS	MUERTOS	VIVOS	MUERTOS	VIVOS	MUERTOS
0										
5										
10										
15										
20										
25										
30										
35										
40										
45										
50										
55										
60										
24 horas										
TOTAL										
vivos 24h										

OBSERVACIONES

13.3. Anexo III. Procedimiento para ensayos bioquímicos

Ensayo de Acetilcolinesterasa

μ l	Solución	M_0 =Homogenizado = 200 μ l
25	Homogenizado por duplicas	Filas A, B, C y D = 150 μ l c/u
14 5	Buffer Tritón al 1% pH 7.8	13,920 μ l = 13.92 ml
10	0.008 gr DTNB (5, 5'-Ditio-bis(2-ácido Nitrobenzoico) + 2 ml <i>Na₂HPO₄ 0.1M pH 7.0</i>	960 μ l = 0.96 ml
*	Disolver 0.015 gr ASCHI en 5 ml H₂O , separar la mitad (para media placa) y a una agregar 5 μ l de Propoxur 0.1 M	5000 μ l 5.0ml/2= 2500 μ l=2.5 ml c/u
25	ASCHI sin propoxur a la 1 ^a , 3 ^a , 5 ^a y 7 ^a Filas	1200 μ l= 1.2 ml
25	ASCHI con propoxur a la 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a y 8 ^a Filas	1200 μ l= 1.2 ml
	Leer en Multiskan Spectrum a 405 nm por 5 minutos (Thermo Labsystems)	
*	*Nota: ASCHI= Acetil TioColina Iodada. En caso que la solución de ASCHI, no alcance mejor disolver 0.017 gr ASCHI en 6 ml H₂O , separ la mitad y agregar a una mitad 5 μ l de <i>propoxur</i> 0.1 M	

Ensayo de esterasas generales

μ l	Solución	M_0 =Homogenizado = 110 μ l
20	Homogenizado por duplicas	
	Preparar 120 μ l α -naphyl y 120 μ l β -naphyl acetato 30 mM, disuelto en 12 ml de <i>Na₂HPO₄ 0.02M pH 7.2</i> cada uno.	9,600 μ l = 9.6 ml
200	α -naphyl acetato (Duplicas) a la 1 ^a , 3 ^a , 5 ^a y 7 ^a Filas	9,600 μ l = 9.6 ml
200	β -naphyl acetato (Duplicas) a la 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a y 8 ^a Filas	9,600 μ l = 9.6 ml
	Dejar por 30 minutos a temperatura ambiente	
50	0.023 gr Fast-blue + 2.25 ml H₂O + 5.25 ml SDS 5%	4,800 μ l = 4.8 ml
	Dejar a temperatura ambiente 5 minutos y leer a 570 nm en punto fijo.	

Ensayo de Paranitrofenil acetato (PnPA)

μ l	Solución	M_0 =Homogenizado = 50 μ l
10	Homogenizado por duplicas	
200	20 ml de Buffer Fosfato Na₂HPO₄ 50 mM pH 7.4 + 100 μ l de p- Nitrofenil Acetato 0.1 M (100 mM)	19,200 μ l = 19.2 ml
	Leer a 405 nm por 2 minutos	

Ensayo de citocomas P⁴⁵⁰.

μ l	Solución	M ₀ =Homogenizado = 150 μ l
20	Homogenizado por duplicas	
80	K₂HPO₄ pH 7.2	7,680 μ l = 7.68 ml
200	Disolver 0.01 gr Tetrametilbencidina en 5 ml de metanol , agregar 15 ml Na C₂H₃O₂ (Acetato de Sodio) 0.25M pH 5.0	19,200 μ l = 19.20 ml
25	H₂O₂ al 3%	2,400 μ l = 2.4 ml
*	*Mantener 1 hora a temperatura ambiente, leer a 650 nm en punto fijo	

Ensayo de Glutación S transferasas (GST)

μ l	Solución	M ₀ =Homogenizado = 70 μ l
10	Homogenizado por duplicas	
200	0.065 gr Glutation reducido en 20 ml de buffer Na₂HPO₄ 0.1M pH 6.5 + 0.013 gr CDNB (1-Cloro-2,4-DinitroBenceno) disuelto en 1 ml de metanol	19,200 μ l = 19.2 ml
	Leer a 340 nm por 5 minutos	
*	*Nota: Primero disolver 0.065 gr <i>Glutation</i> reducido en 20 ml de <i>Buffer Na₂HPO₄ 0.1M pH 6.5</i> y luego agregar la solución de <i>CDNB (1-Cloro-2,4-DinitroBenceno)</i> , disuelto en 1 ml de <i>metanol</i> .	

Ensayo de proteínas totales

μ l	Solución	Homogenizado = 30 μ l
10	Homogenizado por duplicas	
300	Biorad diluido 1:4 (7:28) en H₂O Tridestilada	28,800 μ l = 28.8 ml
	Dejar 5 minutos a temperatura ambiente y leer a 570 nm en punto fijo	

13.4. Anexo IV. Cuantificación de la actividad enzimática de las esterasas, Glutatión S transferasa y Citocromos P⁴⁵⁰.

Cepas	α esterasas(μ mol prod/min/mg proteína)				β esterasas(μ mol prod/min/mg proteína)			ρ NPA (μ mol ρ NPA/min/mg prot)				GST (mmol CDNB conj/min/mg prot)				Cyt P ⁴⁵⁰ (mmol P ⁴⁵⁰ /mg prot)			
	n	Mediana	SD	Dt (P Value)	Mediana	SD	Dt (P Value)	n	Mediana	SD	Dt (P Value)	n	Mediana	SD	Dt (P Value)	n	Mediana	SD	Dt (P Value)
Cepas de laboratorio																			
Rockefeller	72	0,00044	0,0001		0,00058	0,0003		48	0,821	0,51		72	1,296	0,75		48	0,0011	0,0003	
DDT F ³⁰	72	0,00068	0,0003	0,000	0,00082	0,0004	0,000	72	0,965	0,46	0,302	72	1,429	0,48	0,872	72	0,0012	0,0003	0,993
Propoxur F ²⁹	72	0,00054	0,0002	0,630	0,00052	0,0003	0,994	72	0,673	0,48	0,997	72	2,001	1,98	0,000	69	0,0008	0,001	1,000
Lamdacialotri na F ²⁹	72	0,00040	0,0002	0,990	0,00039	0,0003	1,000	71	0,464	0,19	1,000	72	1,566	0,86	0,670	72	0,0013	0,0009	0,951
Cepas de campo																			
Buga F ¹	72	0,00043	0,0003	0,145	0,00038	0,0004	1,000	47	1,003	0,35	0,933	72	2,951	2,38	0,000	48	0,0014	0,0006	0,757
Yumbo F ²	48	0,00075	0,0001	0,000	0,00075	0,0002	0,150	72	0,994	0,26	0,690	72	3,988	1,56	0,000	72	0,0018	0,0004	0,007*
Palmira F ²	72	0,00046	0,0002	0,105	0,00042	0,0002	1,000	72	0,764	0,27	1,000	72	1,893	1,19	0,041	72	0,0011	0,0003	0,998
Cali (pdC) F ²	72	0,00042	0,0001	0,997	0,00040	0,0001	1,000	72	0,993	0,418	0,111	72	2,647	1,67	0,000	72	0,0013	0,0003	0,832
Girón F ¹	72	0,00044	0,0001	0,987	0,00051	0,0002	1,000	72	1,108	0,8	0,000	72	1,732	1,01	0,094	72	0,0011	0,0004	0,998
Medellín (BF) F ²	72	0,00068	0,0002	0,000	0,00063	0,0002	0,980	48	0,607	0,23	1,000	72	2,426	1,33	0,000	72	0,0014	0,001	0,038*
Medellín (AF) F ²	72	0,00042	0,0002	0,638	0,00047	0,0001	1,000	72	0,758	0,343	0,999	72	1,899	1,22	0,009	72	0,0011	0,0007	1,000

* La diferencia en las medianas es significativa si el valor P es <0.05

La prueba t de Dunnett (Dt) trata a un grupo (Rockefeller) como un control y la compara contra todos los otros grupos.

13.5. Anexo V. Extracción de ADN usando Buffer de Pat's Roman

Extraction of DNA from single mosquitoes

Modified from Bender, Spierer and Hogness (J. Mol. Biol 168, 17 1983)

Pat Romans, can be stored on the shelf for months.

Final concentration	For 100 ml
0.1 M NaCL	584 mg NaCL
0.2 M Sucrose	6.85 g
0.1 M Tris HCL ph 9.1 - 9.2	1.211 g Tris, Trisma
0.05 M EDTA	1.861 gt EDTA (Na2)
0.5% SDS	5 mL 10% SDS
	Bring to 100 ml, adjust pH 9.2

1. Freeze mosquitoes and add 1 to each 1.5 ml microfuge tube containing 30 μ l (Modified 60 μ l) of Pat romans. Grind at least 10 seconds using a pestle attached to a homogenizer. Monitor progress of grinding visually and don't stop until you can identify no part. Carefully rinse pestle into the tube with another 30 μ l Pat Romans.
2. When all grinding is complete microfuge tubes a few seconds just to get everything off the sides of the tube and into in the extraction buffer at the bottom. This is important.
3. Incubate at 65 °C in a dry bath for 30 min.
4. While tubes are still warm, add 7 μ l of 8M KAc to a final concentration of 1M. Mix by tapping the tubes.
5. Incubate on ice 30 minutes (more is OK).
6. Microfuge at maximum speed for 15 min at room temperature. Transfer supernatants to fresh 1.5 ml microfuge tubes using a pipette.
7. Add 100 μ l of 100% EtOH to the supernatants, mix and incubate at room temperature for 5 min (at this point you can freeze supernatant/EtOH at -20°C overnight) Microfuge 15 minutes. Carefully remove the EtOH with a pipette. The DNA will be a purplish pellet.
8. Add 100 μ l cold 75% EtOH to the pellets and tap to resuspend. Microfuge 5 min. Remove EtOH.
9. Repeat step 8 using 100% EtOH. At this point the pellets will not be very firmly attached to the tubes, so be careful removing EtOH.
10. Spin in a speed vac for 10 minutes. Make sure that no traces of EtOH remain. (Modified. If you do not have speed vac, you can leave the tubes drying at room temperature).
11. Dissolve nucleic acid pellets in a volume of ~ 100 to 150 μ l of TE (Tris-EDTA pH 8.0) DNA can be stored at 4°C or frozen at – 80°C (Modified. If you do not have TE, you can dissolve the acid pellets with water molecular grade).

13.6. Anexo VI. Real Time PCR para detección de mutaciones kdr.

Melting Curve-PCR to identify Isoleucine 1,016 in the *Aedes aegypti* “para” gene.
(Karla Saavedra, Oct-2012)

Reactives, Primers and Equipment

- iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad 170-8880)
- Real Time Thermocycler
- Flat cap strips (Bio-Rad TCS0803)
- Low 96-well white multiplate PCR plates (Bio-Rad MLL9651)
- 1.5 ml tubes
- ddH₂O
- Primers suspended in TE pH 8.0 for a final 500 picomoles/μl concentration

Val_{1016f} GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGCCACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG
 Ile_{1016f} GCGGGCACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA
 Ile_{1016r} TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC

Melt-Curve PCR Reaction

- Thaw reactives and keep in ice
- Calculate number of reactions
- In a 1.5 ml Eppendorf tube, prepare master mix as follows:

Reactive	1rx	10rx	70rx	97rx
ddH ₂ O	9.88	98.8	691.6	958.3
iQ SYBER mix	10.00	100.0	700.0	970.0
Primer Val1016f	0.04	0.4	2.8	3.8
Primer Ile1016f	0.04	0.4	2.8	3.8
Primer Ile1016r	0.04	0.4	2.8	3.8
Total volume (μl)	20.0 μl	200.0	1400.0	1940.0

- Mix by pipetting
- Load 20 μl of the ‘master mix’ into each well of the PCR plate
- Add 0.5-1.0 μl of DNA template
- Cover reaction with flat cover strips
- Centrifuge plate for 2 minutes to ensure pcr-reaction is at the bottom of the well.

Thermocycler conditions

95 °C 3 min
 95 °C 10 sec
 60 °C 10 sec
 72 °C 30 sec
 39 more times to step 2
 95 °C 10 sec
 Melting curve 65°C to 95°C
 Increment 0.2°C per 10 sec + Plate read END

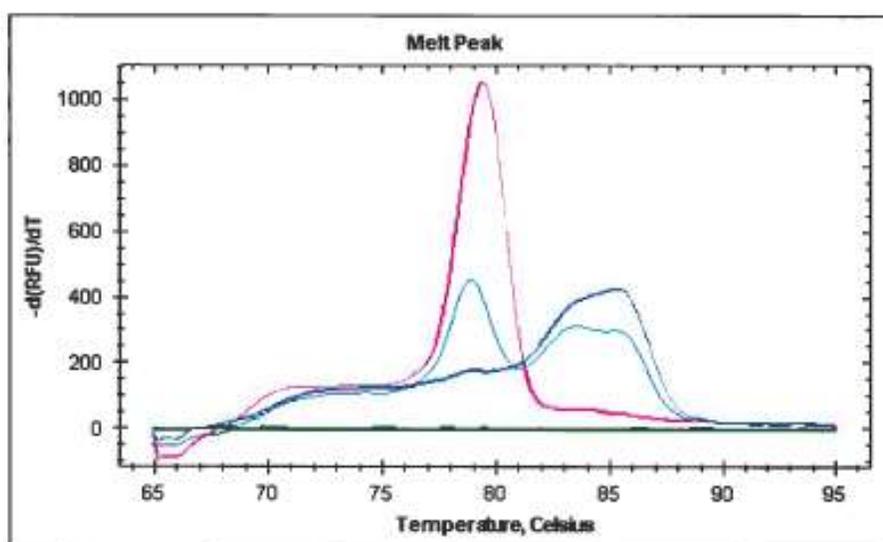
Reading results

You will see two different melting curve peaks:

- 79 °C corresponds to the product amplified with the short primer, which is specific for allele A (ATA codes for Isoleucine or mutant type).
- 85 °C corresponds to the product amplified with the long primer, which is specific for allele G (GTA codes for Valine or susceptible type).

In your samples, three different genotypes are possible:

- AA, one single peak at 79 °C. This is a homozygote for Ile₁₀₁₆, resistant.
- GG, one single peak at 85 °C. This is a homozygote for Val₁₀₁₆, susceptible.
- AG, both peaks are present (79 °C and 85 °C). This is a heterozygote Ile₁₀₁₆/Val₁₀₁₆.



Analyzing data

A common way to interpret results is by calculating the allele frequency for each mosquito population.

- In an excel worksheet, list the genotype information for ~50 mosquitoes. You can write the name of the population, sex, if bioassay alive or dead, etc.
- Add the genotype of each mosquito AA, GG or AG
- Count # of individuals with each genotype: AA, GG or AG
- The total allele frequency is $p^2+2pq+q^2=1$
 p = #homozygotes GG, q = #homozygotes AA, pq = #heterozygotes AG
- To calculate the Ile1016 allele frequency

$$\text{AA allele frequency} = \frac{1*(\#AG \text{ heterozygotes}) + 2*(\#AA \text{ homozygotes})}{2*(\text{total \# of mosquitoes analyzed})}$$

Frequencies closer to 1 have higher frequencies of the resistant allele.

Melting Curve-PCR to identify Cysteine 1,534 in *Aedes aegypti* "para" gene.
Black Lab, 2012 (From Yanola *et al.*, 2011 protocol)

1. Reactives, Primers and Equipment

- iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad 170-8880)
- Real Time Thermocycler
- Flat cap strips (Bio-Rad TCS0803)
- Low 96-well white multiplate PCR plates (Bio-Rad MLL9651)
- 1.5 ml tubes
- ddH₂O
- Primers re-suspended in TE pH 8.0 for a final 500 picomole/μl concentration.
- A second dilution at 50 picomoles/μl is also required. [eg pipette 100 μl of primer (at 500pmol/μl) and add 900 μl of ddH₂O].

Cys1534+ TCTGCTCGTTGAAAGTTGTCGAT TCTACTTTGTGTTCTTCATCATGT
 Phe1534+ TCTACTTTGTGTTCTTCATCATAT
 1534- TCTGCTCGTTGAAAGTTGTCGAT

2. PCR Reaction

- Thaw reagents and keep in ice
- Calculate number of reactions
- In a 1.5 ml Eppendorf tube, prepare master mix as follows:

Reactives	1rx	10rx	64rx	96rx
ddH ₂ O	9.53	95.30	610.00	915.0
iQ SYBER mix	10.00	100.00	640.00	960.0
Primer *Cys1534+	0.066	0.66	4.23	6.4
Primer *Phe1534+	0.20	2.00	13.00	19.3
Primer *1534-	0.20	2.00	13.00	19.3
Total volume (μl)	20.00	200.00	1280.20	1920.0

*Primers at 50 pmol/ul

- Mix by pipetting
- Load 19.6 μl of the 'master mix' into each well of the PCR plate
- Add 0.5 to 1 μl of DNA template
- Cover with flat cover strips
- Centrifuge plate for 2 minutes to ensure reaction mix is at the bottom of the well.

3. Melting curve and thermocycler conditions

```
95 °C 3 min
95 °C 10 sec
57 °C 10 sec
72 °C 30 sec
39 more times to step 2
95 °C 10 sec
Melting curve 65°C to 95°C
Increment 0.5°C per 5 sec + Plate read
END
```

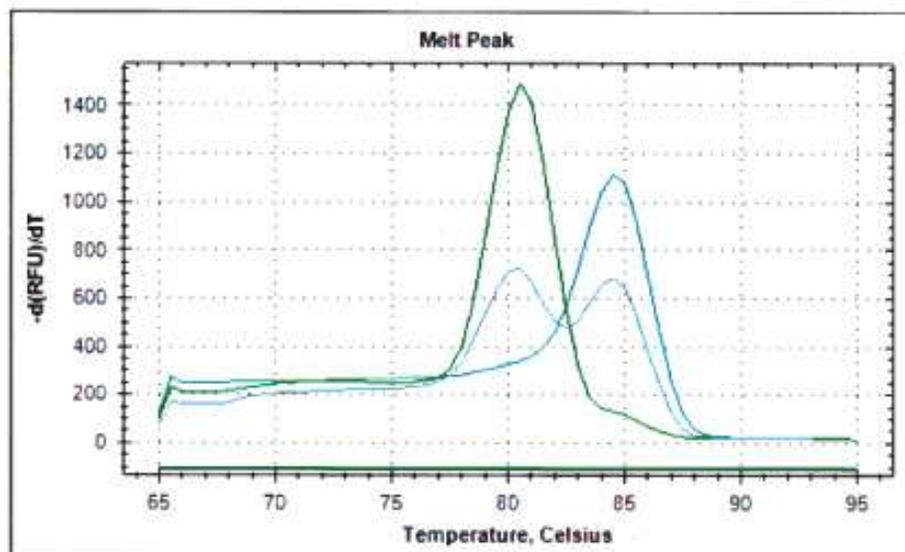
4. Reading results

You will see two different melting curve peaks:

- 80 °C corresponds to the product amplified with the short primer, which is specific for allele T (TTC codes for Phenylalanine or susceptible allele)
- 85 °C corresponds to the product amplified with the long primer, which is specific for allele G (TGC codes for cysteine or resistant allele).

In your samples, three different genotypes are possible:

- TT one single peak at 80 °C. This is a homozygote for Phe₁₅₃₄, susceptible.
- GG, one single peak at 85 °C. This is a homozygote for Cys₁₅₃₄, resistant.
- TG, both peaks are present (80 °C and 85 °C). This is a heterozygote.



13.7. Anexo VII. Mutaciones *Kdr* como mecanismo de resistencia al Dicloro fenil tricloroetano (DDT).

Pregunta de Investigación: ¿La presencia de la mutación *Kdr* Cys1534 en el canal de sodio dependiente de voltaje en los mosquitos de las cepas susceptible Rockefeller que sobreviven a la exposición al DDT está relacionada con el fenotipo resistente?

OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación entre la presencia de las mutaciones *Kdr* Phe1534Cys y el fenotipo resistente para DDT en la cepa de referencia Rockefeller de *Aedes aegypti*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar la susceptibilidad al insecticida DDT en la cepa Rockefeller *Ae. aegypti*

Indicador: Porcentaje de mortalidad determinado para la dosis evaluada.

- Fenotipo de los mosquitos evaluados determinado.

2. Evaluar la presencia de las mutaciones *Kdr* Phe1534Cys en *Ae. aegypti* cepa Rockefeller expuestos a DDT.

Indicador: Presencia y frecuencias alélicas de las mutaciones *Kdr* Phe1534Cys calculadas.

- Asociación del fenotipo resistente y de la presencia de las mutaciones *Kdr* como mecanismo de resistencia al insecticida DDT determinada.

Estrategia Metodológica: Mosquitos hembras de *Aedes aegypti* de la cepa de referencia Rockefeller serán expuestas a 2000 µg/ml de DDT usando la metodología de botellas impregnadas del CDC(20).

La determinación de esta dosis es basada en resultados previos, donde se expuso *Ae. aegypti* de la cepa Rockefeller para calcular la concentración letal (LC₉₉) y LC₅₀. (Gráficas 1A y 2A).

Sin embargo nunca se alcanzó el 99-100% de mortalidad, por lo que se decide exponer a la dosis en la cual se obtuvo la mayor mortalidad que fue del 70%.

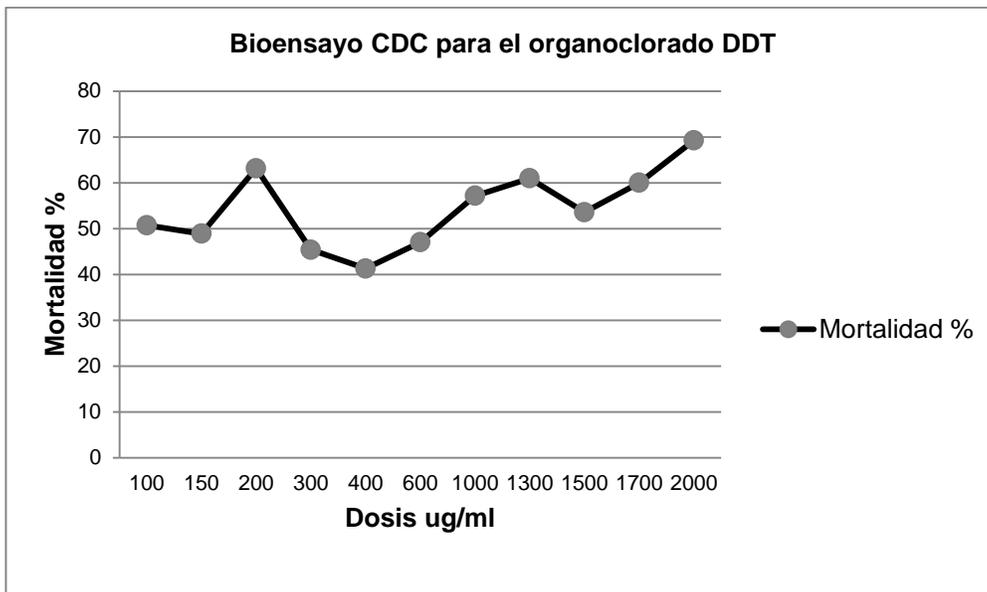


Figura 1A. Porcentaje de mortalidad para *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller expuestas a diferentes dosis de DDT.

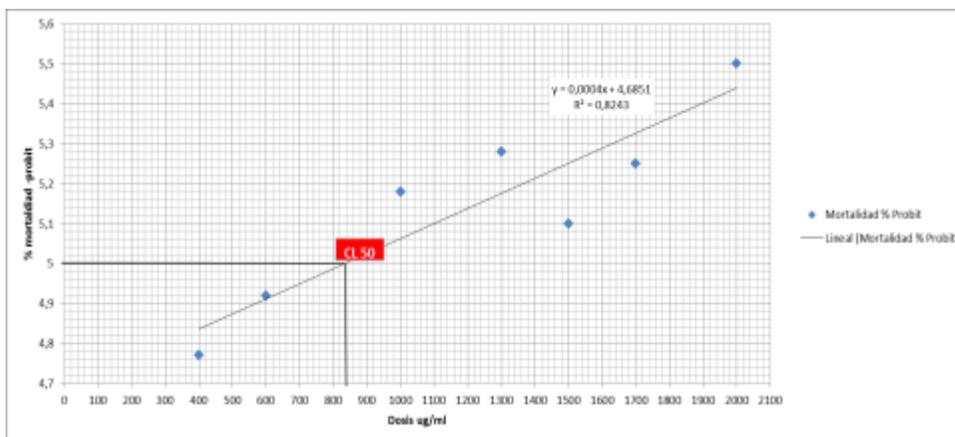


Figura 2A. Análisis probit para la determinación de la CL₅₀ para el insecticida DDT en *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller expuestas a diferentes dosis de DDT.

Después de la exposición durante una hora a la concentración de 2000 µg/ml de DDT, los mosquitos serán trasladados a recipientes de recuperación hasta las 24 horas post exposición. Se registrará la mortalidad nuevamente y los mosquitos serán separados de manera individual de acuerdo al fenotipo registrado (Resistente/sobreviviente)- (susceptible/muerto).

Posteriormente a cada mosquito se le extraerá el ADN siguiendo la metodología de Bender usando el buffer de Pat's Roman(171) para detectar la presencia de las mutaciones Val1016Ile y Phe1534Cys. La detección de la mutación Phe1534Cys se realizará por medio de una PCR en tiempo real, usando el protocolo descrito por Saavedra y Yanola, usando los iniciadores Cys1534+,Phe1534+y1534-

(88,112,120).

Como controles positivos y negativos en cada PCR se usará el ADN de mosquitos de campo F₁ de ciudades pertenecientes a diferentes estados de México, serán usados como referencia de homocigotos para las mutaciones (I1016I y C1534C), estas muestras fueron donadas por la estudiante de doctorado Farah Zamira Vera Maloof, de la Universidad del Estado de Colorado.

Para interpretar los datos se calculará la frecuencia de los alelo para cada población de mosquitos (el total de la frecuencia de los alelos se obtiene a partir de la fórmula $p^2+2pq+q^2=1$).

Para determinar la asociación fenotipo (Resistente/susceptible) –genotipo (Cys1534) se usará la prueba de Chi² o el estadístico exacto de Fisher según el número de individuos para cada genotipo. Para todas las pruebas se aceptará un valor de significación estadística del 5% ($p<0,05$).

Resultados.

Ensayos CDC con DDT a una concentración de 2000 µg/ml

En total se evaluaron 142 mosquitos hembra. El porcentaje de mortalidad y número de individuos muertos y vivos a diferentes tiempos de exposición se muestran en la cuadro 1A.

Tabla 1A. Resultados de los ensayos CDC con la cepa Rockefeller expuesta a a una concentración de 2000 µg/ml de DDT.

Tiempo de exposición	% Mortalidad	Vivos	Muertos	Total
0	0,0	98	0	98
5	3,0	93	5	98
10	2,1	96	3	99
15	4,7	93	7	100
20	13,0	85	19	104
25	19,4	80	29	109
30	29,5	72	43	115
35	51,5	45	78	123
40	62,6	31	93	124
45	73,8	21	109	130
50	83,2	14	123	137
55	83,7	14	124	138
60	88,3	12	132	144
24 horas	86,5	15	127	142

Análisis de asociación entre el fenotipo resistente y la presencia de la mutación Phe1534 Cys

Los resultados de la PCR en tiempo real se muestran en el cuadro 2A. En total se analizaron 41 mosquitos. El número de mosquitos seleccionados se debe a la cantidad de reactivos disponibles para realizar la PCR en tiempo real.

Cuadro 2A. Número de mosquitos susceptibles y muertos con su respectivo genotipo para la mutación Cys1534.

Fenotipo	SS (Phe/Phe)	RS (Phe/Cys)	RR (Cys/Cys)	Frecuencia alelo Phe	Frecuencia alelo Cys
Rockefeller vivo	10	1	3	0,75	0,25
Rockefeller Muerto	8	2	17	0,34	0,66
Total	18	3	20	0,47	0,53

Se planteó la siguiente hipótesis nula:

Ho= Fenotipo resistente al DDT en la cepa Rockefeller depende de la presencia de la mutación Cys1534.

Inicialmente se realizó una prueba de Fisher para los homocigotos encontrados. Se construyó una tabla de contingencia 2 x2 (Cuadro 3A) con los fenotipos y los genotipos encontrados. (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency2/>).

Cuadro 3A. Tabla 2 x 2 con los fenotipos y genotipos de mosquitos de la cepa Rockefeller expuestos a 2000 µg/ml de DDT.

Phenotype	Outcome 1 (RR)	Outcome 2 (SS)	Total
Group vivo	3	10	13
Group muertos	17	8	25
Total	20	18	38

Fisher test The two-tailed P value equals 0.0156.

Chi square with Yates correction Chi squared equals 5.238 with 1 degrees of freedom.
The two-tailed P value equals 0.0221

Debido a que el valor de P para una prueba de dos colas fue de 0,0156, se rechaza la hipótesis nula. Es decir el fenotipo resistente no es dependiente de la presencia de la mutación Cys1534. Este resultado también se obtuvo al realizar una Chi cuadrada con corrección de Yates ($P= 0,0221$)

Posteriormente se realizó un una prueba de Fisher y de Chi², en una tabla de contingencia 2 x 3 (cuadro 4A), teniendo en cuenta los heterocigotos encontrados. Se usó el programa libre “Chi square Test Calculator” disponible en la siguiente página de internet: <http://www.socscistatistics.com/tests/chisquare2/Default2.aspx>

The chi-square statistic is 6,9303. The *p- value* is 0,31268. The result is significant at $p < 0,05$.

Cuadro 4A. Tabla 2 x 3 con los fenotipos y genotipos de mosquitos de la cepa Rockefeller expuestos a 2000 µg/ml de DDT.

Phenotype	RR (Cys/Cys)	RS (Phe/Cys)	SS (Phe/Phe)	Row Totals
Rockefeller vivo	3 (6,83) [2,15]	1 (1,02) [0,00]	10 (6,15) [2,42]	14
Rockefeller muerto	17 (13,17) [1,11]	2 (1,98) [0,00]	8 (11,85) [1,25]	27
Column Totals	20	3	18	41 (Grand Total)

The chi-square statistic is 6,9303. The *p- value* is 0,31268. The result is significant at $p < 0,05$

La tabla de contingencia a continuación proporciona la siguiente información: los totales de células observadas, (los totales de células esperados) y [la estadística de chi-cuadrado para cada celda].

Nuevamente se rechaza la hipótesis nula.

De acuerdo a nuestros hallazgos la mutación Phe1534Cys no está asociada con resistencia al DDT en la cepa Rockefeller de *Ae. aegypti*.

13.8. Anexo VIII. Peptide labeling using TMT Isobaric Mass Tags preceded by in-solution digestion

Material Preparation:

100 mM TEAB (triethyl ammonium bicarbonate) Add 500 μ L of the Dissolution Buffer (1 M TEAB) to 4.5 mL of ultrapure water.

LYSIS:

Lysis Buffer: Add 200 μ L of the Denaturing Reagent (10% SDS) to 1.8 mL of 100 mM TEAB.

Note (FROM TMT KIT): Lysis buffers such as Laemli (prepared without glycerol), RIPA Lysis and Extraction Buffer or 8 M urea in 50 mM TEAB or HEPES buffer, pH 8 may be used as alternative denaturing cell lysis buffers. For urea-based lysis buffer, protein samples must be diluted to < 1M urea before digestion, and the final C18 desalting step is not optional. Addition of protease and/or phosphatase inhibitors during lysis is optional and may interfere with MS analysis.

IF YOU USE urea-based lysis buffer, you can apply FASP protocol! After FASP protocol, add 100 μ L of 100 mM TEAB to dried tryptic peptides and perform peptide labeling directly. Less buffer volume can be used depending on sample amount.

REDUCTION:

200 mM TCEP: Add 70 μ L of the Reducing Reagent (0.5 M TCEP) to 70 μ L of ultrapure water. Then add 35 μ L of the Dissolution Buffer (1 M TEAB).

Note: 200 mM DTT can be used instead (Dissolve 30.85 mg of DTT in 1 ml of 200 mM TEAB)

ALKYLATION:

375 mM iodoacetamide: Dissolve 9 mg of IAA with 132 μ L of 100 mM TEAB **immediately before use.**

TMT labeling:

TMT reagents: Immediately before use, equilibrate the TMT Label Reagents to room temperature.

For the 0.8 mg vials, add 41 μ L of anhydrous acetonitrile to each tube.

For the 5 mg vials, add 256 μ L of solvent to each tube.

Allow the reagent to dissolve for 5 minutes with occasional vortexing. Briefly centrifuge the tube to gather the solution. If you have 5 mg vials, aliquot 41 μ L of each Tag to a new tube (6 vials in total per Tag).

Note: Reagents dissolved in anhydrous acetonitrile are stable for one week when stored at -20°C. Reagents are stored at -80°C.

5% Hydroxylamine HCl Dissolve 50 mg of hydroxylamine HCl into 1 mL of 100 mM TEAB.

Sample preparation

1. Centrifuge sample (lysate, plasma, **serum**) at 16,000 \times g for 10 minutes at 4°C.
2. Carefully separate the supernatant and transfer into a new tube.
3. Determine the protein concentration of the supernatant (using BCA Protein Assay or Bradford) according to standard procedure.
4. Transfer 100 μ g of proteins into a new microcentrifuge tube and adjust to a final volume of 100 μ L with 100 mM TEAB.

NOTE: You can use reduced sample amount and volume accordingly (e.g. to 50 μ l), but if you use reduced sample volume have in mind that the volumes of reducing/alkylating reagents.

5. Add 5 μ L of the 200 mM DTT and incubate sample at 55°C for 1 hour.
6. Immediately before use, prepare 375 mM iodoacetamide by dissolving 9 mg of IAA in 132 μ L of 100 mM TEAB. Protect solution from light (e.g. using aluminum foil).

7. Add 5 μL of the 375 mM iodoacetamide to the sample and incubate for 30 minutes, protected from light at room temperature. Aluminum foil can be used to cover the samples.
8. Add six volumes of pre-chilled (-20°C) acetone (600 μL) and freeze at -20°C for at least 4 hours up to overnight.
9. Centrifuge the samples at 8000 \times g for 10 minutes at 4°C . Carefully invert the tubes to decant the acetone without disturbing the white pellet. Allow the pellet to dry for 2-3 minutes.

Protein Digestion

1. Resuspend 100 μg of acetone-precipitated protein pellets with 100 μL of 100 mM TEAB. If you use less sample, reduce buffer volume (e.g. to 50 μL or less).

Note: An acetone-precipitated pellet might not completely dissolve; but after proteolysis at 37°C , all the protein (peptides) will be solubilized.

2. Dissolve trypsin to final concentration 1 mg/ml by adding 20 μL of the Trypsin Storage Solution to the bottom of the trypsin glass vial (20 μg) and incubate for 5 minutes. Store any remaining reagent in single-use volumes at -80°C (e.g. 2.5 μg of trypsin per 100 μg of protein).
3. Add 1:40 w/w of trypsin (i.e. 2.5 μL (equals to 2.5 μg) per 100 μg of protein). Digest the sample overnight at 37°C .

Peptide Labeling

1. Immediately before use, equilibrate the TMT Label Reagents to room temperature.
2. Carefully add 41 μL of the TMT Label Reagent to each 25-100 μg of digested sample containing 100 mM TEAB. Alternatively, transfer the peptide sample to the TMT Reagent vial.

Note: If you are modifying sample volumes, have in mind that final acetonitrile volume percent (v/v) in the mixture should be 25-30%.

3. Incubate the reaction for 1 hour at room temperature.
4. Add 8 μL of 5% hydroxylamine HCl to the sample and incubate for 15 minutes to quench the reaction.
5. Combine samples at equal amounts to a new tube.
6. Place the volume containing 6 μg of sample mixture to 96-well plate (**V-shaped bottom**) and dry using SpeedVac. For LC-MS analysis up to 3 μg of sample is required.

Table 1. Examples of TMT reaction mixtures

Sample amt. (μg)	Sample volume in 100 mM TEAB (μL)	TMT reagent (μL)	5% Hydroxylamine HCl (μL)
25-100*	100	41	8
25**	50	18	8

*according to TMT protocol

**this is what I used for the experiment

13.9. Anexo IX. Proteínas identificadas en los túbulos de Malpighi e intestino medio de *Aedes (Stegomyia) aegypti*, usando Proteome discoverer.

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
1	Farnesoic acid O-methyl transferase-like protein AAEL005270-PA	AAEL005270	157109287	2
2	ATP synthase subunit beta AAEL002827-PA	AAEL002827	157132308	3
3	Actin 5		Q4PKE5	
4	Cytochrome c oxidase,-subunit VIb, putative AAEL008880-PA	AAEL008880	157120047	
5	60S acidic ribosomal protein P1AAEL003530-PA	AAEL003530	157136851	1
6	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AAEL016984	J9HYM2	2
7	V-type proton ATPase catalytic AAEL008787-PA	AAEL008787	157119815	
8	actin, muscle [Plutella xylostella]	LOC105387683	822092608	
9	Sodium/potassium-dependent ATPase beta-2 subunit AAEL010145-PC	AAEL010145	J9EAN8	2
10	ADP/ATP translocase AAEL004855-PA	AAEL004855	157107727	2
11	Mitochondrial F1F0-ATP synthase subunit d/ATP7 AAEL004423-PA	AAEL004423; AAEL004423	Q1HR21	3
12	Actin AAEL004631-PA	AAEL004631	Q17C87	1
13	ATP synthase subunit beta vacuolar AAEL005798- PA	AAEL005798; AAEL005798	157111261	
14	Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit Va AAEL014944-PA	AAEL014944; AAEL014944	157108055	
15	mitochondrial cytochrome C AAEL004457-PA	AAEL004457	Q1HRI9	
16	Glutathione transferase AAEL001061-PB	AAEL001061	J9HHL7	
17	histone H4 replacement, isoform C [Drosophila melanogaster]	His4r; His4:CG33893	17975542	3R; 2L
18	Enolase AAEL001668-PA	AAEL001668	Q17KK5	
19	Histone H2A4 AAEL003669-PA	AAEL003669; AAEL003669	157137737	3

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
20	Elongation factor 1-beta24 AAEL000951-PA	AAEL000951; AAEL000951	Q17MM5	3
21	Voltage-dependent anion-selective channel AAEL001872-PA	AAEL001872; AAEL001872	157124666	2
22	ATP synthase alpha subunit mitochondrial AAEL012175-PA	AAEL012175; AAEL012175	157131648	2
23	Profilin	AAEL013353; AAEL013353	Q16JE9 Acetyl [N-Term]	
24	Vacuolar ATP synthase subunit e AAEL012035-PA	AAEL012035; AAEL012035	Q1HQT6 Acetyl [N-Term]	
25	Multifunctional 14-3-3 family chaperone, partial AAEL006885-PA	AAEL006885; 1433Z_AEDAE	157114501 Acetyl [N-Term]	
26	Pupal-specific flight muscle actin AAEL001951-PA	AAEL001951; AAEL001951	Q6QNY2	
27	Arginine or creatine kinase AAEL009185-PA	AAEL009185; AAEL009185	157120956	2
28	Actin AAEL004616-PA	AAEL004616; AAEL004616	157106889	1
29	Sodium/potassium-ing ATPase subunit alpha AAEL012062-PB	AAEL012062; AAEL012062	157131369	
30	Histone H2B AAEL015674-PA	AAEL015674; AAEL011741;	157137028	3
31	GSTS1- glutathionetransferase	GSTS1	765339426	
32	tubulin beta chain	AAEL002851; AAEL002851	Q17GX9	3
33	Actin	AAEL005964; AAEL005964	157111827	
34	heat shock cognate 70		Q1HQZ5	
35	40S ribosomal protein S8	AAEL008103; AAEL008103	Q1HRQ9	3
36	Malate dehydrogenase	AAEL008166; AAEL008166	157118108	3
37	elongation factor 1-alpha	AAEL017096; AAEL017096	Q1HR88	

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
38	histone H3.3 [Homo sapiens]	H3F3A; H3F3AP4; H3F3B AAEL003850AA	4504279	1; 2; 17
39	Histone H3	EL003685	Q16N56	3
40	40S ribosomal protein S19	AAEL010756;	Q1HRR8	3
41	Acotinase, mitochondrial	AAEL003734;	157137937	2
42	Carbonic anhydrase	AAEL004930;	157108024	
43	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	AAEL000274;	Q1HRN3	
44	mitochondrial ATP synthase F chain	CUSOD3_a	Q1HRJ7	
45	fructose-bisphosphate aldolase	AAEL005766;	Q178U8	Acetyl [N-Term] 3
46	Myosin regularory light chain 2 (mlc-2)	AAEL002572;	157167683	1
47	Pyruvate kinase	AAEL014913;	157107887	
48	FOHSDR-2	AAEL017320;	D2WKE0	1
49	Tubulin alpha chain	AAEL006642;	157113931	3
50	Ribosomal protein L28 putative	AAEL008353;	157118570	Acetyl [N-Term] 2
51	ATP synthase delta chain	AAEL010823;	157127489	
52	Cytochrome C oxidase subunit VB putative	AAEL008697	Q16KF9	
53	Myosin light chain 1	AAEL012207;	Q16MS4	Acetyl [N-Term]
54	Conserved hypothetical protein	AAEL009257;	Q1HQE0	3
55	Triosephosphate isomerase	AAEL002542;	Q17HW3	1

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
56	40S ribosomal protein S7	AAEL009496; AAEL009496	Q0IEM1	3
57	Ribosomal protein S28 putative	AAEL006860; AAEL006860	Q1HR28	
58	Cytochrome C1	AAEL011871; AAEL011871	Q16NS5	
59	AAEL013694-PA	AAEL013694	157136928 Acetyl [N-Term]	
60	AAEL003750-PB	AAEL003750; AAEL003750	157138050 Acetyl [N-Term]	1
61	AAEL003993-PA	AAEL003993; AAEL003993	Q17E10	3
62	AAEL003957-PC	AAEL003957; AAEL003957	157103739 Acetyl [N-Term]	
63	GSTe4 Glutathionetransferase	AAEL007962; GSTE4;	Q5PY78	
64	60S ribosomal protein L23	AAEL013583; RL23_AEDAE_c	157108448	2
65	ATP synthase subunit gamma	AAEL008848; AAEL008848	Q16XK3	
66	AAEL004500-PA	AAEL004500; AAEL004500	Q0IFN2	2
67	AAEL011641-PA	AAEL011641; AAEL011641	Q16PI3	
68	60S acidic ribosomal protein P0	AAEL010821; AAEL010821	Q1HR99	
69	AAEL002504-PA	AAEL002504; AAEL002504	Q17I03	1
70	40S ribosomal protein S3a	AAEL013158; RS3A_AEDAE_b	Q1HRR3	3
71	40S ribosomal protein S3a	AAEL008192; AAEL008192	J9HFW1	3
72	GDH Glutamate dehydrogenase	AAEL010464; AAEL010464	Q16SW1	
73	NADH dehydrogenase [ubiquinone] putative	AAEL002881;	157132602	

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
74	40S ribosomal protein S18	AAEL009747; AAEL009747	Q1HRL8 Acetyl [N-Term]	
75	Mitochondrial processing peptidase beta subunit	AAEL005435; AAEL011758;	Q17A09	1
76	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase f	AAEL011758; AAEL002534;	157130325	
77	60S ribosomal protein L10	AAEL002534; AAEL010168;	157129707	1
78	40S ribosomal protein S2	AAEL010168	157125338	
79	40S ribosomal protein S4		94468404	
80	60S ribosomal protein L4	AAEL009994; AAEL009994	Q1HQJ0	1
81	CAT1B Catalase	AAEL013407; CAT1B	765339858 Acetyl [N-Term]	
82	Conserved hypothetical protein	AAEL008801; AAEL008801	Q16XN1	
83	40S ribosomal protein S13	AAEL003582; AAEL003582	Q5QC94	
84	Electron oxidoreductase	AAEL013739; AAEL013739	157137180	
85	Mitochondrial ARP synthase b chain	AAEL005610; AAEL005610	Q179J9	
86	Probable citrate synthase 2, mitochondrial	AAEL011789; CISY2_AEDAE	Q16P20	
87	Hypothetical protein	AAEL006509; AAEL801217	157113598	2
88	Tropomyosin invertebrate	AAEL002761; AAEL002761	Q17H75	
89	NADH dehydrogenase putative	AAEL004829; AAEL004829	157107697	2
90	Ubiquinone binding protein putative	AAEL005143; AAEL005143	765336736	3
91	Tropomyosin invertebrate	AAEL002761; AAEL002761	Q17H72 Acetyl [N-Term]	

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
92	Vacuolar ATP synthase subunit f	AAEL002464; AAEL002464	157129338	
93	Initiation factor 5a	AAEL003835; AAEL003835	157138462	
94	60S ribosomal protein L38	AAEL005451; RL38_AEDAE	157110004	2
95	40S ribosomal protein S12	AAEL010299; AAEL010299	Q1HRM3	
96	60S ribosomal protein L7	AAEL012585; AAEL002813;	157167880	
97	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	AAEL002813	Q17H51	1
98	tubulin beta chain	AAEL005052; AAEL012686;	157108656	3
99	Ribosomal protein S12 putative	AAEL012686	157133230	
100	FOHSDR-1	AAEL017302; AAEL017302	765333754	1
101	Annexin	AAEL011302; AAEL011302	157129006	
102	60S acidic ribosomal protein P2	AAEL014583; AAEL010608;	Q1HRM9	
103	Succinate dehydrogenase (quinone)	AAEL010608	Q16SE4	
104	Conserved hypothetical protein	AAEL000294; AAEL011656;	Q17PP2	
105	40sRPS15 40S ribosomal protein S5	AAEL011656	157129941	
106	60S ribosomal protein L31	AAEL006698; RL31_AEDAE	157114043	3
107	40S ribosomal protein S5	AAEL013625; AAEL013625	157136710	Acetyl [N-Term]
108	aminoacylase putative	AAEL011206; AAEL011206	157128691	

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
109	Cytochrome C oxidase subunit VIIA, putative	AAEL007752; AAEL007752	157116774	1
110	Ubiquinol cytochrome c reductase complex core protein	AAEL005269; AAEL005269	157109295	2
111	Diazepam binding inhibitor putative	AAEL009214; AAEL009214	157121092	
112	Histona H2A	AAEL007609; AAEL007609	157116473	
113	60S ribosomal protein L27a [Aedes albopictus]		56417552	
114	NADH ubiquinone dehydrogenase putative	AAEL010230; AAEL010230	Q16TI5	
115	mitochondrial phosphate carrier protein	AAEL011195	Q1HQP9	
116	Conserved hypothetical protein	AAEL004060; AAEL004060	Q17DS3	
117	mAAT aspartate aminotransferase	AAEL002399; AAEL002399	157128621	
118	Adenosylhomocysteinase	AAEL005524; AAEL005524	Q179S1	
119	ribosomal protein S27 [Aedes albopictus]		56417556	
120	Conserved hypothetical protein	AAEL007431; AAEL007431	157116047	
121	Mitochondrial ATPase inhibitor putative	AAEL004284; AAEL004284	Q17D81	2
122	3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	AAEL008006; AAEL008006	Q0IEU5	
123	Vacuolar ATP Synthase subunit h	AAEL006516; AAEL006516	157113604	Acetyl [N-Term] 2
124	TPX4 thioredoxin peroxidase	AAEL002309; TPX4	Q17IM5	2
125	Histone H1 putative	AAEL015464; AAEL015464	Q1DGV3	Acetyl [N-Term]
126	Conserved hypothetical protein	AAEL009467; AAEL009467	157123252	2
127	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	AAEL005515; AAEL005515	Q179S9	

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
128	14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha	AAEL011116; AAEL011116	Q16QZ7	
129	AAEL017516-PB	AAEL017516; AAEL017516	765338407	
130	60S ribosomal protein L8	AAEL000987; AAEL000987	157112987	
131	Hypothetical protein	AAEL010652; AAEL010652	157126892	2
132	Cytochrome B5 (cytb5)	AAEL010017; AAEL010017	157124904	
133	Stretch regulated skeletal muscle protein putative	AAEL013913; AAEL005292	157109480	
134	Dihydrolipoamide dehydrogenase	AAEL006928; AAEL006928	157114623	
135	Pyridoxine kinase	AAEL009601; AAEL009601	157123752	
136	40S RIBOSOMAL PROTEIN S6	AAEL000032; RS6_AEDAE	Q9U761	1
137	Prohibitin	AAEL009345; AAEL801147	157122974	
138	Molybdopterin cofactor sulfurase (mosc)	AAEL014275; AAEL014275	Q16GT3	
139	Cytochrome c oxidase subunit VIA putative	AAEL000929; AAEL000929	Q17MY2	
140	Conserved hypothetical protein	AAEL009201; AAEL009201	Q1HQQ9	
141	Conserved hypothetical protein	AAEL010801; AAEL010801	J9HJ41	
142	Conserved hypothetical protein	AAEL011180; AAEL011180	Q16QU2	
143	Chaperonin 60 KD ch60	AAEL011584; AAEL011584	157129785	
144	Tropomyosin invertebrate	AAEL002759; AAEL002759	157131819	
145	2- Oxoglutarate dehydrogenase	AAEL006721; AAEL006721	157114121	2

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
146	Transketolase	AAEL004434; AAEL004434	157106042	3
147	Ribosomal protein L37; Binds to the 23s rRNA	AAEL017198; AAEL017198	765337929	
148	Conserved hypothetical protein	AAEL009964; AAEL009964	Q1HQH2	2
149	NADH ubiquinone dehydrogenase putative	AAEL014889; AAEL014889	157107772	
150	Myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle	AAEL005733; AAEL005733	Q178Y4	
151	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit)	AAEL003675; AAEL003675	157137763	3
152	60S ribosomal protein L13		A0A0P6IVC2	
153	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	AAEL005946; AAEL005946	Q178D3	1
154	Translationally-controlled tumor protein homolog	AAEL003872; TCTP_AEDAE	Q1HR79	3
155	Ribosomal protein L3		Q1HR77	
156	40S ribosomal protein S26 (115 aa)	AAEL002832; AAEL005085;	157132310	3
157	60S ribosomal protein L30 (116 aa)	AAEL005220	157108574	3
158	60S ribosomal protein L18	AAEL008481; RL18_AEDAE	Q1HR62	2
159	isocitrate dehydrogenase [NADP]		A0A0P6IWM1	
160	NADH-ubiquinone oxidoreductase flavoprotein 1 (ndufv1) (487 aa)	AAEL007681	157116636	
161	40S ribosomal protein S16 (148 aa)	AAEL003427; RS16_AEDAE	157136300	3
162	60S ribosomal protein L24 (153 aa)	AAEL008329;	Q1HR85	
163	Conserved hypothetical protein (158 aa)	AAEL013885	Q16HV9	
164	calmodulin, isoform A [Drosophila melanogaster]	Cam; FBgn0000253	17647231 Acetyl [N-Term]	2R

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
165	60S ribosomal protein L12	AAEL014562; AAEL014562	157142146	2
166	40S ribosomal protein S9	AAEL001759; AAEL001759	157123910	2
167	Ribosomal protein S29, putative	AAEL007824; AAEL007824	157117013	2
168	40S ribosomal protein S10	AAEL002047; AAEL002047	157126309	2
169	60S ribosomal protein L21	AAEL017516; AAEL017516	J9E9X9	
170	60S ribosomal protein L21	AAEL007715; AAEL007715	Q1HRN4	
171	Peroxiredoxin 5, prdx5	AAEL007135; AAEL007135	157115218	3
172	Aspartate ammonia lyase	AAEL008167; AAEL008167	157118058	3
173	Protein disulfide-isomerase	AAEL000641; AAEL000641	Q1HR78	3
174	RpL17 - 60S ribosomal protein L17	AAEL011471; RL17_AEDAE	157129444	
175	High mobility group non-histone protein, putative	AAEL011414; AAEL011414	Q1HR93	
176	Hypothetical protein	AAEL014734; AAEL801137	157106746	
177	Cytochrome c oxidase subunit iv	AAEL005170; AAEL005170	Q17AX5	
178	40S ribosomal protein S17	AAEL004175; AAEL004175	Q52UT2	2
179	60S ribosomal protein L27	AAEL011587; AAEL014838	Q16FB1	
180	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase	AAEL004294; AAEL004294	Q17DA3	2
181	4-Hydroxybutyrate CoA-transferase, putative	AAEL003746; AAEL003746	157138048	1

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
182	Vacuolar ATP synthase subunit c	AAEL005173; AAEL005173	157109023 Acetyl [N-Term]	
183	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	AAEL010330; AAEL010330	Q16TA7	3
184	GSTX1 - Glutathionetransferase	AAEL000092; GSTX1	Q0C791	1
185	60S ribosomal protein L22	AAEL007771; AAEL007771	765333647	1
186	Conserved hypothetical protein	AAEL010789; AAEL010789	Q16RX5	
187	Calponin	AAEL008303; AAEL008303	Q16Z50	
188	elongation factor 1-gamma		Q1HR56	
189	60S ribosomal protein L7a	AAEL005722; AAEL005722	Q0IFE0	
190	60S ribosomal protein L14	AAEL011447; AAEL011447	157129394	2
191	Vacuolar proton ATPases	AAEL006390; AAEL006390	157113272	3
192	Nucleoside diphosphate kinase	AAEL012359; AAEL012359	Q16MB4	
193	60S ribosomal protein L35	AAEL005629; AAEL005629	Q1HRM8	
194	ATP synthase subunit d	AAEL009808; AAEL009808	Q1HQU5	3
195	Receptor for activated protein kinase c (rack1)	AAEL013069; AAEL013069	Q1HRQ2	2
196	Myosin light chain 1,	AAEL007439; AAEL007439	157116094 Acetyl [N-Term]	
197	Heat shock protein, putative	AAEL001052	Q17MF2	3
198	Conserved hypothetical protein	AAEL004699	Q0IFK9	
199	Ribosomal protein L36, putative	AAEL000010; AAEL000010	157103325	1
200	Conserved hypothetical protein	AAEL004234	Q17DE6	

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
201	Odorant-binding protein 99c, putative	AAEL005772; AAEL005772	Q1HRL7	3
202	2-Cys thioredoxin peroxidase	AAEL004112; TPX2	Q8WSF6	3
203	40S ribosomal protein S20	AAEL009506; AAEL009506	Q1HRS9	3
204	Alanine aminotransferase	AAEL009872; AAEL009872	157124459	
205	Conserved hypothetical protein	AAEL012296; AAEL010363'	157125990	
206	Pyruvate dehydrogenase	AAEL004338; AAEL004338	157105561	
207	Isocitrate dehydrogenase	AAEL000454; AAEL000454	157134805	3
208	Thioredoxin reductase	AAEL002886; AAEL002886	157132844	1
209	Conserved hypothetical protein	AAEL006483; AAEL006483	Q175Y3	
210	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	AAEL005056; AAEL005056	157108610	3
211	Conserved hypothetical protein	AAEL011551; AAEL011551	Q16PR4	2
212	Spectrin	AAEL015065; AAEL015065	157108966	
213	40S ribosomal protein S14	AAEL005266; RS14_AEDAE	157109309	2
214	Vacuolar ATP synthase subunit g	AAEL012819; AAEL012819	Q1HQI4	Acetyl [N-Term]
215	60S ribosomal protein L5	AAEL004325; RL5_AEDAE	Q1HQU2	
216	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase	AAEL010505; AAEL010505	157126418	
217	Protein kinase C inhibitor, putative	AAEL012200; AAEL012200	Q1HRC0	
218	DEAD box ATP-dependent RNA helicase	AAEL013359; AAEL013359	Q1HR82	

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
219	Cytochrome c oxidase subunit 2	AAEL010697;	P50692	
220	3-ketoacyl-coa thiolase	AAEL010697	Q16S56	
221	ribosomal protein	AAEL013221;	Q1HRJ3	
222	NADH-ubiquinone oxidoreductase	AAEL012552;	Q16LR5	1
223	Translocon-associated protein, delta subunit	AAEL013320;	Q16JI4	
224	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase	AAEL013320	94469046	
225	Protein kinase C inhibitor, putative	AAEL008093;	157117904	
226	DEAD box ATP-dependent RNA helicase	AAEL012944;	157134063	3
227	Cytochrome c oxidase subunit 2	AAEL008072;	Q16ZS6	
228	3-ketoacyl-coa thiolase	AAEL009313;	Q1HQZ8	1
229	ribosomal protein	AAEL009151;	157120860	
230	NADH-ubiquinone oxidoreductase	AAEL003634;	157137516	
231	Translocon-associated protein, delta subunit	AAEL011689;	157126791	
232	60S ribosomal protein L9	AAEL010611	Q1HR72	2
233	Protein kinase C inhibitor, putative	AAEL007699;	157136734	
234	DEAD box ATP-dependent RNA helicase	AAEL013623	157133861	Acetyl [N-Term]
235	Cytochrome c oxidase subunit 2	AAEL012904;	157128595	
236	3-ketoacyl-coa thiolase	AAEL002372;	157109896	
		AAEL005401;		
		AAEL005401		

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
237	ribosomal protein	AAEL009414; AAEL009414	Q16VZ4	3
238	NADH-ubiquinone oxidoreductase	AAEL014292; AAEL014903	157104324	3
239	Translocon-associated protein, delta subunit	AAEL801114; AAEL017419	J9HTV7	
240	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	AAEL000291; VATL_AEDAE	O16110	
241	Past-1	AAEL010403; AAEL010403	Q16T24	
242	Aquaporin	AAEL003550; AAEL012282;	157136837	1
243	Prohibitin	AAEL012282	157131967	
244	60S ribosomal protein L18a	AAEL006785; AAEL006785	Q174U3	3
245	Heat shock protein	AAEL014843; AAEL011704;	157107378	2
246	Hypothetical protein	AAEL003459; AAEL003459	157136459	
247	40S ribosomal protein S21	AAEL000529; AAEL004503	Q1HR25	2
248	Carbonic anhydrase II, putative	AAEL009330; AAEL009330	157122829	
249	CYP6Z9 - Cytochrome P450	AAEL009129; CYP6Z9	Q16WQ3	1
250	Ebna2 binding protein P100	AAEL000293; AAEL000293	157127091	
251	AAEL017349-PA	AAEL017349; AAEL017349	765338331	
252	60S ribosomal protein L44 L41, putative	AAEL003942; AAEL003942	157103633	2
253	small ubiquitin-related modifier	AAEL015064; AAEL015064	Q16EQ3	

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
254	GPXH1 - Glutathione peroxidase	AAEL012069; GPXH1	765339529	
255	Ribosomal protein S25, putative	AAEL000068; AAEL000068	157103243	1
256	Aliphatic nitrilase, putative	AAEL010284; AAEL010284	157125650	
257	AAEL016982-PA	AAEL016982	765338360	
258	Conserved hypothetical protein	AAEL004151; AAEL004151	Q0IFR8	2
259	AAEL001865-PA	AAEL001865; AAEL801244	157124680	2
260	Conserved hypothetical protein	AAEL008485; AAEL008485	Q16YP3	2
261	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	AAEL007868; AAEL007868	Q5MM88	
262	Pupal cuticle protein 78E, putative	AAEL008289; AAEL008289	157118422	2
263	60S ribosomal protein L6	AAEL008188; AAEL008188	157118133	3
264	Protease m1 zinc metalloprotease	AAEL012778; AAEL012778	157133543	1
265	eukaryotic translation initiation factor 6	AAEL003661; AAEL003661	Q17EW3	3
266	Glutaredoxin, putative	AAEL012238; AAEL012238	Q1HQU6	
267	Aldo-keto reductase	AAEL004088	157104550	3
268	Mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase B16.6 subunit, putative	AAEL005693; AAEL005538	157110366	
269	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	AAEL013904; AAEL013904	Q16HU0	
270	Conserved hypothetical protein	AAEL000458	157134767	3
271	succinyl-CoA synthetase small subunit, putative	AAEL006833;	Q1HR33	

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
272	Myo inositol monophosphatase	AAEL000372; AAEL000372	157130016 Acetyl [N-Term]	
273	Calcineurin b subunit	AAEL007494; AAEL007494	Q171Z1	
274	60S ribosomal protein L13a, partial		94468830	
275	Rab5	AAEL007845; AAEL007845	Q170P3	
276	Malate dehydrogenase	AAEL007707; AAEL012310;	157116681	2
277	Actin	AAEL012310; AAEL014204;	157132019	2
278	6-phosphogluconolactonase	AAEL014204; AAEL009389;	Q16H01	
279	Transaldolase	AAEL009389; AAEL010975;	Q16VW8	3
280	Paramyosin, long form	AAEL010975; AAEL013431;	Q16RF4	
281	AAEL013431-PA, partial	AAEL013431; AAEL011746;	157135919	
282	succinate-CoA ligase subunit beta	AAEL011746; AAEL011025;	Q16P82	
283	Vacuolar ATP synthase subunit ac39	AAEL011025; AAEL003349;	Q1HQS1	
284	NADPH--cytochrome P450 reductase	AAEL003349	Q17FM7	
285	adducin isoform B		M9NCD1	
286	Conserved hypothetical protein	AAEL013775; AAEL013775	157137305	
287	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein r	AAEL002879; AAEL002879	Q17GV6	
288	Complement component	AAEL011090; AAEL010071;	Q1HR26	2
289	Spermidine synthase	AAEL010071	157125087 Acetyl [N-Term]	3

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
290	AAEL017116-PB	AAEL017116; AAEL017116	765338132	
291	Conserved hypothetical protein	AAEL002457; AAEL013272;	157167595	3
292	60S ribosomal protein L37	AAEL013272	Q1HR76	2
293	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	AAEL010143; AAEL010143	Q16TS5	2
294	Aquaporin AQP Ae.a	AAEL003512	Q9NHW7	
295	Aldehyde dehydrogenase	AAEL011756; AAEL011756	Q16P57	
296	Glycogen phosphorylase	AAEL000703	157108521	2
297	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	AAEL001210; AAEL801231	Q1HRB4	
298	Trypsin	AAEL006425; AAEL006425	157113343	2
299	GSTE2 - Glutathionetransferase	AAEL007951; GSTE2	157117405	
300	NADH dehydrogenase, putative	AAEL008490; AAEL008490	157118946	2
301	Tricarboxylate protein	AAEL005991	Q177Y5	2
302	Dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase	AAEL002764; AAEL002764	157131797	
303	ribosomal protein L15		A0A0N8ES04	
304	Trifunctional enzyme beta subunit (tp-beta)	AAEL002296; AAEL002296	157127973	2
305	NADH-ubiquinone oxidoreductase 42 kda subunit	AAEL012950; AAEL012950	157134045	3
306	obg-like ATPase 1	AAEL002160; AAEL002160	Q17J37	
307	Myosin i	AAEL011905; AAEL011905	157130852	

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
308	phosphotransferase	AAEL009387; AAEL009387	J9HT37 Acetyl [N-Term]	3
309	Microsomal glutathione s-transferase	AAEL006829;	Q174Q1	
310	Sodium/potassium-dependent ATPase beta-2 subunit	AAEL010148; AAEL010148	157125252	2
311	Beta chain spectrin	AAEL005845; AAEL005845	Q178J6	
312	Ran; GTP-binding protein involved in nucleocytoplasmic	AAEL009287; AAEL009287	157121273	
313	Myo inositol monophosphatase	AAEL004967; AAEL004967	157108133 Acetyl [N-Term]	
314	Conserved hypothetical protein	AAEL011335; AAEL011335	157129070	
315	Conserved hypothetical protein	AAEL006053; AAEL006053	Q177R5	
316	pyruvate carboxylase		550486	
317	Fibrillarlin	AAEL010248; AAEL010248	Q16TF1	
318	60S ribosomal protein L34	AAEL009341; AAEL801149	Q1HRQ0	
319	Hypothetical protein	AAEL002654; AAEL002654	Q17HK0	2
320	Hypothetical protein	AAEL000667; AAEL000667	Q17NL8	3
321	malic enzyme	AAEL005790; AAEL005790	Q178T5	3
322	NADP-specific isocitrate dehydrogenase	AAEL000746; AAEL000746	157109449	
323	Nipsnap	AAEL000159; AAEL000159	Q17Q08	3
324	Spermatogenesis associated factor	AAEL010585; AAEL010585	157126628	
325	Protein phosphatase-1	AAEL009275; AAEL009275	157121236 Acetyl [N-Term]	3

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
326	Troponin i	AAEL010850; AAEL010850	Q16RS8	3
327	Acyl-coa dehydrogenase	AAEL007555; AAEL007555	Q171S4	
328	Lupus la ribonucleoprotein	AAEL003664; AAEL003664	157137753	3
329	Casein kinase ii, alpha chain (cmgc group iv)	AAEL012094; AAEL012094	157131471	
330	Putative ubiquinone oxidoreductase ndufs8/23 kDa subunit		A0A0N8ERX8	
331	phosphoglycerate mutase	AAEL006070; AAEL006070	Q177P3	
332	Conserved hypothetical protein	AAEL002436; AAEL002436	157167601	Acetyl [N-Term] 3
333	Serine/threonine protein phosphatase 2a regulatory subunit a	AAEL006977; AAEL006977	Q173Y9	Acetyl [N-Term] 2
334	Anterior fat body protein	AAEL001022; AAEL001022	Q17MF0	3
335	Chaperonin; Molecular chaperone; assists the folding of proteins upon ATP hydrolysis	AAEL001715; AAEL801237	Q17KD5	
336	Conserved hypothetical protein	AAEL010097; AAEL010097	Q16TW3	
337	Anterior fat body protein	AAEL001020; AAEL001020	Q17ME8	3
338	Ribosomal protein L35A, putative	AAEL000823; AAEL000823	Q17N60	
339	Putative translocon-associated protein		A0A0P6IT12	
340	Lysosomal aspartic protease Precursor (EC 3.4.23.-)	AAEL006169; ASPP_AEDAE	157112486	1
341	GALE12 - Galectin	AAEL009842; GALE12	157124384	
342	Polyadenylate-binding protein; Binds the poly(A) tail of mRNA	AAEL010318; AAEL010318	157125851	
343	ATPase subunit, putative	AAEL012740;	Q1HRU4	3

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
		AAEL012740		
344	3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	AAEL010146; AAEL010146	Q16TS7	2
345	Adenosine diphosphatase	AAEL005662; AAEL005662	157110697	
346	Alcohol dehydrogenase	AAEL006467; AAEL006467	157113468	
347	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kda subunit	AAEL005508; AAEL005508	157110246	
348	Annexin x	AAEL005426; AAEL005426	157109852	
349	Conserved hypothetical protein	AAEL000328; AAEL000328	Q17PH0	
350	Vacuolar ATP synthase subunit S1	AAEL007777	157116923	
351	Perlecan	AAEL011604	Q16PL9	
352	Moesin/ezrin/radixin homolog 1	AAEL007915; MOEH_AEDAE	Q170J7	3
353	Leucine aminopeptidase	AAEL000424; AAEL000424	157134763	3
354	Protein disulfide isomerase	AAEL001432; AAEL001432	157118649	
355	CYP6AG3 - Cytochrome P450	AAEL007024; CYP6AG3	157114924	
356	iron regulatory protein		38259910	
357	Glutathione synthetase	AAEL009154; AAEL009154	157120878	
358	methionine aminopeptidase 2	AAEL004738; AAEL004738	Q17BZ1	
359	Programmed cell death protein 4	AAEL005832; AAEL005832	Q178N5	
360	Pyruvate dehydrogenase	AAEL005308; AAEL005308	157109492	
361	phosphoglycerate dehydrogenase		94468936	

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
362	putative protein Sec61 alpha subunit		13173171	
363	Conserved hypothetical protein	AAEL000944;	Q17MR8	3
364	Fasciclin ii (fas ii)	AAEL009173;	157120917	
365	Hypothetical protein	AAEL012178;	Q16MV8	2
366	AAEL017481-PA	AAEL017481;	765338225	
367	Troponin t, invertebrate	AAEL002417	157128846	
368	ribosomal protein L19		94468808	
369	Conserved hypothetical protein	AAEL012676;	157133254	
370	Sodium/potassium-dependent ATPase beta-2 subunit	AAEL010783;	157127261	2
371	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	AAEL010783	Q178E4	
372	Imaginal disc growth factor	AAEL005931;	Q17JL4	
373	Proteasome subunit alpha type;	AAEL002023;	157111349	
374	3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	AAEL005830;	Q17H10	3
375	Glucose dehydrogenase	AAEL002841;	Q17DW3	
376	3-2-trans-enoyl-CoA isomerase, putative	AAEL004027;	157107319	
377	superoxide dismutase	AAEL004755;	53680541	
378	Conserved hypothetical protein	AAEL004755	Q17FV1	3
379	Hypothetical protein	AAEL003303;	Q17C92	1
380	Putative heat shock 70 kDa protein cognate 5	AAEL003303	A0A0P6IUUV3	

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
381	dynactin subunit 2	AAEL006029; DCTN2_AEDAE	Q1HQF2	
382	putative phosphatidylethanolamine-binding protein		94469032	
383	Sorting nexin	AAEL003416; AAEL003416	157136204	3
384	Fasciclin, putative	AAEL000541; AAEL000541	157103432	
385	Serine hydroxymethyltransferase	AAEL002510; AAEL002510	Q17I00	1
386	acyl-CoA oxidase	AAEL008574; AAEL008574	157119240	
387	putative RNA-binding protein		14210646	
388	Beta lactamase domain	AAEL009700; AAEL009700	157123989	
389	TPX1 - Thioredoxin peroxidase	AAEL013528; TPX1	157136354	
390	Putative suppressor of cytokine signaling 5		A0A0P6JRW7	
391	Myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle	AAEL001411; AAEL001411	157118639	
392	Conserved hypothetical protein	AAEL010765; AAEL010765	157127263	2
393	glucose-6-phosphate isomerase	AAEL012994; AAEL012994	Q16KI0	3
394	Hypothetical protein	AAEL010577; AAEL010577	Q16SH8	
395	Chaperonin; Molecular chaperone; assists the folding of proteins upon ATP hydrolysis	AAEL000486; AAEL000486	157137024	3
396	AMP dependent ligase	AAEL005740; AAEL005740	157111121	
397	Alcohol dehydrogenase	AAEL011129; AAEL011129	157128407	
398	Protein disulfide-isomerase A6 precursor	AAEL010065; AAEL010065	157125052	3
399	AAEL017368-PA	AAEL017368;	765339119	

Número	Nombre de la proteína		NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
400	phosphoglycerate kinase		18091773		
401	Band 4.1-like protein 4A (NBL4 protein), putative	AAEL002571;	Q17HW0		1
402	MICOS complex subunit Mic60	AAEL010004;	Q16U69		1
403	Hypothetical protein	AAEL004960;	157108123		
404	ATP-citrate synthase	AAEL004297;	157105391		2
405	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	AAEL001593;	Q17KS4		3
406	AAEL017075-PC	AAEL017075;	765339720	Acetyl [N-Term]	
407	Saposin	AAEL003046;	Q0IGB5		1
408	Ribophorin ii	AAEL010521;	157126442		
409	ABC ATP-binding cassette sub-family B member 6, mitochondrial	AAEL008134;	157117982		1
410	26S protease (S4) regulatory subunit, putative	AAEL009883;	Q16UJ3		
411	Glutamate carboxypeptidase	AAEL001588;	Q17KV3		3
412	Glutamine synthetase		14994151		
413	Sugar er	AAEL000902;	157111592		
414	Quinone oxidoreductaseMalic enzyme	AAEL010668;	157126890		2
415	Malic enzyme	AAEL001091;	157114273		
416	Conserved hypothetical protein	AAEL002178;	157167507		
417	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase	AAEL006978;	157114825		2

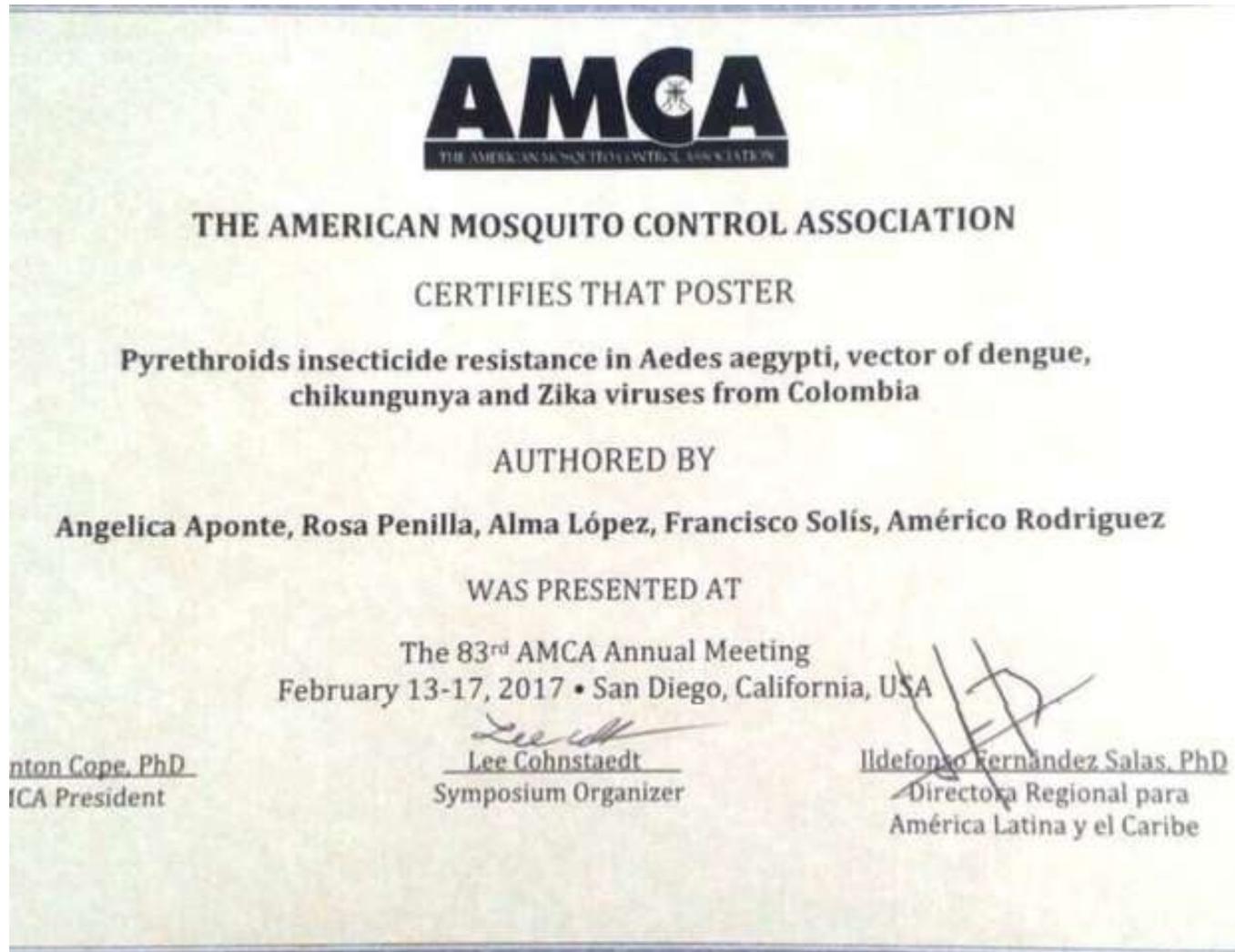
Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
418	Adenylyl cyclase-associated protein	AAEL013074; AAEL013074	Q16K93	2
419	CYP9J10 - Cytochrome P450	AAEL006798; CYP9J10	Q174T0	3
420	Specifically Rac-associated protein, putative	AAEL008021; AAEL008021	157117535	
421	CYTB gene product (mitochondrion)	CYTB; AAEL018685	164523411	MT; Mt
422	Juvenile hormone-inducible protein, putative	AAEL006600; AAEL006600	Q175M5	2
423	Conserved hypothetical protein	AAEL005432; AAEL005432	157109935	1
424	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	AAEL004984; AAEL003036;	Q17BE8	
425	Conserved hypothetical protein	AAEL003036 AAEL000713;	Q0IGC9	1
426	Reticulon/nogo	AAEL000713 AAEL005187;	157108519	2
427	Laminin gamma 1 chain	AAEL005187 AAEL005821;	157109051	
428	Alanyl aminopeptidase	AAEL005821 AAEL012618;	Q178P3	
429	Conserved hypothetical protein	AAEL012618	157133021	
430	aminopeptidase N		19335620	
431	Conserved hypothetical protein	AAEL013968; AAEL013968	157138266	
432	Laminin beta-2 chain	AAEL003658; AAEL003658	157137637	3
433	Conserved hypothetical protein	AAEL005810; AAEL005810	157111253	
434	Serine palmitoyltransferase	AAEL000706; AAEL000706	157108517	2
435	Estradiol 17 beta-dehydrogenase	AAEL007023; AAEL007023	Q173X5	

Número	Nombre de la proteína	NCBI N° Acceso	Modificación	N° Cromosoma
436	Hypothetical protein	AAEL008377; AAEL008377	Q16YZ4	
437	VGA1 - Vitellogenin-A1 Precursor (VG)(PVG1)	AAEL010434	157126144	3
438	Titin	AAEL005324	157109554	2

13.10. Anexo X. Escenarios de resistencia a insecticidas y propuestas para el manejo de la resistencia

Escenarios (Mecanismo de RI)	Población	Propuesta de MRI	
		Control rutinario	Control brotes
1 Mutación KDR (Ile1016) casi o fijadas	Yumbo	Control larvario con <i>Bacillus thuringiensis</i> o inhibidores de crecimiento-Si se usa temefos hacer seguimiento a la susceptibilidad Reducir uso de PYR I	ULV malatión
	No resistencia metabólica KDR (Ile1016) frecuencias bajas		Medellín BF Buga
2 Actividad enzimática elevada	Cali	Control larvario con <i>Bacillus thuringiensis</i> o inhibidores de crecimiento- Si se usa temefos hacer seguimiento a la susceptibilidad	Uso restringido de PYR II
	Medellín AF		Insecticida + Inhibidor de enzimas
3 Actividad de GST elevadas	KDR (Ile1016) alta frecuencia Yumbo	Control larvario con <i>Bacillus thuringiensis</i> o inhibidores de crecimiento- En palmira no se recomienda temefos	ULV malatión
	Medellín BF		Uso restringido de PYR II
	Palmira		Insecticida + Inhibidor de enzimas (EA, DM o CF)
4 Resistencia solo metabólica	N.A	Control larvario con <i>Bacillus thuringiensis</i> o inhibidores de crecimiento	PYR II o malatión Inhibidor de enzimas
5 Mutación KDR (Ile1016) fijadas Alta actividad de enzimas	Medellín BF	Control larvario con <i>Bacillus thuringiensis</i> o inhibidores de crecimiento	No uso de PYR ULV malatión + Inhibidor de enzimas

13.10. Anexo XI. Presentación de resultados en eventos académicos



Santiago de Cali, septiembre 12 de 2017

Angélica Aponte
CIDEIM
Cali

Asunto: Participación en Simposio "Omic Technologies for Research on Infectious Diseases"

Estimada Angélica,

Fue muy grato para nosotros contar con su participación en el I Simposio: "*Omic Technologies for Research on Infectious Diseases*", el cual tuvo lugar el pasado 6 y 7 de septiembre de 2017 en el Hotel Spiwak en Cali.

También, agradecemos la presentación realizada en modalidad oral del trabajo "*Proteomic analysis of the Malpighian tubules and Midgut in Aedes aegypti resistant strains to Pyrethroid*" durante el primer día del Simposio, estamos seguros fue de interés de los asistentes.

Esperamos que este Simposio haya sido una oportunidad para ampliar su conocimiento en las tecnologías ómicas aplicadas a las enfermedades infecciosas, conocer lo que se está haciendo en el país en este ámbito y relacionarse con otros investigadores.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Alejandra Góngora".

Ma. Alejandra Góngora

El Instituto Nacional de Salud

CERTIFICA QUE:

ANGÉLICA APONTE HINCAPIE

Participó en calidad de

ASISTENTE

al

XV encuentro científico

100 años construyendo ciencia y salud

Noviembre 20, 21 y 22 de 2017
Edificio Doctor Angélico, Universidad Santo Tomás
Bogotá, Colombia



Martha Lucía Ospina Martínez
Directora General
Instituto Nacional de Salud



Jorge Martín Rodríguez Hernández
Director de Investigación en Salud Pública
Instituto Nacional de Salud

AÑOS