

**DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE SUSCEPTIBILIDAD A DDT Y PIRETROIDES Y
LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti*
(Díptera: Culicidae) DE LOS MUNICIPIOS DE LA MESA (CUNDINAMARCA) Y
BUCARAMANGA (SANTANDER)**

CARLOS HUMBERTO MURCIA RAMÍREZ



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
MAestrÍA EN INFECCIONES Y SALUD EN EL TRÓPICO
2015**

**DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE SUSCEPTIBILIDAD A DDT Y PIRETROIDES Y
LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti*
(Díptera: Culicidae) DE LOS MUNICIPIOS DE LA MESA (CUNDINAMARCA) Y
BUCARAMANGA (SANTANDER)**

CARLOS HUMBERTO MURCIA RAMÍREZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de
Magister Scientiae en Infecciones y Salud en el Trópico

Directora

MARTHA LUCIA QUIÑONES P.

Bióloga, M.Sc., Ph.D

Universidad Nacional de Colombia

Codirectores

RONALD YESID MAESTRE SERRANO

Biólogo, Ph.D

Universidad Simón Bolívar

Ligia Inés Moncada

Bióloga, MSc

Universidad Nacional de Colombia



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN INFECCIONES Y SALUD EN EL TRÓPICO
2015**

**A mis Padres y Hermana por su apoyo,
a Diana Londoño por su compañía y
apoyo.**

Tabla de contenido

Resumen	7
Introducción	9
Hipótesis:	10
Objetivo:	11
Específicos:	11
Marco teórico:	12
dengue	12
chikungunya	14
Fiebre amarilla:	16
<i>Aedes aegypti</i>	18
Control de <i>Ae. aegypti</i>	21
Insecticidas	21
Piretroides y compuestos relacionados	22
Modo de acción piretroides	23
DDT.....	25
Modo de Acción del DDT	26
Resistencia	26
Mecanismos de resistencia.....	26
Resistencia del sitio blanco:.....	28
Resistencia <i>kdr</i> :	28
Resistencia metabólica; Glutación S-transferasas, Oxidasas y esterasas	31
Tipos de resistencia	33
Sinergistas	33
Métodos para determinar resistencia	34
Ensayos biológicos de la OMS.....	34
Ensayos biológicos del centro de control y prevención (CDC)	36
Ensayos bioquímicos	36
Ensayos Moleculares.....	37
Antecedentes	39
Planteamiento del problema y Justificación	41

Metodología:	43
Área de estudio.....	43
Material Entomológico	43
Ensayos Biológicos, Bioquímicos y Moleculares.....	44
Ensayos Biológicos de botellas impregnadas del CDC	44
Ensayos Bioquímicos para cuantificar la actividad enzimática	44
Genotipificación de alelos silvestres y mutantes (<i>kdr</i>) en las posiciones 1016 y 1534... 45	
Consideraciones éticas	48
Resultados	49
Colecta de material entomológico:	49
Mantenimiento de Colonia de <i>Ae. aegypti</i> de campo y cepa Rockefeller	52
Evaluación del estado de la susceptibilidad de <i>Ae. aegypti</i> colectado en La Mesa Cundinamarca.....	53
Estado de la susceptibilidad al lambdacialotrina	53
Estado de la susceptibilidad al deltametrina	53
Estado de la susceptibilidad al DDT.....	54
Grados de Resistencia de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de La Mesa Cundinamarca. 55	
Grados de Resistencia a lambdacialotrina.....	55
Grados de Resistencia a deltametrina	56
Evaluación del estado de la susceptibilidad de <i>Ae. aegypti</i> colectados en Bucaramanga Santander	58
Estado de la susceptibilidad al lambdacialotrina	58
Estado de la susceptibilidad al deltametrina	59
Estado de la susceptibilidad al DDT.....	60
Grados de Resistencia de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de Bucaramanga Santander60	
Grados de Resistencia a lambdacialotrina.....	60
Grados de Resistencia a deltametrina	61
Cuantificación de la Actividad enzimática detoxificante en poblaciones de La Mesa y Bucaramanga	62
Bioensayo de Acetilcolinesterasa (Ache y Achi)	63
Bioensayo de α esterasas (α -Est).....	64
Bioensayo de Beta esterasas (β -Est).....	65
Bioensayo de Oxidasas de Función Mixta (MFO).....	67

Bioensayo de Glutación S-Transferasas (GST)	68
Bioensayo de PNPA esterasas	69
Bioensayo de Proteínas Totales, mediante Bradford (PTN)	70
Curva Estándar de α , β esterasas, Oxidasas de Función Mixta y Proteínas Totales de las Poblaciones de La Mesa.....	71
Consolidado de Resultados de Actividad enzimática de los mosquitos de campo	72
Extracción de ADN de mosquitos individuales de campo.....	73
Cuantificación de ADN mediante Espectrofotometría a 260nm de las muestras de La Mesa y Bucaramanga.....	73
Estandarización de la PCR para amplificar las mutaciones Cys1534 y Ile1016.....	74
Frecuencias genotípicas <i>kdr</i> Ile1016, Cys1534 y Silvestres en <i>Ae. aegypti</i>	76
Frecuencias de los genotipos Ile1016/Ile1016 y Val1016/Val1016 en poblaciones de La Mesa.....	76
Frecuencias de los genotipos Phe1534/Phe1534 y Cys1534/Cys1534 en poblaciones de La Mesa.....	78
Frecuencias de los genotipos Ile1016/Ile1016 y Val1016/Val1016 en poblaciones de Bucaramanga.....	81
Frecuencias de los genotipos Phe1534/Phe1534 y Cys1534/Cys1534 en poblaciones de Bucaramanga	83
Discusión y Análisis	86
Estado de susceptibilidad de los mosquitos <i>Aedes aegypti</i> de campo	86
Actividad enzimática de las poblaciones de campo.....	87
Resistencia <i>kdr</i> (Knockdown resistance) en las poblaciones de campo	88
Conclusiones	91
Recomendaciones	92
Agradecimientos	93
Bibliografía	94

Resumen

Las infecciones por virus dengue y chikungunya son enfermedades transmitidas principalmente por el mosquito *Aedes aegypti* en las Américas. En Colombia son un importante problema de salud pública y ante la ausencia de una vacuna efectiva, el control vectorial es el principal mecanismo de control. En el país se usó DDT desde 1959 hasta finales de los 60s durante la campaña de eliminación del *Ae. aegypti*. Ante la presión de selección ejercida con este insecticida sobre las poblaciones de *Ae. aegypti*, se generaron poblaciones resistentes, conllevando a la suspensión de esta molécula en la década de 1980 para el control del dengue. Posteriormente se introdujeron los organofosforados temefós y malatión para el control de esta enfermedad en Colombia. En los 90's se implementaron los piretroides, los cuales son menos tóxicos para los humanos en comparación a los organofosforados, organoclorados y carbamatos. Actualmente en el país se usan en el control rutinario de *Ae. aegypti* el larvicida temefós sobre criaderos y en brotes de dengue los adulticidas malatión, pirimifos metil y en menor medida algunos piretroides. Sin embargo, la resistencia de *Ae. aegypti* a insecticidas resulta una de las principales amenazas contra la eficacia de los programas de control contra el dengue y chikungunya. Esta resistencia a insecticidas está mediada por dos mecanismos principales: por enzimas detoxificantes (esterasas, Oxidasas y Glutación S-transferasas) o por una alteración en los receptores blanco del insecticida (alteración de la acetilcolinesterasa o mutaciones *knockdown resistance kdr* en los canales de sodio dependientes de voltaje). Esta última, la resistencia *kdr*, puede mediar la resistencia a DDT y piretroides, ya que ambos tipos de insecticidas tienen como blanco los canales de sodio. Dado que la resistencia al DDT es generalizada en todo el territorio nacional y en los departamentos de Cundinamarca y Santander se ha registrado resistencia a los piretroides deltametrina y lambdacialotrina y al organofosforado temefós, este trabajo pretende determinar si hay resistencia cruzada entre DDT y piretroides mediada por el mecanismo *kdr*, o si la resistencia está relacionada con mecanismos enzimáticos. Esta información es importante para la toma de decisiones sobre cual insecticida es el más adecuado para utilizar en los departamentos de Cundinamarca y Santander.

Para el desarrollo de este estudio se colectaron formas inmaduras de *Ae. aegypti* de los municipios de Bucaramanga, Santander y La Mesa, Cundinamarca endémicos para dengue y chikungunya y en los cuales se ha reportado resistencia a DDT y piretroides. A partir de este material, se obtuvieron generaciones filiales 1 y 2 en condiciones de laboratorio. Se estimaron los niveles de resistencia mediante ensayos biológicos utilizando la metodología del CDC. Los mecanismos de resistencia se identificaron por medio de ensayos bioquímicos evaluando la actividad enzimática de esterasas (acetilcolinesterasas, α , β y PNPA esterasas), oxidasas de función mixta y glutación S-transferasas y mediante pruebas moleculares mediante la identificación de mutaciones en los alelos Ile1016 y Cys1534 de los canales de sodio dependientes de voltaje.

Como resultado se obtuvo que las poblaciones de *Aedes aegypti* de Bucaramanga y La Mesa fueron resistentes al DDT, a lambdacialotrina y moderadamente a deltametrina. Se

encontró actividad elevada en las poblaciones de La Mesa y Bucaramanga de los principales grupos de enzimas detoxificantes como GST, esterasas. Las MFO y PNPA solo se encontraron alteradas en La Mesa. Adicionalmente se evidenció que hay circulación simultánea de las mutaciones *kdr* Ile1016 y Cys1534 en los canales de sodio dependientes de voltaje en las poblaciones evaluadas y se evaluó por primera vez para Colombia la mutación *kdr* Cys1534.

Se concluye que los mecanismos enzimáticos y *kdr* están asociados con la resistencia en las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Mesa y Bucaramanga. En La Mesa se puede explicar probablemente con la actividad enzimática incrementada de las Oxidasas de función mixta y las mutaciones Ile1016 *kdr*. y en Bucaramanga se puede explicar con la actividad enzimática incrementada de las α -esteras y las mutaciones Cys1534 *kdr*. Además, las altas frecuencias de las mutaciones Ile1016 y Cys1534 *kdr* probablemente están asociadas con la resistencia al DDT y piretroides, por lo que no se recomienda el uso de piretroides para el control de dengue, zika o chikungunya en el país

Palabras clave: Resistencia a insecticidas, enzimas, *kdr*, chikungunya, dengue, *Aedes aegypti*.

Introducción

En las Américas, los virus del dengue, chikungunya y fiebre amarilla se transmiten principalmente a los humanos por la picadura del mosquito *Ae. aegypti*. Actualmente la eficiencia de las vacunas existentes para dengue es muy baja (Thomas, 2015) y no existe un antiviral específico para el virus del chikungunya (Long & Heise, 2015; OPS, 2011). De esta manera el control de vectores mediante el uso de insecticidas larvicidas y adulticidas, ha sido la principal estrategia para reducir la transmisión (Bisset, 2002).

En Colombia el uso de insecticidas para el control de *Ae. aegypti* lleva más de seis décadas; inició a finales de 1950 con la aplicación focal del larvicida temefos junto con aplicación perifocal del DDT, con lo que se logró eliminar al vector en 293 localidades de 296 positivas para *Ae. aegypti* en el país (Padilla et al., 2012). Sin embargo, con la reinfestación en Cúcuta con poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes al DDT provenientes de Venezuela, se obligó a suspender el uso de éste insecticida. A partir de la década de los 70's se usó el insecticida fenitrotión en las áreas de reinfestación de *Ae. aegypti*, que para la fecha se habían extendido en los sitios con condiciones óptimas para el vector en todo el territorio nacional (Padilla et al., 2012). En los 80s se introdujo al país el adulticida malatión y en los 90s los piretroides, los cuales eran rotados con los otros insecticidas que se venían usando hasta la fecha (Maestre-Serrano et al., 2014; Maestre-Serrano, 2012) y resultan menos tóxicos para los humanos que los organofosforados, carbamatos y organoclorados (Ponce et al., 2006). Actualmente para el control de vectores de dengue en el país, el tratamiento se basa en el uso de organofosforados temefos y malatión y el piretroide deltametrina (INS, 2010), sin embargo, una de las principales amenazas contra las estrategias dirigidas a controlar la transmisión del dengue mediante el uso de insecticidas ha sido el desarrollo de resistencia como consecuencia de la presión selectiva en diversas poblaciones de mosquitos (Tonn et al., 1976; Silva et al., 2014).

Dicha resistencia puede estar mediada principalmente por dos mecanismos: alteración del sitio blanco, en los que se encuentran insensibilidad en acetilcolinesterasa (iAChE) y resistencia *kdr* (*Knockdown resistance*) y resistencia metabólica (o fisiológica) (Ranson et al., 2011) en los que están involucrados tres grupos de enzimas: esterasas, oxidasas de función mixta (MFO) y glutatión S-transferasas (GST). (Hemingway & Ranson, 2000; Silva et al., 2014). La resistencia *kdr* es el mecanismo más común en insectos resistentes a DDT y piretroides, generándose resistencia cruzada, ya que ambos insecticidas tienen el mismo sitio blanco y pueden llegar a presentar resistencia cruzada (Bregues et al., 2003).

En el país, la resistencia de *Ae. aegypti* a insecticidas se ha reportado en diferentes sitios del país: el primer reporte se originó en Cúcuta donde se encontró resistencia al DDT durante la década de los 60s (Busvine & Coker, 1958); en los años posteriores se documentó resistencia al mismo insecticida de forma progresiva en gran parte del territorio nacional, (Fonseca-González et al., 2011) (Ocampo et al., 2011; Santacoloma et al., 2010). Con la introducción del temefós y la constante presión en las poblaciones de *Ae. aegypti* a este insecticida, se reportó resistencia por primera vez en Cali (en la década de los 1990s)

(Suárez et al., 1996) la cual también ha sido progresiva desde entonces y se ha encontrado en ciudades como Cartagena, Buga, Ibagué y Neiva (Rey-Vega, 2011).

A partir del 2005 con el inicio del proyecto nacional para documentar resistencia en las poblaciones de *Ae. aegypti* en todo el país, como resultado de este proyecto se encontró resistencia a insecticidas en Valle, Cauca, Huila, Guaviare, Nariño, Sucre, Meta, Antioquia, Santander y Norte de Santander al organofosforado temefós (González et al., 2005; Fonseca et al., 2007; Salazar., et al 2007) y en Cundinamarca y Santander las poblaciones de *Ae. aegypti* se encontraron resistentes a los piretroides deltametrina y lambdacialotrina (Santacoloma, 2008). Además se documentó resistencia generalizada al DDT en todo el país (Fonseca-González et al., 2011).

En el 2014 Maestre y colaboradores en el único trabajo de exploración de mutaciones *kdr* en el país, encontró expresión de la mutación Ile1016 en poblaciones de *Ae. aegypti* de la región Caribe con diferencias en sus frecuencias alélicas que van desde 0,07 hasta 0,35 (Maestre et al., 2014). En otros trabajos de Brasil, Martinica y las Islas Caimán, se encontró que con la circulación de alelos *kdr*, se puede dar lugar a la diseminación rápida de poblaciones resistentes sobre las poblaciones susceptibles en 8 generaciones (Linss et al., 2014). De esta manera la detección del mecanismo de resistencia *kdr* es importante en el direccionamiento de los programas de control, la prevención de la resistencia y tiene consecuencias contraproducentes en la sostenibilidad del uso de piretroides, siendo crítico en el desarrollo de estrategias de manejo de resistencia (Saavedra et al., 2007).

Dado que la resistencia al DDT es generalizada en todo el territorio nacional y que los piretroides se vienen utilizando en el control de *Ae. aegypti*, se requiere conocer si hay resistencia cruzada entre DDT y piretroides mediada por el mecanismo *kdr*, o si esta mediada por otros mecanismos bioquímicos en los municipios de La Mesa (Cundinamarca) barrios 1 y 2 y Bucaramanga (Santander) barrio 17 (Santacoloma, 2008; Santacoloma et al., 2010) donde se ha reportado resistencia tanto a piretroides como a DDT.

Hipótesis:

- Las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Mesa y Bucaramanga son susceptibles al DDT, deltametrina y lambdacialotrina y no presentan actividad elevada de alguno de los grupos de enzimas detoxificantes o mecanismo *kdr* mediando la resistencia.
- Las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Mesa y Bucaramanga son resistentes al DDT, deltametrina y lambdacialotrina y presentan actividad elevada de alguno de los grupos de enzimas detoxificantes o mecanismo *kdr* mediando la resistencia.

Objetivo:

Determinar el estado de la susceptibilidad a insecticidas tipo piretroide y DDT y los mecanismos enzimáticos y moleculares asociados en las poblaciones de *Ae. aegypti* de los departamentos de Cundinamarca y Santander, durante el año 2015.

Específicos:

- Determinar el estado de la susceptibilidad y grados de resistencia a insecticidas piretroides y DDT en las poblaciones de *Ae.* objeto de estudio.
- Detectar alteraciones enzimáticas asociadas con resistencia a insecticidas en poblaciones de *Ae. aegypti*. Objeto de estudio.
- Detectar las mutaciones *kdr* en las posiciones 1016 para Ile y 1534 para Cys del gen del canal de sodio dependiente de voltaje y su frecuencia alélica como posible causa de resistencia a piretroides y DDT en las poblaciones de *Ae. aegypti* objeto de estudio.

Marco teórico:

dengue

El dengue es la infección viral transmitida por mosquitos que se ha extendido más rápidamente en el mundo, se estima que unos 50 millones de infecciones de dengue, y unos 2,5 millones de personas viven en más de 100 países en los que es endémico (Service, 2014) constituyendo a nivel mundial la arbovirosis más importante en términos de morbilidad, letalidad y de implicaciones económicas (Martínez Torres, 2008).

Las manifestaciones clínicas pueden incluir diferentes formas de expresión: en la forma menos grave se puede dar lugar a fiebre indiferenciada, fiebre con dolor de cabeza, intenso malestar general, dolor osteomioarticular, leucopenia y algún tipo de sangrado, mientras que en las formas graves además de los síntomas anteriores también se puede presentar una falla cardíaca debido a la fuga de sangre, a nivel gastrointestinal y en otros lugares. También se ha reportado formas atípicas, y están asociadas con un daño intenso en órgano o sistema (encefalopatía, miocardiopatía o hepatopatía por dengue), (Martínez, dengue, 1997).

El dengue es causado por cuatro virus similares, los serotipos DENV-1, -2, -3 y -4, y de acuerdo a sus manifestaciones, forma menos grave o grave, puede clasificarse como hemorrágico o clásico respectivamente. Presenta una inmunidad de larga duración (toda la vida) mientras que la inmunidad cruzada entre cada serotipo es muy infrecuente y por el contrario la infección con otro serotipo puede favorecer la forma grave de la patología (Martínez, 1998).

El dengue clásico y el hemorrágico son transmitidos por la hembra adulta de *Ae. aegypti* y en menor medida por *Ae. albopictus*; ambas especies se reproducen en recipientes artificiales (antropogénicos), tales como ollas de almacenamiento de agua y neumáticos. La transmisión transovárica se ha informado en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* como evento alternativo de segregación del virus (Service, 2014).

Los mosquitos del género *Aedes* del grupo *scutellaris* (*Ae. scutellaris*), que también se reproducen en recipientes naturales y artificiales, pueden ser vectores en algunas partes de la zona del Pacífico Occidental, *Ae. polynesiensis*, *Ae. rotumae*, *Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus* y *Ae. pseudoscutellaris* también son vectores importantes del virus del dengue. Aunque se ha reportado transmisión del virus del dengue en monos en bosques de Sri Lanka, Malasia, Vietnam y África occidental, hay pocas cepas enzoóticas que estén involucradas en epidemias. La transmisión se produce entre la población humana, y los humanos son los reservorios (Service, 2014).

El dengue en Colombia es endémico (figura 1) y constituye un problema prioritario de salud pública, hay muchos factores que son determinantes en el mantenimiento de la enfermedad, incluyendo reintroducción de serotipos al país, circulación simultánea de cuatro serotipos, la infestación por *Ae. aegypti* en más del 90 % del país correspondiente a zonas debajo de los 2200 m.s.n.m., el comportamiento urbano del vector, la disponibilidad

de agua potable constante en todo el país (SIVIGILA, Prevención y control del dengue, 2001).

Desde la reinfestación por *Ae. aegypti* en 1970 han ocurrido varias epidemias de dengue en el país de las cuatro clases de serotipos; en 1971 se logró aislar el serotipo dengue 2 el cual venía circulando con el serotipo dengue 1. Mientras que el serotipo dengue 3 y dengue 4 se reconocieron a mitad de los 70 y principios de los 80. Para el principio del segundo milenio los serotipos que más circulaban eran el I, II y IV (SIVIGILA, Prevención y control del dengue, 2001).

Así, el primer caso de dengue hemorrágico en Colombia se originó en Puerto Berrio (Antioquia) en el año de 1989, en el país se ha observado incremento en el número de casos de la enfermedad, pasando de 1,4 casos por 100000 habitantes en 1994 a 5.17 casos por cien mil habitantes en 1998 con una tasa de 2.64 por 100000 habitantes, más recientemente, en el 2014 se notificaron 110473 casos totales de dengue (SIVIGILA, Prevención y control del dengue, 2001; SIVIGILA, Boletín epidemiológico semanal, 2015).

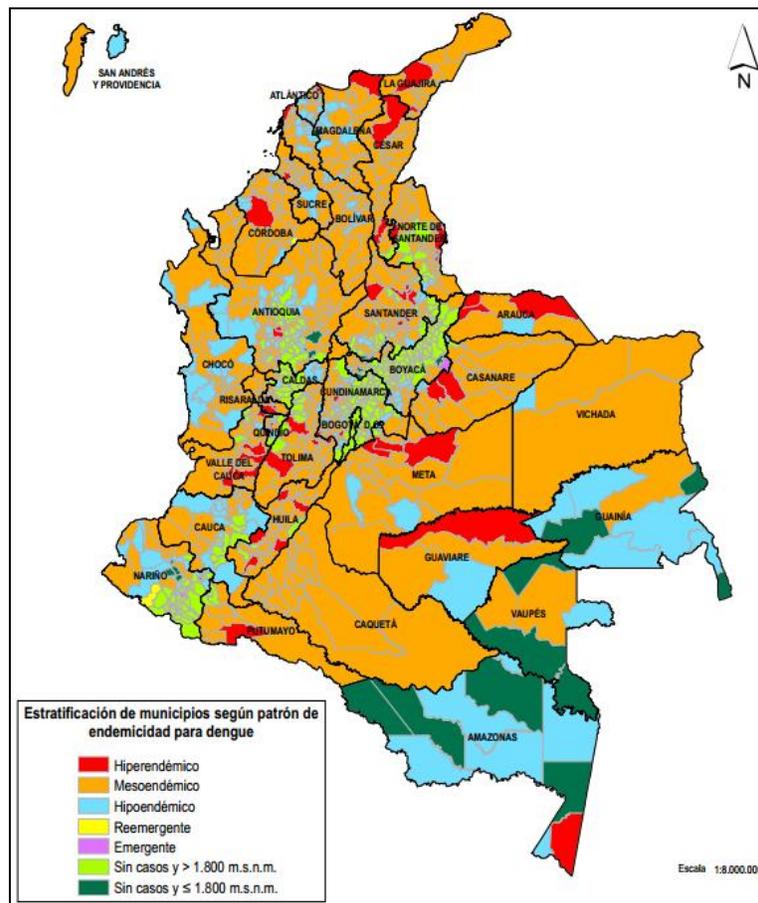


Figura 1. Patrón de endemicidad para dengue 2008 – 2013, tomado de INS - Sivigila 2008-2013.

En Colombia los reportes de dengue hasta la semana epidemiológica número 45 (noviembre del año 2015) notificaron 80034 casos totales de dengue, de los cuales 78961 corresponden a dengue y 1073 a dengue grave (98 y 2% respectivamente) (SIVIGILA, INS, 2015), mostrando el comportamiento de epidemia de los últimos años.

Durante el año 2014 la incidencia nacional fue de 413,5 casos por 100.000 habitantes, y la población a riesgo es la urbana. El 78% de los casos fueron procedentes de 12 departamentos: Santander, Cundinamarca, Norte de Santander, Valle del Cauca, Tolima, Meta, Antioquia, Huila, Sucre, Córdoba, Atlántico y Cesar. Mientras que, en la distribución por municipio, el 50% de los casos de dengue fueron principalmente de Bucaramanga, Girardot, Ibagué, Cali, Cúcuta, Villavicencio, Neiva, Medellín, Sincelejo, Floridablanca, Barranquilla, Montería, Armenia, Girón, Espinal, Piedecuesta, Barrancabermeja, Soledad, Acacias, Cartagena, Yopal, Valledupar y Palmira. También se confirmaron 88 muertes de las cuales 12 fueron de Santander y 3 de Cundinamarca (SIVIGILA, INS, 2015).

En el 2015, el dengue a la semana epidemiológica 12 presenta 25959 casos, con una incidencia nacional de 97,1 casos por 100000 habitantes. Como en el año 2014, el 80% de los casos se concentran en Tolima, Valle del Cauca, Antioquía, Huila, Cundinamarca, Santander, Meta, Norte de Santander, Quindío y Cesar, resaltando el aporte de casos de los municipios de Bucaramanga, Girardot, Cali, Ibagué, entre otros (SIVIGILA, Boletín epidemiológico semanal, 2015).

chikungunya

El chikungunya es una enfermedad viral, cuyo agente infeccioso es transmitido por hembras adultas del género *Aedes*. Comparte con el dengue los mismos vectores, distribución geográfica y algunos síntomas, ya que consiste en una enfermedad aguda con fiebre, erupciones en la piel y a diferencia del dengue, artralgia incapacitante. Actualmente no existe ningún antivírico específico o vacuna contra el virus del chikungunya, el tratamiento consiste en aliviar los síntomas (Pialoux ., et al 2007). La prevención y el control se basan en gran medida en la reducción del número de depósitos de aguas naturales y artificiales que puedan servir de criadero de los mosquitos (OMS, 2014). La palabra *chikungunya*, se utiliza tanto para el virus como para la enfermedad y significa "caminar encorvado" en el dialecto africano Swahili o Makonde, y hace referencia al efecto de la artralgia incapacitante (Pialoux et al., 2007).

Por su parte, el virus consiste en un arbovirus del grupo de los Alphavirus (familia Togaviridae) con un genoma de RNA de cadena sencilla y una cápside de 60-70 nm de diámetro y una envoltura fosfolipídica. Son sensibles a la desecación y a temperaturas cercanas a 58°C. Se conocen 28 virus dentro del género *Alphavirus*, de éstos, 6 son causantes de enfermedad de chikungunya: el virus o'nyong-nyong en África, el Ross River y Barmah Forest en Australia y el Pacífico, el Sindbis (cosmopolita) y el Mayaro en Sur America- Guyana Francesa. Las cepas más antiguas provienen de India, Malasia y Tailandia, sin embargo, la primera epidemia ocurrió en Tanzania en 1952 (Pialoux et al., 2007; Yergolkar et al., 2006).

Los principales brotes de chikungunya se han originado en África, Asia y el subcontinente indio, entre 1999 y el 2000 hubo un brote importante en la República Democrática del Congo, y en 2007 otro en Gabón. En febrero de 2005 el brote se localizó en las islas del Océano Índico, con el que se relacionaron numerosos casos importados en Europa. En 2006 y 2007 hubo otro brote en la India del que se vieron afectados otros países de Asia Sudoriental con más de 1,9 millones de casos. En diciembre de 2013 en Francia se registraron dos casos autóctonos confirmados mediante ensayos de laboratorio en la parte francesa de la isla caribeña de St. Martin. Desde entonces se ha confirmado la transmisión local en la parte holandesa de la isla (St. Maarten), Anguila, Dominica, Guayana Francesa, Guadalupe, Islas Vírgenes Británicas, Martinica y St. Barthèlemy. Aruba solo ha notificado casos importados. Este es el primer brote documentado de fiebre chikungunya con transmisión autóctona en las Américas (OMS: chikungunya, 2014).

En Colombia se confirmó el primer caso importado del virus del chikungunya el 19 de Julio del 2014, mediante ensayos serológicos usando el anticuerpo IgM Chk-virus en el laboratorio de virología del Instituto Nacional de Salud, el caso correspondía a una mujer colombiana de 71 años procedente de República Dominicana. El 11 de septiembre (semana epidemiológica 37 del 2014) se notificó el primer caso de chikungunya autóctono confirmado por laboratorio proveniente del corregimiento de San Joaquín, municipio de Mahates departamento de Bolívar (Martínez-Durán et al., 2014).

A la semana epidemiológica 45 del 2015 se reportaron 353.323 casos, de los cuales 350.519, 2.297 confirmados por laboratorio y 507 sospechosos, procedentes de 35 entidades territoriales (correspondientes a más del 94% del territorio nacional- 2015); Amazonas, Atlántico, Arauca, Antioquia, Barranquilla, Bolívar, Boyacá, Caldas, Caquetá, Cartagena, Casanare, Cauca, Cesar, Córdoba, Cundinamarca, Huila, La Guajira, Magdalena, Meta, Putumayo, Nariño, Norte de Santander, Sucre, Santander, Santa Marta, Quindío, Risaralda, Tolima, San Andrés, Providencia y Santa Catalina y Valle del Cauca, (figura 2). De este número de casos la región Caribe aportó más del 70% de los casos (SIVIGILA, INS, 2015).

El comportamiento de chikungunya para el 2015 continúa similar al del año anterior, se reportaron 10087 casos a la décimosegunda semana epidemiológica del 2015, con un acumulado de 249.013 casos (más casos que los reportados para dengue y en menos tiempo). Estos fueron provenientes de 31 entidades territoriales (correspondiente al 96.87 % del territorio nacional). La región Caribe aportó el 59,80% de los casos mientras que la región central (Cundinamarca, Tolima, Antioquia, Caldas, Huila, Quindío, Risaralda) y occidental (Boyacá, Santander y Norte de Santander) aportaron 18,37% y 19,87% de los casos respectivamente (SIVIGILA, Boletín epidemiológico semanal, 2015).

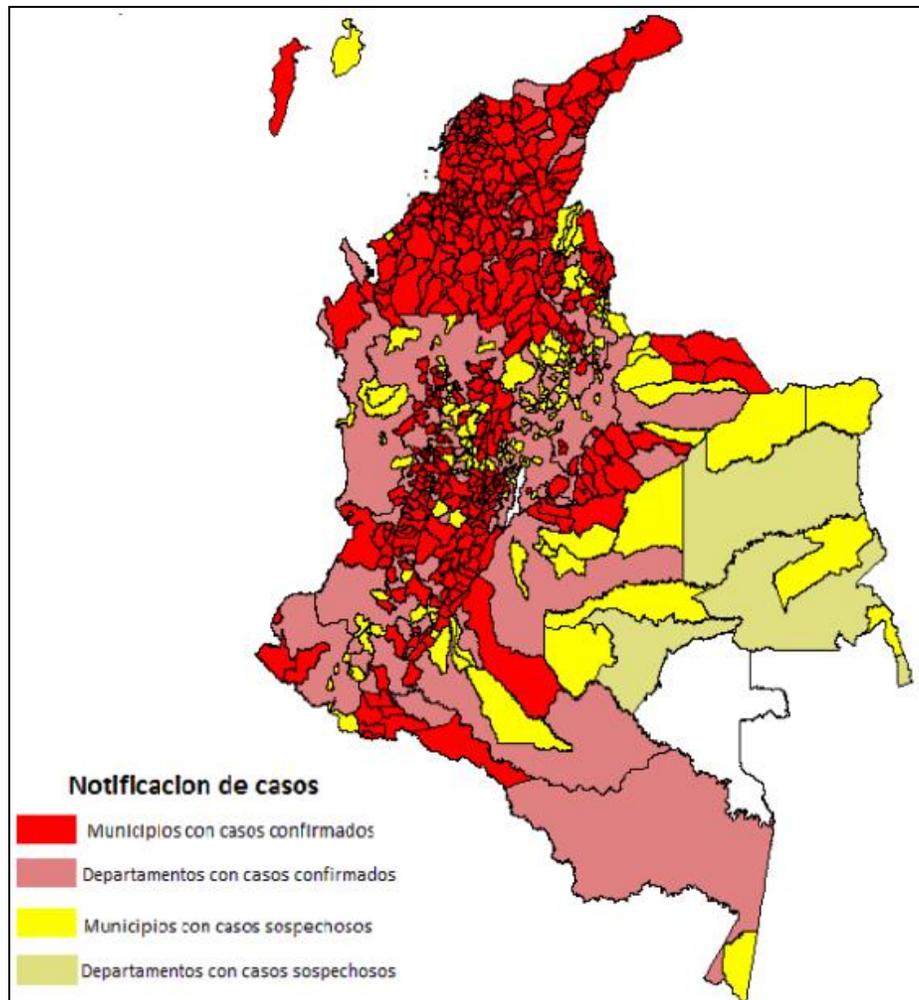


Figura 2. Entidades territoriales y municipios con casos de chikungunya, tomado de (SIVIGILA, INS, 2015).

fiebre amarilla:

La fiebre amarilla o vomito negro es una enfermedad viral infecciosa, usualmente aguda, hemorrágica con ciclos de transmisión selvática, intermedia y urbana (OMS: fiebre amarilla, 2014). La fiebre amarilla urbana es transmitida por mosquitos *Ae. aegypti* infectados con virus del género *Flavivirus* los cuales pueden cursar como una infección banal y aun asintomática, detectable sólo por laboratorio. Los porcentajes de letalidad varían entre un 5 y un 80%, son mayores en aquellos pacientes que ingresan en el período de intoxicación y en los niños (Instituto Nacional de Salud: fiebre amarilla, 2014) (OMS: fiebre amarilla, 2014).

La fiebre amarilla es una zoonosis propia de algunas regiones tropicales de América del Sur y África, que a través del tiempo ha causado numerosas epidemias con elevadas tasas de mortalidad. Se reconocen dos ciclos de transmisión (selvático y urbano). La fiebre amarilla continúa siendo importante en varios países de Suramérica y en África

subsahariana por la alta morbilidad que ocasiona, cercana a los 200.000 casos al año, la mayoría procedentes de África, en donde es común la forma urbana o rural de la enfermedad en 34 países. Según la OMS, entre 1987 y 1991 se informaron en el mundo cerca de 19.000 casos de fiebre amarilla con una mortalidad global de 24%. La presencia de la fiebre amarilla selvática en las Américas sigue restringida a la región norte del continente sudamericano, e incluye la Guayana Francesa, Surinam, Guyana, Venezuela, Trinidad y Tobago, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y la región centro-oriental del Brasil (Instituto Nacional de Salud: fiebre amarilla, 2014; OMS: fiebre amarilla, 2014).

En América, la enfermedad se encuentra controlada como consecuencia del control del vector y al desarrollo de una vacuna; aunque en algunas regiones selváticas se han registrados algunos casos. Se la encuentra en las regiones tropicales y en todo el continente americano, en donde la cantidad de casos notificados se ha incrementado marcadamente (Instituto Nacional de Salud: fiebre amarilla, 2014).

En Colombia los últimos casos urbanos registrados se dieron en Socorro-Santander en 1929 (Rodríguez et al., 2003). Sin embargo, en los últimos seis años, los departamentos más afectados por este evento corresponden a Norte de Santander, el cual se vio afectado por el brote del Catatumbo del año 2003, con una letalidad acumulada entre 2000 y 2005 de 4%. El departamento de Guaviare presentó 19 casos confirmados y una letalidad de 57,9% entre 2000 y 2005. El departamento de Cesar reportó 18 casos con una letalidad de 38,9%; Magdalena presentó 15 casos y una letalidad de 33,3%; Meta, 8 casos confirmados y una letalidad de 87,5%. En la Guajira se presentaron 6 casos y una letalidad de 33,3%; es de resaltar que este departamento, así como Cesar y Magdalena, registraron estos casos durante el brote de la Costa Atlántica, que inició a finales del 2003 y se prolongó hasta el año 2004 (Instituto Nacional de Salud: fiebre amarilla, 2014).

Aedes aegypti

Aedes (Stegomyia) aegypti es el mosquito transmisor de los virus del chikungunya, el dengue y la fiebre amarilla. Es probablemente el díptero más domesticado y urbano. Se encuentra en asentamientos humanos y cuenta con una amplia distribución en las regiones tropicales y subtropicales. Se encuentra en la mayoría de los países que se encuentran entre las latitudes 45 N y 40 S, con restricciones donde la temperatura no favorece su desarrollo. Los individuos de esta especie se pueden reconocer porque presentan unas líneas blancas curvas en el tórax y tarsos con anillos blancos. A pesar de que ha sido en general considerado una especie americana que se ha propagado a través del comercio a todas las partes de los trópicos, muchos trabajadores ahora admiten que en su origen fue una especie egipcia traídos a América por los primeros navegantes (Service, 2014).

Ciclo de vida: Las hembras de *Ae. aegypti* depositan los huevos individualmente en bordes de cuerpos de agua, generalmente por encima de la superficie del agua: pueden resistir el desecamiento por más de 5 meses, a este proceso se le denomina diapausa (Lounibos, 2002). Los huevos eclosionan en dos días o menos a larvas, sin embargo, como son organismos ectotermos, el desarrollo está modulado por la temperatura, haciendo que la eclosión se prolongue en clima fresco e invierno (Service, 2014). El estadio larval es relativamente corto, ocupando de seis a diez días, principalmente a temperaturas alrededor de los 25°C (Service, 2014). Las larvas maduras son robustas, con un sifón respiratorio corto, puntiagudo. El sifón lleva un par de pequeños mechones o setas de pelo, ubicadas más allá del pecten. A nivel comportamental, las larvas son muy susceptibles a las perturbaciones, incluyendo movimientos del agua y luz solar, lo que hace que sean difícil de encontrar en cuerpos de agua grandes (Service, 2014). El periodo de pupa es muy corto, no dura más de dos días, bajo condiciones normales, para posteriormente emerger a adulto o imago. El ciclo de vida completo puede durar entre once días a tres semanas (figura 3) (Service, 2014).

Los adultos se acoplan para volar pocas horas después de que emergen. El apareamiento tiene lugar durante el vuelo y solo las hembras emergen con su sistema reproductor más desarrollado, los machos duran más tiempo para desarrollarse. Las hembras son hematófagas, la obtención de una comida de sangre inicia el desarrollo de los ovarios, y una fuente constante de sangre permite que las hembras puedan producir un máximo número de huevos. Cada hembra puede ovipositar de 50 a 150 huevos durante su vida (Service, 2014).

A nivel comportamental, las hembras adultas de *Ae. aegypti* son de actividad diurna, y se puede encontrar actividad de picadura tanto en la mañana como en la tarde, pero principalmente de hematofagia diurna (Harrington et al., 2001). En la transmisión de virus como el dengue o el chikungunya, los adultos de *Ae. aegypti* son capaces de incubar el agente infeccioso por varios factores: reposar en el intradomicilio, ser de preferencia antropofílica en la ingesta, tiene tendencia a ingestas suplementarias, capacidad de ovipositar en diferentes lugares y rango de vuelo superior a los 900 metros (Mullen & Durden, 2002).

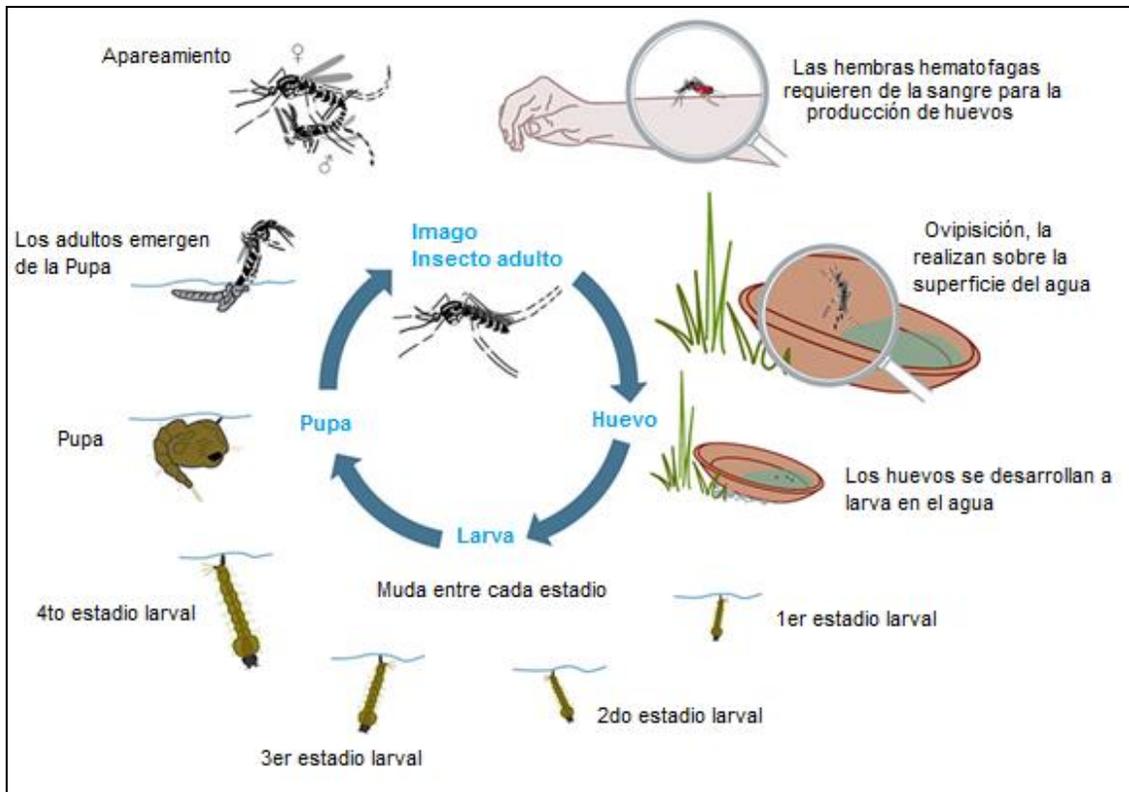


Figura 3. Ciclo de vida de *Ae. aegypti*, modificado de *biogents, Ingeborg Schleip* Fuente: <http://www.biogents.com/cms/website.php?id=/en/about.htm>

Sitios de cría: Los principales criaderos de *Ae. aegypti* son los recipientes artificiales dentro y alrededor de las viviendas y asentamientos humanos, no se ha encontrado que se reproduzcan eficientemente en pantanos, piscinas o charcos temporales, pese a que algunos de estos cuerpos de agua se encuentren en cercanía a viviendas (Mullen & Durden, 2002; González-Obando et al., 2007). Se han encontrado larvas de *Ae. aegypti* en barriles, contenedores de agua lluvia, pozos, cisternas, tanques, canaletas de los techos, tanques de inodoro, latas, jarrones, urnas de cementerio, albercas, llantas usadas, etc (figura 4) (Mullen & Durden, 2002). También se han encontrado estadios inmaduros de *Ae. aegypti* en huecos de árboles, bromelias, en hojas de plátano y en aberturas de más de 300 metros de algunos árboles, huecos de cangrejo, preferentemente sobre agua limpia, sin embargo, también se ha encontrado en agua contaminada con hojas de plantas caducifolias (Mullen & Durden, 2002).



Figura 4. Criaderos artificiales de *Ae. aegypti*, tomado de <http://health.puducherry.gov.in/>

En Colombia *Ae. aegypti* se encuentra distribuido en más del 80% del territorio nacional (figura 5), situado entre 1.000 y 2.200 m.s.n.m. También se ha reportado la presencia de *Ae. albopictus* (vector selvático y urbano de dengue) en Leticia (SIVIGILA, Prevención y control del dengue, 2001).

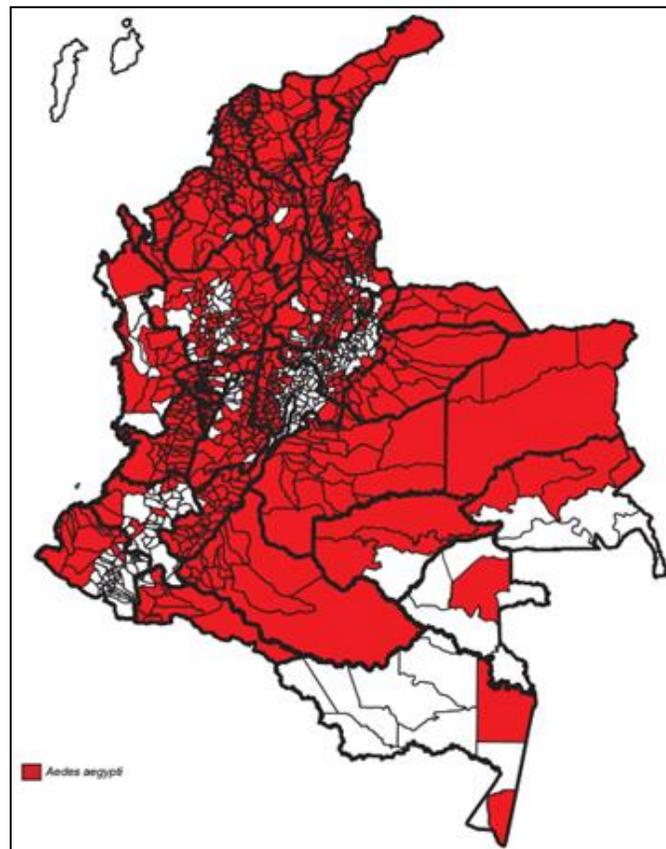


Figura 5. Distribución de *Ae. aegypti* en Colombia. Tomado de, mapa digital integrado del Instituto Geográfico Agustín Codazzi, Sivigila e informes del Grupo de Entomología del Instituto Nacional de Salud, informes del Programa de Prevención y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores del Ministerio de la Protección Social

Control de *Ae. aegypti*

Las vacunas de dengue y chikungunya están en desarrollo, y no se han consolidado de forma global para el uso en salud pública, de esta manera para proteger la población en riesgo contra dengue y chikungunya, el control vectorial es la principal medida para la prevención e interrupción de la transmisión de éstas enfermedades (Wenceslao & Pedroni, 2008). Una medida importante en el control consiste en evitar el contacto humano vector, de esta manera se han diseñado diferentes métodos relacionados con la reducción de las densidades del vector (Liu, 2015), mientras que, como medidas de prevención, se realizan campañas educativas dirigidas a la comunidad, con el fin de eliminar los criaderos del vector, lo cual se integra con la aplicación de larvicidas en criaderos de difícil eliminación (WHO, 2009) y depósitos de agua potable de uso doméstico. En el control biológico destaca el uso de peces y copépodos para el control de larvas de *Ae. aegypti*, por su parte, el control químico está ligado al uso de insecticidas adulticidas o larvicidas (INS, 2010).

En Colombia los larvicidas autorizados por el Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores del Ministerio de Salud y Protección Social para el control focal, son la bacteria *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* (Mancheno et al., 1988), los reguladores de crecimiento y el organofosforado temefos (INS, 2010). El temefós es el más utilizado en el país dada su mayor capacidad residual y compatibilidad con los programas de control social (Santacoloma et al., 2012), éste es de aplicación focal sobre los criaderos, mientras que en los casos de epidemia, las poblaciones de adultos se controlan mediante aspersiones con insecticidas químicos: el organofosforado malatión ha sido la molécula más utilizada en el país desde los años ochenta (Ocampo et al., 2011), seguido en menor proporción, por los piretroides lambda-cialotrina y deltametrina (Santacoloma et al., 2012).

En eventos de epidemias o brotes de dengue y más recientemente de chikungunya, se usa la estrategia 1-4-7, la cual consiste en aplicar adulticidas sobre *Ae. aegypti* durante tres días (1, 4 y 7) con el fin de interrumpir la transmisión de los virus, con base en los tiempos en que las hembras de los insectos hacen ingestas de sangre y por lo tanto tienen contacto con los humanos (INS, 2010).

Insecticidas

Los insecticidas son sustancias químicas orgánicas o inorgánicas o mezclas de sustancias cuya función es prevenir, matar, repeler o mitigar el efecto de cualquier insecto (volador o no), son de naturaleza sintética o productos naturales. Estas sustancias pueden actuar sobre insectos adultos e inmaduros, denominados así adulticidas y larvicidas respectivamente, han sido usados en agricultura, salud pública, horticultura, o almacenamiento de alimentos (Achudume, 2012).

Hay diversos tipos de insecticida, incluyendo diversas formas de aceites de hidrocarburos (alquitran), compuestos arsénicos, organoclorados, organofosforados, carbonatos, dinitrofenoles, tiocianatos orgánicos, azufre, fluoruro de sodio, piretroides, nicotina, etc. Muchos de ellos tienen efecto nocivo para la salud humana y el medio ambiente y se han retirado comercial y legalmente con base en análisis de riesgo-beneficio (Achudume, 2012). Los efectos tóxicos de los insecticidas dependen de los elementos orgánicos e inorgánicos que conforman su estructura, estos modulan sus propiedades específicas, la presencia de metales como el hierro, selenio, arsénico y flúor, por ejemplo, son esenciales en la alta toxicidad y por lo tanto en la letalidad del insecticida. Estos organometales o organometaloides tienen diferente absorción y énfasis en sus efectos. Algunos de estos insecticidas son sintéticos o de origen natural, sin embargo, muchos compuestos provenientes de metabolitos secundarios de plantas que han mostrado efectos prospectivos y costo-efectivos han sido sintetizados. Por ejemplo, las piretrinas fueron conocidos durante años como productos naturales; sin embargo, sus piretroides derivados son considerados como variantes de compuestos naturales a pesar de que no se han encontrado en la naturaleza (Achudume, 2012; Nauen et al., 2012). En Colombia en el control focal del dengue se utiliza el larvicida temefos, mientras que el adulticida malatión es el más usado en brotes junto con algunos piretroides y otros organofosforados, pero estos últimos en menor medida (INS; OPS; Ministerio de la Protección Social, 2010).

Piretroides y compuestos relacionados

A comienzos de 1800 durante una investigación llevada a cabo por el investigador armenio Juntikoff, se descubrió que ciertas tribus caucásicas usaban flores como insecticida, estas plantas correspondían a especies del género *Chrysanthemum* y se les conocía como "piretro", fue introducida desde África hasta Europa central. Durante años Yugoslavia fue el principal productor de las flores, luego Japón y Kenia en 1915 y 1940 respectivamente. En 1950 los piretroides sintéticos se desarrollaron comercialmente a mayor escala (O'Brien, 1967; Nauen et al., 2012).

La forma más común en que se utilizan los piretroides es como un extracto de piretro, el cual se obtiene mediante la maceración de las flores con metanol o acetona, seguido por destilación del disolvente, para dejar el material la "piretrina" aislada. Este contiene una mezcla de ésteres, las flores pueden contener 0,7 a 3% de piretrina, dependiendo de la cepa. A nivel estructural, la piretrina posee diferentes ésteres L1C1, L1C2, L2C1 y L2C2 donde L1 y L2 son alcoholes y C1 y C2 ácidos. En su estructura también se encuentra un anillo triangular de ciclopropano junto con un grupo carboxílico libre (figura 6) (O'Brien, 1967).

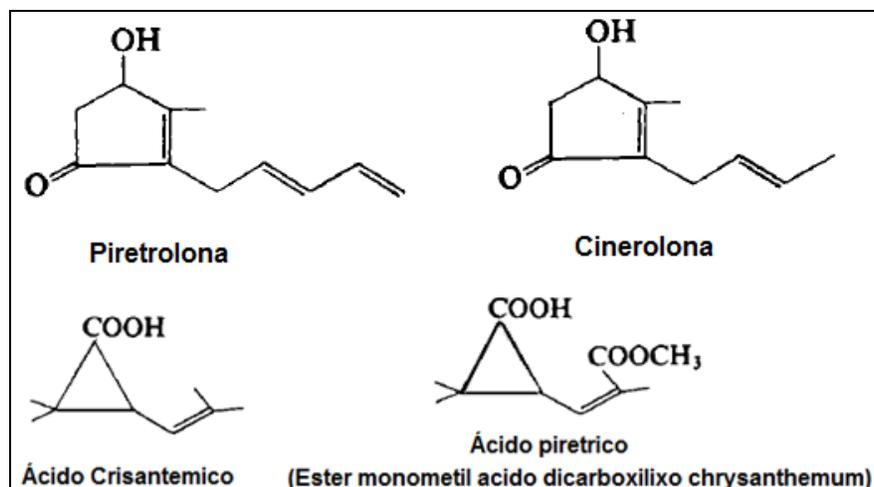


Figura 6. Componentes de las piretrinas (O'Brien, 1967)

De acuerdo a la clasificación estándar de los piretroides (la cuál ignora los isómeros y es un tanto ambigua), indica que los ésteres que poseen piretrolones están el grupo de las piretrina I si es ácido crisantémico, si poseen ácido pirétrico son del grupo piretrina II. Mientras que los ésteres que contienen cinerolones y ácido crisantémico son del grupo de las cinerinas I, y en el grupo de las cinerinas II las del ácido pirétrico (Davies et al., 2007a). Adicionalmente los piretroides sintéticos como la aletrina y ciclotrina, ambos ésteres del ácido crisantémico pueden actuar como sinergistas con otros insecticidas como carbamatos y organofosforados (O'Brien, 1967). Los piretroides son compuestos fotoestables, con alta actividad insecticida, baja toxicidad para los mamíferos y persistencia limitada en el suelo (Davies et al., 2007a).

Se han desarrollado piretroides distintos a la permetrina, por ejemplo la cipermetrina y la deltametrina, los cuales son relativamente recientes, han sido ampliamente usados por su mayor eficacia y actividad respecto a la permetrina (Davies et al., 2007a), sin embargo los piretroides sintetizados promisorios consisten en moléculas con gran cantidad de grupos funcionales en posición *cis* "highcis" que hacen al insecticida más potente en orden de la variación estructural y estabilidad (Silvério et al., 2009). En estudios de estereoisómeros de ácido norcrisantémico en los que se desarrollaron piretroides de última generación con alta toxicidad en insectos y baja en mamíferos, encontraron que la metoflutrina es un buen candidato (Sugano & Ishiwatari, 2012).

Modo de acción piretroides

Los piretroides y sus análogos como el DDT pertenecen a un grupo de neurotoxinas que comparten un modo de acción similar. El sitio blanco de estos insecticidas es el canal de sodio dependiente de voltaje (NaV ó Vssc) presente en células del sistema nervioso central y periférico (neuronas, miocitos, células endocrinas y ovarios), ocasionando un cambio en la cinética de propagación de los impulsos nerviosos. Estructuralmente el canal de sodio dependiente de voltaje (NaV) es una proteína integral de transmembrana compuesta por cuatro dominios homólogos (I – IV), cada uno compuesto por seis hélices ó segmentos (S1-

S6) conectados por *loops* (lazos). Los segmentos S5, S6 y los *P-loops* de S5-S6 forman un poro acuoso central, y las hélices S1-S4 de cada dominio se unen para dar lugar a cuatro dominios independientes sensibles al voltaje (Silva et al., 2014)

La subunidad α del gen NaV comprende un ORF (*open Reading frame*) con 6417 nucleotidos que codifican 2139 aminoácidos, resultando es una proteína con una masa molecular de 240 kDa. Este gen se localiza en el locus para (parálisis) del cromosoma X y se compone de 35 exones y 32 intrones, los cuales transcriben diferentes RNAs mensajeros mediante *splicing* alternativo (Silva et al., 2014).

Los efectos de los piretroides son estereo específicos, encontrándose dos sitios diferentes de unión sobre los canales de sodio dependientes de voltaje. Según lo descrito por O'Reilly, el primero se encuentra en las hélices IIS5 y IIS6, las cuales podrían jugar un papel importante en la interacción con las moléculas de insecticida y el enlazamiento con el sitio IIS4-S5 podría explicar la fuerte potencia de los piretroides en comparación con el DDT. El segundo sitio (sugerido por Du y colaboradores, corresponde al sitio de unión en "bolsillo" formado por el enlace IS4-S5 y las hélices IS5 y IIS6. Para ambos modelos, el efecto selectivo del insecticida se explicaría por la no conservación de los aminoácidos de estas regiones entre los artrópodos y otros animales. (O'Reilly A. et al., 2006; Du et al., 2013).

Por su parte los insecticidas piretroides afectan el sistema nervioso central y el periférico de los insectos. Inicialmente se estimulan a las células nerviosas para producir descargas repetitivas y eventualmente causar parálisis, un efecto similar, pero más pronunciado que el del DDT. Sin embargo, con los piretroides el insecto produce una reacción incapacitante, pero el efecto subletal, la cual se conoce como 'caída' (Knock out: Kd). Puntualmente los piretroides amplían el flujo de la corriente de sodio hasta que el nivel de hiperexcitabilidad sobrepasa la capacidad de la célula para mantener la actividad de la bomba de sodio (Bloomquist, 1996).

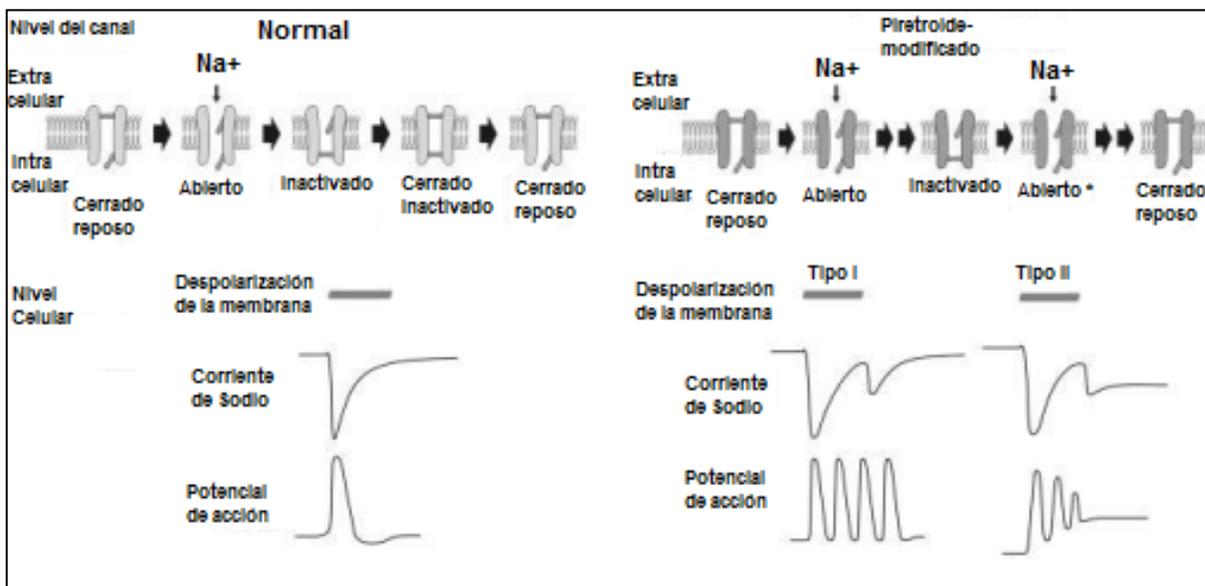


Figura 7. Efecto de los piretroides sobre la excitabilidad neuronal, adaptado de (Shafer et al., 2005)

En la figura 7 se representa el efecto de los piretroides sobre los canales individuales, la corriente de sodio y el potencial de acción. En condiciones normales la despolarización abre el canal que permite al sodio entrar a la célula. Para limitar la entrada de sodio y duración de la despolarización, los canales se inactivan y regresan a estado de reposo antes de la reapertura. Los piretroides inhiben la función de doble filtro o “dos puertas” diferentes que controlan el flujo de sodio a través del canal, retrasando la inactivación, (permitiendo el flujo seguido de sodio: En la figura 7: Abierto*). La despolarización se da de manera rápida e inactivante en una célula bajo condiciones normales, mientras que con la acción de piretroides los canales permanecen abiertos permitiendo el flujo de sodio aún después de la despolarización. Finalmente, la despolarización en circunstancias normales genera un único potencial de acción, mientras que, bajo los efectos de piretroides, se despolariza la membrana celular por encima del umbral para la generación potencial de acción, resultando en una serie de potenciales de acción (Shafer et al., 2005).

DDT

El Dicloro difenil tricloroetano (figura 8) o DDT es conocido como el insecticida sintético más eficaz y barato de la historia. Fue sintetizado en 1874, pero sus propiedades como insecticida solo se conocieron hasta 1939. Su uso inicialmente estaba ligado al del ejército de los Estados Unidos para el control de mosquitos durante la segunda guerra mundial en áreas altamente maláricas. En 1955 la OMS inició un programa para el control de malaria usando DDT a nivel global (O’Brien, 1967). Pese a que es un insecticida de larga persistencia, su popularidad disminuyó por la resistencia de los insectos en varios países, contaminación generalizada del medio ambiente y acumulación en tejido adiposo de mamíferos incluyendo humanos. En el 2004, el convenio de Estocolmo de contaminantes orgánicos persistentes prohibió su uso, sin embargo, en países donde la malaria es endémica se continúa usando (Pérez & Alegría-Torres, 2012).

El DDT tiene una presión de vapor muy baja (1.5×10^{-7} mm a 20°C) que le confiere persistencia en diferentes superficies (hasta por 18 meses), es una molécula estable, relativamente insensible a la luz y de acción residual. Bajo condiciones alcalinas se puede obtener el derivado DDE, el cual no es tóxico, además su solubilidad al agua es muy baja (O’Brien, 1967).

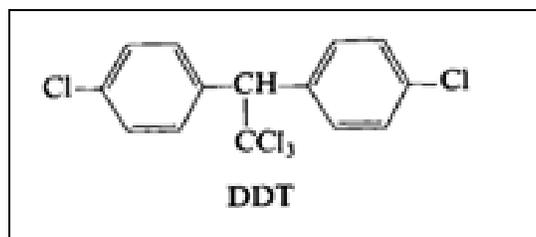


Figura 8. Molécula de Dicloro difenil tricloroetano o DDT, fuente (O’Brien, 1967).

Modo de Acción del DDT

El DDT afecta el sistema nervioso periférico: las neuronas se disparan espontáneamente al primer contacto con el insecticida provocando que los músculos se contraigan, lo que resulta en temblores en todo el cuerpo y apéndices (los llamados 'nerviosismo DDT') junto con hiperexcitabilidad, seguido muy lentamente por ataxia (pérdida de movimiento) y parálisis (la cuál puede ser total en 24 horas) (O'Brien, 1967). En mamíferos, también hay hiperexcitabilidad y temblores (particularmente en la cara), convulsiones, rigidez con opistótonos (la cabeza arqueada hacia atrás) y movimientos descoordinados, finalmente hay debilidad y postración (Davies et al., 2007).

En comparación con algunos insecticidas DDT es más bien de acción lenta. Sus efectos en la unión neuromuscular se dan lugar por la despolarización debido a un aumento de la frecuencia de los potenciales postsinápticos como consecuencia de una liberación espontánea acelerada del neurotransmisor (Perry et al., 1998; Davies et al., 2007).

El DDT y los insecticidas de tipo piretroides han sido algunos de los adulticidas de mayor éxito desarrollados hasta ahora. Sin embargo, por el uso intensivo de DDT (en los años 1950 y 1960) y luego piretroides (después de su introducción en la década de 1970) se ha desarrollado resistencia generalizada (genética en el sitio-diana y metabólica) en muchas especies de insectos, generando inconveniente para uso continuado y eficaz en muchos programas de control de plagas (Khambay & Jewess, 2005).

Resistencia

La resistencia a insecticidas puede definirse como un cambio heredable en la sensibilidad de una población de una plaga, que se refleja en la incapacidad repetida de un producto para alcanzar el nivel esperado de control cuando se usa de acuerdo a la recomendación de la etiqueta. La resistencia surge con mayor frecuencia en poblaciones de individuos que han sido presionados con un insecticida o acaricida mediante el uso excesivo o mal uso (Nauen et al., 2012).

Otra definición más reciente anota que la resistencia a los insecticidas es la capacidad de los individuos de una especie para soportar dosis de sustancias tóxicas, que serían letales para la mayoría de individuos de una población, se da lugar por un cambio en la composición genética de una población dada, en respuesta a la presión de selección, como resultado de la aplicación constante del mismo producto químico (Silva et al., 2014).

Mecanismos de resistencia

Los dos principales mecanismos de resistencia corresponden a: 1. Alteración en el sitio blanco y 2. Resistencia metabólica (figura 9). Sin embargo, también se conoce la resistencia comportamental, la cual no es muy usual en *Ae. aegypti* y la penetración reducida del insecticida.

La resistencia metabólica se produce cuando la alta actividad de una o más enzimas, sobre una porción suficiente de insecticida actúa de manera que secuestra o desintoxica la molécula de insecticida antes de que alcance su objetivo en el insecto (Hemingway & Ranson, 2000). Esto ocurre debido al aumento en el número de moléculas de enzima disponibles (amplificación genética o la hiperactivación de la expresión génica) o por medio de mutaciones en el gen (en el exón que codifica la enzima) produciendo la metabolización más eficiente del insecticida (Hemingway J. , 2000). Principalmente son tres superfamilias de enzimas que están involucradas en el proceso de desintoxicación: esterasas, oxidasas de función mixta (MFO, o simple P450) y glutatión S-transferasa (GST) (Hemingway & Ranson, 2000).

Además, recientemente se han caracterizado los principales genes que codifican las enzimas responsables de la desintoxicación, como posibles marcadores moleculares para la resistencia (Hemingway et al., 2004).

Sin embargo la detección de enzimas detoxificantes actualmente se basa en el uso de ensayos bioquímicos colorimétricos, los cuales se emplean para detectar cambios en la actividad de enzimas de desintoxicación. En esta prueba, la actividad enzimática de una población natural se compara con los linajes de control queridos, utilizando sustratos específicos para cada familia enzimática. Es de resaltar que además de los ensayos colorimétricos, también los ensayos con microarreglos están teniendo acogida en la investigación de resistencia metabólica, estos trabajos implican la comparación de la expresión de todos los genes del metabolismo de insecticidas (GSTs, MFOs, esterasas, P450, antioxidantes, superóxido dismutasa, peroxidasas y citocromo oxidasa I) entre mosquitos susceptibles y resistentes (Silva et al., 2014).

Por otro lado, la resistencia basada en la insensibilidad del sitio *blanco* (figura 9) ocurre cuando hay una alteración en las moléculas diana que interactúan con el insecticida, de esta manera se vuelve menos tóxico o ineficiente (Brogdon & McAllister, 1998) (Hemingway et al., 2004).

Dichas alteraciones son causadas por mutaciones y se originan en regiones estructurales conservadas del sistema nervioso del insecto (regiones *blanco* del insecticida), haciendo que las moléculas de insecticida no se puedan unir completamente sobre el sitio diana. Es de resaltar que dichas modificaciones no interfieren sobre las funciones fisiológicas del sistema nervioso, y además se han encontrado en sitios homólogos entre diferentes especies de insectos (ortólogos) (Ffrench-Constant et al., 1998).

	Mecanismos de resistencia				
	Metabólica			Sitio	
	Esterasas	Monooxigenasas	Glutación S-transferasas	Kdr	MACE
Piretroides	●	●●		●	
DDT		●	●	●	
Carbamatos	●				●●
Organofosforados	●●	●			●●

Figura 9. Principales mecanismos asociados con resistencia a insecticidas en mosquitos, un círculo grande indica un mecanismo de resistencia importante, mientras que un punto mediano o pequeño indica que el mecanismo ha sido descrito pero es menos relevante. *kdr*, *knockdown resistance* MACE, *modification of acetylcholinesterase*. Adaptado de (IRAC, 2010)

El fenómeno de resistencia se ha observado en más de 500 especies de insectos de todo el mundo, según la OMS (WHO, Insecticide Resistance Management, 2012), la resistencia a los piretroides parece ser la más extendida.

Resistencia del sitio blanco:

Los mecanismos de resistencia metabólica y de alteración del sitio blanco, son implícitamente, resistencia genética: se heredan en la población de mosquitos, los genes que se vuelven “refractarios” para mejorar sus mecanismos de desintoxicación a los insecticidas (Consoli & Oliveira, 1994).

La alteración del sitio blanco se da lugar cuando mutaciones no silenciosas en genes estructurales, modifican o alteran los aminoácidos responsables de anclaje del insecticida en un sitio específico (Maestre-Serrano, 2012). Por ejemplo, el gen **Rdl** que codifica para la subunidad RDL del receptor **GABA** (sitio blanco de algunos insecticidas) está asociado con un tipo de resistencia a avermectina y ciclodieno. Los canales de sodio dependientes de voltaje son blanco de piretroides y DDT, y algunas mutaciones están asociadas con resistencia con este tipo de insecticida, la denominada resistencia *knockdown* (**kdr**) (Saavedra-Rodriguez et al., 2007). De igual manera ocurre con la acetilcolinesterasa, por una alteración molecular, se origina insensibilidad a organofosforados y carbamatos (Bisset, 2002; Hemingway J. , 2000).

Resistencia *kdr*:

La resistencia *knockdown* (*kdr*) es una de las dos mayores formas de resistencia al DDT y a insecticidas piretroides, se ha asociado con mutaciones no sinónimas sobre los canales de sodio dependiente de voltaje (Vssc) los cuales son blanco de este tipo de insecticidas (Srisawat et al., 2010). Las mutaciones se encuentran sobre alguno de los seis segmentos

hidrofobicos (S1-S6) generalmente en los *p-loops* o *linkers* dentro de los cuatro dominios homologos (i-IV) en los canales de sodio dependientes de voltaje (Figura 10). Estas mutaciones, se han encontrado en insectos y acaros, generando cambios conformacionales sobre las proteínas Vssc, pero conservando su papel fisiológico (O'Reilly et al., 2006).

El gen del canal de sodio, también denominado gen Aa-para (para de paralisis) en *Ae. aegypti* consiste en un ORF de 6441 pares de bases (al menos la región transcrita más larga) que codifica 2.147 residuos de aminoacidos con un peso molecular estimado de 241 kD. Tiene alrededor de 33 exones abarcando 293 kb, cuyo transcrito esta modulado por splicing alternativo (Chang et al., 2009).

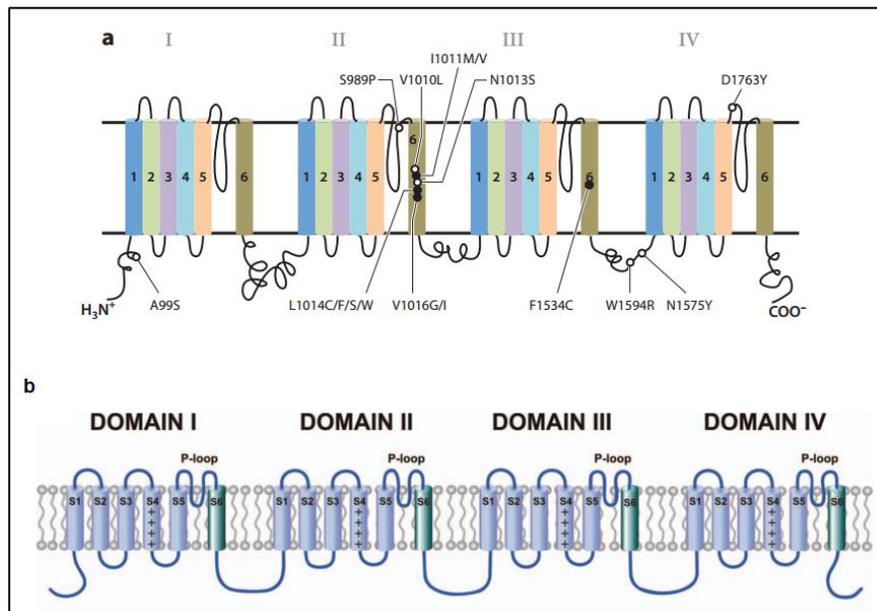


Figura 10. Representación gráfica de las ubicaciones de las mutaciones asociadas con resistencia a piretroides en los canales de sodio (Vssc) de mosquitos. a. Las mutaciones Ser a Pro (S989P), Ile a Met/Val (I1011 M/V), Leu a Phe/Ser (L1014F/S), Val a Gly/Ile (V1016G/I), Phe a Cys /F1534C) y Asp a Tyr (D1763Y) han sido examinadas funcionalmente. b. La posición de las mutaciones están designadas de acuerdo a la numeración del canal de sodio dependiente de voltaje de *M. domestica*. Se enumeran los 4 dominios homologos con numeros romanos (I-IV) y los segmentos hidrofobicos están enumerados de 1 a 6 (S1-S6) y están unidos por *p-loops linkers*. Adaptado de Liu, 2015 y Davies y colaboradores (Liu, 2015; Davies et al., 2007a).

En insectos la mutación *kdr* más común es la sustitución Leu/Phe en el sitio 1014 (el cuál a sido numerado de acuerdo a la secuencia primaria del canal de sodio dependiente de voltaje de *Musca domestica*) seguida por la sustitución de Leu/Ser en la misma posición, (encontradas en mosquitos *Anopheles* y *Culex*) (Rinkevich et al., 2013) Sin embargo se han encontrado 11 mutaciones no sinonimas en 9 diferentes loci de diferentes especies de insectos (Brenques et al., 2003).

En *Ae. aegypti* la posición 1014 del codon de Leu es codificado por los nucleotidos CTA mientras que en *Anopheles* y *Culex* es codificado por TTA, esto sugiere que dos sustituciones tendrían que ser seleccionadas de manera simultanea en el mismo codón con el fin de cambiar Leu a Phe (TTT) o Ser (TCA), por lo tanto esta mutación es muy poco probable en *Ae. aegypti* (Saavedra-Rodriguez et al., 2007).

De esta manera, al menos tres sustituciones están relacionadas con resistencia a piretroides en *Ae. aegypti*, la 1016 (Val a Ile ó Gly) y la Ile 1011 (I a M/V) en el segmento IIS6 y F1534C (Phe a Cys) en el segmento IIS6 (Kushwah et al., 2015). Sin embargo el papel del sitio polimorfico en la región IIS6 en la posición 1011 (Ile o Val a Met) en la resistencia esta por esclarecer (Brito et al., 2013). En algunos países donde ha existido presión constante con insecticidas piretroides se han encontrado nuevas mutación asociadas con resistencia (Linss et al., 2014).

Además se ha encontrado que la combinación de algunas de estas mutaciones tiene efecto sinergista sobre la perdida de la susceptibilidad, afectando la sensibilidad de los canales de sodio sobre los piretroides (SupYoon et al., 2008). Esto sugiere que la interacción de multiples mutaciones juega un papel importante en la comprensión de la resistencia a piretroides y a DDT (Liu, 2015).

La razón por la cual las mutaciones sobre los puentes o *linkers* de los canales de sodio hacen que los insectos se vuelvan resistentes a piretroides, radica en que los aminoacidos que constituyen la proteína de las poblaciones susceptibles tiene un ambiente químico que favorece la interacción alosterica entre compuestos insecticidas y el poro de entrada de los residuos de sodio, en contraste las poblaciones resistentes, mediante la alteración de al menos un aminoacido, modifican las características fisicoquímicas del “epitope” de piretroides y DDT (Liu, 2015).

Estudios de modelamiento y docking sobre el dominio II y III en los canales de sodio dependientes de voltaje indican que los grupos ácidos de los piretroides interactuan con las cadenas laterales de los segmentos hidrofobicos IIS5 y IIS6, mientras que los grupos éster y alcohol se asocian con el IIS5 (figura 11). Así mismo, cada residuo en los *linkers* de los segmentos hidrofóbicos (que están conformados por diferentes aminoacidos) tiene propiedades estereoquímicas definidas que pueden favorecer o no la unión con el insecticida (Davies et al., 2007a; O'Reilly et al., 2006).

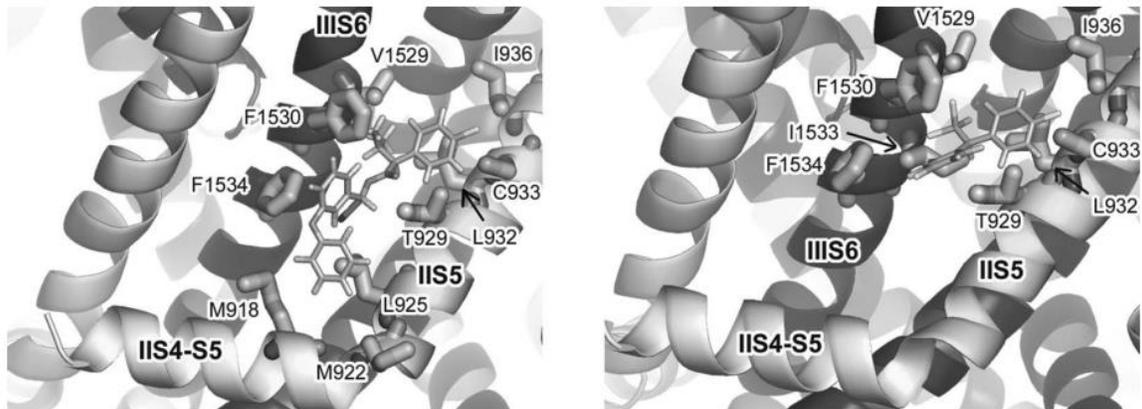


Figura 11. Predicción de los sitios de unión a piretroides (izquierda) y DDT (derecha) indicando los segmentos hidrofóbicos, los aminoácidos y los dominios con los que interactúan los insecticidas en el canal de sodio (Davies et al., 2007a; O'Reilly et al., 2006).

Resistencia metabólica; Glutación S-transferasas, Oxidasas y esterasas

La resistencia metabólica, está asociada con un incremento en la detoxificación de insecticida o porque el insecto no metaboliza el compuesto tóxico. La detoxificación se puede dar lugar por la acción de enzimas detoxificantes, incluyendo: glutación-S-transferasas, Oxidasas y esterasas, las cuales actúan sobre la molécula de insecticida hasta el punto de que pierde su capacidad sobre el organismo (Bisset, 2002).

El glutación s-transferasas (GSTs) son un grupo de isoenzimas de múltiples genes implicados en la desintoxicación celular de compuestos xenobióticos y endobióticos. A nivel celular, las GSTs se pueden encontrar en el citosol, microsoma y mitocondria, sin embargo, no hay presencia de GSTs mitocondriales en mosquitos. Las GST se dividen en diferentes subclases, *alfa* (α), *miu* (μ), *pi* (π) y *theta* (θ), y delta – ϵ (asociadas con metabolismo de xenobióticos), omega, sigma y zeta en el citosol de insectos (Aravindan et al., 2014). La función de catálisis de las GSTs se produce por la conjugación con glutación (GSH) y los productos menos tóxicos y más hidrófilos pueden entonces ser parcialmente metabolizados y excretados. Los niveles de expresión de diferentes isoformas de GST son específicos de cada tejido y para comprender el papel que desempeñan con resistencia, es necesario determinar del patrón de expresión de la isoforma y las especificidades de sustrato de cada isoforma (Salinas & Wong, 1999). El papel de las GSTs en la resistencia en insectos es el de la desintoxicación de insecticidas de tipo organofosforados y DDT mediante una reacción de conjugación y catálisis respectivamente (Lumjuan et al., 2007).

Las oxidadasas son enzimas que catalizan una reacción de oxidación/reducción empleando oxígeno molecular (O_2) como aceptor de electrones. En estas reacciones el oxígeno se reduce a agua (H_2O) o a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Brogdon & McAllister, 1998). Las oxidadasas son una subclase de las oxidorreductasas y a su vez existen muchas clases de oxidadasas en el organismo. El aldehído oxidada, por ejemplo, está involucrado en el metabolismo oxidativo de xenobióticos y en la reducción de nitrosaminas, ácidos

hidroxámicos, N-óxidos, hidrocarburos aromáticos nitropolicíclicos, colorantes azo y sulfóxidos. Por otro lado, el citocromo P450 es una superfamilia de hemoproteínas (también conocidas como monooxigenasas, oxidasas de función mixta) responsables del metabolismo oxidativo de una amplia variedad de componentes exógenos (alcoquímicos vegetales, promutágenos e insecticidas) y endógenos (hormonas juveniles, ecdiesteroides, feromonas) del metabolismo. También se ha encontrado resistencia mediada por P450 para casi todas las clases de insecticidas, principalmente piretroides, organoclorados y reguladores de crecimiento (Fonseca & Quiñones, 2005; Brogdon & McAllister, 1998).

La activación de P450 está mediada por dos mecanismos genéticos: por cambios estructurales en P450s específicos o por niveles elevados de expresión de P450s. Así mismo algunas mutaciones puntuales dentro de genes estructurales P450 pueden resultar en actividades catalíticas incrementadas o alta afinidad por el insecticida. Algunos estudios han registrado sobre-expresión constitutiva (CYP6G1, CYP12D1) e inducción post exposición a DDT (CYP12D1) en cepas de insectos resistentes, pero en pocos casos se ha establecido conexión definitiva entre la expresión elevada de un gen P450 específico y el desarrollo de resistencia (Fonseca & Quiñones, 2005).

Las esterasas son enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis (esterasas de fase I) de ésteres carboxílicos (carboxilesterasas), amidas (amidases), ésteres de fosfato (fosfatasas), entre otras. Las carboxil esterasas catalizan la hidrólisis de ésteres carboxílicos y se asocian como primer mecanismo de resistencia a organofosforados, carbamatos y piretroides. Se han encontrado niveles elevados de esterasas inespecíficas en el 90% de los casos de tolerancia a insecticidas y en más de 30 especies de insectos resistentes (Hemingway J. , 2000; Fonseca & Quiñones, 2005).

Las esterasas secuestran el insecticida antes que llegue a su sitio de acción, sin embargo, de acuerdo a la estequiometría de la reacción, se requieren altas cantidades de enzima para el desarrollo de resistencia. Algunos de los genes asociados en la expresión y sobreexpresión de estas enzimas forman parte del cromosoma 3 (en Dípteros) y se han usado como marcadores moleculares de resistencia, por ejemplo, los genes *est a1'* y *est b2'* y *est b3'* (Vaughan et al., 1997).

Finalmente, en la resistencia del comportamiento, la población de mosquitos conserva su susceptibilidad intrínseca al insecticida, pero cambia su comportamiento para evitar el contacto con el insecticida (Forattini O. , 1962; Forattini O. , 1965a). Este tipo de resistencia se ha visto más en vectores de malaria, donde algunas especies de *Anopheles* modulan su comportamiento de picadura para evitar el contacto con el insecticida, en *Aedes* es poco usual (Kongmee et al., 2004).

Tipos de resistencia

Resistencia cruzada

La resistencia cruzada ocurre cuando un solo gen confiere resistencia a un número de químicos del mismo grupo. Otra definición dice que los individuos de una especie utilizan mecanismos de detoxificación similar para compuestos que a nivel químico son muy relacionados (Figura 12) (Metcalf, 1989). Por ejemplo el caso de fosfotriesterasas que proporcionan resistencia a muchos organofosforados. También se encuentra el caso del gen *kdr* que confiere resistencia a DDT y piretroides, y en regiones donde se ha presionado durante muchos años con DDT, se ha encontrado resistencia tanto en DDT como en piretroides, ya que se han fijado los genes “resistentes” en las poblaciones (WHO: Committee on insecticides, 1957; Metcalf, 1989). En Colombia el fenómeno de resistencia cruzada mediada por *kdr* no ha sido estudiado ampliamente, aun conociendo que hay resistencia generalizada al DDT (Maestre-Serrano, 2012).

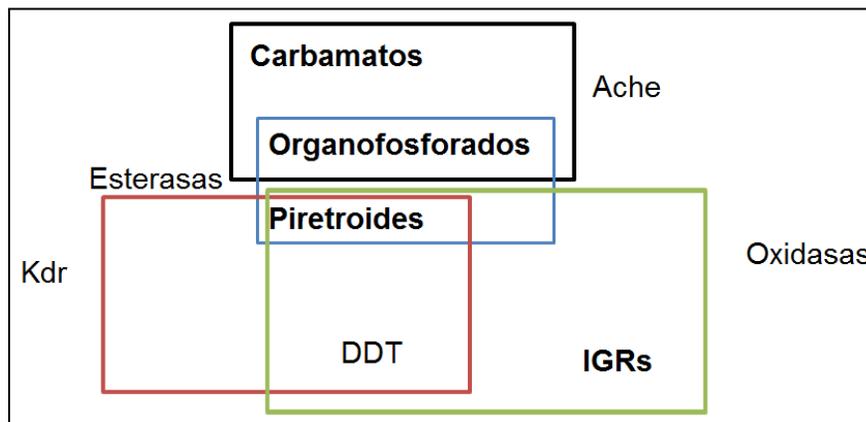


Figura 12. Resistencia cruzada de los diferentes insecticidas, adaptado de (Brogdon & McAllister, 1998).

Resistencia múltiple

Ocurre cuando dos o más mecanismos involucrados con resistencia están operando en el mismo insecto. Sin embargo no está necesariamente relacionado con resistencia cruzada, ya que un insecto puede ser resistente a 2 o más insecticidas con diferentes mecanismos (Maestre-Serrano, 2012; Metcalf, 1989).

Sinergistas

Son sustancias químicas que tienen función cooperativa con los insecticidas. Teniendo en cuenta que algunos de los mecanismos antagonistas más importantes sobre los insecticidas son las enzimas detoxificantes, los sinergistas inhiben, precisamente este tipo de enzimas (Maestre-Serrano, 2012). La S, S, S-tributilfosforotioato (DEF) es inhibidor de esterasas y de la GST, el fosfato de trifenilo (TFF) inhibidor de esterasas específicas, el butóxido de

piperonilo (PB), inhibidor de monooxigenasas y el ácido etacrínico (EA), inhibidor específico de la GST (Maestre-Serrano, 2012; Rodríguez , 2008).

Métodos para determinar resistencia

Existen diferentes ensayos para determinar si las poblaciones de mosquitos son resistentes o susceptibles a los diferentes tipos de insecticidas. Los métodos consisten en exponer a una población de insectos al insecticida y medir mortalidad, actividad enzimática o presencia de mutaciones que confieren resistencia. Si se quiere observar mortalidad en función del tiempo y concentración de insecticida, la metodología usada es la propuesta por el CDC u OMS (Brogdon & McAllister, 1998). Si lo que se quiere es determinar resistencia metabólica, éste ensayo se realiza a través de ensayos bioquímicos en los cuales se cuantifica actividad enzimática asociada a enzimas detoxificantes de insecticidas (Valle et al., 2006).

Finamente, para identificar alelos mutantes sobre los canales de sodio o sitios blanco del insecticida que puedan conferir resistencia se han desarrollado PCRs alelo específicas para determinar la presencia de genes con mutaciones puntuales asociados con modificación del sitio diana del insecticida (Saavedra-Rodriguez et al., 2007).

Algunos de los índices para establecer resistencia son concentración diagnóstica, concentración letal (LC50 o CL95), factor de resistencia. La LC50 o CL 50 es la concentración letal que provoca el 50% de mortalidad, mientras que la CL95 es la concentración letal que provoca el 95% de mortalidad (Leyva et al., 2008), en piretroides se conoce como KC_{50} haciendo referencia al efecto de caída. A su vez e factor de resistencia 50 es un índice en el cual se divide la CL50 de la cepa de campo sobre la CL50 de la cepa susceptible o cepa Rockefeller (Rodriguez & Magdalena, 2011).

Ensayos biológicos de la OMS

En mosquitos adultos la metodología consiste en exponer los individuos de las poblaciones a evaluar con papeles impregnados con una dos única y determinada de insecticida durante un tiempo específico. Usualmente el tiempo de exposición requerido es de 1 hora, con excepción del organofosforado fenitrotión, el cual es de 2 horas. Posteriormente, los mosquitos son transferidos a un papel sin impregnar (bajo condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y solución azucarada como fuente de alimento). Las lecturas de mortalidad se realizan después de 24 horas de exposición al insecticida (figura 13) (WHO., 1981a).



Figura 13. Ensayo biológico de la organización mundial de salud para insectos adultos (OMS). Tomado de (Maestre-Serrano, 2012).

Si se quiere determinar susceptibilidad en estadios inmaduros del insecto, en las larvas (L3 tardío o L4) se mide mediante la exposición de los individuos a una concentración diagnóstico o varias concentraciones de temefos para estimar la concentración letal (LC50 o CL95) y calcular el factor de resistencia, se usa agua como disolvente (Figura 14).



Figura 14. Ensayo biológico de la OMS en larvas (WHO), tomado de (Maestre-Serrano, 2012).

Los individuos expuestos en el ensayo continúan expuestos durante 24 horas (Santacoloma, 2008; World Health Organization, 1981b).

Ensayos biológicos del centro de control y prevención (CDC)

La metodología de botellas impregnadas fue estandarizada por el CDC (Brogdon & McAllister, 1998) para estimar resistencia en mosquitos de interés en salud pública, en el protocolo está diseñado principalmente para *Anopheles* y *Aedes* (Brogdon & McAllister, 1998). El objetivo de la técnica es medir el tiempo que tarda la dosis de un insecticida en alcanzar el sitio blanco en el mosquito, ya sean los canales de sodio, receptores GABA o acetilcolinesterasa (Brogdon & McAllister, 1998). En esta técnica se someten entre 15 y 25 mosquitos de una población de campo (o una población a evaluar) en una botella previamente impregnada con una dosis de insecticida (figura 15). Posteriormente se hacen lecturas de mortalidad a un tiempo determinado, si son menores a 90% se puede comenzar a presumir resistencia (Brogdon & McAllister, 1998).



Figura 15. Ensayo de botellas impregnadas del CDC, fuente: Propia.

Ensayos bioquímicos

Esta técnica se usa para determinar los mecanismos metabólicos que pueden estar confiriendo resistencia fisiológica en una población de insectos (Valle, et al 2006). En el ensayo se puede determinar la disminución de la sensibilidad de las enzimas diana y el aumento de la actividad enzimática. Para estimar el primer mecanismo, se mide el cambio en la acetilcolinesterasa asociada con resistencia a carbamatos y organofosfatos. Para el segundo, se evalúa el aumento de la actividad de esterasas, oxidasas de función mixta y

glutathion s-transferasas por secuestro o aumento de la desintoxicación de los insecticidas (Santacoloma, 2008; Maestre-Serrano, 2012).

Ensayos Moleculares

Consisten en la amplificación de genes o, fragmentos de genes a través de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar alteraciones o mutaciones puntuales dentro del genoma de los insectos que puedan conferir resistencia, por ejemplo, *knockdown resistance (kdr)* o *modification of acetylcholinesterase (MACE)*.

En *Ae. aegypti* se han desarrollado ensayos basados en la amplificación de distintos segmentos del gen del canal de sodio dependiente de voltaje (NaV) o de todo el gen, con el fin de determinar e identificar las mutaciones asociadas con resistencia a piretroides. Los ensayos de PCR basados en la amplificación de parte del gen, tienen como objetivo flanquear la sección entre el exón 20 y 21, ya que estas regiones son las que usualmente contemplan polimorfismos asociados con resistencia (Saavedra-Rodriguez et al., 2007; Rajatileka et al., 2008).

Para flanquear la región correspondiente a los exones polimórficos, actualmente existen diferentes ensayos basados en reacción en cadena de la polimerasa: PCR en tiempo real, PCR RT, High resolution melt, PCR múltiple, Heated oligonucleotide ligation assay y PCR alelo-específico. La PCR en tiempo real y en alguna medida la High resolution melt son metodologías con resultados de alta resolución, ya que mediante estas técnica se puede estimar la cantidad de copias de la región flanqueada ó encontrar los aminoácidos asociados con resistencia, sin embargo requiere de equipos especializados, reactivos adicionales a los de la PCR convencional y algunos protocolos que usan *pre-mix* (premezcla de PCR) no contemplan la calibración de las sales (por ejemplo el cofactor) durante la amplificación (Crampton et al., 1997; Inniset al., 2012).

La PCR convencional incluye diferentes técnicas: la amplificación alelo-especifica, la amplificación con retrotranscriptasa (PCR-RT) ó la PCR multiplex. La PCR alelo –especifica implica el uso de cebadores que flanquean de manera específica los alelos mutantes y los alelos silvestres, la PCR RT amplifica el transcrito del gen NaV y la PCR multiplex puede amplificar distintos alelos al mismo tiempo (Inniset al., 2012). Cada técnica presenta ventajas y desventajas: mediante la PCR multiplex se pueden explorar distintos tipos de mutaciones, pero se pueden encontrar amplicones inespecíficos (Crampton et al., 1997). La RT PCR requiere de un reactivo adicional (la retrotranscriptasa) y de un ensayo adicional de secuenciación para estimar los sitios polimórficos, mientras que en la PCR alelo-específica, los cebadores empalman directamente con los alelos de los exones 20 y 21 silvestres y mutantes (Inniset al., 2012; Saavedra-Rodriguez et al., 2007).

Tabla 1. Métodos moleculares usados para detectar mutaciones *kdr*

Método	Equipos requeridos	Mutación	Referencia
PCR alelo-especifico (AS-PCR)	Termociclador, electroforesis y procesador de imagen	L1014F, V1016	Silva et al., 2014; Saavedra-Rodriguez et al., 2007
PCR RT	Termociclador, electroforesis y procesador de imagen	V1016G	Srisawat & Komalamisra, 2010
High resolution melt (HRM)	Termociclador, máquina de PCR en tiempo real	L1014F/S	Silva et al., 2014; Saavedra-Rodriguez et al., 2007
PCR-RFLP	Termociclador	L1014F/C	Silva et al., 2014
PCR multiplex	Termociclador, electroforesis y procesador de imagen	L1014F	Silva et al., 2014
Heated oligonucleotide ligation assay (HOLA)	Baño termostato, lector ELISA	Ile1011Val Val1016Ile	Rajatileka et al., 2008
PCR, Secuenciación	Maquina para secuenciar, Termociclador	Gen NaV	Saavedra-Rodriguez et al., 2007)

Antecedentes

En Colombia el uso de insecticidas para el control de *Ae. aegypti* inició a finales de 1950 con la aplicación focal del larvicida temefos y el insecticida de acción residual fenitrotión como adulticida junto con aplicación perifocal del DDT, con los que se logró eliminar al vector en 293 localidades de 296 positivas para *Ae. aegypti* en el país (Padilla et al., 2012). Sin embargo, con la reinfestación en Cúcuta con poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes al DDT provenientes de Venezuela (Busvine & Coker, 1958), se obligó a suspender el uso de este insecticida.

En los 1970s se usó el insecticida fenitrotión en las áreas de reinfestación de *Ae. aegypti*, que para la fecha se había extendido en todas las áreas del país con condiciones óptimas para el vector (Padilla et al., 2012). En los 1980s se introdujo al país el adulticida malatión y en los 1990s los piretroides (Padilla et al., 2012). Éstos eran rotados con los otros insecticidas que se venían usando hasta la fecha, con el fin de evitar presión constante con el mismo químico y evitar la resistencia (Maestre-Serrano et al., 2014; Maestre-Serrano, 2012). Actualmente para el control de vectores de dengue en el país, el tratamiento se basa en el uso de insecticidas organofosforados como el larvicida temefos, y malatión, deltametrina o lambdacialotrina (piretroide) como adulticidas (Santacoloma et al., 2012; INS, 2010). Sin embargo, las estrategias dirigidas a controlar la transmisión del dengue mediante el uso de insecticidas han presentado inconvenientes debido al desarrollo de resistencia como consecuencia de la presión selectiva en diversas poblaciones de mosquitos (Tonn et al., 1976; Silva et al., 2014).

El primer reporte de resistencia a insecticidas en Colombia se originó en Cúcuta durante los 1960s, fue el primer reporte de resistencia al DDT en mosquitos *Ae. aegypti* del país (Busvine & Coker, 1958). Más recientemente se ha demostrado resistencia generalizada al DDT en la mayor parte del territorio nacional (Fonseca-González et al., 2011; Ocampo et al., 2011; Santacoloma et al., 2010). Posteriormente con el ingreso del larvicida temefos, se documentó por primera vez (en Colombia) resistencia al mismo en los 1990s en la ciudad de Cali (Suárez et al., 1996). Desde entonces se ha registrado resistencia progresivamente al temefos en diferentes ciudades del país, incluyendo Cartagena, Cali, Buga, Ibagué y Neiva (Rey-Vega, 2011; Morales et al., 1998; Ocampo et al., 2011).

En el 2005 con el inicio del proyecto nacional (con participación de la Universidad Nacional, Universidad de Antioquia, CIDEIM y el Instituto Nacional de Salud) para determinar la línea base de la susceptibilidad de las poblaciones de *Ae. aegypti* en Colombia, se documentó la resistencia de *Ae. aegypti* en la mayor parte del país, mediante la evaluación de dosis diagnosticas en piretroides (lambdacialotrina, deltametrina, permetrina, ciflutrina, etodénprox) organofosforados (fenitrotión, malatión), organoclorados (DDT), y carbamatos (propoxur, bendiocarb) en adultos y el organofosforado Temefos en larvas (Santacoloma et al., 2010; Maestre-Serrano et al., 2014). En este proyecto se encontró que había resistencia a Temefos (dosis 0.014 ppm – 0.012 ppm) en algunas poblaciones de Quibdó, Chocó en Norte de Santander, Cúcuta, Putumayo, Huila, Nariño, Cauca, Villavicencio, Valle y Cundinamarca.

En el mismo macroproyecto, con las metodologías del CDC y la OMS a nivel de adulticidas se encontró resistencia al organoclorado DDT, el carbamato bendiocarb y el piretroide etofenprox en Blanquizal, santa fe la Playa y Oasis (Antioquia) y al organofosforado fenitrotión solo se encontró resistencia en Santafé la playa (Rey-Vega, 2011).

Posteriormente en el departamento de Cundinamarca, en los municipios de La Mesa (zona 1) se encontraron poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes a temefos con mortalidades de 23% y 48% - 54% respectivamente, La resistencia encontrada en la Mesa 1 estaba mediada por alteración en las β esterasas y AchE modificada (Rey-Vega, 2011).

Por su parte Santacoloma en el 2010 encontró resistencia a piretroides en las poblaciones de la Mesa Cundinamarca sector 1 con mortalidades de 13% (OMS) y 70% (CDC) con lambdacialotrina y 73,5 % (OMS) y 89,3% (CDC) con deltametrina. En el sector 2 de la Mesa también encontró resistencia a lambdacialotrina (mortalidades de 85,1% con OMS y 88,3% con CDC) pero no a deltametrina. También evaluó el sector 17 de Bucaramanga, allí encontró resistencia a deltametrina y lambdacialotrina con mortalidades de 24,1% y 57,2% mediante ensayos de la OMS, con la metodología del CDC encontró resistencia solo a lambdacialotrina con mortalidades de 45,8%. Todas las poblaciones de Cundinamarca y Santander evaluadas en el trabajo, fueron altamente resistentes al DDT con mortalidades de entre 0% y 17,1%. Además, encontró actividad enzimática elevada asociada con esterasas en Bucaramanga y la Mesa 1 (Santacoloma et al., 2010), sin embargo, no se encontró actividad elevada de glutatión S-transferasas ni de oxidasas (la cual está relacionada con resistencia al DDT y piretroides respectivamente). En el estudio no se evaluó resistencia *kdr*.

El único registro en el país acerca de resistencia *kdr*, fue el realizado por Maestre y colaboradores en el 2014, donde encontró la mutación Ile1016 en todas las poblaciones evaluadas de la región Caribe (Barranquilla, Puerto Colombia, Soledad, Valledupar, San Juan del Cesar, Sincelejo, Montería, Ciénaga y Cartagena) con una frecuencia alélica de entre 0.07 a 0.35, y homocigotos mutantes resistentes en 6 de 9 poblaciones (Maestre-Serrano et al., 2014). Sin embargo, se ha observado que la sustitución 1016 Ile *kdr* puede estar presente junto con la sustitución 1534 Cys en poblaciones naturales de *Ae. aegypti* (Linss et al., 2014). En Brasil ambas mutaciones se encontraron circulando con frecuencias genotípicas de hasta 0.9 (Linss et al., 2014), estos resultados también fueron similares en Gran Caimán y Martinica (Harris et al., 2010; Marcombe et al., 2012).

Planteamiento del problema y Justificación

En Colombia el uso de insecticidas se ha implementado como la principal estrategia para interrumpir la transmisión de dengue y más recientemente del chikungunya (INS, 2010). Actualmente se usa el larvicida temefos en el control entomológico rutinario de los estadios inmaduros de *Ae. aegypti* y el adulticida malatión o algunos piretroides como la deltametrina y lambdacialotrina en eventos de brotes o cuando el control de criaderos no es suficiente (INS, 2010), con el fin de reducir las densidades del vector.

Sin embargo, por la constante presión selectiva de los insecticidas en las poblaciones de *Ae. aegypti* se ha encontrado resistencia a algunos de los insecticidas empleados en salud pública: se ha reportado resistencia al larvicida temefós en gran parte del territorio nacional (Rey-Vega, 2011; Morales et al., 1998; Ocampo et al., 2011) y a adulticidas de tipo piretroides (Santacoloma, 2008; Santacoloma, 2010; Rey-Vega, 2011) condicionando el control de adultos al uso del organofosforado malatión (al cuál no se ha reportado resistencia) (Santacoloma, 2012). Sin embargo, la limitación al uso de malatión puede traer serios inconvenientes, dado que la presión selectiva y constante con el mismo tipo de insecticida puede conllevar a eventos de resistencia, sin contar con el hecho de que malatión en algunos sitios no es aceptado por la comunidad por su fuerte olor y su carácter corrosivo sobre metales (CDC, Malathion 2010).

Con el fin de evitar este tipo de barreras en el control vectorial, es necesario conocer los mecanismos de resistencia, así, si la resistencia a uno o más insecticidas está mediada por enzimas detoxificantes o por alteración del sitio blanco, se puede direccionar el uso de los insecticidas de tal manera que el mecanismo de resistencia presente en la población de vectores, no afecte el nuevo producto a utilizar.

De esta manera es práctico conocer los mecanismos que confieren resistencia a piretroides y DDT en poblaciones donde se ha reportado pérdida de la susceptibilidad (aunque actualmente no se usa el DDT en el control de *Ae. aegypti*, se ha documentado resistencia a éste insecticida en todo el país, este evento es importante dado que la resistencia a DDT puede también estar relacionada con resistencia a piretroides mediante el mecanismo *kdr*). En el presente estudio se va a determinar si la resistencia a piretroides y al DDT está mediada por mecanismos enzimáticos (bioquímicos) o por resistencia *kdr* en los departamentos de Cundinamarca y Santander, en los cuales se ha reportado resistencia previamente a éstos insecticidas.

Actualmente solo existe un trabajo asociado *kdr* en poblaciones de *Ae. aegypti* con antecedentes de resistencia al DDT y piretroides en la región Caribe (Maestre et al., 2014), por lo tanto, se desconoce si la resistencia al DDT, deltametrina y lambdacialotrina en los departamentos de Cundinamarca y Santander está mediada por genes *kdr* resistentes.

En un trabajo reciente realizado en Brazil, se encontró que pueden existir varios alelos resistentes en la misma población de *Ae. aegypti*, favoreciendo la rápida diseminación de la resistencia a lo largo de las poblaciones cercanas (Linss et al., 2014), además en otro

ensayo de entrecruzamiento y genética de poblaciones se reveló que al cruzar cepas *kdr* resistentes con la cepa rockefeller susceptible, luego de 8 generaciones, las poblaciones susceptibles se volvían altamente resistentes a piretroides (Brito et al., 2013). En el mismo trabajo de Brito y colaboradores, se estableció que el costo en la sobrevivencia de las mutaciones *kdr* es muy alto, llegando a modular el comportamiento de los adultos de *Ae. aegypti* (Brito et al., 2013).

Por lo tanto, conocer la circulación de los alelos *kdr* es útil en el direccionamiento de las medidas de control, ya que tiene consecuencias contraproducentes en el en los programas que usan insecticidas piretroides para reducir las densidades de mosquitos (Saavedra-Rodriguez et al., 2007).

Con este estudio se respondió la pregunta: ¿La resistencia a DDT y piretroides en las poblaciones naturales de *Ae. aegypti* de Cundinamarca y Santander está mediada por mecanismos enzimáticos o por *kdr*?, A su vez se logró conocer la frecuencia de las mutaciones *kdr* Ile1016 y Cys1534 en regiones donde no se ha explorado este mecanismo de resistencia.

Metodología:

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en los departamentos de Cundinamarca y Santander en barrios de Bucaramanga (Santander) del sector 17 y La Mesa sectores 1 y 2 (Cundinamarca) donde previamente se ha reportado resistencia a piretroides y DDT (Santacoloma et al., 2010).

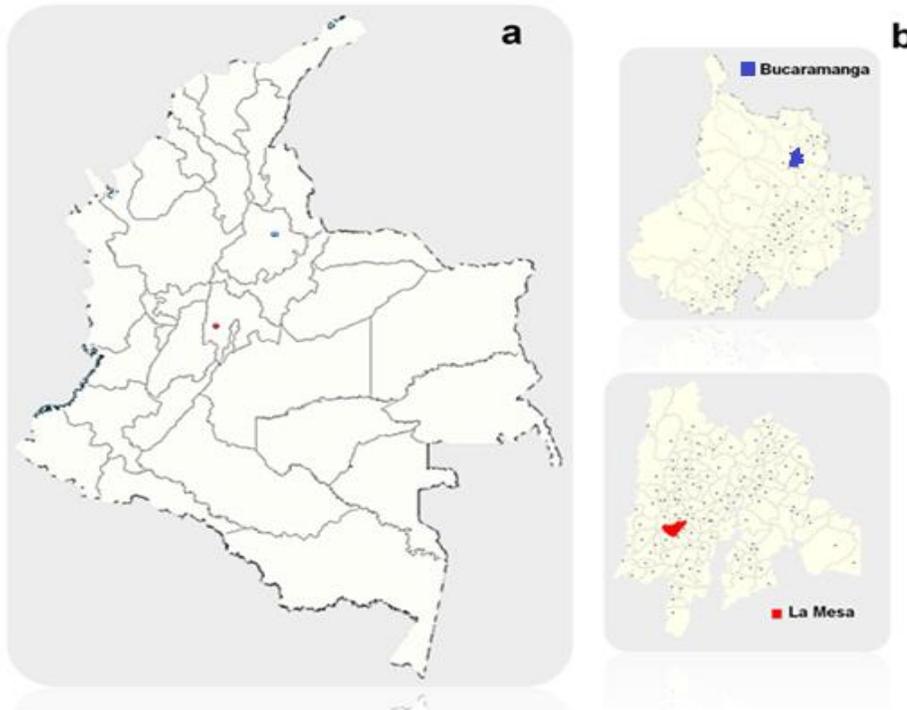


Figura 16. Sitios de muestreo del presente estudio: **a.** En el mapa de Colombia en Cundinamarca con el punto rojo La Mesa, y en Santander con el punto azul: Bucaramanga y **b.** En la parte superior el departamento de Santander, ubicando en azul el municipio de Bucaramanga, en la parte inferior el departamento de Cundinamarca ubicando en rojo el municipio de La Mesa. Editado del IGAC.

Material Entomológico

Se recolectaron formas inmaduras de *Ae. aegypti* en los dos departamentos evaluados, en viviendas seleccionadas de manera aleatoria en los barrios Estoraques y Mutis (Bucaramanga), Villas del Nuevo Siglo y Centro (La Mesa). Se realizó inspección de criaderos de *Ae. aegypti*, incluyendo canecas, llantas, bebederos animales, tanques bajos, floreros, etc. De allí se llevaron al laboratorio de Entomología Médica de la Universidad Nacional donde se obtuvieron generaciones filiales F1 y F2 en condiciones de laboratorio: $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4$ de temperatura, 70 – 75 % de humedad y un fotoperíodo de 12:12 horas, para sus posteriores ensayos biológicos, bioquímicos y moleculares.

Cien hembras de la primera generación (F1) con dos días de vida se almacenaron a – 70 °C, con éste material se determinaron mecanismos de resistencia enzimáticos y moleculares (*kdr*), las hembras de la segunda y primera generación sirvieron para realizar los ensayos biológicos para la determinación de la susceptibilidad a los insecticidas evaluados.

Ensayos Biológicos, Bioquímicos y Moleculares

Los ensayos biológicos, bioquímicos y moleculares, se llevaron a cabo de acuerdo a lo descrito por el CDC, Valle y colaboradores (2006), Saavedra y colaboradores (2007) y Maestre y colaboradores (2014) respectivamente.

Ensayos Biológicos de botellas impregnadas del CDC

Los ensayos biológicos se realizaron siguiendo la metodología del CDC (CDC, 2012), la cual utiliza botellas de vidrio impregnadas con las dosis diagnóstico de cada insecticida (12.5 µg/botella para piretroides y 75 µg/botella para DDT de acuerdo al CDC y 6,25 µg/botella para piretroides y 150 µg/botella para DDT de acuerdo a lo reportado para Colombia por Fonseca-Gonzales y Santacoloma en el 2008), para estimar la resistencia en mosquitos. En cada botella se expusieron a la dosis diagnóstica de cada insecticida durante una hora entre 15 a 25 hembras de 3-5 días post-emergencia sin alimentar con fuente sanguínea. Las pruebas se interpretaron con la proporción de mosquitos caídos al tiempo diagnóstico, el cual para piretroides fue de 30 minutos y DDT de 30/45 minutos, utilizando las concentraciones diagnósticas para Colombia y CDC.

Los criterios de mortalidad fueron: mosquitos con síntomas de intoxicación tales como incapacidad de volar o de pararse después de caer sobre el dorso. Los resultados se expresaron en gráficas de mortalidad en función de tiempo por concentración de insecticida y en grados de resistencia usando la KC_{50} (dosis Knockdown 50) de las poblaciones de campo y de la cepa susceptible Rockefeller: así los grados de resistencia se obtuvieron al dividir la KC_{50} de la cepa de campo sobre la KC_{50} de la cepa de referencia Rockefeller y las dosis letales y knockdown 50 mediante el software Biostat versión 5.9.8 con un análisis de regresión Probit.

Ensayos Bioquímicos para cuantificar la actividad enzimática

Se realizaron ensayos bioquímicos para determinar si había actividad enzimática elevada de las enzimas detoxificantes: Acetilcolinesterasa, esterasas α y β , PNPA esterasas, monooxigenasas (MFO) y glutatión-S-transferasas (GST). Consistieron en medir las densidades ópticas a longitudes de onda predeterminadas de cada enzima-sustrato en mosquitos individuales de campo. Para determinar el incremento en el nivel de las enzimas, se establecieron puntos de corte usando la cepa de referencia Rockefeller de *Ae. aegypti*, los promedios de los valores de absorbancia obtenidos de las poblaciones de campo, iguales o superiores a este valor, se consideraron como normales, en tanto que los valores superiores se asumieron como incrementos en el nivel de enzimas (Valle et.al, 2006).

En los ensayos de acetilcolinesterasa (ACE) se utilizó acetiltiocolina yodada y propoxur como inhibidor en presencia de un revelador. En el ensayo de β esterasas (β -EST) se utilizó β -naftol como control positivo y un sustrato de β -naftil, junto con el revelador *fast blue*, la lectura se hizo a 570nm. Para el ensayo de las esterasas PNPA (PNPA-EST) se utilizó el sustrato PNPA/Na fosfato, la lectura se hizo a 405 nm. Por su parte el ensayo de glutatión s-transferasas (GST) incluyó una solución sustrato de GSH/CDNB y la lectura se hizo a 340 nm. El ensayo de las oxidasas de función mixta (p450 monooxigenasas MFO) tuvo como sustrato y reactivos: buffer fosfato KI, TMBZ/Na acet y H₂O₂, el control positivo fue citocromo C y la lectura se hizo a 650 nm. El ensayo de Bradford (PTN) sirvió para estimar proteínas totales, donde se usó BSA como control y reactivo Bio-Rad de sustrato, la lectura se hizo a 620 nm. Se realizó una curva de calibración con el BSA, mediante diluciones seriadas en factor de 2, con el fin de estimar la cantidad de proteína presente (Valle et al, 2006).

ENZYME	sample vol (μ l)	n° replicate	λ (Abs)	t lecture (minutes)
EST alpha	10	2	570	15
EST beta	10	2	570	15
PNPA-EST	10	2	405	2
GST	15	2	340	20
MFO	20	2	650	90
ACE	25 (x 2)	2	405	60
PTN	10	2	620	5

Figura 17. Volumen, réplicas, tiempo de lectura y absorbancia para cada bioensayo enzimático

Con el fin de expresar los valores como actividad enzimática, se corrigieron los datos obtenidos de absorbancia de la siguiente manera: teniendo en cuenta el volumen de homogenizado del mosquito, la cantidad de proteínas totales en cada mosquito (mediante ensayo de Bradford), la unidad de actividad enzimática de cada enzima para la conversión de los valores de absorbancia de acuerdo a la guía de Valle y colaboradores (Valle et al, 2006).

Genotipificación de alelos silvestres y mutantes (*kdr*) en las posiciones 1016 y 1534

Para la detección de las mutaciones *kdr* se realizó una amplificación usando una PCR del gen de canal de sodio dependiente de voltaje. Se emplearon los *primers* alelo-específicos para los exones 20 y 21, donde se encuentran las mutaciones (VAL1016, GLI1016):

Inicialmente se realizó extracción de ADN total de mosquitos individuales mediante el protocolo de Qiagen (adaptado para insectos: Purification of total DNA from insects using the DNeasy® Blood & Tissue Kit) el cuál usa columnas de filtro afines al ADN. El tiempo de

incubación con proteinasa- buffer de extracción fué de 10 minutos a 56°C, y la purificación con buffers afines a los reactivos diferentes al eluyente y el ADN, tales como la hidroxiapatita, el SDS, sales, entre otros. La elución final se hizo con Buffer de elución AE a 8000 rpm durante 1 min. Posteriormente se cuantificó en nanodrop el DNA extraído (como control de calidad), y se tuvo un estimado de la cantidad de ADN y sales que pudieran interferir en la amplificación por PCR.

Para amplificar las secuencias de los exones 20 y 21 se usaron los sets de *primers* V1016lf, V1016Vf y V1016r y los sets de *primers* Cys1534, Phe1534 y 1534. La mezcla de PCR para la mutación Ile1016 tuvo un volumen final de 25 µL, los cuales incluyeron 10 picomole de cada primer, Taq Mastermix 1X (Promega o Fermentas), buffer PCR (10 mM Tris – HCL pH 8.4, 50mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 1 mM de cada dNTP (Promega o Fermentas) y 200 ng ADN extraído. Mientras que para evaluar la mutación Cys1534, se utilizó una mezcla de PCR de 20 uL de volumen final con 9.53 uL de agua milli-Q, 0.066 uL del *primer* Cys1534 y 0.20 de los *primers* 1534 y Phe1534 a 100 uM, Master mix 2X y 1 uL de ADN extraído (>30ng/uL) (Yanola et al., 2011).

Primers:

Ile f V1016lf (kdr)
GCG GGC ACA ATT GTT TCC CAC CCG CAC TGA
Val: V1016vf (silvestre)
CGG GCA GGG CGG CGG GGG CGG GGC CAC AAA TTG TTT CCC ACC CGC ACC GG
V1016r
G GAT GAA CCG AAA TTG GAC AAA AGC
Cys1534 (kdr)
GCGGGCAGGGCGGGCGGGGGCGGGGCCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATGT G
Phe1534 (silvestre)
GCGGGCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATAT T
1534r
TCTGCTCGTTGAAGTTGTCGAT

Para la amplificación de la mutación Ile1016 se utilizó el perfil térmico: ciclo inicial de 95°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min, y 72°C por 2 min, con una extensión final de 72°C por 10 min:

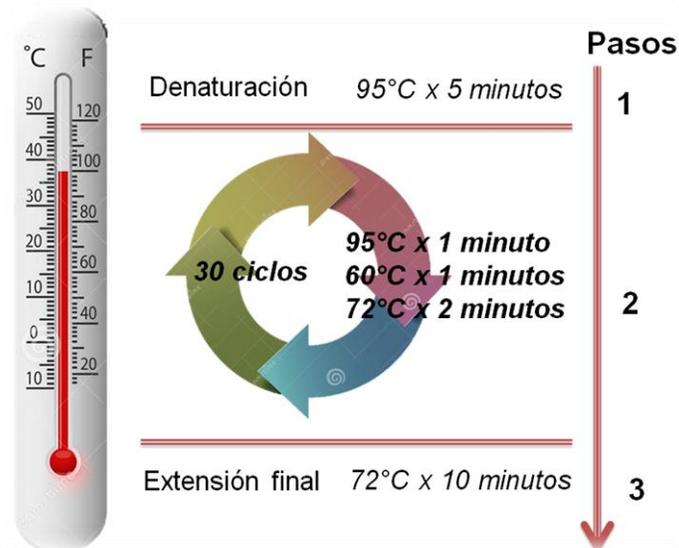


Figura 18. Perfil térmico para la amplificación del gen *kdr*

Mientras que para la mutación Cys1534 el perfil térmico fue: ciclo inicial 95°C por 3 minutos seguido por 39 ciclos de 95°C por 10 segundos, 57°C por 10 segundos y 72°C por 30 segundos, con un ciclo final de 95°C por 10 segundos, con una variación en el anillamiento de acuerdo a las características del *primer*.

Para cada metodología se corrieron simultáneamente los controles susceptibles, que fueron especímenes de la cepa de referencia Rockefeller, del Laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Medicina, los controles positivos fueron proporcionados por el Doctor Ronald Maestre de la Universidad Simón Bolívar.

Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 3%, corriendo los amplicones a 90 V por 1:45 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1mg/mL).

En el análisis de resultados, los amplicones de 93 y 113 pb correspondieron a los alelos 1534 Phe (*Phe+1534/Phe1534* genotipo silvestre) y 1534 Cys (*Cys^{kdr}1534/Cys1534* genotipo mutante) respectivamente. Mientras que una banda de 78 pb correspondió al genotipo Ile1016/Ile1016 (homocigoto *kdr*), dos bandas, una en 98 y otra en 78 fue el genotipo Val1016/Ile1016 (heterocigoto) y una banda en 98 pb correspondió al genotipo Val1016/Val1016 (homocigoto silvestre) (Linss et al., 2014; Saavedra-Rodriguez et al., 2007).

La frecuencia alélica se calculó para cada población de mosquitos, mediante la ecuación $p^2+2pq+q^2=1$ (Hardy, 1908), tomando de ejemplo los genotipos GG, TT y TG donde p= número de homocigotos GG, q = número de homocigotos TT y pq= número de heterocigotos TG, se calculó la frecuencia del alelo GG así:

Frecuencia alelo GG= $1*(\# \text{ heterocigotos TG}) + 2*(\# \text{ homocigotos GG}) / 2*(\text{total de individuos analizados})$. Finalmente se realizó una comparación entre las medias (a través de test paramétricos o no paramétricos) de las frecuencias alélicas y genotípicas para

determinar si había diferencias entre los resultados encontrados en La Mesa y Bucaramanga a través del software Past versión 2.17c. Para relacionar los grados de resistencia con las frecuencias alélicas y genotípicas, se realizó un análisis de correlación de Spearman y un modelo de regresión lineal para observar si la variable grados de resistencia explicaba las frecuencias alélicas y genotípicas.

Consideraciones éticas

Los muestreos de las larvas de los mosquitos se realizaron en las viviendas de los barrios seleccionados por tener antecedentes de resistencia a DDT y piretroides. Se solicitó permiso a los jefes de hogar para el ingreso a sus patios, y acompañamiento mientras se realizaron las colectas. Esta actividad no generó riesgo para las familias.

El proyecto se sometió al comité de ética de la Facultad de Medicina para su aprobación y ejecución en la Universidad Nacional de Colombia.

Resultados

Colecta de material entomológico:

Se muestrearon en La Mesa los sectores del Centro y Villas del Nuevo Siglo 30 viviendas correspondientes a 49407.13 m² (figura 20) y 30 viviendas correspondientes a 28896.48 m² (figura 19) respectivamente, con acompañamiento de personal de la Secretaria de Salud. El esfuerzo de muestreo fue de 39151,5 m² por 8 horas por persona respectivamente. El levantamiento entomológico de larvas de *Ae. aegypti* se realizó en marzo.



Figura 19. Área de Villas muestreada en el municipio de La Mesa, Cundinamarca, calculada mediante el Google Maps Area Calculator Tool versión 6.6 (Daft Logic Software).

De las recolectas realizadas en la comuna Villas del Nuevo Siglo, se obtuvieron densidades larvales mínimas de 20 larvas por tanque bajo y máximas de hasta 152 larvas por tanque bajo. Los criaderos más productivos fueron las albercas con una positividad de 35/40. Los criaderos menos productivos fueron las cunetas y los tejados. Adicionalmente se observó, que en la comuna había 5 personas con sintomatología de chikungunya.



Figura 20. Área del Centro muestreada en el municipio de La Mesa, Cundinamarca, calculada mediante el Google Maps Area Calculator Tool versión 6.6 (Daft Logic Software).

El levantamiento entomológico de larvas de *Ae. aegypti* en Bucaramanga se realizó en junio del 2015, se muestrearon 90 viviendas en la Comuna Mutis, incluyendo los Barrios Mutis, Estoraques y Concordia, con acompañamiento de personal de la secretaria de Salud de Bucaramanga, para un esfuerzo de muestreo de 192169,77 m² por 8 horas por persona respectivamente.

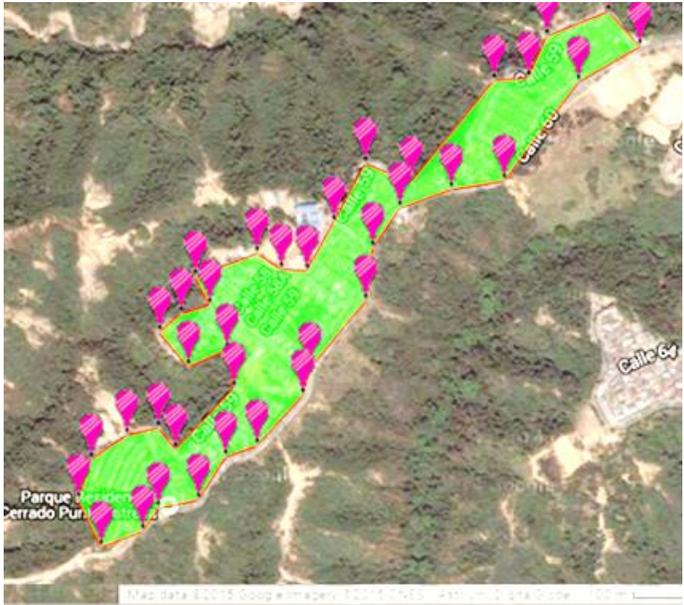


Figura 21. Área de Estoraques muestreada en el municipio de Bucaramanga, Santander, calculada mediante el Google Maps Area Calculator Tool versión 6.6 (Daft Logic Software).

En el barrio Estoraques se muestrearon 142483.37 m² correspondientes a 45 viviendas. En las inspecciones se incluyeron albercas, tanques altos, llantas, floreros y canecas en cada vivienda. Los sitios que presentaron mayor cantidad de criaderos positivos fueron las albercas (45/45).



Figura 22. Criaderos de mayor positividad: Barrio Estoraques, Bucaramanga, Santander

En los Barrios Mutis y Concordia se muestrearon 45 viviendas (correspondientes a 241856.17 m²), allí se inspeccionaron albercas, tanques altos, llantas, floreros, canecas y cunetas de tejado en cada vivienda. Los sitios de mayor positividad fueron las albercas con una tasa de 43 viviendas positivas de 45 muestreadas.

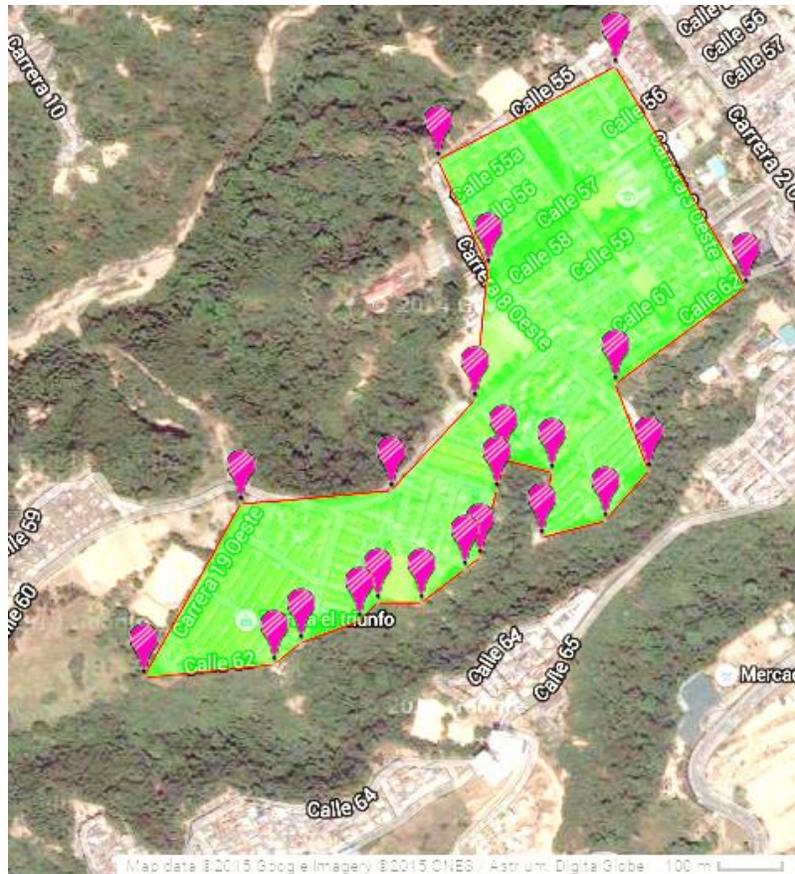


Figura 23. Área de Mutis y Concordia muestreada en el municipio de Bucaramanga, Santander, calculada mediante el Google Maps Area Calculator Tool versión 6.6 (Daft Logic Software).

Mantenimiento de Colonia de *Ae. aegypti* de campo y cepa Rockefeller

A partir de los mosquitos colectados en campo en La Mesa y Bucaramanga (F0) se obtuvieron generaciones filiales F1 y F2. Con la F2 se realizaron los ensayos de botellas impregnadas del CDC para evaluar el estado de resistencia a los insecticidas piretroides lambdacialotrina y deltametrina y al Organoclorado DDT. El número de individuos total probados fue de 4003 adultos: 1013 hembras de *Ae. aegypti* de La Mesa, 1191 hembras de *Ae. aegypti* de Bucaramanga y 1799 mosquitos cepa susceptible Rockefeller. Con la F1 se realizaron los ensayos moleculares y bioquímicos, con los cuales se procesaron 100 individuos de campo por duplicado para la genotipificación y 100 individuos de campo por duplicado para la determinación de actividad enzimática.

Evaluación del estado de la susceptibilidad de *Ae. aegypti* colectado en La Mesa Cundinamarca

Estado de la susceptibilidad al lambdacialotrina

Todos los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo a lo sugerido por el CDC y Brogdon & McAllister. Se evaluó el estado de la susceptibilidad de 144 individuos de *Ae. aegypti* de La Mesa y 151 individuos cepa Rockefeller frente al insecticida piretroide lambdacialotrina concentración 10ug/mL. En promedio la mortalidad de la población de la Mesa fue del 57.01% mientras que la mortalidad en la población control Rockefeller fue del 100% al tiempo diagnóstico de 30 minutos. La humedad relativa promedio fue del 62% y la temperatura promedio fue de 22°C durante los ensayos

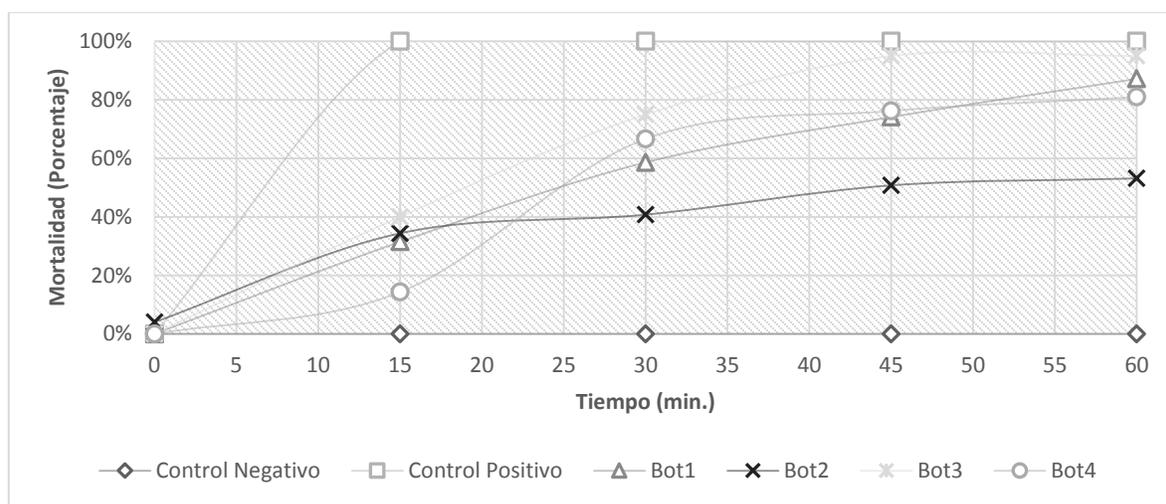


Figura 24. Susceptibilidad de adultos de *Ae. aegypti* de la Mesa expuestos a lambdacialotrina 10ug/mL. Bot 1-4: réplicas, Controles (positivo y negativo): *Ae. aegypti* cepa Rockefeller.

Estado de la susceptibilidad al deltametrina

Se evaluó el estado de la susceptibilidad de 126 individuos de *Ae. aegypti* de La Mesa y 104 individuos cepa Rockefeller (población control) frente al insecticida piretroide deltametrina. En promedio la mortalidad de la población de la Mesa fue del 43.41% mientras que la mortalidad en la población control Rockefeller fue del 100% al tiempo diagnóstico de 30 minutos. La humedad relativa promedio fue del 64% y la temperatura promedio fue de 21,3°C durante los ensayos.

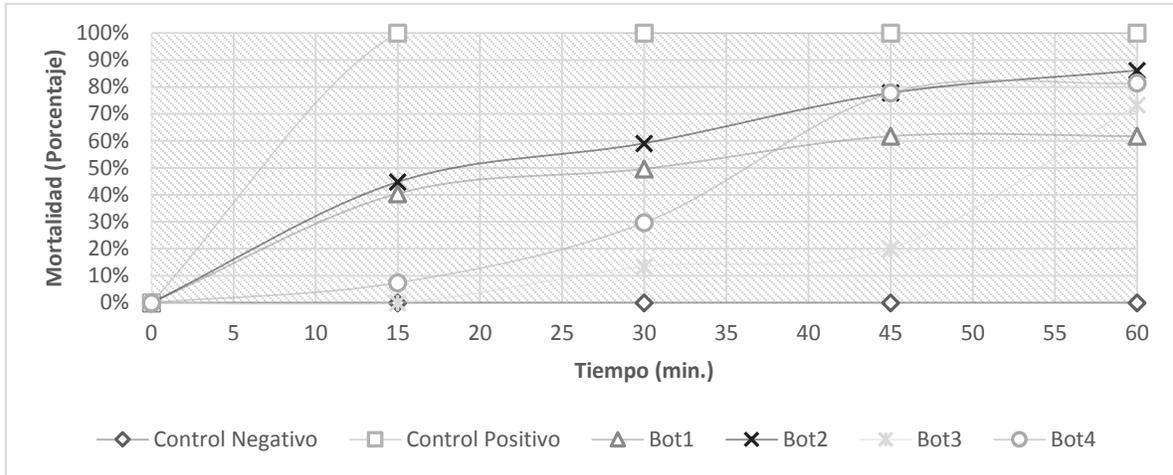


Figura 25. Susceptibilidad de adultos de *Ae. aegypti* de la Mesa expuestos a deltametrina 10 ug/mL. Bot 1-4: réplicas, Controles (positivo y negativo): *Ae. aegypti* cepa Rockefeller.

Estado de la susceptibilidad al DDT

También se evaluó el estado de la susceptibilidad de 191 individuos de *Ae. aegypti* de La Mesa y 134 individuos cepa Rockefeller (población control) frente al insecticida DDT. En promedio la mortalidad de la población de la Mesa fue del 2.52% mientras que la mortalidad en la población control fue del 100% al tiempo diagnóstico de 45 minutos. La humedad relativa promedio fue del 62% y la temperatura promedio fue de 21,3°C durante los ensayos.

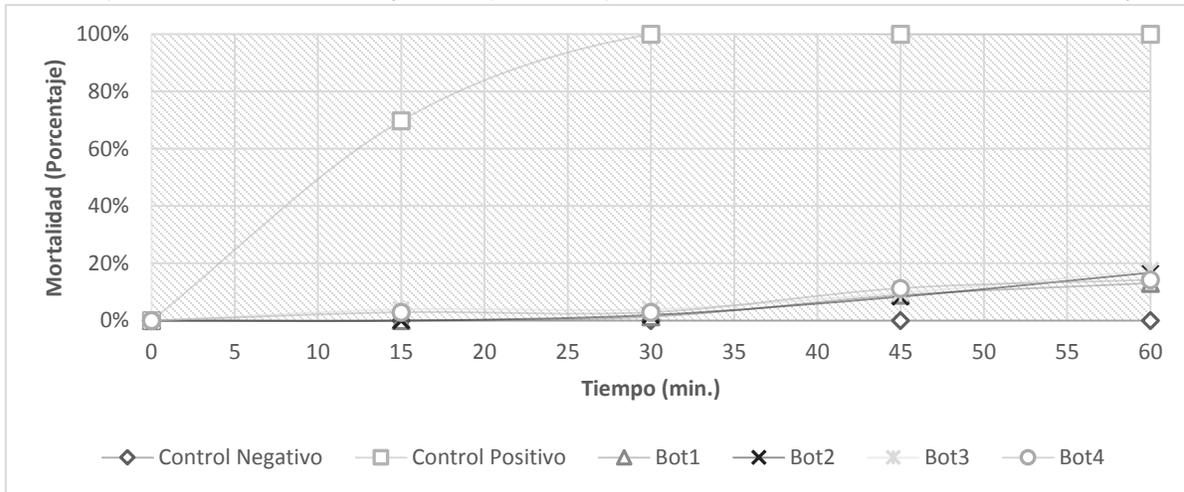


Figura 26. Susceptibilidad de adultos de *Ae. aegypti* de la Mesa expuestos a DDT 150 ug/mL. Bot 1-4: réplicas, Controles (positivo y negativo): *Ae. aegypti* cepa Rockefeller.

Grados de Resistencia de las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Mesa Cundinamarca

Se probaron 5 concentraciones diferentes con dos a tres replicas para cada insecticida: lambdacialotrina, deltametrina y DDT, con estos datos se realizó un análisis probit tanto para las poblaciones de campo como para las susceptibles Rockefeller.

Grados de Resistencia a lambdacialotrina

Se encontró que en las poblaciones de La Mesa la concentración letal 50 (LC 50) fue de 9,09 ug/mL para el insecticida lambdacialotrina al tiempo diagnóstico, (piretroides: 30 minutos).

Tabla 2. Output de los datos estadísticos obtenidos en Biostat V5.8.9. Indicando las LC 50, y la comparación el Chi² entre dos tratamientos de lambdacialotrina a los que se sometieron las poblaciones de la Mesa.

Estadísticos de Regresión		n=297	
LC50		9,097	
β		0,231	
Probit (%)		Diferencia	Chi cuadrado
0,024023908		0,783	0,593
0,115024291		2,053	0,852
0,561744207		0,891	0,0098

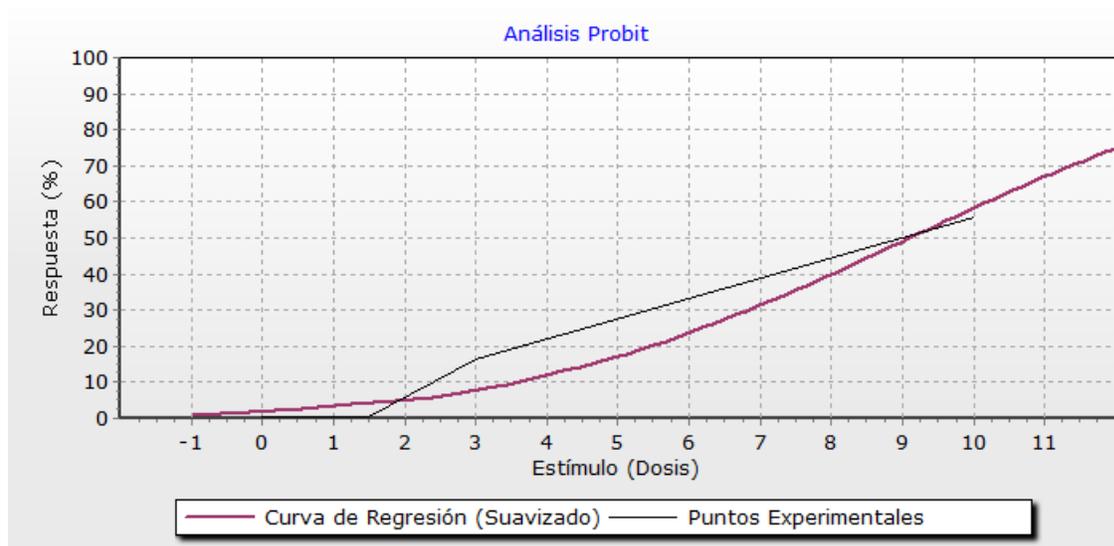


Figura 27. Resultado del Análisis Probit, Respuesta (Mortalidad) en función de dosis de insecticida (estimulo) de las poblaciones de La Mesa expuestas a lambdacialotrina.

En contraste la población susceptible Rockefeller tuvo una LC 50 de 0,48 ug/mL para el piretroide lambdacialotrina.

Tabla 3. Output de los datos estadísticos obtenidos en Biostat V5.8.9. Indicando las LC 50, y la comparación el Chi²entre dos tratamientos de lambdacialotrina a los que se sometieron las poblaciones susceptibles (Rockefeller).

Estadísticos de Regresión		n=613		
LC50	0,4861812			
β	0,30411133			
Porcentaje Actual (%)	Probit (%)	Diferencia	Chi ²	
0,7777	0,777	4,47	9,52	
0,998	0,999	-0,249	0,00047	

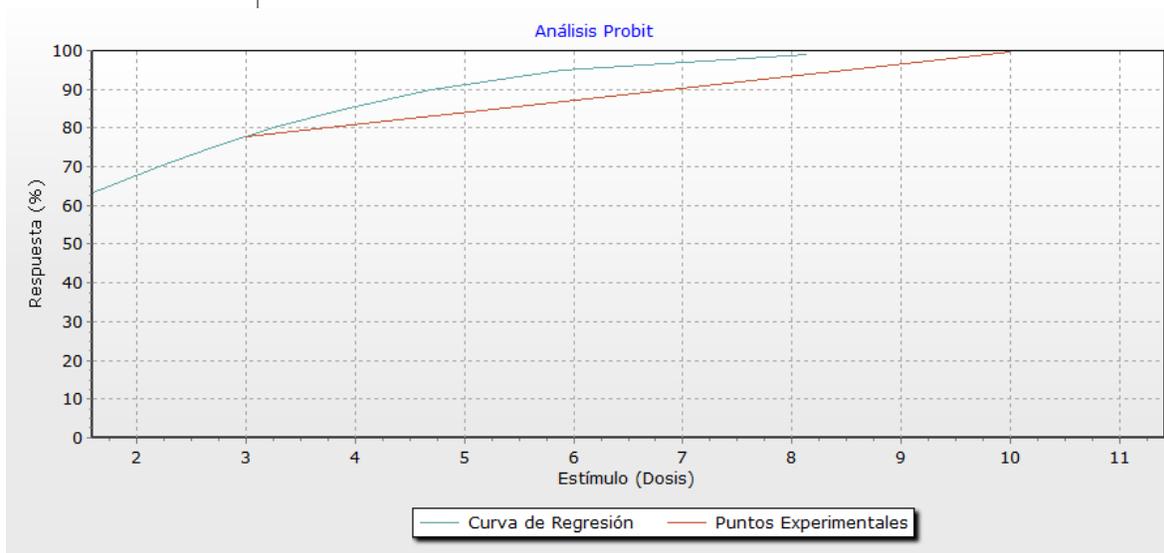


Figura 28. Resultado del Análisis Probit, Respuesta (Mortalidad) en función de dosis de insecticida (estímulo) de las poblaciones susceptibles Rockefeller expuestas a lambdacialotrina

Por lo tanto, los grados de resistencia obtenidos para el insecticida lambdacialotrina al comparar las poblaciones de campo de La Mesa frente a las poblaciones susceptibles Rockefeller fue de 18X.

$$RR50 = LC50 (\text{Población de campo}) = 9,097 / LC50 (\text{Población susceptible}) = 0,4861812$$

$$RR50 = 18.68806$$

Grados de Resistencia a deltametrina

La LC 50 de acuerdo a la regresión Probit para las poblaciones de La Mesa fue de 10,64 ug/mL para el piretroide deltametrina al tiempo diagnóstico, (30 minutos).

Tabla 4. Output de los datos estadísticos obtenidos en Biostat V5.8.9. Indicando las LC 50, y la comparación el Chi²entre dos tratamientos de deltametrina a los que se sometieron las poblaciones de la Mesa.

Estadísticos de Regresión		n=248	
LC50	10,6430471		
β	1,47041011		
Probit (%)		Diferencia	Chi ²
0,142857143		2,16	9,38
0,484126984		2,08	7,09

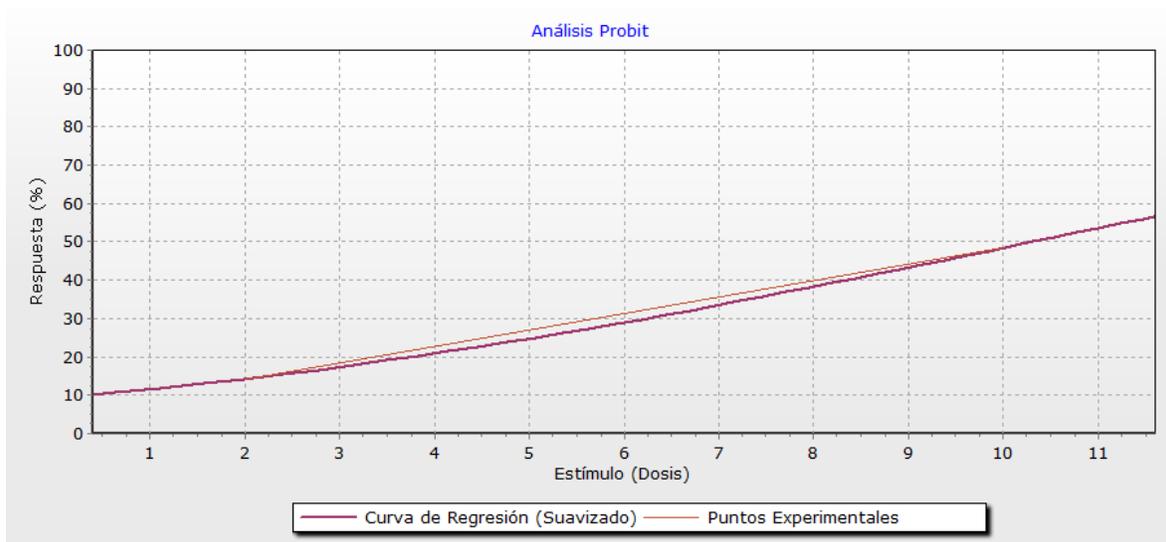


Figura 29. Resultado del Análisis Probit, Respuesta (Mortalidad) en función de dosis de insecticida (estimulo) de las poblaciones de La Mesa expuestos a deltametrina.

A su vez, la población susceptible Rockefeller tuvo una LC 50 de 0,68 ug/mL para el piretroide deltametrina.

Tabla 5. Output de los datos estadísticos obtenidos en Biostat V5.8.9. Indicando las LC 50, y la comparación el Chi²entre dos tratamientos de deltametrina a los que se sometieron las poblaciones Susceptibles.

Estadísticos de Regresión		n=504	
LC50 (Log10)			
β			
Porcentaje Actual (%)	Probit (%)	Diferencia	Chi ²
0,916	0,916	2,60	3,0776
0,998	0,999	- 0,249	0,00047

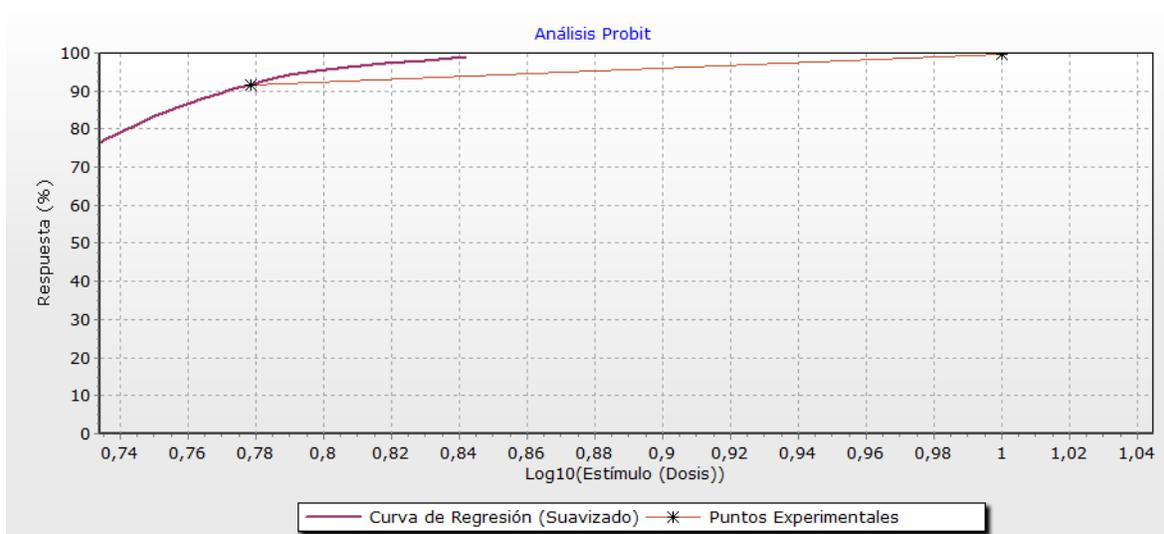


Figura 30. Resultado del Análisis Probit, Respuesta (Mortalidad) en función de dosis de insecticida (estimulo) de las poblaciones susceptibles Rockefeller expuestos a deltametrina.

De esta manera, los grados de resistencia que se obtuvieron para el insecticida deltametrina cuando se comparó la población de campo de La Mesa frente a las poblaciones susceptibles Rockefeller fue de 15X.

$$RR50 = LC50 (\text{Población de campo}) = \mathbf{10,64} / LC50 (\text{Población susceptible}) = \mathbf{0,68}$$

$$RR50 = \mathbf{15,647}$$

Evaluación del estado de la susceptibilidad de *Ae. aegypti* colectados en Bucaramanga Santander

Estado de la susceptibilidad al lambdacialotrina

Por su parte, con los mosquitos colectados en Santander, se evaluó el estado de la susceptibilidad de 166 individuos de *Ae. aegypti* de Bucaramanga y 105 individuos cepa Rockefeller (población control) frente al insecticida piretroide lambdacialotrina. En promedio la mortalidad de la población de Bucaramanga fue del 71,80% mientras que la mortalidad en la población control Rockefeller fue del 100% al tiempo diagnóstico de 30 minutos. La humedad relativa promedio fue del 60% y la temperatura promedio fue de 20,8°C durante los ensayos.

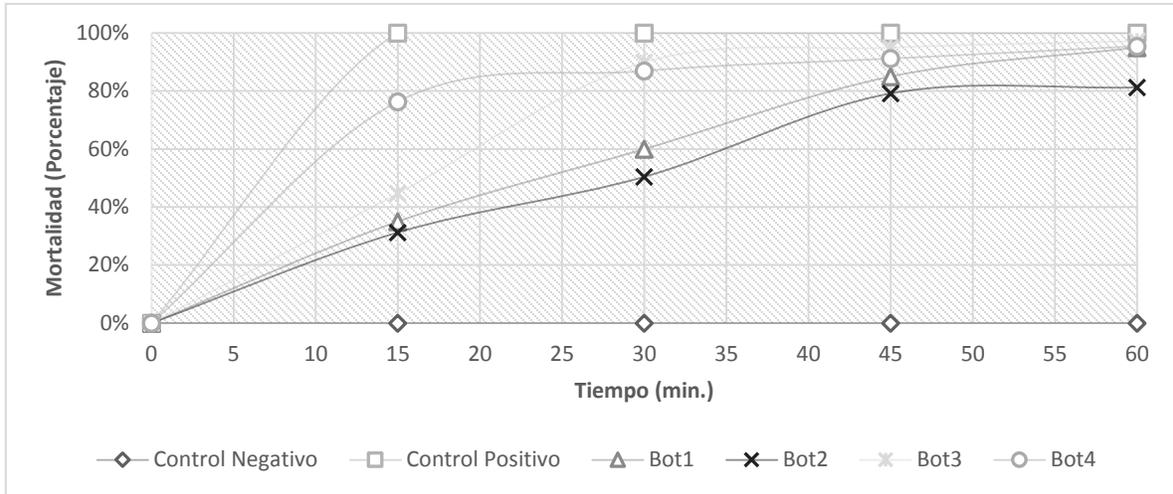


Figura 31. Susceptibilidad de adultos de *Ae. aegypti* de Bucaramanga expuestos a lambda-cialotrina 10 ug/mL. Bot 1-4: réplicas, Controles (positivo y negativo): *Ae. aegypti* cepa Rockefeller.

Estado de la susceptibilidad al deltametrina

Posteriormente se evaluó el estado de la susceptibilidad de 165 individuos de *Ae. aegypti* de Bucaramanga y 97 individuos cepa Rockefeller (población control) frente al insecticida piretroide deltametrina (10 ug/mL). En promedio la mortalidad de la población de Bucaramanga fue del 88,61% mientras que la mortalidad en la población control Rockefeller fue del 100% al tiempo diagnóstico de 30 minutos. La humedad relativa promedio fue del 62% y la temperatura promedio fue de 19,9°C durante los ensayos.

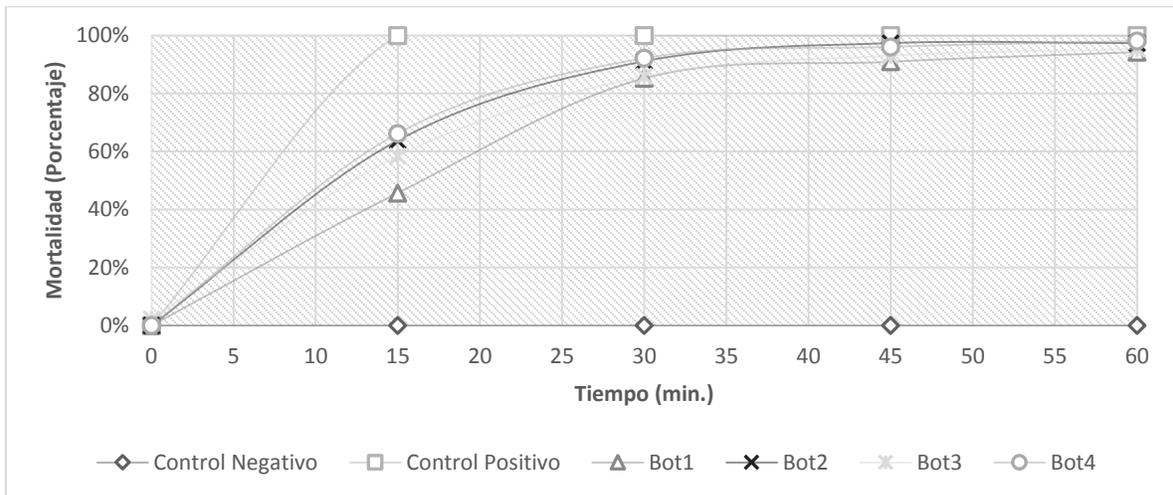


Figura 32. Susceptibilidad de adultos de *Ae. aegypti* de Bucaramanga expuestos a deltametrina 10 ug/mL. Bot 1-4: réplicas, Controles (positivo y negativo): *Ae. aegypti* cepa Rockefeller.

Estado de la susceptibilidad al DDT

Además, se evaluó el estado de la susceptibilidad de 148 individuos de *Ae. aegypti* de Bucaramanga y 91 individuos cepa Rockefeller (población control) frente al insecticida DDT (concentración 150 ug/mL). En promedio la mortalidad de la población de Bucaramanga fue del 4,01% mientras que la mortalidad en la población control fue del 100% a 45 minutos de tiempo diagnóstico. La humedad relativa promedio fue del 64% y la temperatura promedio fue de 19,85°C durante los ensayos.

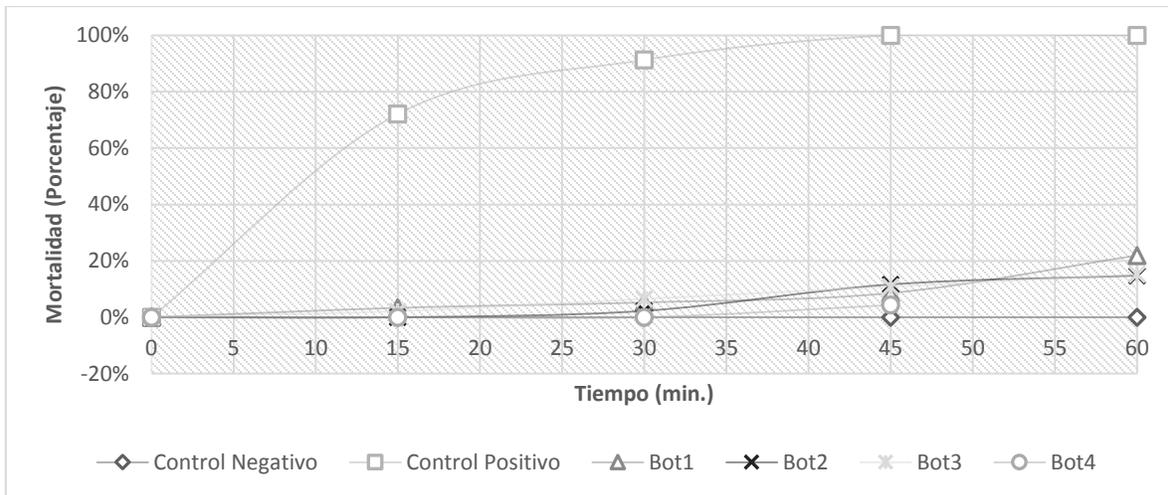


Figura 33. Susceptibilidad de adultos de *Ae. aegypti* de Bucaramanga expuestos a DDT 150 ug/mL. Bot 1-4: réplicas, Controles (positivo y negativo): *Ae. aegypti* cepa Rockefeller.

Grados de Resistencia de las poblaciones de *Ae. aegypti* de Bucaramanga Santander

Se realizaron de dos a tres bioensayos del CDC con al menos 5 concentraciones diferentes de insecticida: lambdacialotrina, deltametrina y DDT. A partir de los datos obtenidos se realizó un análisis probit con las poblaciones de campo y con las poblaciones susceptibles Rockefeller.

Grados de Resistencia a lambdacialotrina

Se encontró que en las poblaciones de Bucaramanga la concentración letal 50 (LC 50) fue de 8,61 ug/mL para el insecticida lambdacialotrina al tiempo diagnóstico, (piretroides: 30 minutos).

Tabla 6. Output de los datos estadísticos obtenidos en Biostat V5.8.9. Indicando las LC 50, y la comparación el Chi²entre dos tratamientos de lambdacialotrina a los que se sometieron las poblaciones de Bucaramanga

Estadísticos de Regresión		n=352	
LC50	8,617		
β	0,4806		
Probit (%)		Diferencia	Chi cuadrado
2,48795		0,2498	348,40
0,74698		-3,49	9,8397

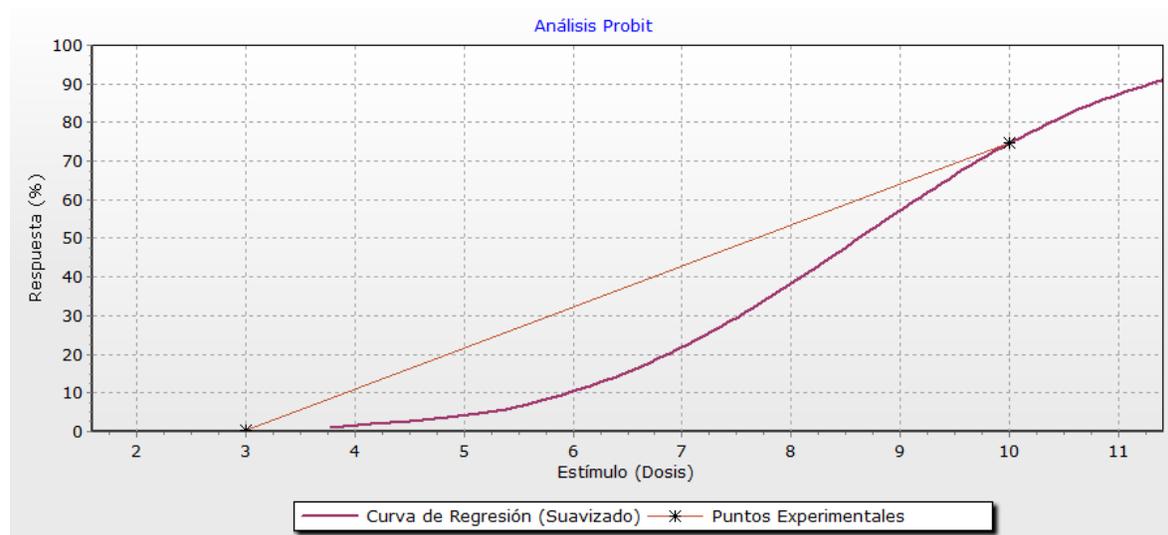


Figura 34. Resultado del Análisis Probit, Respuesta (Mortalidad) en función de dosis de insecticida (estimulo) de las poblaciones de Bucaramanga expuestas a lambdacialotrina.

Por lo tanto, se encontró que los grados de resistencia para el insecticida lambdacialotrina al comparar las poblaciones de campo de Bucaramanga frente a las poblaciones susceptibles Rockefeller fue de 17X.

$$RR50 = LC50 (\text{Población de campo}) = 8,617 / LC50 (\text{Población susceptible}) = 0,4861812$$

$$RR50 = 17.7238$$

Grados de Resistencia a deltametrina

Se obtuvieron los grados de resistencia de las poblaciones de Bucaramanga expuestas a deltametrina. La LC 50 de acuerdo a la regresión Probit para éstas poblaciones fue de 10,64 ug/mL para el piretroide deltametrina al tiempo diagnóstico, (30 minutos).

Tabla 7. Output de los datos estadísticos obtenidos en Biostat V5.8.9. Indicando las LC 50, y la comparación el Chi² entre dos tratamientos de deltametrina a los que se sometieron las poblaciones de Bucaramanga.

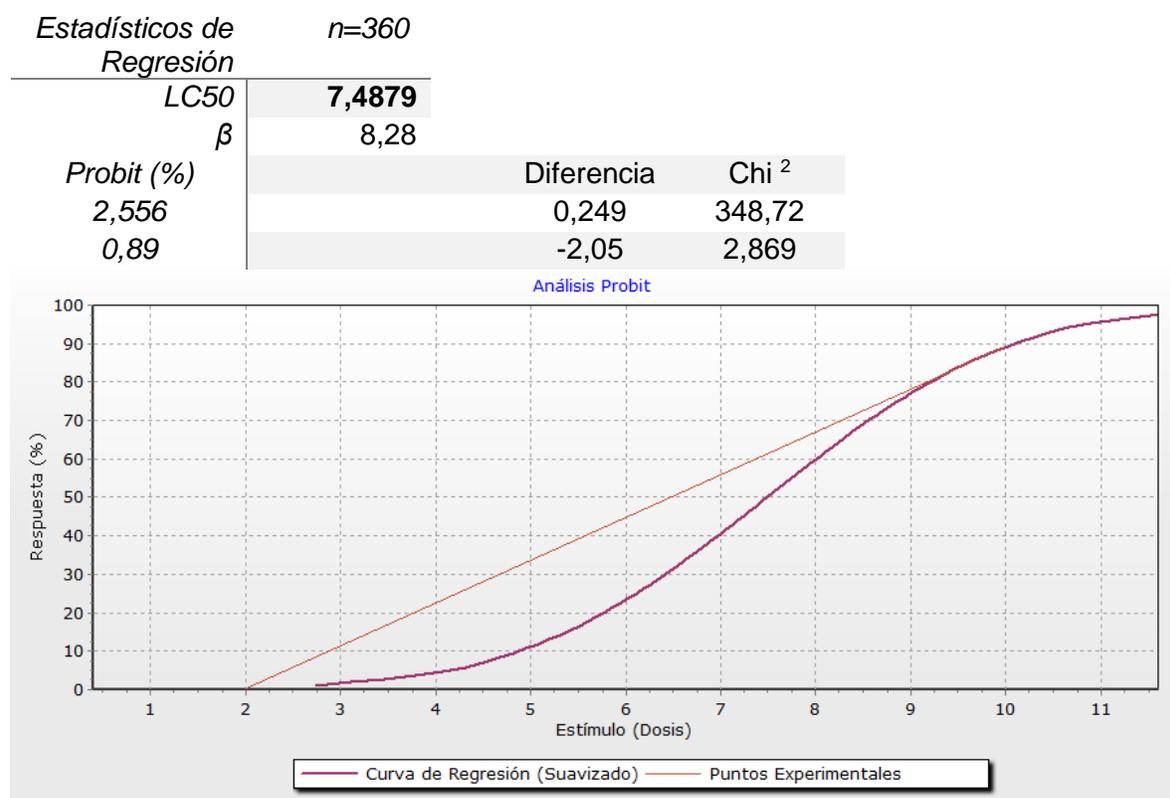


Figura 35. Resultado del Análisis Probit, Respuesta (Mortalidad) en función de dosis de insecticida (estimulo) de las poblaciones de Bucaramanga expuestas a deltametrina.

De esta manera, los grados de resistencia que se obtuvieron para el insecticida deltametrina cuando se comparó la población de campo de Bucaramanga frente a las poblaciones susceptibles Rockefeller fue de 11X.

$$RR50 = LC50 (\text{Población de campo}) = \mathbf{7,4879} / LC50 (\text{Población susceptible}) = \mathbf{0,68}$$

$$RR50 = \mathbf{11.011}$$

Cuantificación de la Actividad enzimática detoxificante en poblaciones de La Mesa y Bucaramanga

En Colombia hay varios estudios en los que se ha evaluado la actividad enzimática asociada con resistencia metabólica de las distintas poblaciones de *Ae. aegypti* de campo, sin embargo, solo encontramos estudios recientes de evaluación de la actividad detoxificante de los principales grupos de enzimas GTS, MFO, α - β -PNPA esterasas y Acetilcolinesterasas en Bucaramanga y La Mesa, en los reportes de Santacoloma y Rey, en el 2010 y 2011 respectivamente (Santacoloma et al., 2010, Rey et al., 2011). En el

trabajo aquí presentado, se decidieron mostrar los resultados de los ensayos bioquímicos en actividad enzimática, ya que tradicionalmente en Colombia, en las publicaciones se encontraban los resultados en densidades ópticas, los cuales no resultan en la mejor aproximación para estimar la actividad enzimática (Valle et al., 2006).

Bioensayo de Acetilcolinesterasa (Ache y Achi)

Se procesaron 90 individuos de campo (45 de La Mesa y 45 de Bucaramanga) y 10 individuos cepa Rockefeller (5 por población) por duplicado para estimar la actividad de la Acetilcolinesterasa (AChE) en ausencia del inhibidor propoxur y la Acetilcolinesterasa inhibida (AChi) en presencia del propoxur.



Figura 36. Coloración resultante de los bioensayos de Acetilcolinesterasa de la población de La Mesa (Cundinamarca, imagen izquierda) y Bucaramanga (Santander, imagen derecha) luego de la lectura a 405 nm. Los pozos A (1 a 12), B (1 a 12), C (1 a 12), D (1 a 12), E (1 a 12), F (1 a 12), G (1 a 6), H (1 a 6) son mosquitos de campo, los pozos G (7 a 9) y H (7 a 9) son Rockefeller y los G (10 a 12) y H (10 a 12) son los controles.



Figura 37. Coloración resultante del bioensayo de Acetilcolinesterasa inhibida de la población de La Mesa (Cundinamarca, imagen izquierda) y de Bucaramanga (Santander, imagen derecha) luego de la lectura a 405 nm. Los pozos A (1 a 12), B (1 a 12), C (1 a 12), D (1 a 12), E (1 a 12), F (1 a 12), G (1 a 6), H (1 a 6) son mosquitos de campo, los pozos G (7 a 9) y H (7 a 9) son Rockefeller y los G (10 a 12) y H (10 a 12) son los controles.

Los resultados de las absorbancias luego de la lectura a 405 nm se expresaron como el porcentaje de inhibición de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa después de la inhibición con propoxur:

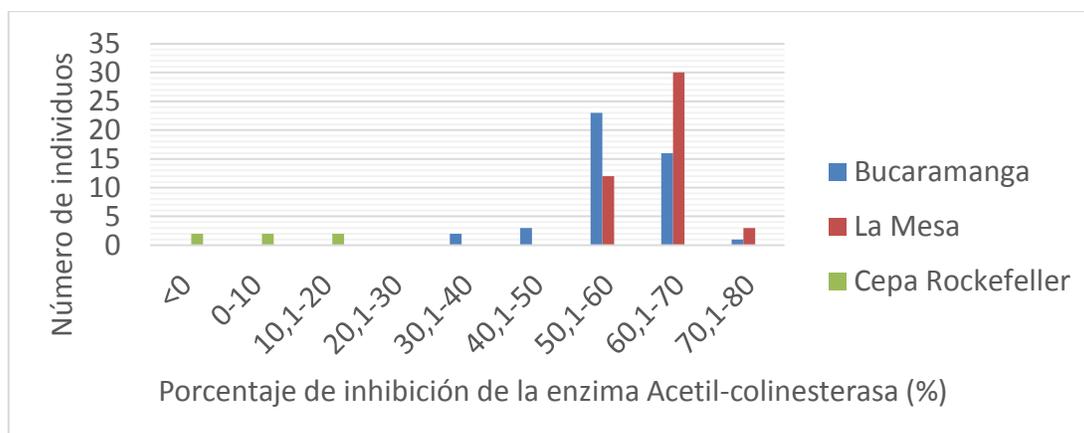


Figura 38. Porcentaje de inhibición de la acetilcolinesterasa de las poblaciones de La Mesa, Bucaramanga y Rockefeller.

Teniendo en cuenta que, a mayor porcentaje de inhibición con propoxur, mayor incremento de enzima, se encontró que el porcentaje de inhibición en la cepa susceptible Rockefeller fue entre 0% y 20%, mientras que las poblaciones de La Mesa y Bucaramanga tuvieron porcentajes de inhibición entre 50% y 80%. En términos generales las poblaciones de La Mesa tuvieron porcentajes de inhibición mayores, pues el 75% de los individuos estuvo en un rango de porcentaje de inhibición entre 60-70% en comparación con el 51% de los individuos de las poblaciones de Bucaramanga, las cuales estuvieron entre 50-60%.

Bioensayo de α esterasas (α -Est)

Se procesaron 45 individuos de campo de La Mesa, 45 de Bucaramanga y 10 individuos cepa Rockefeller (5 por población) por duplicado para estimar la actividad de las α esterasas. Se calculó la actividad enzimática por minuto a partir de un factor de conversión basado en los datos de ug/mg (mosquito) y ptn/min. El resultado fue la cantidad de sustrato (en nmol) consumido por mg de proteína de cada mosquito en el tiempo total de reacción (15 minutos):

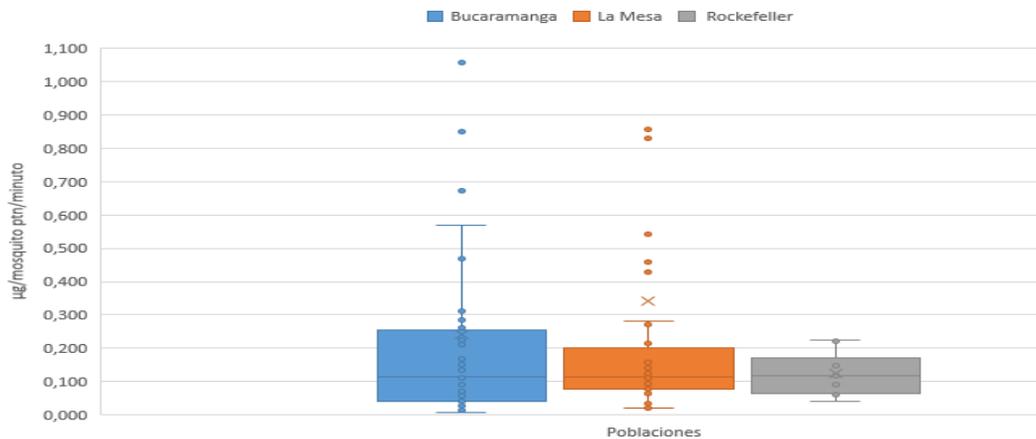


Figura 39. Diagrama de caja y bigotes de la actividad enzimática de las α -esterasas de las poblaciones de Bucaramanga, la Mesa y Rockefeller: media, mediana, valores interiores, mínimos y máximos y percentil 75 y 25.

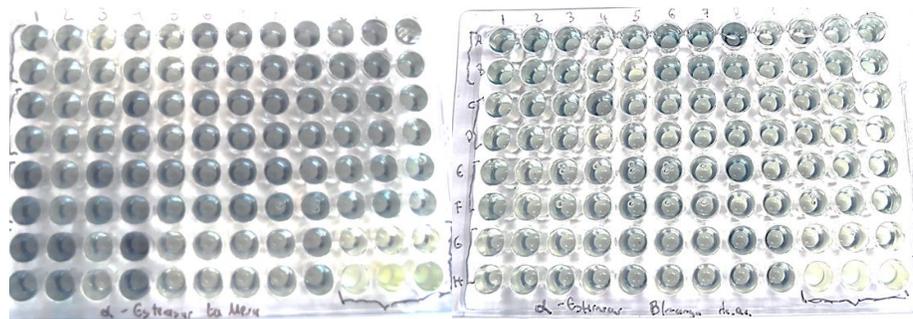


Figura 40. Coloración resultante del bioensayo de esteratas α , de izquierda a derecha las poblaciones de La Mesa (Cundinamarca) y Bucaramanga (Santander) luego de la lectura a 570 nm. Los pozos A (1 a 12), B (1 a 12), C (1 a 12), D (1 a 12), E (1 a 12), F (1 a 12), G (1 a 6), H (1 a 6) son mosquitos de campo, los pozos G (7 a 9) y H (7 a 9) son Rockefeller y los G (10 a 12) y H (10 a 12) son los controles.

Los ensayos de α -esterasas mostraron que los valores de la media en la actividad enzimática de la cepa susceptible Rockefeller fueron los menores con 0,124 ug/mosquito (mg) ptn/min, los de Bucaramanga superiores con 0,250 ug/mosquito (mg) ptn/min y los de la Mesa los mayores con 0,340 ug/mosquito (mg) ptn/min, significando un aumento de 0,216 ug/mosquito (mg) ptn/min respecto a la población susceptible.

Bioensayo de Beta esteratas (β -Est)

Se procesaron 90 individuos de campo: 45 de La Mesa y 45 de Bucaramanga y 10 individuos cepa Rockefeller (5 para La Mesa y 5 para Bucaramanga) por duplicado para estimar la actividad de las β - esteratas. Se calculó la actividad enzimática por minuto a partir de un factor de conversión basado en los datos de ug/mg (mosquito) y ptn/min. El

resultado fue la cantidad de sustrato (en μg) consumido por mg de proteína de cada mosquito en el tiempo total de reacción (15 minutos):

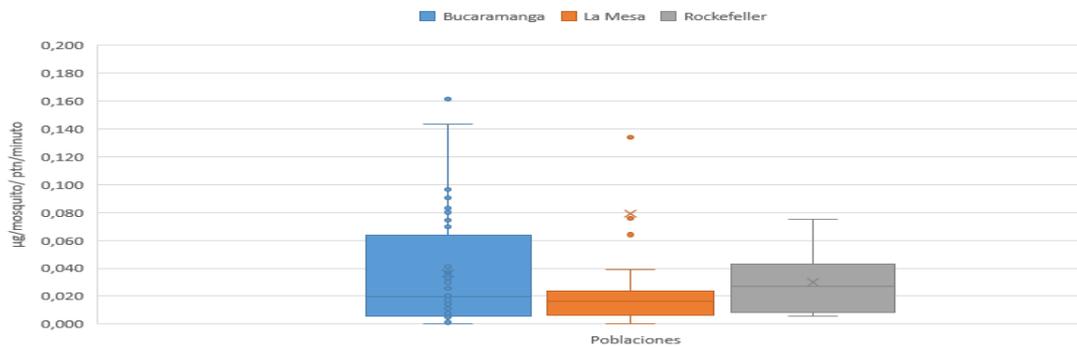


Figura 41. Diagrama de caja y bigotes de la actividad enzimática de las β -esterasas de las poblaciones de Bucaramanga, la Mesa y Rockefeller: media, mediana, valores interiores, mínimos y máximos y percentil 75 y 25.



Figura 42. Coloración resultante de los bioensayos de esterases β de las poblaciones de La Mesa (Cundinamarca, imagen izquierda) y de Bucaramanga (Santander, imagen derecha) luego de la lectura a 570 nm. Los pozos A (1 a 12), B (1 a 12), C (1 a 12), D (1 a 12), E (1 a 12), F (1 a 12), G (1 a 6), H (1 a 6) son mosquitos de campo, los pozos G (7 a 9) y H (7 a 9) son Rockefeller y los G (10 a 12) y H (10 a 12) son los controles.

En los ensayos de β -esterasas se observó que los valores de la media en la actividad enzimática de la cepa susceptible Rockefeller fueron de $0,030 \text{ ug/mosquito (mg) ptn/min}$, los de Bucaramanga tuvieron un incremento leve de $0,036 \text{ ug/mosquito (mg) ptn/min}$ y los de la Mesa fueron los más altos con $0,079 \text{ ug/mosquito (mg) ptn/min}$, sin embargo, el aumento no fue tan considerable, pues significo solamente $0,049 \text{ ug/mosquito (mg) ptn/min}$ respecto a la población susceptible.

Bioensayo de Oxidasas de Función Mixta (MFO)

Se procesaron 45 individuos de campo y 5 individuos cepa Rockefeller por duplicado para estimar la actividad de las Oxidasas de Función Mixta. En este ensayo se calculó el contenido total de Hemo (Citocromo P450 Monooxigenasas) como estimado indirecto de la actividad enzimática. Se cuantificó la concentración de citocromo/ mg de proteína (el cual está asociado con las reacciones de monooxigenación) de insecto:

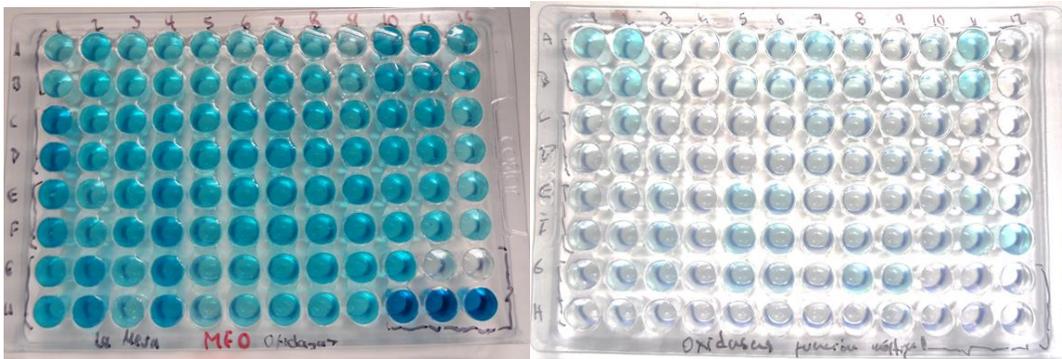


Figura 43. Coloración resultante del bioensayo de Oxidasas de Función Mixta de la población de La Mesa (Cundinamarca, imagen izquierda) y Bucaramanga (Santander, imagen derecha) luego de la lectura a 650 nm. Los pozos A (1 a 12), B (1 a 12), C (1 a 12), D (1 a 12), E (1 a 12), F (1 a 12), G (1 a 6), H (1 a 6) son mosquitos de campo, los pozos G (7 a 9) y H (7 a 9) son Rockefeller y los G (10 a 12) y H (10 a 12) son los controles.

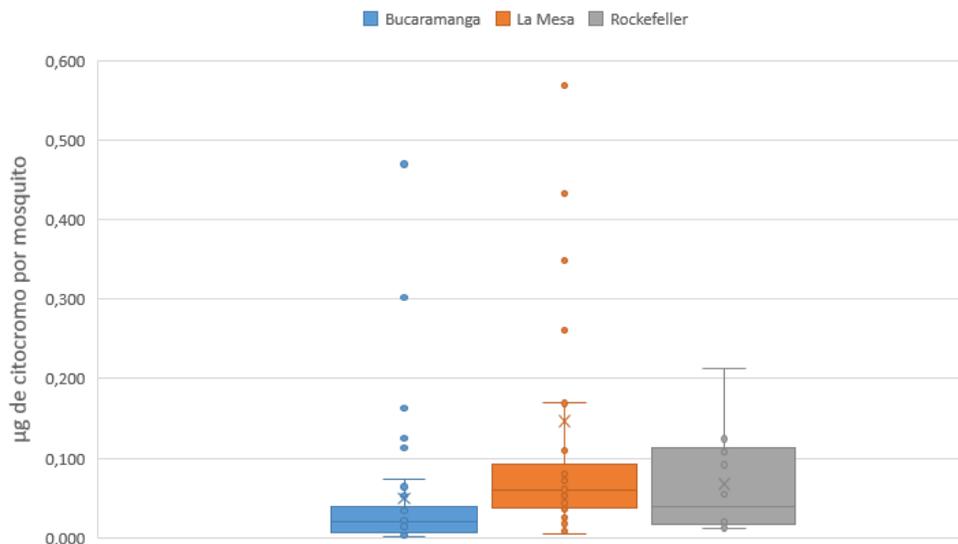


Figura 44. Diagrama de caja y bigotes de la actividad enzimática de las MFO de las poblaciones de Bucaramanga, la Mesa y Rockefeller: media, mediana, valores interiores, mínimos y máximos y percentil 75 y 25.

Los resultados de los ensayos de oxidasas de función mixta indicaron que no hubo un aumento en la actividad enzimática de los mosquitos *Ae. aegypti* de Bucaramanga, ya que los valores de citocromo estuvieron por debajo de los valores de las poblaciones susceptibles Rockefeller. En contraste, las poblaciones de La Mesa si tuvieron valores de citocromo por mosquito superiores, con un incremento en la actividad enzimática de 0,072 ug de citocromo por mg de mosquito, comparados con la cepa de referencia susceptible.

Bioensayo de Glutación S-Transferasas (GST)

Se procesaron 45 individuos de campo de La Mesa, 45 de Bucaramanga y 5 individuos cepa Rockefeller por cada población. Cada ensayo se hizo por duplicado para estimar la actividad de las Glutación S-Transferasas. En este ensayo se calculó la cantidad de sustrato usado en la reacción (similar al bioensayo de PNPA) de insecto mediante el coeficiente de extinción del sustrato S- (4-nitrofenil-2-Cloro) glutatión en relación al total de proteína por mosquito en función de tiempo, nmoles de Glutatión por mosquito por minuto:

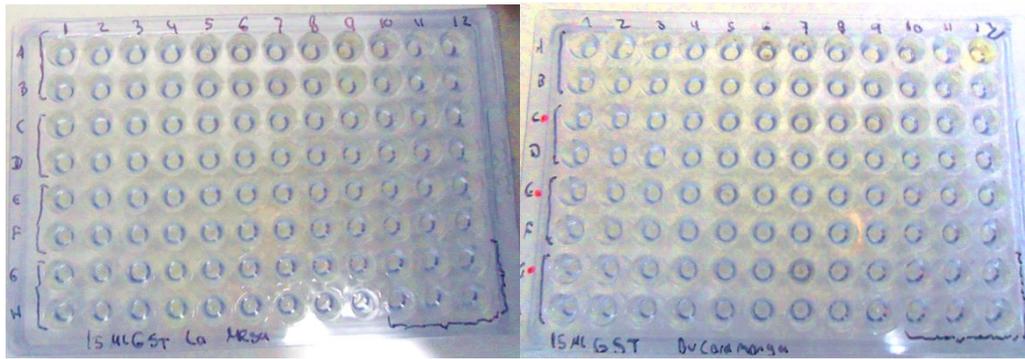


Figura 45. Coloración resultante del bioensayo de Glutación S-Transferasas de las poblaciones de La Mesa (Cundinamarca, imagen izquierda) y Bucaramanga (Santander, imagen derecha) luego de la lectura a 340 nm. Los pozos A (1 a 12), B (1 a 12), C (1 a 12), D (1 a 12), E (1 a 12), F (1 a 12), G (1 a 6), H (1 a 6) son mosquitos de campo, los pozos G (7 a 9) y H (7 a 9) son Rockefeller y los G (10 a 12) y H (10 a 12) son los controles.

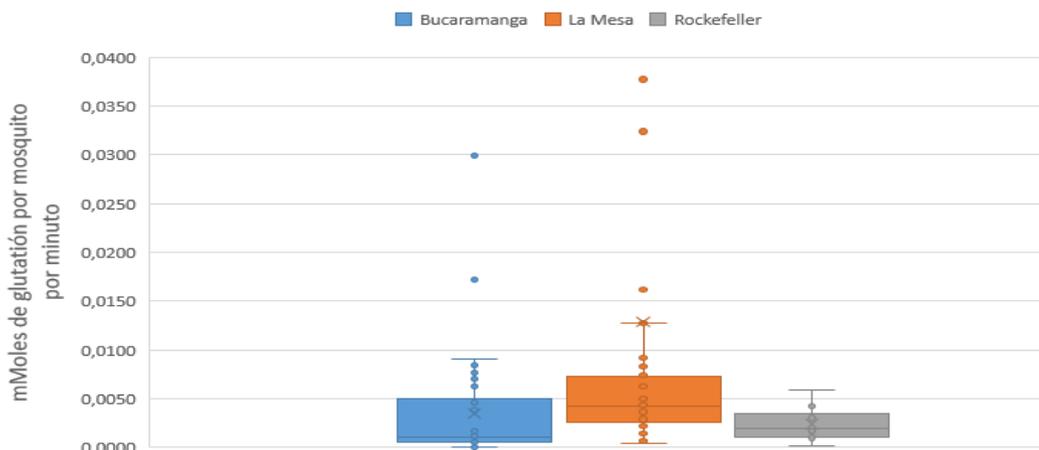


Figura 46. Diagrama de caja y bigotes de la actividad enzimática de las GST de las poblaciones de Bucaramanga, la Mesa y Rockefeller: media, mediana, valores interiores, mínimos y máximos y percentil 75 y 25.

En los ensayos de Glutatión S- transferasas se encontró que ambas poblaciones de *Ae. aegypti*, tanto las de Bucaramanga como las de La Mesa, presentaron actividad enzimática elevada, respecto a los datos obtenidos con la cepa Rockefeller. En orden de mayor a menor, La Mesa tuvo mayor cantidad de nMoles de glutatión por mosquito por minuto, seguido por Bucaramanga y finalmente la cepa Rockefeller, de tal manera que La Mesa estuvo 0,109 nMoles de glutatión por mosquito por minuto por encima de la población susceptible.

Bioensayo de PNPA esterasas

Se procesaron 45 individuos de campo y 5 individuos cepa Rockefeller por duplicado para estimar la actividad de las PNPA esterasas. En este ensayo el resultado final se expresó como la diferencia entre la Abs/mg ptn/min. Se calculó la variación en la absorbancia por minuto correlacionado con la cantidad de proteína contenida en cada mosquito:



Figura 47. Coloración resultante del bioensayo de PNPA esterasas de la población de La Mesa (Cundinamarca, imagen izquierda) y Bucaramanga (Santander, imagen derecha) luego de la lectura a 405 nm. Los pozos A (1 a 12), B (1 a 12), C (1 a 12), D (1 a 12), E (1 a 12), F (1 a 12), G (1 a 6), H (1 a 6) son mosquitos de campo, los pozos G (7 a 9) y H (7 a 9) son Rockefeller y los G (10 a 12) y H (10 a 12) son los controles.

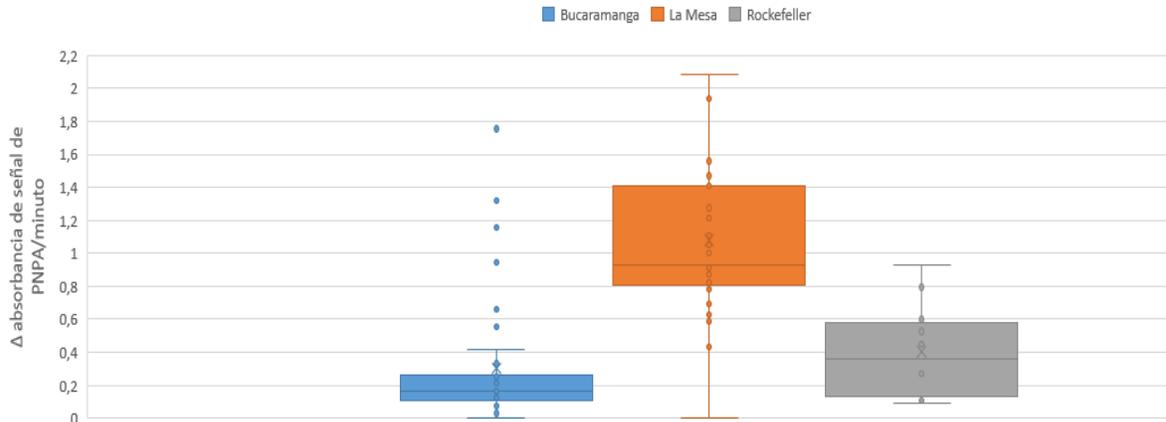


Figura 48. Diagrama de caja y bigotes de la actividad enzimática de las PNPA esterasas de las poblaciones de Bucaramanga, la Mesa y Rockefeller: media, mediana, valores interiores, mínimos y máximos y percentil 75 y 25.

Los resultados más contrastantes de actividad enzimática fueron los obtenidos en el ensayo de PNPA esterasas. Se encontró actividad enzimática elevada de las enzimas PNPA-est en la población de La Mesa y actividad enzimática por debajo de la susceptible en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Bucaramanga. La media de la actividad enzimática en las poblaciones de La Mesa mostró que, comparado con la cepa susceptible, esta 0,706 Abs/mg mosquito/min por encima de la población Rockefeller.

Bioensayo de Proteínas Totales, mediante Bradford (PTN)

Para correlacionar con los valores de actividad enzimática obtenidos en los otros bioensayos relacionados con resistencia metabólica, se calculó la dosis total de proteína por mosquito de 90 individuos: 45 mosquitos de la Mesa y 45 de Bucaramanga, incluyendo 5 Rockefeller para cada población, los controles de las pruebas y de la curva estándar fue BSA:

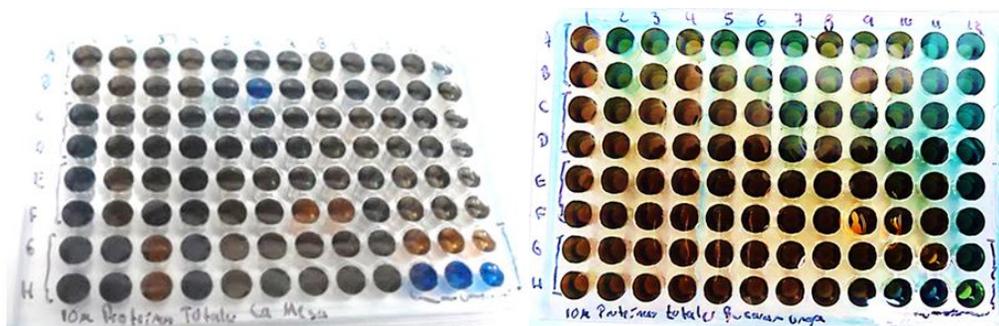


Figura 49. Coloración resultante del bioensayo de Bradford de Proteínas Totales de la población de La Mesa (Cundinamarca, imagen de la izquierda) y de Bucaramanga (imagen de la derecha) luego de la lectura a 620 nm. Los pozos A (1 a 12), B (1 a 12), C (1 a 12), D

(1 a 12), E (1 a 12), F (1 a 12), G (1 a 6), H (1 a 6) son mosquitos de campo, los pozos G (7 a 9) y H (7 a 9) son Rockefeller y los G (10 a 12) y H (10 a 12) son los controles.

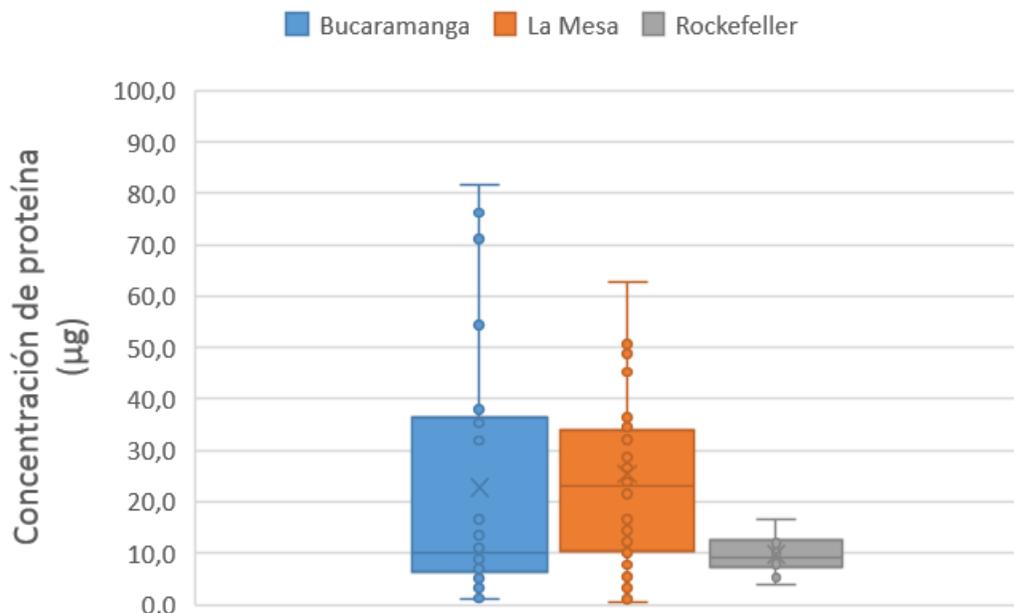


Figura 50. Diagrama de caja y bigotes de la cuantificación de las proteínas totales (ptn) de las poblaciones de Bucaramanga, la Mesa y Rockefeller: media, mediana, valores interiores, mínimos y máximos y percentil 75 y 25.

De acuerdo a los valores obtenidos en el ensayo de Bradford de proteínas totales, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los datos de cuantificación de las poblaciones de La Mesa y de Bucaramanga. Sin embargo, se observó una disminución en las poblaciones susceptibles Rockefeller, esto evidentemente debido a el tamaño de las poblaciones de campo comparado con las poblaciones de cautiverio como la Rockefeller, las cuales son X/2 aproximadamente el tamaño de una población silvestre.

Curva Estándar de α , β esterasas, Oxidasas de Función Mixta y Proteínas Totales de las Poblaciones de La Mesa

Se calculó la curva estándar del α , β - naftol, Citocromo C y el BSA con el fin de tener un estimado de la relación concentración: absorbancia por cada longitud de onda:



Figura 51. Coloración resultante de la curva estándar de las α y β esterasas, Citocromo C y BSA luego de las lecturas a 570 nm, 650 nm y 620 nm respectivamente. Para todos los casos se utilizó la misma cantidad de reactivo (desde 0 hasta 5 μ g de reactivo).

Con la curva estándar, se corrigió el resultado de concentración de cada ensayo, con base en la concentración de los controles positivos utilizados.

Consolidado de Resultados de Actividad enzimática de los mosquitos de campo

Los resultados encontrados en este trabajo indican que, las poblaciones de *Ae. aegypti* de Bucaramanga tienen actividad enzimática elevada en los grupos detoxificantes GST, α - β esterasas y Acetilcolinesteras. Por otro lado, las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Mesa, presentaron actividad enzimática elevada en las esterasas PNPA, las MFO, las α - β esterasas y las Acetilcolinesteras.

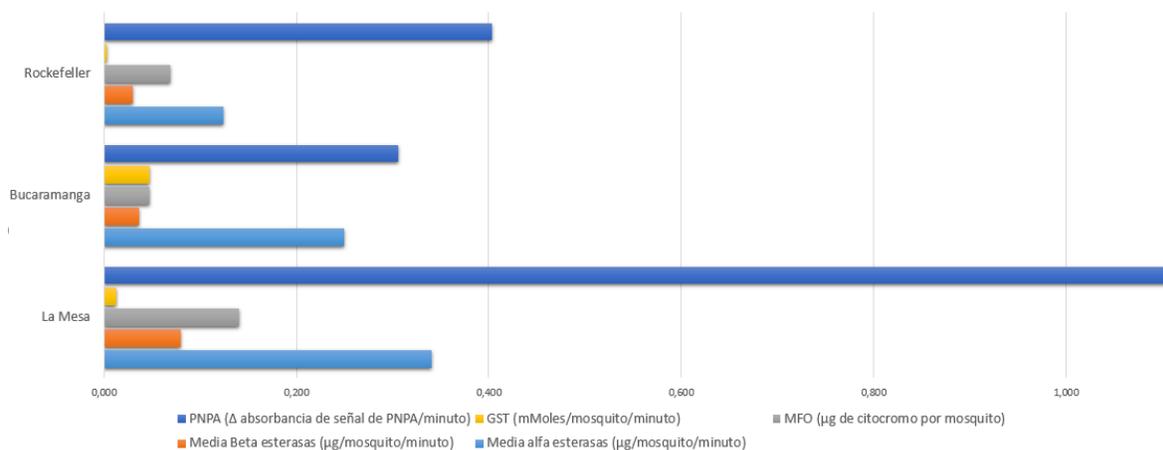


Figura 52. Análisis del consolidado de la actividad enzimática de las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Mesa, Bucaramanga y Rockefeller. Media de la actividad enzimática en cada unidad enzimática determinada.

Hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias de la actividad enzimática de las poblaciones de campo y las poblaciones susceptibles, Rockefeller ($p=0,05$) para los ensayos de PNPA, MFO, β esterasas y α -esterasas, sin embargo, no hubo diferencias entre las poblaciones de la Mesa y las susceptibles, en el ensayo de GST y en el de β -esterasas entre las poblaciones de Bucaramanga y las Rockefeller.

Extracción de ADN de mosquitos individuales de campo

Con los individuos de la generación filia 1 (F1) se obtuvieron extraídos de ADN de 50 individuos con un promedio de 26,74 ng /uL de concentración final, con estas muestras se realizaron los ensayos de biología molecular, por lo cual se obtuvieron buenos resultados de rendimiento con el protocolo de extracción.

Cuantificación de ADN mediante Espectrofotometría a 260nm de las muestras de La Mesa y Bucaramanga

Para cada población se procesaron 50 individuos ($n=100$) se usó 1 uL de extraído para cuantificar el ADN total y estimar la presencia de sales. Se obtuvieron los siguientes resultados de cuantificación:

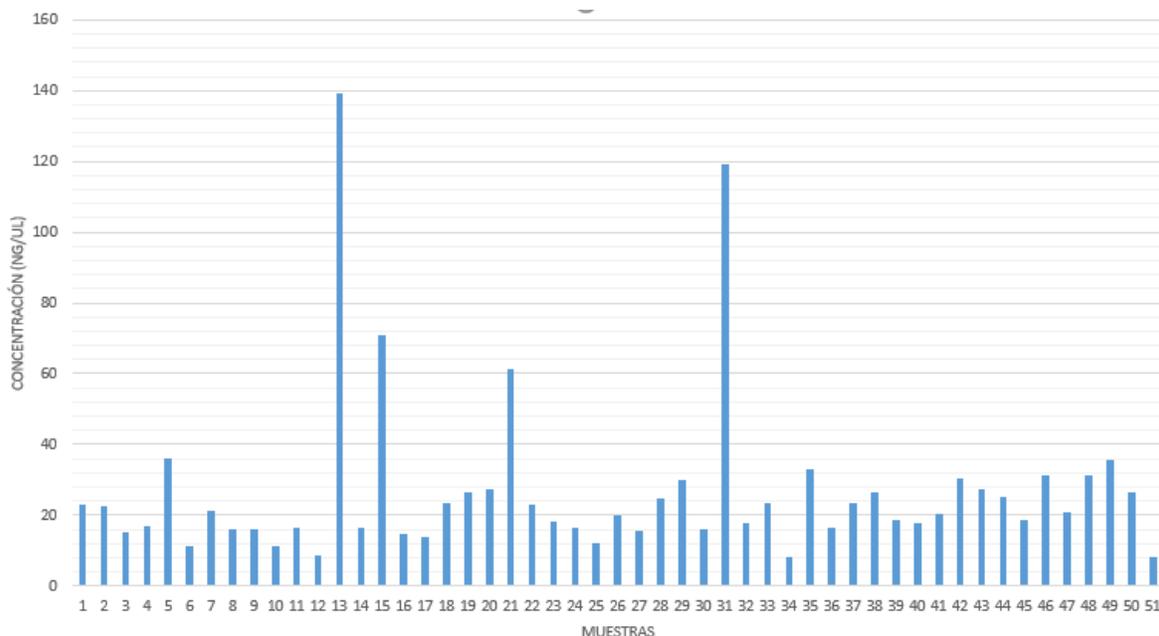


Figura 53. Resultados de cuantificación de los extraídos de mosquitos de Bucaramanga mediante espectrofotometría a 260 nm

El promedio de cuantificación de la concentración de los primeros 25 mosquitos de Bucaramanga fue de 27,15 ng/uL, el rendimiento más alto fue el de la muestra 13, con un resultado de 139,3 ng/uL.

El promedio de concentración de las muestras 26 a 51 de los mosquitos *Ae. aegypti* de Bucaramanga fue de 26,34 ng/uL, el mayor rendimiento se encontró en la muestra 31 (119,1 ng/uL).

Todos los extraídos indicaron picos a 220 nm y 230 nm, posiblemente asociados con la presencia de algunos péptidos, sin embargo, a 260 nm también se encontraron valores correspondientes a ácidos nucleicos, con una curva creciente, asociada con el ADN extraído.

Adicionalmente, las muestras de ADN extraídas de La Mesa estuvieron en un rango de concentración entre 5 y 70 ng/uL, con un promedio de 30 ng/uL:

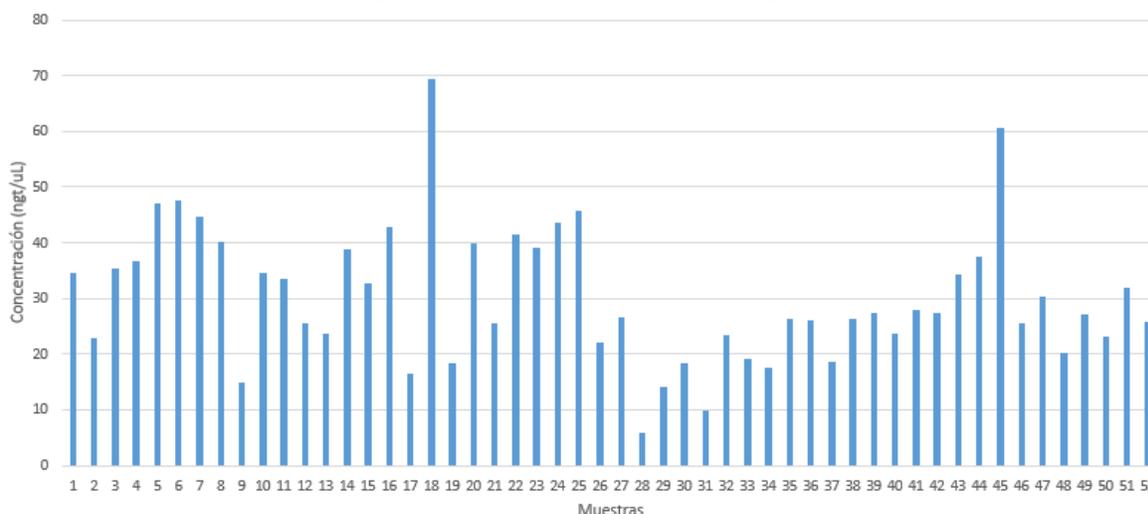


Figura 54. Resultados de cuantificación de los extraídos de mosquitos de La Mesa mediante espectrofotometría a 260 nm.

La concentración más alta que se obtuvo fue de 69 ng/uL, sin embargo, estas muestras presentaron picos asociados con fenoles y algunos péptidos.

Estandarización de la PCR para amplificar las mutaciones Cys1534 y Ile1016

Se encontró que las condiciones de amplificación para cada mutación, tanto la Cys1534 como la Ile1016 cambiaron de acuerdo a las concentraciones esperadas de MgCl₂ y a la concentración esperada de ADN molde:

Tabla 8. Condiciones de PCR reportadas comparadas con las encontradas en este trabajo para la amplificación de las regiones Ile1016 y Cys1534.

Mutación	Reactivo	Condiciones reportadas	Condiciones exitosas encontradas
Ile1016	MgCl ₂	1.5 mM	3 mM (Green Master Mix, Promega)
	dNTPs	1 mM	400 uM
	ADN molde	200 ng	desde 5 ng

Cys1534	MgCl ₂	1.5 mM	3 mM (Green Master Mix, Promega), 4 mM (Master Mix, ThermoScientific)
	dNTPs	0.2 mM	3 mM (Green Master Mix, Promega), 0.4 mM (Master Mix, ThermoScientific)
	ADN molde	50ng	desde 5 ng
	Taq Pol	1 U/uL	0.05 U

Para cada mutación las condiciones reportadas (para la mutación Ile1016 a un volumen final de 25 µL) implicaban: 10 picomole de cada primer, Taq Mastermix 1X, buffer PCR (10 mM Tris – HCL pH 8.4, 50mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 1 mM de cada dNTP y 200 ng ADN extraído. Mientras que para evaluar la mutación Cys1534: (volumen final de 20uL) 9.53 uL de agua milli-Q, 0.066 uL del *primer* Cys1534 y 0.20 de los *primers* 1534 y Phe1534 a 100 uM, Master mix 2X y 1 uL de ADN extraído (>30ng/uL) (Yanola et al., 2011, Saavedra et al., 2007). Sin embargo, para amplificar la región Ile1016 basto con una plantilla de ADN de 5 ng (1 uL a 5uL de ADN) a condiciones de Green Master Mix 2X (Promega cat. M7121) con 400 uM de dNTPs y 3 mM de MgCl₂. A su vez, las condiciones para la mutación Cys1534, mostraron que con Green Master Mix 2X (Promega, cat. M7121) se pueden obtener productos exitosos con 5ng de ADN molde o con más de 139 ng. En contraste, con la Master mix colorless (Thermo scientific, Cat: K0171), reacciones superiores a 1ng de ADN molde generaban productos no exitosos.

Luego de la estandarización de las PCRs, se amplificaron los controles positivos de la mutación *kdr* Ile1016, en donde se esperaban los siguientes resultados *in silico*:

Tabla 9. Genotipos, fenotipos reportados y amplicones esperados mediante Primer blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) de las mutaciones Ile1016 y Cys1534.

Posición	Genotipo: Alelo	Fenotipo	Amplicón en pares de bases
1016	Ile1016/Ile1016: <u>A</u> TA A/A	<i>kdr</i>	78 pb
	Val1016/Val1016: <u>G</u> TA G/G	Silvestre	98 pb
	Val1016/ Ile1016:G/A	Heterocigoto	Ambas bandas
1534	Phe1534/phe1534: <u>T</u> TC F/F	Silvestre	93 pb
	Cys1534/Cys1534: <u>T</u> GC C/C	<i>kdr</i>	113 pb
	Phe1534/Cys1534: F/C	Heterocigoto	Ambas bandas

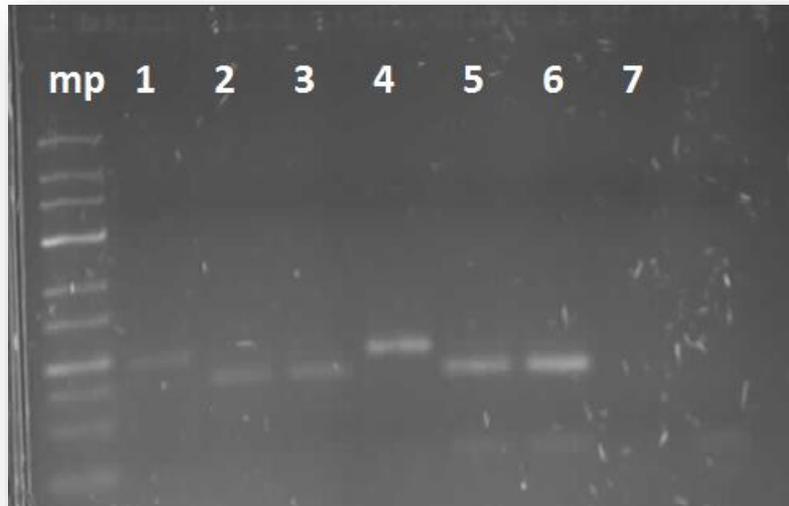


Figura 55. Controles positivos de la PCR *kdr* Ile1016, mp: marcador de peso de 25 pb, líneas 1 y 4: banda de 98 pb (Val1016/Val1016: silvestre), líneas 2, 3, 5 y 6: banda de 78 pb (Ile1016/Ile1016: *kdr*), carril 8, control de reacción.

Los resultados obtenidos de la PCR de los controles positivos Ile1016 mostraron dos bandas separadas por 20 pb, indicando el genotipo silvestre a 98 pb y el mutante *kdr* a 78 pb. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 3% a 90 V durante 2 horas y teñidos con SYBR Green 1mg/mL y documentados en un fotodocumentador (BioRad GelDoc XR)

Frecuencias genóticas *kdr* Ile1016, Cys1534 y Silvestres en *Ae. aegypti*

De acuerdo a las bandas obtenidas por PCR alelo-especifico de los mosquitos *Ae. aegypti* de Bucaramanga y La Mesa, se evidenció que en dichas poblaciones hay circulación de alelos homocigotos silvestres susceptibles en las posiciones Val1016 y Phe1534, homocigotos *kdr* Ile1016 y Cys1534 resistentes y heterocigotos Ile1016 y Cys1534 en los dominios IIS4 y IIS6 del canal de sodio dependiente de voltaje. Acá encontramos que, los genotipos *kdr* presentaron una banda a 78 pb (Ile1016) y 113 pb (Cys1534), los silvestres a 98 pb (Val1016) y 93 pb (Phe1534), y los heterocigotos dos bandas, resultados comparables con los de Maestre, Saavedra y Linss y colaboradores (Maestre-Serrano., 2014, Saavedra et al., 2007, Linss et al., 2014).

Frecuencias de los genotipos Ile1016/Ile1016 y Val1016/Val1016 en poblaciones de La Mesa

Se encontró circulación de la mutación Ile1016 en las poblaciones de La Mesa (n=50).

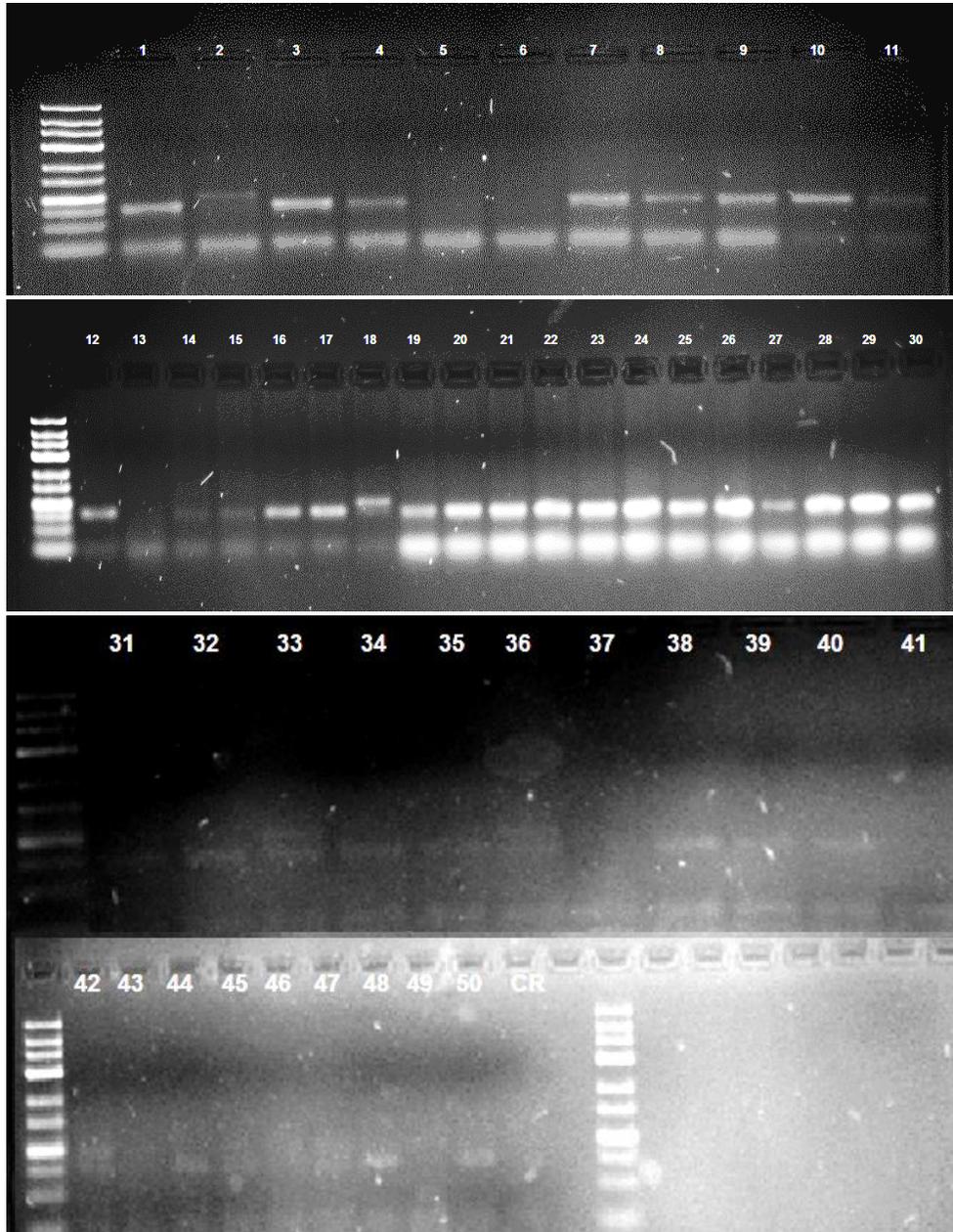


Figura 56. Resultado de la PCR *kdr* Ile1016 de los mosquitos de La Mesa. Electroforesis a 90V por 2 horas en gel de agarosa al 3%. Las bandas en 78 pb y 98 pb corresponden a los mutantes *kdr* y silvestres respectivamente. Los carriles de marcador de peso son marcadores de 25 pb (Promega), las líneas de 1 a 50: son mosquitos individuales de La Mesa y CR: es el control de reacción.

Se observó que, de los 50 individuos de La Mesa, 43 fueron homocigotos mutantes *kdr* (A/A: Ile1016), 3 Silvestres (G/G: Val 1016) y 4 heterocigotos (A/G: Ile/Val 1016).

Tabla 10. Frecuencias alélicas y genotípicas de La Mesa *kdr* Ile1016 (G/G y A/A). Calculadas mediante “Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. Rodriguez et al., (2009).

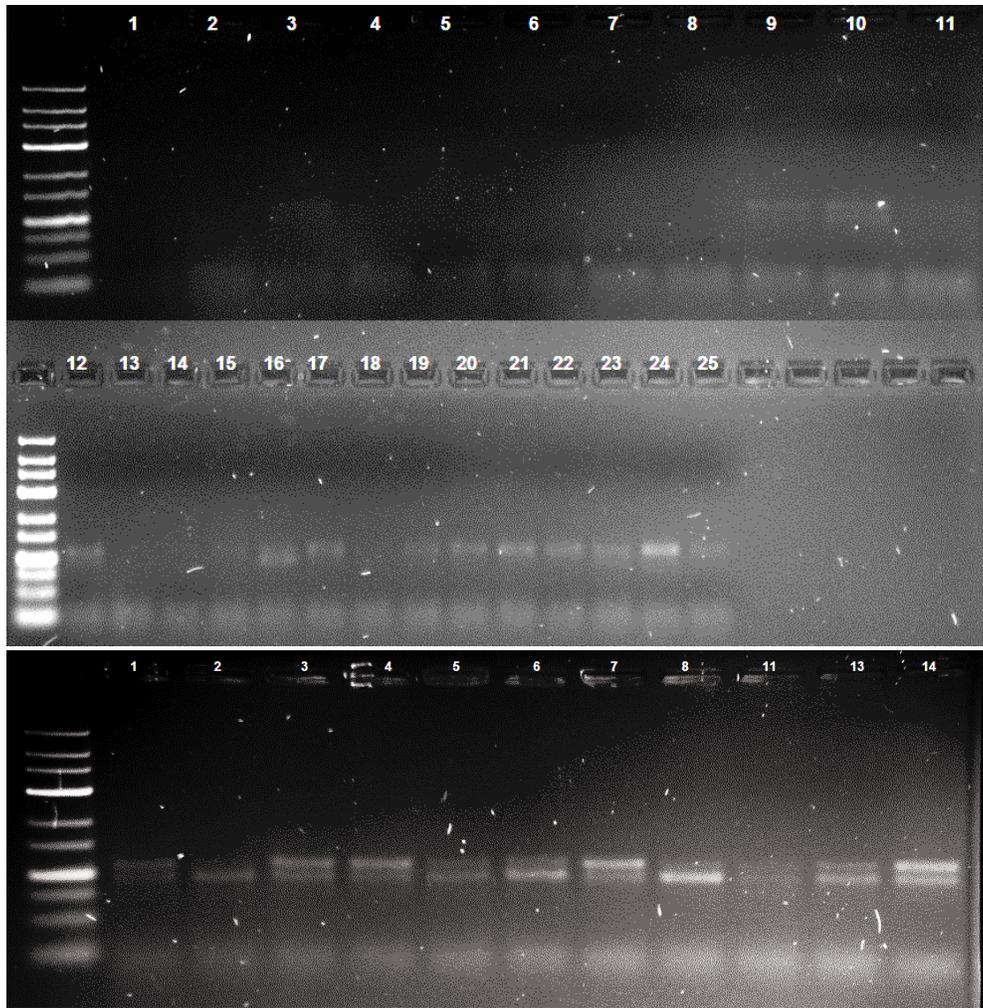
GENOTIPO	ESPERADO	OBSERVADO	FRECUENCIA ALELICA	FRECUENCIA GENOTÍPICA (Frecuencia Hardy-Weinberg)	X ² P=0.05
Homocigoto Silvestre G/G Val1,016/Val1,016	0.5	3	Val1,016 = 0.1	0.01	15.43
Heterocigotos A/G 1016 Val1,016/ Ile1,016	9	4	–	0.18	
Homocigotos kdr A/A Ile1,016/Ile1,016	40.5	43	Ile1,016 = 0.9	0.81	

En las poblaciones de La Mesa, la frecuencia genotípica de la mutación *kdr* Iso1,016/Iso1,016 (ATA) fue de 81% y la alélica fue de 90%, mientras que los Heterocigotos y los silvestres G/G fueron 18% y 1% respectivamente. El valor del Chi² fue de 15.43.

Frecuencias de los genotipos Phe1534/Phe1534 y Cys1534/Cys1534 en poblaciones de La Mesa

Yanola y colaboradores (2011), desarrollaron unos *primers* alelo-específicos que flanqueaban la región 1534 del dominio IIS6 del canal de sodio dependiente de voltaje en *Ae. aegypti*. Con el fin de identificar la mutación Cys1,534 (TGC), y obtener el primer registro de las frecuencias alélicas Cys1,534 y genotípicas Cys1534^{Kdr}/Cys1534^{Kdr} del dominio IIS6 para Colombia, se evaluaron por PCR alelo – específico, las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Mesa (Cundinamarca) y Bucaramanga (Santander).

Se encontró circulación de la mutación Cisteína (TGC) en la posición 1534 en las poblaciones de La Mesa (n=50).



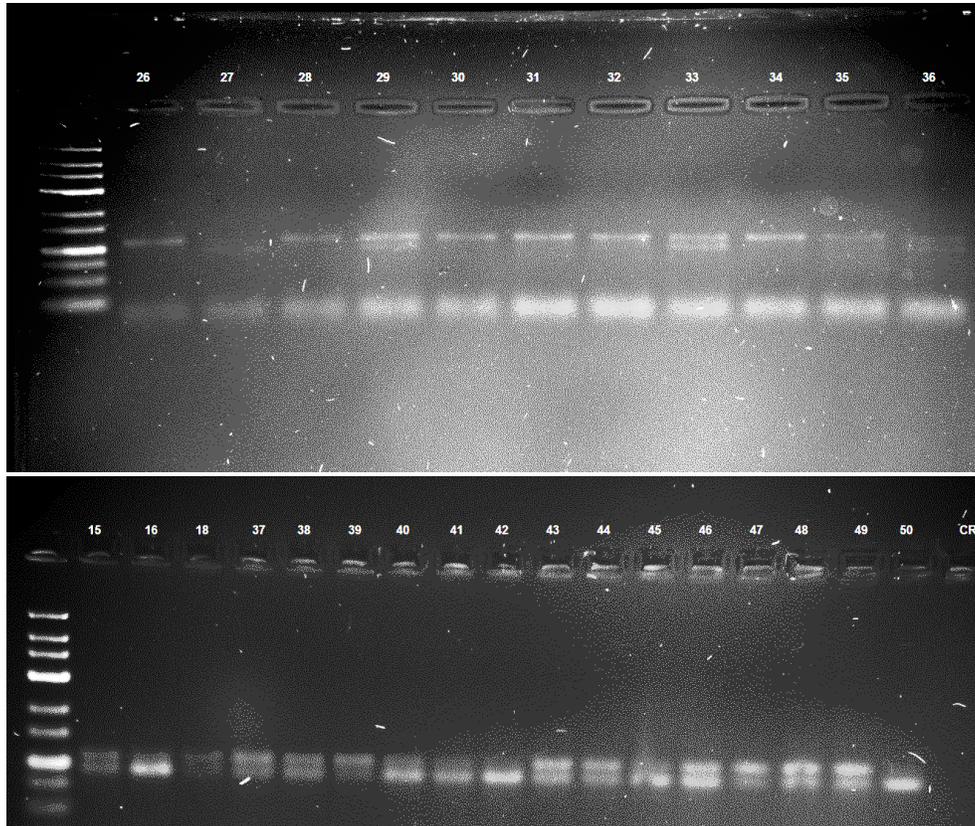


Figura 57. Resultado de la PCR *kdr* 1536 de los mosquitos de La Mesa, Electroforesis a 90V por 2:30 horas en gel de agarosa al 3%. las bandas en 93 pb y 113 pb corresponden a los silvestres y mutantes *kdr* respectivamente. Los carriles de marcador de peso son marcadores de 25 pb (Promega), las líneas de 1 a 50: son mosquitos individuales de La Mesa y CR: es el control de reacción.

En las poblaciones de La Mesa se encontraron circulando las mutaciones *kdr* Ile 1016 y la *kdr* 1534 en los 50 individuos muestreados. Mediante la PCR para amplificar el fragmento de ADN en la posición 1534 se encontró que de 50 individuos de La Mesa: 19 fueron homocigotos mutantes *kdr* (C/C: Cys1534), 8 Silvestres (F/F: Phe 1534) y 23 heterocigotos (F/C: Phe/Cys 1534).

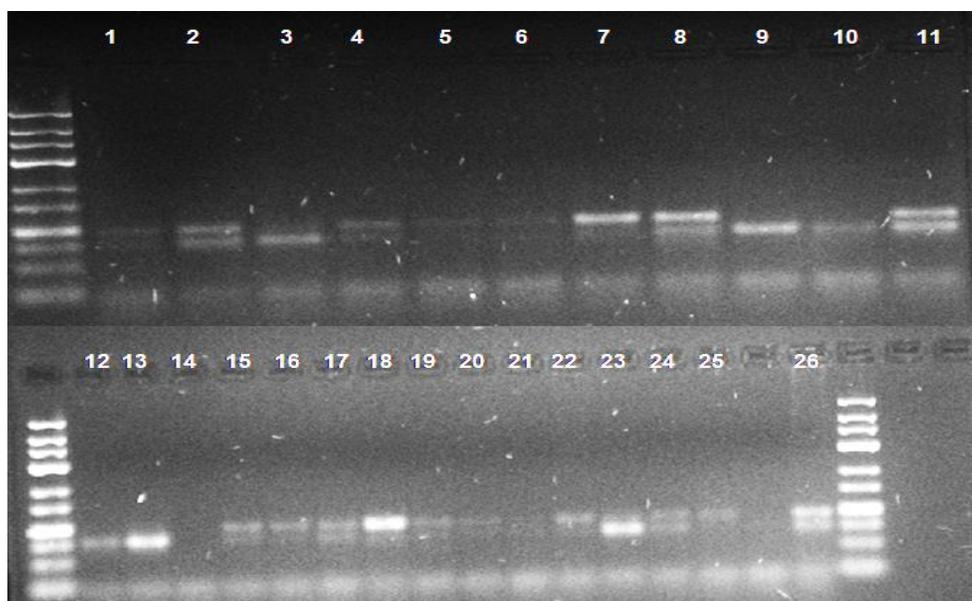
Tabla 11. Frecuencias alélicas y genotípicas de La Mesa 1534 (G/G y A/A). Calculadas mediante “Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. Rodriguez et al., (2009).

GENOTIPO	ESPERADO	OBSERVADO	FRECUENCIA ALELICA	FRECUENCIA GENOTIPICA (Frecuencia Hardy-Weinberg)	X ² P=0.05
Homocigoto Silvestre F/F Phe1534/Phe1534:	7,61	8	Phe1,534 = 0,39	0,1521	0,06
Heterocigotos F/C Phe1534/Cys1534	23,79	23	–	0,4758	
Homocigotos kdr C/C Cys1534/Cys1534	18,61	19	Cys1,534 = 0,61	0,3721	

Las frecuencias genotípicas de la mutación *kdr* Cys1,534/Cys1,534 (TGC) fueron de 0,37 y las alélicas de 0,61, mientras que en los susceptibles silvestres Phe1,534/Phe1,534 fueron 0,15 y 0,39. Los Heterocigotos tuvieron mayor frecuencia genotípica con un valor 0,47. El valor del Chi² fue de 0,06.

Frecuencias de los genotipos Ile1016/Ile1016 y Val1016/Val1016 en poblaciones de Bucaramanga

Se encontraron fijados alelos mutantes Ile 1016 y Phe1534 en las poblaciones de Bucaramanga (n=50).



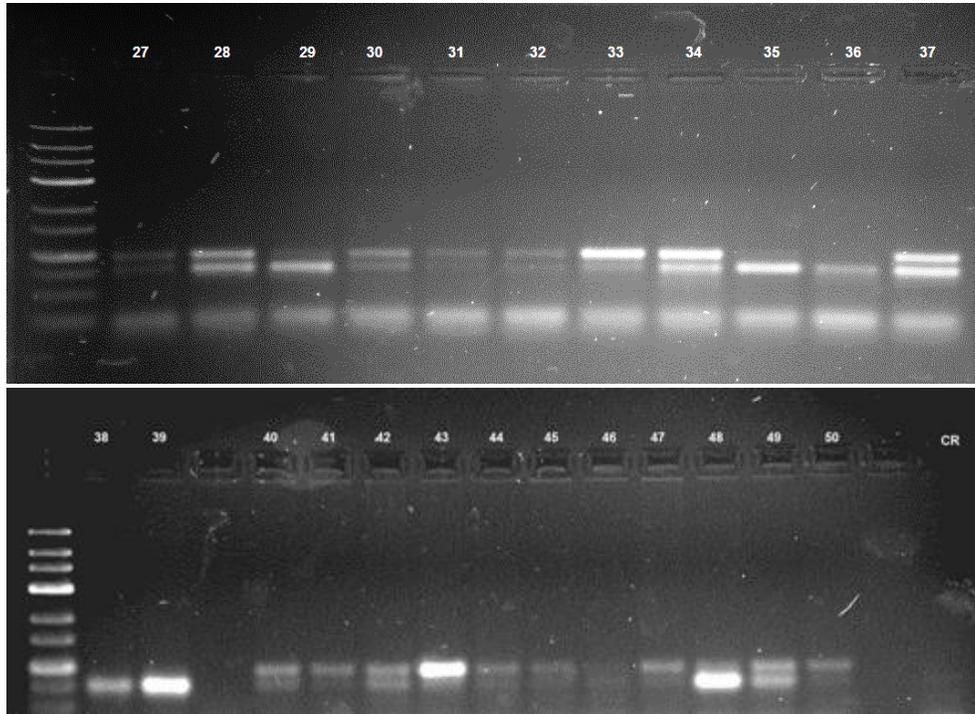


Figura 58. Resultado de la PCR *kdr* Ile1016 de los mosquitos de Bucaramanga, Electroforesis a 90V por 2:00 horas en gel de agarosa al 3%. las bandas en 78 pb y 98 pb corresponden a los mutantes *kdr* y silvestres respectivamente. Los carriles de marcador de peso son marcadores de 25 pb (Promega), las líneas de 1 a 50: son mosquitos individuales de Bucaramanga y CR: es el control de reacción.

De los 50 individuos evaluados mediante PCR alelo específico de Bucaramanga se encontró que 14 individuos fueron homocigotos *kdr* (Ile1016/Ile1016: A/A), 17 Homocigotos silvestres (Val1016/Val1016: G/G) y 19 Heterocigotos (Val1016/ Ile1016: G/A).

Tabla 12. Frecuencias alélicas y genotípicas de Bucaramanga Val1016Ile (G/G y A/A). Calculadas mediante "Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. Rodriguez et al., (2009).

GENOTIPO	ESPERADO	OBSERVADO	FRECUENCIA ALELICA	FRECUENCIA GENOTIPICA (Frecuencia Hardy-Weinberg)	X ² P=0.05
Homocigoto Silvestre G/G Val1016/Val1016	14,05	17	Val1016 = 0,53	0,2809	2,81
Heterocigotos A/G 1016 Val1016/ Ile1016	24,91	19	–	0,4982	
Homocigotos kdr A/A Ile1016/Ile1016	11,05	14	Ile1016 = 0,47	0,2209	

En las poblaciones de Bucaramanga, la frecuencia genotípica de la mutación *kdr* Ile1016/Ile1016 (ATA) fue de 0,22 y la alélica fue de 0,47, mientras que en los Heterocigotos y los silvestres Val1,016/Val1,016 (GTA) las frecuencias genotípicas fueron 0,28 y 0,49 respectivamente. En esta población la frecuencia alélica de los Silvestres fue mayor con un valor de 0,53. El valor del Chi² fue de 2.81.

Frecuencias de los genotipos Phe1534/Phe1534 y Cys1534/Cys1534 en poblaciones de Bucaramanga

Las mutaciones en la posición 1534 Cisteína (TGC) se encontraron fijadas en las poblaciones de Bucaramanga (n=50).

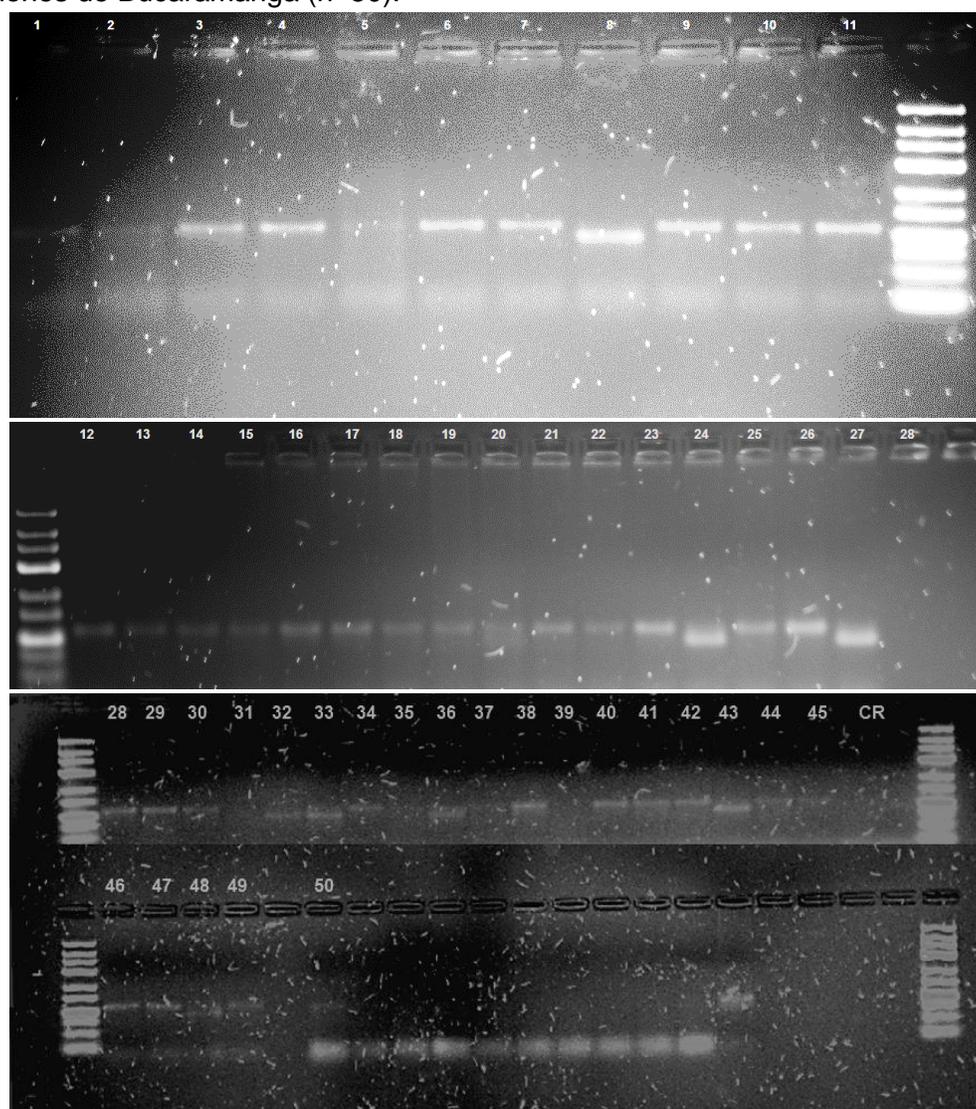


Figura 59. Resultado de la PCR *kdr* Cys1534 de los mosquitos de Bucaramanga, Electroforesis a 90V por 2:30 horas en gel de agarosa al 3%. las bandas en 93 pb y 113 pb corresponden a los silvestres y mutantes *kdr* respectivamente. Los carriles de marcador de

peso son marcadores de 25 pb (Promega), las líneas de 1 a 50: son mosquitos individuales de Bucaramanga y CR: es el control de reacción

En los 50 individuos evaluados por PCR para amplificar la región 1534 en la población de Bucaramanga se encontró que 39 individuos fueron homocigotos *kdr* (Cys1534/Cys1534: C/C), 10 Homocigotos silvestres (Phe1534/phe1534: F/F) y 1 Heterocigoto (Phe1534/Cys1534: F/C).

Tabla 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de Bucaramanga 1534 (Phe1534/ Phe1534, Cys1534/Cys1534 y Phe1534/Cys1534). Calculadas mediante "Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. Rodriguez et al., (2009).

GENOTIPO	ESPERADO	OBSERVADO	FRECUENCIA ALELICA	FRECUENCIA GENOTÍPICA (Frecuencia Hardy-Weinberg)	X ² P=0.05
Homocigoto Silvestre F/F Phe1534/Phe1534:	2,2	10	Phe1534 = 0,21	0,0441	44,15
Heterocigotos F/C Phe1534/Cys1534	16,59	1	–	0,3318	
Homocigotos <i>kdr</i> C/C Cys1534/Cys1534	31,21	39	Cys1534 =0,79	0,6241	

En las poblaciones de Bucaramanga, la frecuencia genotípica de la mutación *kdr* C/C Cys1534/Cys1534 (TGC) fue de 0,62, mientras que en los Heterocigotos y los silvestres Phe1534/Phe1534 (TTC) las frecuencias genotípicas fueron 0,33 y 0,04 respectivamente. En esta población la frecuencia alélica de los mutantes *kdr* fue mayor con un valor de 0,79. El valor del Chi² fue de 44,15 y al comparar las medias de las frecuencias alélicas y genotípicas de las poblaciones de La Mesa y Bucaramanga, se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con un valor de F= 7,2 con un p= 0,04.

Relación entre los grados de resistencia y las frecuencias alélicas y genotípicas

Se realizaron dos análisis estadísticos: correlación de Spearman para establecer la relación que había entre los grados de resistencia encontrados y las frecuencias alélicas y genotípicas de las mutaciones *kdr* y regresión lineal para conocer si las variables grados de resistencia eran buenos predictores de las frecuencias *kdr*. Se encontró que la correlación entre los grados de resistencia y las mutaciones *kdr* es de 75%.

Tabla 14. Estadísticos de regresión. Comparación entre las variables frecuencias Kdr y grados de resistencia

<i>Regresión Lineal</i>				
<i>Estadísticos de Regresión</i>				
<i>R</i>		0,743		
<i>R Cuadrado</i>		0,553		
<i>R Cuadrado Ajustado</i>		0,404		
<i>S</i>		0,164		
	d.f.	SS	MS	nivel p
<i>Regresión</i>	1	0,1002	0,1002	0,14951
<i>Residuo</i>	3	0,0809	0,0269	
				Nivel de F: 3,71
<i>Total</i>	4	0,181		

Adicionalmente el modelo de regresión lineal, indicó que la variable grados de resistencia es un predictor estable de la frecuencia *kdr* ($F=3,71$, valor de $p=0,14$) y las variables implicadas, explica en un 55% el modelo total.

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS

En este trabajo se evaluó la susceptibilidad y los grados de resistencia de las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Mesa (Cundinamarca) y Bucaramanga (Santander) frente a los piretroides lambdacialotrina y deltametrina y al organoclorado DDT, y los mecanismos enzimáticos y moleculares asociados.

Estado de susceptibilidad de los mosquitos *Aedes aegypti* de campo

Los resultados de este trabajo muestran que los porcentajes de mortalidad en los bioensayos con los piretroides deltametrina y lambdacialotrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Mesa disminuyeron de 70-100%, valor reportado por Santacoloma et al (2010), a 43-57% valores encontrados en este trabajo. Mientras que, en Bucaramanga, los porcentajes de mortalidad aumentaron para lambdacialotrina, pasando de 45% a 71,80% y disminuyó para deltametrina en el año 2015, en contraste con lo reportado hace 5 años (Santacoloma et al., 2010). En este trabajo se utilizaron las dosis diagnósticos reportadas por el CDC, mientras que Santacoloma, utilizó las reportadas a nivel nacional, lo cual podría explicar la diferencia entre los resultados. Sin embargo, dado que la población muestreada procede de la misma región geográfica, éste sería el primer reporte de ensayos de susceptibilidad con dosis sugeridas por el CDC, para Bucaramanga y La Mesa.

Adicionalmente se encontró que los niveles de resistencia fueron de 15X y 11X a deltametrina y 18X y 17X a lambdacialotrina en los individuos de *Ae. aegypti* de La Mesa y Bucaramanga respectivamente. Las mortalidades al DDT no mostraron aumento significativo estadísticamente en los valores de resistencia entre 2010-2015 (Santacoloma et al., 2010 vs resultados encontrados).

Este aumento en los niveles de resistencias podría estar asociados probablemente a las presiones con deltametrina y lambdacialotrina en La Mesa y deltametrina en Bucaramanga, pese a que tradicionalmente, en eventos de brotes y epidemias se recomienda el uso del adulticida malatión en primera medida, por encima que de los piretroides (INS; OPS; Secretaria de Salud, 2010). Sin embargo, probablemente en Bucaramanga y La Mesa habrían utilizado por criterios de disponibilidad o priorización el piretroide deltametrina de manera sectorizada, haciendo que las poblaciones de *Ae. aegypti* adyacentes o recurrentes al sitio intervenido, recibieran concentraciones menores de insecticida, como consecuencia de la persistencia disminuida de los piretroides (Palmquist et al., 2012), factores físicos, operativos (Bisset, 2002) o por un cambio en el comportamiento del vector durante la aplicación de insecticida mediante ULV (ultra low volume), favoreciendo el incremento en la resistencia. Es probable también que, las comunidades hayan intensificado el uso de insecticidas domésticos (los cuales tiene como principio activo piretroides). Dichas poblaciones requieren vigilancia entomológica periódica para monitorear la evolución de la resistencia, la cuál va en aparente aumento, para deltametrina y lambdacialotrina en La Mesa y para deltametrina en Bucaramanga al menos en el periodo de tiempo 2010-2015.

Adicionalmente, habría ganancia (desde un punto de vista operativo) con el insecticida lambdacialotrina en Bucaramanga, debido a que las poblaciones de *Ae. aegypti* de ésta

localidad son actualmente más susceptibles. Si bien, esta hipótesis sugiere un uso intensivo de insecticidas piretroides durante los últimos 5 años, también, existe la posibilidad de que durante el periodo 2010-2015 se hubiera utilizado malatión para el control de *Ae. aegypti*, de ser así, dicha resistencia a los piretroides podría estar asociada con genes refractarios resistentes *kdr* o con una sobreexpresión de las enzimas detoxificantes, lo cual también se evaluó en este trabajo y se discutirá en la siguiente sección.

Actividad enzimática de las poblaciones de campo

En el trabajo aquí presentado, se encontró que, las GST, β - esterasas, α -esterasas y Acetilcolinesterasas tienen actividad enzimática incrementada en las poblaciones de La Mesa y Bucaramanga, en tanto que, las PNPA-esterasas y las MFO están únicamente incrementadas en las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Mesa y no en las de Bucaramanga, en contraste con Santacoloma y colaboradores en el 2010, que si encontraron MFO alteradas en las poblaciones de Bucaramanga.

La actividad enzimática alterada de las oxidasas en las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Mesa, indican que, probablemente hubo algún estímulo químico reciente con Organofosforados o Piretroides en La Mesa, ocasionando una sobreexpresión en el grupo de genes asociados con el citocromo p450 o al menos en los encargados de la expresión de las MFO (Hemingway et al., 2004; Crampton et al., 1997; Brogdon et al., 1997), Además, las alteraciones de las Acetilcolinesterasas encontradas en Bucaramanga y La Mesa, de acuerdo al criterio de Brogdon y colaboradores que indica que porcentajes de inhibición <70% por Propoxur son altos (Brogdon et al., 1998), revelaron que solo el 5% de la población de campo presentó actividad enzimática alterada considerablemente. Este resultado podría indicar que el uso continuo del larvicida Temefós en la intervención rutinaria de los programas de control vectorial, estaría generando mecanismos de resistencia en un porcentaje pequeño de la población de *Ae. aegypti* intervenida.

Por otro lado, el incremento en las esterasas A y B, enzimas asociadas principalmente con resistencia a Organofosforados (IRAC, 2010), sugiere que probablemente hubo mayor presión intensiva con este grupo de insecticidas, principalmente en las poblaciones de La Mesa, donde los valores de actividad enzimática fueron más altos, comparados con los de Bucaramanga. Se cree que el incremento observado en los individuos de La Mesa, podría estar asociado con las presiones intensivas *rutinarias* con el larvicida Temefós, mientras que, en eventos de *brotes* y *epidemias*, habría una rotación aparentemente más frecuente en el municipio de Bucaramanga, donde se evidenció menor alteración en las esterasas. Estos resultados son importantes, puesto que podrían indicar una posible resistencia cruzada entre Temefos y Malatión debido a que ambos insecticidas son del grupo de los organofosforados. De hecho, estudios en el Sur de América y el Caribe indican que eventos similares de resistencia cruzada entre Temefos y Malatión vienen ocurriendo recientemente, en poblaciones de *Ae. aegypti* intervenidas de forma intensiva (Rodríguez, Bisset, Ruiz, & Soca, 2002; Rawlins & Wan, 1995).

Finalmente, al comparar los valores de actividad enzimática en Bucaramanga y La Mesa, pese a que se identificó aumento sucinto de los principales grupos de enzimas detoxificantes, como esterasas α y β , MFO (citocromo p450) y Acetilcolinesterasas se observó que el incremento más importante fue el de las GST en Bucaramanga y el de las PNPA esterasas en La Mesa. Las PNPA esterasas en La Mesa estuvieron fuertemente correlacionadas las esterasas α y β , dando soporte a la hipótesis de presión constante con Organofosforados, posiblemente con Temefos en este Municipio y afirmando que las esterasas juegan un papel importante en la detoxificación de Xenobióticos (incluyendo insecticidas) en La Mesa. Entretanto, en Bucaramanga, las GST pueden explicar la resistencia encontrada a DDT, y una posible sobreexpresión en los genes codificantes para transferasas, probablemente debido al flujo que han tenido las poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes al DDT provenientes de Venezuela hacía Colombia y la fijación de estos alelos resistentes en las poblaciones cercanas incluyendo las de Bucaramanga. Todos los resultados encontrados evidencian que hay selección de mecanismos de resistencia independientes en las dos poblaciones de vectores muestreadas, acorde probablemente, con las historias distintas en las presiones de insecticidas en La Mesa y Bucaramanga.

Dado que las enzimas esterasas están elevadas, podrían direccionarse las medidas de control en el uso de insecticidas del grupo de los carbamatos en las poblaciones de Bucaramanga, y es muy probable que los vectores de La Mesa presenten resistencia cruzada a los diferentes grupos de Insecticidas, principalmente a piretroides, DDT y Organofosforados, sugiriendo que hay que realizar rotación de insecticidas de manera más controlada o frecuente en este Municipio.

Resistencia *kdr* (Knockdown resistance) en las poblaciones de campo

En este estudio, se evaluó la frecuencia de la mutación Ile1016 (GTA a ATA) del dominio IIS6 y por primera vez para Colombia, una mutación del dominio IIS6, la mutación Cys1534 (TTIC a TGC) en las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Mesa y Bucaramanga. En Colombia, Maestre y colaboradores (2014) realizaron el primer estudio en relación con las frecuencias de las mutaciones en la posición Ile1016, localizadas en el dominio IIS6 en la región del Caribe y por lo tanto se discutieron los resultados obtenidos con los resultados allí encontrados, y con los de otras poblaciones de Sur America.

Frecuencias genotípicas y alélicas en el sitio 1016 (silvestres y *kdr*) del dominio IIS6 de las poblaciones de campo

Las frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación Iso1016^{*kdr*}/Iso1016^{*Kdr*}, fueron mayores en las poblaciones de La Mesa, respecto a las de Bucaramanga. Al compararlas con la Región Caribe, (Maestre et al., 2014), las evaluadas en este trabajo fueron mayores, presumiblemente asociadas con las diferencias entre las presiones selectivas de insecticidas y el flujo genético de cada población. Adicionalmente, las frecuencias encontradas, se apartaron significativamente de las proporciones de Hardy-Weinberg. Con estos resultados, se evidenció que las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Mesa cuentan con distintos mecanismos de resistencia frente a piretroides, incluyendo actividad enzimática elevada de las MFOs y frecuencias de alelos *kdr* altas, sin embargo, dado que la actividad

de las GST fue casi tan baja como las de la población susceptible Rockefeller en esta localidad, probablemente la mutación Ile1016 juegue un papel importante en la resistencia al DDT. Otra hipótesis que se planteó, fue el hecho de que los mosquitos muestreados en La Mesa probablemente hayan sido los más presionados y por lo tanto los que mayor probabilidad tenían de presentar altas frecuencias de los genotipos *kdr* resistentes, sin embargo, si así hubiera sido, las frecuencias encontradas fueron bastante altas como para presumir una rápida dispersión de la mutación en el resto de la población, la cual adicionalmente, se podría ver favorecida por el área pequeña del Municipio, el uso de piretroides de manera intensiva, el aumento en el número de criaderos a causa de la suspensión frecuente del servicio de agua y las condiciones ambientales en La Mesa.

Por otro lado, en el municipio de Bucaramanga, las frecuencias genotípicas de los individuos Ile1016 *kdr* resistentes estuvieron por debajo de 0,23, mientras que los heterocigotos, fueron los más frecuentes con casi el 0,5 de la población total. Si relacionamos este resultado, con la alta alteración de las GST en Bucaramanga, podríamos especular que, en las poblaciones de *Ae. aegypti* de esta región, los mecanismos de resistencia metabólica tendrían mayor protagonismo por encima de los mecanismos de *kdr*, al menos en comparación con Ile1016 *kdr*, a la hora de explicar la resistencia al DDT. Adicionalmente, la resistencia encontrada a los piretroides, podría estar asociada con los niveles alterados de esterasas- α , demostrando que, están involucrados dos mecanismos diferentes de resistencia para DDT y piretroides.

Varios estudios en Centroamérica, Asia (Saavedra-Rodriguez et al., 2007; Rinkevich et al., 2013) han demostrado que la presencia de alelos homocigotos resistentes en conjunto con la presión intensiva con piretroides, favorecen la rápida dispersión de la mutación en el resto de la población, Brito y colaboradores en el 2008, demostraron que solo se necesitan de unas pocas generaciones, para que la mutación se fije en el resto de la población. Dadas las condiciones mencionadas en La Mesa, es necesario emplear una medida con el fin de disminuir o diluir los genes *kdr* circulantes, los cuales tienen aparentemente una fuerte relación con la resistencia al DDT y piretroides. Adicionalmente, en Bucaramanga, existen varios mecanismos que podrían explicar la resistencia a piretroides y DDT, incluyendo mecanismo *kdr* y alteración en la actividad enzimática, estos resultados son comparables con los de Martins y colaboradores (Martins et al., 2009; Lima et al., 2011) en donde también se encontraron diferentes mecanismos de resistencia en las poblaciones muestreadas en Brasil.

Es recomendable disminuir ó diluir las poblaciones de *Ae. aegypti* que presentaron alta frecuencia de las mutaciones Ile1016 *kdr*, una estrategia adecuada para esto, podría ser el la liberación de individuos susceptibles en campo, incapaces de transmitir algún tipo de virus. Recientemente trabajos relacionados en Brasil con mosquitos transgenicos, han tenido un impacto favorable en la disminución de mosquitos mutantes resistentes (Carvalho et al., 2015), indicando que sería una estrategia prospectiva a evaluar, para diluir los homocigotos *kdr*.

Frecuencias genotípicas y alélicas en el sitio 1534 del dominio IIS6 de las poblaciones de campo

En contraste con las mutaciones *kdr* Ile1016, se encontró que, las frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación Cys1534 fueron mayores en Bucaramanga en comparación con las de La Mesa. Esto indica que, posiblemente, en Bucaramanga la mutación en la posición Cys1534, estaría relacionada con la resistencia a piretroides, en conjunto con los mecanismos enzimáticos, en este caso el de las esterasas- α las cuales se encontraron alteradas en estas poblaciones. Además, dada la naturaleza de las mutaciones sobre el dominio IIS6, se esperaría que las poblaciones de Bucaramanga tuvieran una pérdida considerable de la afinidad por los insecticidas tipo piretroide, esto debido a que las mutaciones sobre el sitio Cys1534 acá encontradas, podrían estar involucradas con los sitios de unión a insecticida (Davies et al., 2007a; O'Reilly A.O et al., 2006). Finalmente, no se descarta la posibilidad de que las mutaciones *kdr* Cys1534 tenga un rol importante en la resistencia al DDT, pese a que en las poblaciones de Bucaramanga se encontró actividad alterada de las GST, la cual podría explicarla, se esperaría que las poblaciones de *Ae. aegypti* de Santander y Municipios adyacentes a Venezuela, presentaran 1 o más mecanismos involucrados con la resistencia al organoclorado DDT, lo cual estaría en total correspondencia con las altas frecuencias alélicas de la mutación *kdr* Cys1534 aquí encontradas y la alteración de las GSTs.

Adicionalmente, como es el primer registro de esta mutación para Colombia, se compararon los resultados obtenidos con las poblaciones más cercanas, que en este caso fueron los del trabajo de Linss y colaboradores en Brasil (2014). Al igual que en este estudio, se encontró que en las poblaciones de *Ae. aegypti* pueden circular dobles mutantes Cys1534 y Ile1016. Este resultado indica que, no solo tenemos poblaciones de *Ae. aegypti* con mecanismos enzimáticos asociados con resistencia fisiológica, sino que además existen poblaciones dobles mutantes para *kdr* circulantes con diferentes frecuencias en el país.

Al igual que con la mutación Ile1016*Kdr*, se recomienda diluir los alelos resistentes Cys1534 *kdr* fijados en las poblaciones de La Mesa y en mayor medida las de Bucaramanga, con el fin de aumentar la población de homocigotos susceptibles.

Relación entre las mutaciones I1,016V y F1,534C y los grados de resistencia

Brogdon et al., (1998), Bisset et al. (2002) y Hemingway et al., (2004) les dan un peso importante a los mecanismos fisiológicos enzimáticos, y moleculares al modelo explicativo de resistencia, sin embargo, Forattini (1962; 1965), les daba mayor relevancia a las variables comportamentales y de penetrancia reducida en los vectores, a la hora de explicar los mecanismos y estrategias involucrados en la resistencia de los mosquitos vectores. En el trabajo aquí expuesto, se encontró que, mediante un modelo de regresión, las mutaciones Ile1016 *kdr*, Cys1534 *kdr* y los grados de resistencia explican en un 55% el modelo total. Estos resultados indican que, la variable *kdr* es un predictor de la resistencia, en este caso mediante un valor cuantificable como los grados de resistencia. El 44% faltante en el modelo, podría estar asociado con otras variables importantes a la hora de explicar el modelo total, probablemente las variables fisiológicas, como las enzimas detoxificantes, la resistencia mediante un cambio de comportamiento, la ecoepidemiología del vector y la adaptabilidad biológica de las poblaciones de *Ae. aegypti* tendrían un papel fundamental en el modelo total.

La correlación encontrada entre las frecuencias de las mutaciones Ile1016 *kdr* y Cys1534 *kdr* y los grados de resistencia, podría evidenciar que la resistencia de las poblaciones de campo de Santander y Cundinamarca a los insecticidas piretroides lambdacialotrina, deltametrina y DDT, se explican en parte a las altas frecuencias de las mutaciones Ile1016 y Cys1534 *kdr*. pues se ha evidenciado que las mutaciones asociadas con los genes en los canales de sodio dependientes de voltaje (VGSC) pueden jugar un papel importante en la pérdida de la interacción insecticida-sitio blanco, llegando a generar resistencia cruzada (O'Reilly et al., 2006; Srisawat., 2010; Vais., 2001).

Esto sugiere que, la vigilancia periódica de dichas mutaciones sería esencial para el monitoreo de las poblaciones de campo, con el fin de tomar decisiones más acertadas acerca de los insecticidas a usar en eventos de brotes y epidemias tanto de dengue como chikungunya y más recientemente del virus del zika.

CONCLUSIONES

- Las poblaciones de *Aedes aegypti* de Bucaramanga y La Mesa son resistentes al DDT, presentan resistencia al piretroide lambdacialotrina y resistencia moderada al piretroide deltametrina.
- La resistencia encontrada a piretroides en La Mesa se puede explicar con la actividad enzimática incrementada de las Oxidasas de función mixta y las mutaciones Ile1016 *kdr*.
- La resistencia encontrada a piretroides en Bucaramanga se puede explicar con la actividad enzimática incrementada de las α -esteras y las mutaciones Cys1534 *kdr*.
- Están circulando de manera simultáneamente los genotipos resistentes mutantes Ile1016 *kdr* y Cys1534 *kdr* en las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Mesa y Bucaramanga, y las altas frecuencias genotípicas y alélicas podrían explicar la resistencia cruzada entre DDT y piretroides.

Recomendaciones

Se requiere vigilancia entomológica periódica para monitorear la evolución de la resistencia, la cual aumentó para deltametrina y lambdacialotrina en La Mesa y para deltametrina en Bucaramanga en el período de tiempo 2010-2015.

En La Mesa, dado que todas las enzimas esterasas (Acetilcolinesterasas, α , β y PNPA) se encontraron alteradas, podrían direccionarse las medidas de control en el uso de malatión con el cual aún no se ha registrado resistencia y viene siendo una opción viable en eventos de brotes y epidemias de dengue, chikungunya ó zika o insecticidas del grupo de los carbamatos, IGRs o *Bti* para el control rutinario de *Ae. aegypti*.

Tanto en las poblaciones de La Mesa como en las de Bucaramanga, se recomienda disminuir ó diluir las altas frecuencia de las mutaciones Ile1016 *kdr* y las de Cys1534, una estrategia adecuada para esto, la aplicación de poblaciones de *Ae. aegypti* de laboratorio parasitadas con *Wolbachia*, las cuales no tienen la capacidad de transmitir y son susceptibles. Adicionalmente, una disminución en las presiones con piretroides podría ser favorable para la no fijación “*de novo*” del mecanismo *kdr* en las poblaciones susceptibles.

Agradecimientos

Al grupo de Investigación en Entomología, a la Maestría en Infecciones y Salud en el Trópico y a Colciencias por la financiación, convocatoria 617.

A las secretarías de Salud de La Mesa y Bucaramanga

Al técnico de ETV de Bucaramanga Jesús Valencia, y a la Entomóloga Dorian y por su cordial recibimiento y colaboración.

A la Doctora Leonor Chacón de Mendieta del Laboratorio Departamental de Salud Pública de Santander.

Al señor Gabriel Cruz, técnico de Entomología de La Mesa y al Dr. Miguel Peña por su apoyo logístico y administrativo.

A Luisa Fernanda Pineda de la Maestría en Infecciones y Salud en el Trópico por su apoyo administrativo.

A la Dra. Liliana Santacoloma por su oportuna colaboración con los controles positivos.

A la Bióloga Diana Londoño por su asesoría y colaboración.

A los profesores de la Maestría en Infecciones y Salud en el Trópico, especialmente a las doctoras Martha Quiñones, Ligia Moncada y Maria Clara Echeverry por su constante colaboración y formación.

Al Dr. Ronald Maestre por su disposición y colaboración.

A todos los compañeros de Maestría y del LEMUN por su amistad y apoyo.

Bibliografía

- Achudume, A. (2012). Insecticide. In A. i. InTech, *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management* (pp. 1: 3-22). Nigeria: Obafemi Awolowo University.
- Aravindan, V., Muthukumaravel, S., & Gunasekaran, K. (2014). Interaction affinity of Delta and Epsilon class glutathione-s-transferases (GSTs) to bind with DDT for detoxification and conferring resistance in *Anopheles gambiae*, a malaria vector. *Journal of vector borne diseases*, 51(1), 8-15.
- Baly, A., Toledo, M., Boelaert, M., Reyes, A., Vanlerberghe, V., Ceballos, E., Van der Stuyft, P. (2007). Cost effectiveness of *Aedes aegypti* control programmes: participatory versus vertical. *R. Soc Trop. Med. Hyg.* , 101, 578–586.
- Bisset, J. (2002). Correct use of insecticides: management of resistance. . *Rev. Cubana Med. Trop*, 54, 202–219.
- Bloomquist, J. R. (1996). Ion channels as targets for insecticides. *Rev. Entomol.* , 41, 163 – 190.
- Bregues, C. H., Chandre, F., McCarroll, L., & Duchon, S. (2003). Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. . *Med Vet Ent* , 17: 87–94.
- Bregues, C., Hawkes, N. J., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., Hemingway, J. (2003). Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and vet*, 17(1), 87-94.
- Brito, L. P., Linss, J. G., Lima-Camara, T. N., Belinato, T. A., Peixoto, A. A., Lima, J. B., & Martins, A. J. (2013). Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. . *PLoS one*, 8(4), e60878.
- Brogdon, W. G., & McAllister, J. C. (1998). Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. . *Journal of the American Mosquito Control Association.*, 14(2), 159-164.
- Brogdon, W., & McAllister, J. (1998). Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis* , 4(4):605–613.
- Brogdon, W., Janet, M. J., & Vulule, J. (1997). Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13(3), 233-237.
- Busvine, J., & Coker, W. (1958). Resistance patterns in DDT resistant *Aedes aegypti*. . *Bull World Health Organ.* , 18:651-6.
- Carvalho, D. O., McKemey, A. R., Garziera, L., Lacroix, R., Donnelly, C. A., Alphey, L., & Capurro, M. L. (2015). Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. . *PLoS neglected tropical*, 9 (7).

- CDC. (2010, Noviembre 18). *Centers for disease control and prevention*. Retrieved from Malathion: <http://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0375.html>
- Chang, C., Shen, W. K., Wang, T. T., Lin, Y. H., Hsu, E. L., & Dai, S. M. (2009). A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 39(4), 272-278.
- Consoli, R., & Oliveira, R. (1994). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil [online]. *Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ*, 228 p. ISBN 85-85676-03-5.
- Crampton, J. M., Beard, C. B., & Louis, C. (1997). *The molecular biology of insect disease vectors: a methods manual*. Londres: Chapman & Hall Ltd.
- Davies, T. G., Field, L. M., Usherwood, P. N., & Williamson, M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB life*, 59(3), 151-162.
- Davies, T., Field, L., Usherwood, P., & Williamson, M. (2007a). A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Mol Biol*, 16:361-375.
- Du Y., Nomura Y., Satar G., Hu Z., Nauen R., He S.Y., K., D. (2013). Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *PNAS*, 110(29):11785–11790.
- Dunn, L. (1927). Observations on the oviposition of *Aedes aegypti* Linn. in relation to distance from habitation. *Bulletin of Entomology Res.*, 18: 145-148.
- Ffrench-Constant, R., Pittendrigh, B., Vaughan, A., & Anthony, N. (1998). Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353(1376):1685–1693.
- Fonseca, I., & Quiñones, M. L. (2005). Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública. *Rev. Colomb. Entomol*, Vol.31, n.2 [cited 2015-02-02], pp. 107-115 .
- Fonseca, I., Bolanos, D., Gómez, W., & Quinones, M. (2007). Evaluación de la susceptibilidad de larvas de *Aedes aegypti* a insecticidas en el departamento de Antioquia. Memorias XIII Congreso colombiano de parasitología y medicina tropical. *Biomédica*, 27 (2):1.
- Fonseca-González, I., Quiñones, M. L., Lenhart, A., & Brogdon, W. G. (2011). Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest management science*, 67(4), 430-437.
- Forattini, O. (1962). Entomología médica. Parte general, Diptera, Anophelini. *Faculdade de Higiene e Saúde Pública, São Paulo.*, vol. I, 622 pp.
- Forattini, O. (1965a.). Entomología médica. Culicini: Culex, Aedes Psorophora., *Universidade São Paulo, São Paulo.*, vol. II, 506 pp.

- González, J., Rey, G., Olano, V., & Brochero, H. (2005). Ministerio de la Protección Social. *Informe técnico*, Convenio 043.
- González-Obando, R., Gamboa, F., Perafán, O., Suárez, M. F., & L., M. (2007). Experience of an entomological analysis of the breeding sites of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in Cali, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 33(2), 148-156.
- Hardy, G. H. (1908). Mendelian proportions in a mixed population. *Scienc*, Science 28: 49–50.
- Harrington, L. C., Edman, J. D., & Scott, T. W. (2001). Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *Journal of Medical Entomology*, 38(3), 411-422.
- Harris, A., Rajatileka, S., & Ranson, H. (2010). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg*, 83:277-284.
- Hemingway, J. (2000). The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemical Molecular Biol*, 30:1009–1015.
- Hemingway, J., & Ranson, H. (2000). Insecticides resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology.*, 45.371-391.
- Hemingway, J., Hawkes, N., McCarroll, L., & Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Molec Biol*, 34:653–665.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (2012). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. . California: Academic press.
- INS; OPS; Ministerio de la Protección Social. (2010). *Guía para la vigilancia entomológica de dengue*. Bogotá: Instituto Nacional de Salud.
- Instituto Nacional de Salud. (2014, Junio 11). Fiebre Amarilla. *Instituto Nacional de Salud, Equipo Inmun prevenibles*, pp. 1-18.
- IRAC. (2010). *Prevention and management of insecticide resistance in vectors of public health importance*. Seattle, USA: Resistance management for sustainable agriculture and improved public health.
- Khambay, B., & Jewess, P. (2005). Pyrethroids. In *Comprehensive Molecular Insect Science* (Gilbert, L. I., Iatrou, K., and Gill, S. S. eds.). *Elsevier, Oxford*, vol. 6, pp. 1 – 29.
- Kongmee, M., Prabaripai, A., Akratanakul, P., Bangs, M. J., & Chareonviriyaphap, T. (2004). Behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposed to deltamethrin and possible implications for disease control. *Journal of medical entomology*, 41(6), 1055-1063.
- Kushwah, R. B., Dykes, C. L., Kapoor, N., Adak, T., & Singh, O. P. (2015). Pyrethroid-Resistance and Presence of Two Knockdown Resistance (kdr) Mutations, F1534C and a Novel Mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(1), e3332.

- Leyva, M., Tacoronte, J. E., Marquetti, M. D., Scull, R., Montada, D., Rodríguez, Y., & Yirian Bruzón, R. (2008). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). . *Revista Cubana de Medicina Tropical*.
- Lima, E. P., Paiva, M. H., Araújo, A. P., Da Silva, E. V., Da Silva, U. M., Oliveira, L. N., & De Melo Santos, M. A. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. . *Parasit Vectors*, 4(5), 2-12.
- Linss, J. G., Brito, L. P., Garcia, G. A., Araki, A. S., Bruno, R. V., Lima, J. B., & Martins, A. J. (2014). Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasit Vectors*, 7(1), 25.
- Liu, N. (2015). Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. . *Annual review of entomology*., 60, 537-559.
- Long, K. M., & Heise, M. T. (2015). Protective and Pathogenic Responses to chikungunya Virus Infection. . *Current Tropical Medicine Reports*, 1-9.
- Lounibos, L. P. (2002). Invasions by insect vectors of human disease. *Annual review of entomology*, 47(1), 233-266.
- Lumjuan, N., Stevenson, B., Prapanthadarab, L., Somboonc, P., Brophyd, P., Loftuse, B., & Severson, D. &. (2007). The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.37, pp.1026-35.
- Maestre-Serrano, R. (2012). Susceptibility status of *Aedes aegypti* to insecticides in Colombia. In Intech, *Insecticides- Pest engineering* (pp. Chapter 8: 163-200). Croacia: Intech.
- Maestre-Serrano, R., Gomez-Carmargo, D., & Ponce-Garcia, G. (2014). Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 10.1016.
- Mancheno, M., Kroeger, A., & Álvarez, G. (1988). Manual técnico para el control de malaria, dengue, leishmaniosis y oncocercosis. . *Servi Offset Ltda*, 1998. p. 264.
- Marcombe, S., Mathieu, R., Pocquet, N., Riaz, M., & Poupardin, R. (2012). Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PLoS One* , 7:e30989.
- Martinez Torres, E. (2008). dengue. *Estudios Avanzados*, Volumen 22, n.64. pp. 33-52.
- Martínez, E. (1997). dengue. In González, & Saldaña, *Infectología clínica pediátrica* (pp. p.589-95.). México, DF: Editorial Trillas.
- Martínez, E. (1998). *dengue y dengue hemorrágico*. Buenos Aires: Universidad de Quilmes.
- Martínez-Durán, M., Gomez, S., Mercado, M., Campo, A., & Alarcon-Cruz, A. (2014, Octubre 31). Transmisión autóctona de chikungunya en Colombia. *Informe Quincenal Epidemiológico Nacional*, pp. 311-339.

- Martins, A., Andrade, L., Linss, J., Peixoto, A., & Valle, D. (2009). Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. . *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 81(1), 108-115.
- Matheson, R. (1950). *Medical entomology*. Nw York: Th vail-Ballou Press.
- Metcalf, R. (1989). Insect resistance to insecticides. . *Pesticide Science* , 26, 333-358.
- Morales, A., Olano, V., & Ferro, C. (1998). Laboratorio de Entomología, 1934 – 1997. . *80 años del Instituto Nacional de Salud*, 414.
- Motta, A., Tonn, R., Uribe, L., & Calheiros, L. (1976). A comparison of methods of application of several insecticides for the control of *Aedes aegypti* in villages in Colombia. *WHO/VBC/76*, 626: 1-33.
- Mullen, G. R., & Durden, L. A. (2002). *Medical and veterinary entomology*. Academic press.
- Nauen, R., Elbert, A., McCaffery, A., Slater, R., & Sparks, T. C. (2012). IRAC: insecticide resistance, and mode of action classification of insecticides. . *Modern Crop Protection Compounds*, Volumes 1-3, Second Edition, 935-955.
- O'Brien, R. (1967). Pyrethroids. In R. O'Brien, *Insecticides: Action and Metabolism* (pp. Capítulo 10; 164-172). New York: Academic Press.
- O'Reilly A.O, Khambay BPS, Williamson MS, Field LA, Wallace BA, & TGE., D. (2006). Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochem Journal*, 396:255–263.
- Ocampo, C., Quiñones, M., & Brochero, H. (2007). *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*. Bogota: Red Nacional de Vigilancia a Insecticidas.
- Ocampo, C., Salazar, M., Mina, N., Mcallister, J., & Brogdon, W. (2011). Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. . *Acta Tropica*, 118 (1):37-44.
- OMS. (2014, Marzo). *Organización Mundial de la Salud*. Retrieved from Fiebre amarilla: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/es/>
- OMS. (2014, Octubre). *Organización Mundial de la Salud*. Retrieved from chikungunya, Nota descriptiva N°327: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/es/>
- OPS ; O. M. S. (2011). Respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas. *Washington, DC: OPS*.
- OPS. (1995). *dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control*. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud.
- Padilla, J. C., Rojas, D. P., & Sáenz-Gómez, R. (2012). *dengue en Colombia: Epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia*. Bogotá, Colombia: Guía de impresiones.

- Palmquist, K., Fairbrother, A., & Salatas, J. (2012). Pyrethroid insecticides: use, environmental fate, and ecotoxicology. *INTECH*, Open Access Publisher.
- Parola, P., De Lamballerie, X., Jourdan, J., Rovey, C., Vaillant, V., Minodier, P., & Charrel, R. N. (2006). Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerging infectious diseases*, 12(10), 1493.
- Pérez, I., & Alegría-Torres, J. (2012). DDT and Its Metabolites in Mexico. In Intech, *Insecticides* (pp. Capítulo 5: 99- 116). Croacia: Intech.
- Perry, A., Yamamoto, I., Ishaaya, I., & Perry, R. (1998). The organochlorine insecticides. In *Insecticides in Agriculture and Environment: Retrospects and Prospects*, . Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Pialoux, G., Gaüzère, B. A., Jauréguiberry, S., & Strobel, M. (2007). chikungunya, an epidemic arbovirosis. *The Lancet infectious diseases*, 7(5), 319-327.
- Pinheiro, F., & Corber, S. (1997). Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. . *World Health Stat.*, 50, 161–169.
- Ponce, G., Cantú, P. C., Flores, A., Badii, M., Zapata, R., López, B., & Fernández, I. (2006). Modo de acción de los insecticidas. *Revista salud pública y nutrición*. , Octubre-Diciembre, 7(4).
- Rajatileka, S., Black, W. C., Saavedra-Rodriguez, K., Trongtokit, Y., Apiwathnasorn, C., McCall, P. J., & Ranson, H. (2008). Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. *Acta tropica*, 108(1), 54-57.
- Ranson, H., N'Guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z., & Corbel, V. (2011). Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implication for malaria control? *Trends Parasitology*, 27(2):91-98.
- Rawlins, S. C., & Wan, J. O. (1995). Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 11(1), 59-65.
- Rey-Vega, G. (2011). Determinación de los grados de resistencia al insecticida temefos en poblaciones de *Aedes aegypti* Linnaeus 1762, (Diptera: Culicidae) y su implicación en la eficacia del insecticida en los departamentos de Cauca, Guajira, Cundinamarca y Atlántico. *Tesis de maestría*.
- Rinkevich, F., Du, Y., & Dong, K. (2013). Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 106:93–100.
- Rodríguez, C., & Magdalena, M. (2011). Impacto operacional del uso de insecticidas en larvas de *Aedes aegypti* en La Habana. *Rev Cubana Med Trop [online]*. , vol.63, n.1 [citado 2014-08-04], pp. 81-86. .
- Rodríguez, G., Velandia, M., & Boshell, J. (2003). Fiebre amarilla; la enfermedad y su control. *INS*.

- Rodríguez, M. (2008). Estudio de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). . *Tesis de doctorado en Ciencias de la Salud. Laboratorio de Toxicología y genética. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kour*, 128p.
- Rodríguez, M., Bisset, J., Ruiz, M., & Soca, A. (2002). Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. . *Journal of medical entomology*, 39(6), 882-888.
- Rojas, W., Gonzales, J., Amud, M., Quiñones, M., & Vélez, I. (2003). Evaluación de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* del municipio de Barrancabermeja, Santander, a los insecticidas Malation, fenitrorion, Temefos, Lambdacyhalotrina, deltametrina, permetrina, Propoxur y DDT. *Biomédica*, 23 (1).
- Saavedra-Rodríguez, K., Urdaneta-Marquez, L., Rajatileka, S., Moulton, M., Flores, A. E., Fernandez-Salas, I., . . . Black, W. C. (2007). A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect molecular biology*, Vol. 16, no 6, p. 785-798.
- Salazar, M., Carvajal, A., Cullar, M., Olaya, A., Quinones, J., Velásquez, O., Ocampo, C. (2007). Resistencia a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* y *Anopheles spp* en los departamentos de Huila, Valle, Cauca y Nariño. *Biomédica* , 27 (2): 177.
- Salinas, A. E., & Wong, M. G. (1999). Glutathione S-transferases-a review. *Current medicinal chemistry*, 6(4), 279-310.
- Santacoloma Varón, L., Chaves Córdoba, B., & Brochero, H. L. (2010). Susceptibility of *Aedes aegypti* to DDT, deltamethrin, and lambda-cyhalothrin in Colombia. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 27(1), 66-73.
- Santacoloma, L. (2008). *Estado de la susceptibilidad a insecticidas de poblaciones naturales de Aedes aegypti Linnaeus 1762 vector del dengue y Anopheles darlingi Root 1926 vector primario de malaria (Díptera: Culicidae) en cinco departamentos de Colombia*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia - Tesis de Maestría.
- Santacoloma, L., Chaves, B., & Brochero, H. L. (2012). Estado de la susceptibilidad de poblaciones naturales. . *Biomédica*, 32(3), 333-343.
- Service, M. (2014). Culicinae mosquitoes. En M. Service, *Medical Entomology for Students*. Liverpool: Cambridge Press.
- Service, M. (2014). *Medical Entomology for Students*. Liverpool School of Tropical Medicine: Cambridge University Press.
- Shafer, T. J., Meyer, D. A., & Crofton, K. M. (2005). Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environmental health perspectives*, 113(2), 123.
- Shannon, R. (1931). The environment and behaviour of some Brazilian mosquitoes. *Proc. Ent. Soc*, 33: 1-27.

- Silva, A. P., Santos, J. M., & Martins, A. J. (2014). Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids – a review. *Parasites & Vectors*, 7(1), 450. doi:10.1186/1756-3305-7-450.
- Silvério, F. O., de Alvarenga, E. S., Moreno, S. C., & Picanço, M. C. (2009). Synthesis and insecticidal activity of new pyrethroids. *Pest management science*, 65(8), 900-905.
- SIVIGILA. (2001). *Prevención y control del dengue*. OPS/OMS Colombia: Informe ejecutivo semanal- Grupo de vigilancia en salud pública.
- SIVIGILA. (2015). Boletín epidemiológico semanal. *Instituto nacional de salud, INS*, 17-23.
- SIVIGILA. (2015, Febrero 05). *INS*. Retrieved from Instituto Nacional de Salud: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiologico/2014%20Boletin%20epidemiologico%20s emana%2053.pdf>
- SIVIGILA. (2015, Enero). *Instituto Nacional de Salud*. Retrieved from Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiologico/2015%20Boletin%20epidemiologico%20s emana%2001.pdf>
- Smirle, M., Zurowski, C., Lowery, D., & Footitt, R. (2010). Relationship of insecticide tolerance to esterase enzyme activity in *Aphis pomi* and *Aphis spiraecola*. *Journal of Economic Entomology*, 103:374–378.
- Spiegel, J., Bennett, S., Hattersley, L., Hayden, M., Kittayapong, P., Nalim, S., . . . Gubler, D. (2005). Barriers and bridges to prevention and control of dengue: the need for a social–ecological approach. *EcoHealth*, 2, 27.
- Srisawat, R., & Komalamisra, N. (2010). Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Applied Entomology and Zoology*, 45(2), 275-282.
- Suárez, M., Gonzáles, R., & Morales, C. (1996). Temefos resistance to *Aedes aegypti* in Cali, Colombia. . *Supplement to the American Journal of Tropical Medicine*, 55 (2): 257.
- Sugano, M., & Ishiwatari, T. (2012). The biological activity of a novel pyrethroid: metofluthrin. In N. Matsuo, & T. Mori, *Pyrethroids: from Chrysanthemum to modern industrial insecticide* (pp. 314: 203-220). Berlin: Springer.
- SupYoon, K., Symington, S., Lee, S., Soderlund, D., & Clark, J. (2008). Three mutations identified in the voltage-sensitive sodium channel α -subunit gene of permethrin-resistant human head lice reduce the permethrin sensitivity of house fly Vssc1 sodium channels expressed in *Xenopus oocytes*. . *Insect Biochem. Mol. Biol.* , 38:296-306.
- Syafruddin, D., & et al, a. (2010). Detection of 1014F kdr mutation in four major Anopheline malaria vectors in Indonesia. *Malaria Journal*, 9:135.

- Thomas, S. J. (2015). Preventing dengue—Is the Possibility Now a Reality?. . *New England Journal of Medicine.*, 372: 172-173.
- Tonn, R., Uribe, L., Calheiros, L., & Motta, A. (1976). A comparison of methods of application of several insecticides for the control of *Aedes aegypti* in villages in Colombia. *WHO*, 76 626: 1-33.
- Vais, H., Williamson, M. S., Devonshire, A. L., & Usherwood, P. N. (2001). The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. *Pest management science*, 57(10), 877-888.
- Valle, D., Montella, I., Medeiros, P., Ribeiro, R., Martins, A., & Lima, J. (2006). Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti*. *First edition. DF*; all.
- Vaughan, A., Hawkes, N., & Hemingway, J. (1997). Coamplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide resistance *Culex quinquefasciatus*. . *The Biochemical Journal* , 325: 359-365.
- Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., K., M., A., B., & M., M. (2004). The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology* , 13:1–7.
- Wenceslao, P., & Pedroni, E. (2008). Análisis costo-beneficio del control de vectores en la transmisión potencial de dengue. *Rev Panam Salud Pública.*, 24:113-9.
- WHO. (2012). Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors (GPIRM). . *Geneva: World Health Organization*.
- WHO. (2014, Octubre). <http://www.who.int>. Retrieved from Organización mundial de la salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/es/>
- WHO, O. (1957). Seventh report Expert Committee on insecticides. *World Health Organization. Tech Report Ser.*, Vol.125, pp.37.
- WHO., W. H. (1981a). Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphorus and carbamate insecticides. *Establishment of the base-line.*, WHO/ VBC/81.805.
- World Health Organization (WHO), . (2009). Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. *Geneva*.
- World Health Organization, W. (1981b). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquitoes larvae to insecticide. . *documento sin publicar*, WHO/ VBC/81.807.
- Yanola, J., Somboon, P., Walton, C., Nachaiwieng, W., Somwang, P., & Prapanthadara, L. (2011). 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. *Tropical Medicine & International Health*, 16: 501–509.

- Yergolkar, P. N., Tandale, B. V., Arankalle, V. A., Sathe, P. S., AB, S., Gandhe, S. S., & Mishra, A. C. (2006). chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. . *Emerging infectious diseases*, 12(10), 1580.
- Zlotkin, E. (1999). The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annual review of entomology*,, 44(1), 429-455.