

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA RESISTENCIA AL INSECTICIDA
LAMBDA-CIALOTRINA EN EL MOSQUITO *Aedes aegypti* DE CÚCUTA NORTE DE
SANTANDER, COLOMBIA**

DARÍO LEONARDO VIDES TORRES



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PREGRADO EN BIOLOGÍA
2018**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA RESISTENCIA AL INSECTICIDA
LAMBDA-CIALOTRINA EN EL MOSQUITO *Aedes aegypti* DE CÚCUTA NORTE DE
SANTANDER, COLOMBIA**

DARÍO LEONARDO VIDES TORRES

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de
Biólogo

Director

MAURICIO FIGUEROA

Biólogo. M.Sc.

Universidad de Pamplona

Codirector

OMAR TRIANA CHÁVEZ

Biólogo. Ph.D.

Universidad de Antioquia



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PREGRADO EN BIOLOGÍA
2018**

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por ponerme en el lugar y en el tiempo correcto. Por darme la oportunidad y la capacidad de trabajar para lograr esta meta y entrever mi sueño. Por las innumerables bendiciones que ha derramado sobre mí, que llevaron a concluir cada uno de mis propósitos, como el de ser hoy un profesional Biólogo.

A **mis abuelos** maternos quienes desde que inicie este proceso fueron de gran apoyo emocional y económico.

A **mi tutor** el Biólogo M.Sc. Mauricio Figueroa, por brindarme siempre su apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

A **la Bióloga** M.Sc. Wlida Becerra, docente del Departamento de Biología de la universidad de Pamplona, por el cariño y apoyo brindado durante mi formación como Biólogo.

Al Biólogo M.Sc. Olver Parada, por su apoyo y asesoría en temas relacionados con este trabajo de grado

A **mis amigos y compañeros** Sindy Galán, Yiseth Mendoza, María Cenith Rizzo, Luis Miguel Vergara.

A la **Secretaría Departamental de Salud** de Norte de Santander, y a sus técnicos por el acompañamiento en las visitas domiciliarias en la realización del trabajo de campo.

Al Ph.D. Omar Triana, codirector y coordinador del grupo de investigación en Biología y Control de Enfermedades Infecciosas (**BCEI**) de la universidad de Antioquia, quien me recibió en su laboratorio y me brindo todo el apoyo para la realización de la parte experimental de este proyecto.

A **la M.Sc.** Yurany Granada, quien me brindo todo su apoyo y asesoría durante mi estancia en el laboratorio de (BCEI) de la universidad de Antioquia.

Gracias a todos los integrantes del grupo de investigación **BCEI**, quienes siempre me apoyaron y con quienes compartí durante mi estancia en Medellín.

Dedicatoria

Dedico este trabajo de grado a mis abuelos Leonel y Miquelina por todo ese apoyo incondicional que me han brindado, a mi madre Noemi y a toda mi familia.

Gracias a todos ellos fue posible lograr este sueño.

Muchas gracias.

Darío Leonardo Vides Torres

1'096.209.625

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 12 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 15 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 17 |
| 2.1 <i>Aedes aegypti</i> y los arbovirus que transmite | 17 |
| 2.1.1 <i>Aedes aegypti</i> | 17 |
| 2.1.1.1 Ciclo de vida | 17 |
| 2.1.1.1.1 Huevo | 17 |
| 2.1.1.1.2 Larva | 17 |
| 2.1.1.1.3 Pupa | 18 |
| 2.1.1.1.4 Adulto | 18 |
| 2.1.2 Arbovirus que transmite | 20 |
| 2.1.2.1 Dengue (DENV) | 20 |
| 2.1.2.2 Chikungunya (CHIKV) | 20 |
| 2.1.2.3 Zika (ZIKV) | 21 |
| 2.1.2.4 Mayaro (MAYV) | 21 |
| 2.2 Distribución mundial de <i>Aedes aegypti</i> | 22 |
| 2.2.1 Distribucion de <i>Ae. aegypti</i> en Colombia | 22 |
| 2.2.2 Distribucion de <i>Ae. aegypti</i> en Cúcuta | 24 |
| 2.3 Criaderos | 24 |
| 2.4 Metodos de control del vector <i>Ae. aegypti</i> | 25 |
| 2.5 Control químico | 26 |
| 2.5.1 Control químico del vector <i>Aedes aegypti</i> | 26 |
| 2.5.2 Control químico del vector <i>Aedes aegypti</i> en Colombia | 26 |
| 2.6 Insecticidas | 28 |
| 2.7 Resistencia a insecticidas | 28 |

| | |
|---|----|
| 2.7.1 Mecanismos de resistencia a insecticidas | 29 |
| 2.7.1.1 Resistencia metabólica | 30 |
| 2.7.1.2 Alteración en el sitio blanco | 30 |
| 2.7.1.2.1 Resistencia Knockdown (Kdr) | 31 |
| 2.8 Canal de sodio | 31 |
| 2.8.1 Estructura del canal de sodio | 32 |
| 2.8.2 Canal de sodio -Piretroides | 33 |
| 3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN | 34 |
| 4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 37 |
| 5. HIPÓTESIS | 37 |
| 6. OBJETIVOS | 38 |
| 6.1 General | 38 |
| 6.2 Específicos | 38 |
| 7. METODOLOGÍA | 39 |
| 7.1 Área de estudio | 39 |
| 7.2. Colecta del materia biológico | 40 |
| 7.3. Obtención de la F ₁ de <i>Ae. aegypti</i> en el laboratorio | 40 |
| 7.4. Bioensayos para la población de campo | 41 |
| 7.5. Identificación de mutaciones | 43 |
| 7.5.1 Extracción de DNA | 43 |
| 7.5.2 Genotipificación de la PCR específica de alelo | 43 |
| 7.6 Análisis poblacional | 44 |
| 8. RESULTADOS | 45 |
| 8.1 Ensayos biológicos del insecticida Lambda-cialotrina | 45 |
| 8.2 PCR específica de alelo para las mutaciones F1558C, V1016I, V419L | 46 |
| 8.3 Correlación de la resistencia con las f.a de las diferentes mutaciones | 58 |
| 8.4 Mutaciones en combinación | 59 |
| 9. DISCUSIONES | 60 |
| 9.1 Bioensayos | 60 |
| 9.2 Mutación F1558C | 61 |

| | |
|----------------------------|----|
| 9.3. Mutación V1016I | 62 |
| 9.4 Mutación V419L | 63 |
| 10. CONCLUSIONES | 65 |
| 11. RECOMENDACIONES | 66 |
| 12. BIBLIOGRAFÍA | 67 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de *Ae. aegypti*,

Figura 2. Distribución de *Ae. aegypti* en Colombia,

Figura 3. Criaderos artificiales de *Ae. aegypti*.

Figura 4. Control químico contra *Ae. aegypti*.

Figura 5. Principales mecanismos descritos asociados con resistencia a insecticidas en mosquitos.

Figura 6. Estructura molecular del canal iónico dependientes de voltaje.

Figura 7. Estructura molecular del insecticida lambda-cialotrina,

Figura 8. Mapa de Cúcuta y los barrios donde se recolectaron las muestras de mosquitos de *Ae. aegypti*.

Figura 9. Grados de resistencia a lambda-cialotrina de las poblaciones de *Ae. aegypti* estudiadas en el municipio de San José de Cúcuta, Colombia

Figura 10. Resultado de la Reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo (PCR- AS) para la mutación F1558C.

Figura 11. Resultado de la Reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo (PCR- AS) para la mutación V1016I.

Figura 12. Resultado de la Reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo (PCR- AS) para la mutación V419L.

Figura 13. Comparación de frecuencias alélicas para la mutación F1558C, en *Ae. aegypti* de cuatro barrios estudiados en Cúcuta.

Figura 14. Comparación de frecuencias alélicas para la mutación V1016I, en *Ae. aegypti* de cuatro barrios estudiados en Cúcuta.

Figura 15. Comparación de frecuencias alélicas para la mutación V419L, en *Ae. aegypti* de cuatro barrios estudiados en Cúcuta.

Figura 16. Correlación entre la frecuencia de alelos mutados kdr (1558C, 1016I, 419L) y la resistencia a la lambda-cialotrina en poblaciones de *Ae. aegypti*

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones en partes por millón del insecticida lambda-cialotrina evaluadas en larvas de *Ae. aegypti*.

Tabla 2. Cebadores específicos de alelos utilizados en la genotipificación de *Ae. aegypti* de Colombia.

Tabla 3. Tasa de resistencia a lambda-cialotrina de las poblaciones de *Ae. aegypti* estudiadas en el municipio de San José de Cúcuta, Colombia.

Tabla 4: Frecuencias genotípicas y alélicas para la mutación F1558C en *Ae. aegypti* de cuatro barrios estudiados en Cúcuta.

Tabla 5: Frecuencias genotípicas y alélicas para la mutación V1016I en *Ae. aegypti* de cuatro barrios estudiados en Cúcuta.

Tabla 6: Frecuencias genotípicas y alélicas para la mutación V419L en *Ae. aegypti* de cuatro barrios estudiados en Cúcuta.

Tabla 7. Genotipos y valores asociados para la evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante Chi cuadrado de las mutaciones del canal de sodio en *Ae. aegypti* de la población Toledo Plata

Tabla 8. Genotipos y valores asociados para la evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante Chi cuadrado de las mutaciones del canal de sodio en *Ae. aegypti* de la población Santa Teresita

Tabla 9. Genotipos y valores asociados para la evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante Chi cuadrado de las mutaciones del canal de sodio en *Ae. aegypti*, población Circunvalación.

Tabla 10. Genotipos y valores asociados para la evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante Chi cuadrado de las mutaciones del canal de sodio en *Ae. aegypti*, población Tucunaré

Tabla 11. Haplotipos observados en poblaciones de mosquitos *Ae. aegypti* de Toledo Plata, Santa Teresita, Circunvalación y Tucunaré.

RESUMEN

Las enfermedades causadas por arbovirus como Dengue, Chikungunya y Zika constituyen un problema de salud pública a nivel departamental y mundial. En Colombia en el presente año a la semana epidemiológica 13 se reportan al SIVIGILA 402 casos de Dengue, mientras que a la semana 16 se notifican 329 nuevos casos de Zika y 180 casos de Chikungunya. Para controlar el insecto vector se han utilizado diferentes alternativas, como el control biológico, manejo ambiental, insecticidas de origen biológico e insecticidas químicos. La principal estrategia para el control de *Ae. aegypti* es el uso de insecticidas químicos, siendo los piretroides unos de los más utilizados. Sin embargo, se reporta la resistencia del insecto a estos químicos. Esta resistencia a nivel mundial se encuentra asociada en gran medida a mutaciones en el gen del canal del sodio (resistencia knockdown (kdr)). Este trabajo pretendió caracterizar el estado de resistencia a lambda-cialotrina y la identificación de mutaciones en la región codificante del canal de sodio en poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de Cúcuta Norte de Santander. Para el estudio se colectaron formas inmaduras de *Ae. aegypti* de los barrios Toledo Plata, Santa Teresita, Circunvalación y Tucunaré de Cúcuta. A partir de este material en condiciones de laboratorio se obtuvieron las generaciones F₀ para adultos y F₁ en larvas. Se seleccionaron larvas en tercer y cuarto estadio las cuales fueron expuestas a seis concentraciones del insecticida (grado técnico 98% lambda-cialotrina), determinando la mortalidad larval 24 horas después de la exposición, siguiendo la metodología propuesta por la Organización Mundial de la Salud. En las formas adultas se realizó extracción de DNA, posteriormente se identificaron las mutaciones en el canal de sodio mediante una PCR alelo específica (AS-PCR). Se evidenció la resistencia a la lambda-cialotrina y se identificó la presencia de las tres mutaciones en las poblaciones analizadas. Se determinó la presencia del alelo 1558C en un 100%. Sugiriendo que esta mutación este confiriendo resistencia a insecticidas diferentes a la lambda-cialotrina. Además, se observó una asociación positiva significativa del 50% entre las mutaciones V419L y V1016I y la resistencia a la lambda-cialotrina. Se concluye que el uso indiscriminado de insecticidas en la región ha conllevado al desarrollo de resistencia que ha de perdurar en el tiempo. Se recomienda, discontinuar el uso de estos insecticidas por un largo tiempo, para que los insectos vuelvan a hacerse susceptibles.

Palabras Clave: *Aedes aegypti*, Resistencia a insecticidas, Resistencia knockdown (kdr), Gen del canal de sodio, Lambda-cialotrina

ABSTRACT

Diseases caused by arboviruses, such as Dengue, Chikungunya, and Zika, constitute a problem for public health at on a state and national level. Currently in Colombia, as of the thirtieth epidemiological week, the SIVIGILA has reported 402 cases of Dengue, while as of the sixteenth week there have been 329 new cases of Zika and 180 cases of Chikungunya. To control insect vectors, there continues to be a consistent use of biological control, environmental manipulation, and biological and chemical insecticides. The principle strategy for the control of *Ae. aegypti* is the use of chemical insecticides, specifically the use of pyrethroids. Nevertheless, insect resistance to this chemical intervention has been reported. This resistance on a world scale is largely associated with mutations to the sodium channel gene (knockdown resistance (kdr)). This work aims to characterize the state of resistance to lamda-cyhalothrin and identify mutations to the coding region for sodium channels in populations of *Ae. aegypti*. residing in northern Cúcuta de Santander. For the study, immature *Ae. aegypti* were collected from the towns of Toledo Plata, Santa Teresita, Circunvalación, and Tucunaré in Cúcuta. Under laboratory conditions, the F₀ adult generations and F₁ larva generations were obtained. Larvae were selected in between their third and fourth developmental stage and were exposed to six concentrations of insecticides (98% lamda-cyhalothrin). Larval mortality was calculated 24 hours after exposure using methodology from World Health Organization. In adult forms DNA extraction was performed to identify sodium channel mutations using allele specific polymerase chain reaction (AS-PCR). Resistance to lamda-cyhalothrin and three sodium channel mutations were identified in the analyzed populations. The presence of allele 1558C was identified in 100% of samples suggesting that this mutation confers resistance to insecticides other than lamda-cyhalothrin. Additionally, there was a positive association to resistance to lamda-cyhalothrin in 50% of samples with V419L and V1016I mutations. We conclude that the indiscriminate use of insecticide in the region has

allowed for the development of insecticide resistance that will persist over time. Based on these results, we recommend the discontinuation of insecticide use for a large period to increase insecticide susceptibility in populations.

Keywords: *Aedes aegypti*, Insecticide resistance, knockdown resistance (kdr), Sodium channel gene, lambda-cyhalothrin

1. INTRODUCCIÓN

Aedes aegypti es una de las especies más importantes de mosquitos en lo que se refiere a la transmisión de enfermedades. Se considera una especie invasora, ya que han colonizado exitosamente muchos sitios fuera de sus ámbitos nativos (Juliano & Lounibos, 2005). *Ae. aegypti*, originaria de África, migró al nuevo mundo durante los siglos XV al XVII a bordo de los barcos que transportaban esclavos (Christophers, 1960, Tabachnick, 1991). Este insecto es transmisor de arbovirus como Dengue, Zika, Chikungunya y Mayaro, que son como lo describió la Organización Mundial de la Salud en 1967, un grupo de virus que existen en la naturaleza principalmente, debido a la transmisión biológica entre huéspedes vertebrados susceptibles por artrópodos hematófagos; de ahí su nombre del inglés “Arthropod-Borne Viruses” o “Virus llevados (transmitidos) por artrópodos” (Arredondo et al., 2016). El avance de estas arbovirosis alcanza elevados niveles de morbimortalidad en una situación epidemiológica sumamente compleja, determinada por la diversidad de causas simultáneas y concomitantes que la contextualizan; como son la variabilidad de las condiciones ambientales, los elementos demográficos y socioeconómicos que favorecen su presencia (Undurraga et al., 2015).

En su mayoría la aplicación inadecuada de programas para el control de vectores ha causado el desarrollo de resistencia por parte de *Ae. aegypti*. La resistencia a los insecticidas en los mosquitos es mediada por una serie de mecanismos, dos de los cuales son el foco principal de la mayoría de los estudios: la resistencia metabólica y las alteraciones del sitio objetivo *mutaciones kdr*. La resistencia metabólica implica grandes familias de enzimas multigenas: citocromo P450, glutatión S-transferasas y carboxil estererasas. El citocromo P450s, en particular, se ha visto implicado en conferir resistencia a los mosquitos. (Ngoagoauni et al., 2016; Moyes et al., 2017).

En el país durante muchas décadas se ha realizado control químico con insecticidas adulticidas piretroides (lambda-cialotrina, deltametrina, permetrina) y adulticidas/larvicidas organofosforados (malatión y temefos), la constante presión ha causado pérdida de susceptibilidad por parte del vector *Ae. aegypti*, por lo cual se ha reportado en diferentes sitios del territorio nacional resistencia: el primer reporte se originó en Cúcuta donde se encontró resistencia al DDT durante la década de los 60s (Augusto 1961). Posteriormente en ensayos bioquímicos en Cali y mediante el uso larvas

de *Ae. aegypti* se demostró actividad enzimática asociada con resistencia (Ocampo et al., 2004). En otro trabajo se detecta resistencia a Temefos y Malatión en algunas localidades de Antioquia, Cali, Tuluá y Cartagena (Fonseca et al., 2005), y en otras localidades de Colombia (Fonseca-González et al., 2011, Ocampo et al., 2011; Santacoloma et al., 2010). Por último, (Maestre et al., 2014), y (Atencia et al., 2016), en la región Caribe reportan por primera vez para Colombia las mutaciones V1016I y F1534C respectivamente, asociadas ampliamente a poblaciones resistentes; por su parte (Granada et al., 2018) hacen lo mismo para la mutación V419L en poblaciones de Bello, Villavicencio y Riohacha.

Dada que la resistencia a insecticidas y la asociación de mutaciones Kdr en el canal de sodio regulado por voltaje (V_{gsc}) ha sido reportado en gran parte del territorio nacional, se pretende conocer si en Cúcuta *Ae. aegypti* es resistente al piretroide lambda-cialotrina, y si estos presentan mutaciones en el canal de sodio.

2. MARCO TEORICO

2.1 *Aedes aegypti* y los Arbovirus que transmite

2.1.1 *Aedes aegypti*

Aedes aegypti (Linnaeus) es un díptero perteneciente a la familia culicidae, con metamorfosis completa (holometabólica). Durante su desarrollo ontogénico pasa por los estadios de huevo, larva, pupa y adulto (Montero 2009). El mosquito es el principal vector de los virus Dengue Chikungunya y Zika (Rodríguez-morales 2015).

2.1.1.1 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, proceso denominado diapausa (Lounibos, 2002).

2.1.1.1.1 Huevo

Los huevos de *Ae. aegypti* miden aproximadamente 1 mm de longitud; tienen forma de cigarro y son tersos. Al momento de la postura son blancos, pero rápidamente cambian a negro brillante. Si el ambiente es húmedo y cálido son fecundados en 48 horas, pero puede prolongarse a cinco días si bajan las temperaturas; resisten largos períodos de desecación, hasta por un año, lo que es uno de los principales obstáculos para su control. Algunos hacen eclosión en los primeros 15 minutos de contacto con el agua y otros hasta que son mojados varias veces. (Chico-Aldana, 2017)

2.1.1.1.2 Larva

Las larvas son exclusivamente acuáticas. La fase larval es el período de alimentación y crecimiento. Las larvas de *Aedes* se distinguen a simple vista de las de otros géneros: en la superficie del agua se mantienen casi verticales y nadan con un característico movimiento serpentino. Se identifican por dos prominentes espinas laterales del tórax y una hilera recta de siete a doce escamas del peine en el octavo segmento abdominal. La duración del desarrollo larval depende de la temperatura, la disponibilidad de alimento y la densidad de larvas en el recipiente.

En condiciones óptimas, el período larval desde la eclosión hasta la fase de pupa, puede ser de cinco días, pero comúnmente es de 7 a 14 días. La mayor parte de los recipientes desechados sirven como sitio de reproducción (latas, neumáticos, botellas) y en algunos casos la desecación y el rebosamiento por la lluvia son perturbaciones y causan mortalidad en larvas y pupas. (Chico-Aldana, 2017)

2.1.1.1.3 Pupa

Las pupas también son acuáticas, no se alimentan; su función es la metamorfosis del estadio larval al adulto. Se mantienen en la superficie del agua debido a que tienen la propiedad de flotar, lo que facilita la emergencia del insecto adulto. El estadio de pupa dura dos a tres días, si antes no intervienen los factores ambientales. (Chico-Aldana, 2017)

2.1.1.1.4 Adulto

Es la fase reproductora de *Ae. aegypti*. Es un mosquito oscuro con bandas blancas en las bases de los segmentos torales y un característico diseño en forma de lira en el mesonoto (sección del tórax del mosquito) (Chico-Aldana, 2017). 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. (Service, 2014). 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, 2009).

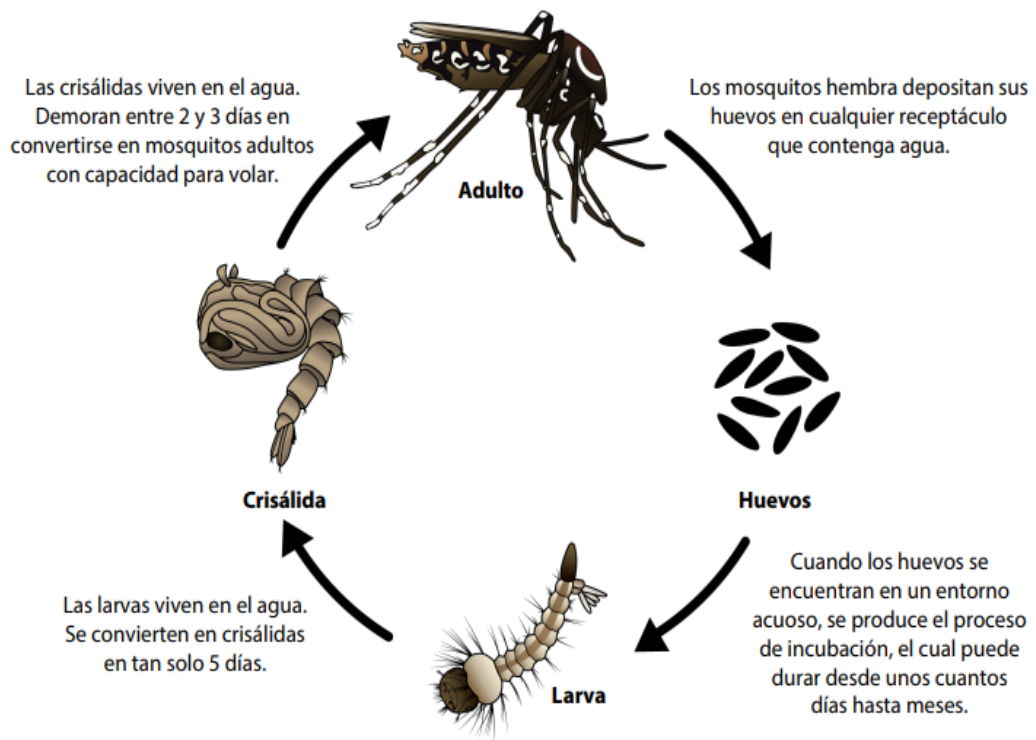


Figura 1. Ciclo de vida de *Ae. aegypti*, tomado de CDC, fuente: <https://www.cdc.gov/zika/pdfs/spanish/MosquitoLifecyle-sp.pdf>

2.1.2 Arbovirus que transmite

La prevalencia de la infección de arbovirus como dengue, Zika, Chikungunya, Mayaro entre otros, en el humano está directamente asociada a la presencia de *Aedes aegypti*, el cual es catalogado como su principal vector a nivel mundial, dada su amplia distribución en las zonas tropicales y subtropicales, y a su preferencia por el ambiente doméstico en donde establece su ciclo de vida (Organización Mundial de la Salud 2009).

2.1.2.1 Dengue (DENV)

El dengue es causado por el virus del mismo nombre. En la mayoría de los casos se manifiesta como un síndrome leve autolimitado conocido como fiebre dengue (FD) y en algunos de forma severa o fiebre hemorrágica del dengue (FHD), que puede llegar a ser fatal cuando se acompaña de choque hipovolémico (FHD/SCD), (Cortes et., al 2007). Esta arbovirosis es causada 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).

2.1.2.2 Chikungunya (CHIKV)

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. 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).

2.1.2.3 Zika (ZIKAV)

La infección por virus zika es una enfermedad emergente causada por el virus del mismo nombre, que es transmitido a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes* tales como *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis* y *Ae. hensilli*. Es un arbovirus de la familia *Flaviviridae* que contiene una sola cadena de ARN. Se han identificado dos linajes principales: el asiático y el africano. Su transmisión es tanto selvática como urbana y se sugiere que pueda tener reservorios primates no humanos. Algunos autores indican haber encontrado anticuerpos anti-zika en varios animales como orangutanes, cebras, elefantes y roedores. (Uribarren-Berrueta 2015). Los síntomas aparecen entre 3 a 12 días después de la picadura del mosquito y los más comunes son: fiebre leve, exantema, conjuntivitis no purulenta y artritis, principalmente en pies y manos. Otros síntomas incluyen: mialgias, artralgias, cefalea, dolor retro-ocular, edema de miembros inferiores, vértigo, dolor abdominal y vómito. La enfermedad generalmente es leve y autolimitada con duración de dos a siete días. Sin embargo, se han descrito complicaciones neurológicas y autoinmunitarias, así como malformaciones congénitas (microcefalia). (Arredondo et al., 2016).

2.1.2.4 Mayaro (MAYV)

El virus Mayaro es un miembro de la familia *Togaviridae* y el género *Alphavirus*. estudios moleculares han reconocido 2 linajes MAYV: genotipos D y L. Mayaro se ha asociado con una enfermedad parecida al dengue con erupción cutánea, fiebre y artralgia severa en la América del Sur tropical. La artralgia dura varias semanas y afecta principalmente a los tobillos, muñecas y dedos de los pies, pero también puede afectar las articulaciones principales. Esta arbovirosis causa una enfermedad febril aguda de leve a moderadamente grave de 3 a 5 días de duración con recuperación sin complicaciones. (Azevedo et al., 2009).

Ante la falta de una vacuna patentada que pueda prevenir y controlar la presencia de estos virus en el humano, el único método efectivo para contrarrestar estas patologías, consiste en controlar las poblaciones del insecto vector, las cuales se encuentran actualmente distribuidas desde 35°N hasta los 35°S (Díaz-Nieto et al. 2013). La prevención y control de estos arbovirus depende exclusivamente de las medidas eficaces de lucha antivectorial y del seguimiento de la infección de los mosquitos, *Ae. Aegypti* es altamente antropofílico, con marcado comportamiento endofágico y

endofílico; todas estas características son directamente relacionadas con su alta eficiencia como vector. Los seres humanos se contagian por picaduras de hembras infectadas, que a su vez se infectan principalmente al succionar sangre de personas contagiadas. Estos virus infectan el intestino medio del mosquito y luego se extiende hasta las glándulas salivales en un período de entre 8 y 12 días. Tras este periodo de incubación, el mosquito puede transmitir el virus a las personas al picarlas con fines exploratorios o alimentarios (Organización Mundial de la Salud 2018).

2.2 Distribución mundial de *Ae. aegypti*

Este mosquito presenta una amplia distribución por debajo de los 2200 metros sobre el nivel del mar en las regiones intertropicales del mundo, especialmente entre las latitudes 45°N y 35°S (Pozzetto et al., 2015). Estos límites geográficos corresponden, aproximadamente, a un invierno isotérmico de 10 °C. *Ae. aegypti* también se ha encontrado en áreas tan al norte como 45°N, pero dichas invasiones han ocurrido durante los meses más calientes y los mosquitos no han sobrevivido los inviernos. (Organización Mundial de la Salud (OMS) 2009).

2.2.1 Distribución de *Ae aegypti* en Colombia

En Colombia *Aedes aegypti* se encuentra distribuido en más del 80% del territorio nacional, en 2015 se había reportado en 718 municipios por debajo de 2200 msnm en los 32 departamentos del territorio nacional. De igual manera se registró la presencia del vector en 1138 localidades de 30 departamentos (Instituto Nacional de Salud 2014).

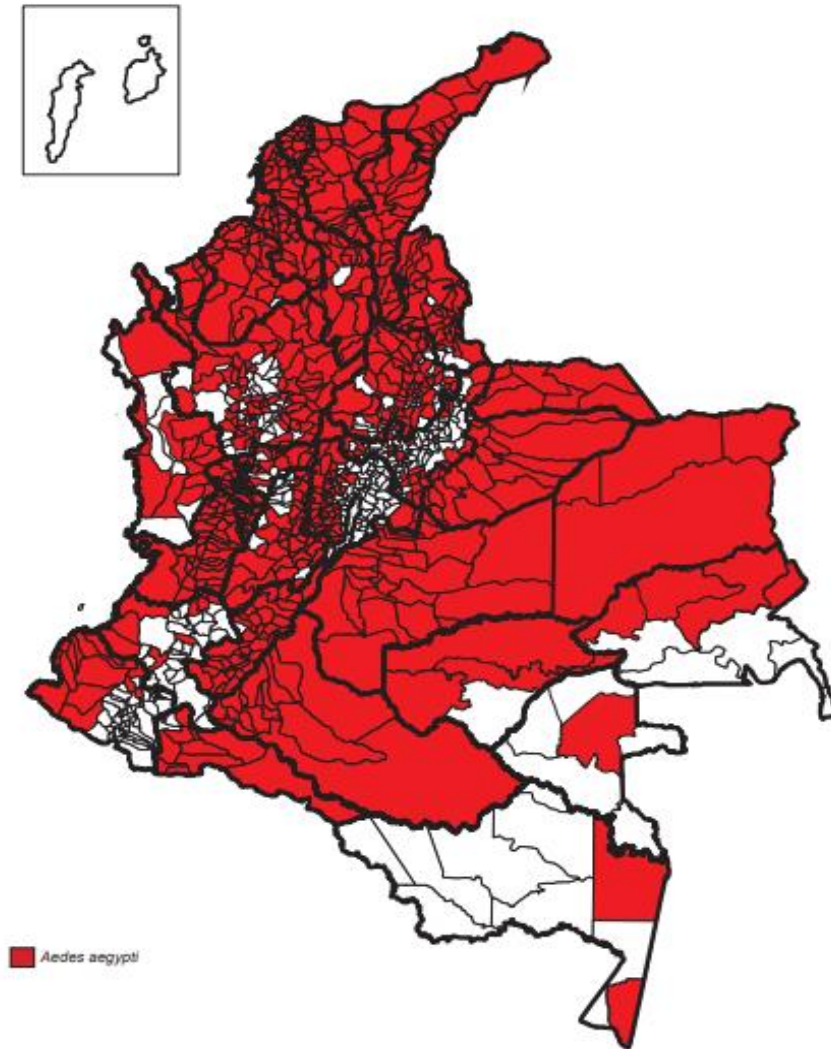


Figura 2. Distribución de *Ae. aegypti* en Colombia. Tomado de, mapa digital integrado del Instituto Geográfico Agustín Codazzi, Sivigila e informes del Grupo de Entomología del Instituto Nacional de Salud, informes del Programa de Prevención y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores del Ministerio de la Protección Social (Instituto Nacional de Salud 2014)

2.2.2 Distribución de *Aedes aegypti* en Cúcuta

Cúcuta es una zona hiperendémica para enfermedades transmitidas por vectores y en especial las que acompañan al *Aedes aegypti*, las zonas de mayor presencia del mosquito son: las comunas de Atalaya, Libertad, Aeropuerto y Centro, dentro de Cúcuta, y Villa del Rosario, Los Patios, El Zulia, Puerto Santander y San Cayetano, en el área Metropolitana. (Juan Alberto Bitar Mejía, IDS.)

2.3 Criaderos de mosquitos

Los mosquitos se encuentran en estadios inmaduros en el agua, sobre todo en recipientes artificiales urbanos o domésticos en: cementerios, basurales, neumáticos, floreros, botellas, bebederos de animales, latas abiertas o contenedores de cualquier tipo, depósito de agua de bebida, cisternas, vasijas, tinajas, todo tipo de recipientes en desuso aun pequeños). Se los ha observado colocando sus huevos en sitios naturales: axilas de plantas como las bromeliáceas y bananeros, huecos de árboles, de cañas (bambú, por ejemplo) muy próximos a viviendas y, a menudo, en espacios interiores (Ortiz & Argote, 2016). Los estudios sobre el radio de vuelo indican que la mayoría de las hembras de *Ae. aegypti* pueden pasar toda la vida en el interior de las casas en las que se han convertido en adultos o alrededor de ellas, y que suelen volar unos 400 metros de media. Esto implica que son las personas, más que los mosquitos, quienes propagan rápidamente el virus en las comunidades o lugares donde residen o de una comunidad o lugar a otro (Organización Mundial de la Salud 2018).



Figura 3. Criaderos artificiales de *Ae. aegypti*. Tomado de (Instituto Nacional de Salud 2014).

2.4 Métodos de Control del vector *Aedes aegypti*

Existen diferentes estrategias para el control de *Aedes*, como son el manejo ambiental, el control biológico y el químico. El más efectivo es el control ambiental, que previene el criadero de los mosquitos y el contacto del patógeno con el vector-humanos. El manejo ambiental está enfocado principalmente a la destrucción y alteración del hábitat natural de las larvas y la producción de mosquitos adultos en cada comunidad (Organización Mundial de la Salud, 2014)

El control biológico se realiza usando predadores o parásitos para competir o reducir las poblaciones de las especies problema. Peces larvívoros y la bacteria *Bacillus Thuriensis* H-14 (BTI), son los dos organismos más empleados (Mccall, 2007). Sin embargo, el mayor énfasis se da para el control químico, debido a su efectividad en regular las poblaciones tanto larvales adultas, utilizando los insecticidas químicos (Bisset et al., 2009).

2.5 Control químico

El Control Químico de las plagas es la represión de sus poblaciones o la prevención de su desarrollo mediante el uso de sustancias químicas, tal control está ligado al uso de insecticidas larvicidas y adulticidas de cualquier tipo como organoclorados, organofosforados, avermectinas, carbamatos, insecticidas reguladores de crecimientos y piretroides. (Organización Mundial de la Salud, 2014)

2.5.1 Control químico del vector *Aedes aegypti*

Ae. aegypti fue erradicado de 21 países de las Américas durante 1948-1972, pero debido al deterioro de las campañas de control vectorial, el vector volvió a dispersarse sobre estos países, los cuales sufrieron nuevas epidemias de dengue. En octubre de 1994, todos los países de las Américas excepto Bermuda, Canadá y Chile, estaban re-infestados (Paho 1994). Para el control de las densidades de *Ae. aegypti* y otros insectos vectores de importancia en la salud pública, se emplean desde hace más de 40 años métodos de control químico con relativo éxito, manteniendo en muchos casos el control de la enfermedad (Burbano, 2013).

2.5.2 Control químico del vector *Aedes aegypti* en Colombia

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). 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 (Maestre-Serrano et al., 2012; Maestre-Serrano, 2014) que resultan menos tóxicos para los humanos que los organofosforados, carbamatos y organoclorados (Ponce et al., 2006).

Este control se ha realizado en mayor parte para evitar la transmisión del virus dengue. Las poblaciones de *Ae. aegypti* han sido presionadas continuamente con adulticidas piretroides (lambda-cialotrina, deltametrina, permetrina) y adulticidas/larvicidas organofosforados (malatión y temefos). Como consecuencia de lo anterior, *Ae. aegypti* está desarrollando resistencia a estos insecticidas (OMS 1992). La vigilancia de la susceptibilidad a insecticidas en *Ae. aegypti* juega un papel fundamental en cualquier programa de control de vectores. Es así como el primer paso en la identificación de un problema potencial de resistencia es detectar los cambios en la susceptibilidad de una población de vectores a través de bioensayos, ensayos bioquímicos y ensayos moleculares (Burbano, 2013).



Figura 4. Control químico contra *Ae. aegypti*. fumigación mediante termonebulizadores en los diferentes barrios de Cúcuta. Fuente, diario la Opinión 2015.

2.6 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 insecticidas, 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 tanto para la salud humana como para el medio ambiente, por ello se ha mantenido el uso comercial y legalmente con base en análisis de riesgo-beneficio (Achudume, 2012).

2.7 Resistencia a insecticidas

La resistencia a insecticidas es una característica heredada que otorga mayor habilidad a una población de insectos de tolerar dosis de un insecticida de tal modo que los individuos resistentes sobreviven a una concentración del compuesto que normalmente sería letal para la especie (OMS, 1992). La resistencia a insecticidas se explica con base en factores multidimensionales dependientes de la bioquímica, fisiología, genética y ecología de los vectores teniendo en cuenta que todo esto varía con la especie, población y localización geográfica. Las poblaciones resistentes se desarrollan a través de la sobrevivencia y reproducción después de la exposición a un insecticida de los individuos que portan genes de resistencia. Se puede considerar que la producción de sobrevivientes refleja la presencia del gen o genes que codifican para mecanismos que confieren resistencia (OMS, 1992).

Numerosos factores influyen en la evolución de resistencia a insecticidas los cuales pueden agruparse en tres categorías: factores genéticos, biológicos y operacionales. Los factores genéticos se relacionan principalmente con la frecuencia y dominancia de los alelos de resistencia, en tanto que los biológicos incluyen el ciclo de vida, el número de descendientes por generación y las tasas de flujo génico. Los factores genéticos y biológicos son intrínsecos a las especies y por lo tanto se escapan al control humano. Los factores operacionales si pueden ser manejados a fin de evitar o

retardar el desarrollo de resistencia. Estos factores se asocian directamente con el tiempo, dosis y formulación del insecticida, el estadio seleccionado y el uso previo de insecticidas relacionados. (Georghiou, 1990)

2.7.1 Mecanismos de resistencia a insecticidas

En los insectos los dos principales mecanismos de resistencia a insecticidas son el incremento en la tasa de detoxificación de los insecticidas y las alteraciones en el sitio blanco. Otros mecanismos basados en la respuesta al estrés térmico, penetración disminuida, incremento en las tasas de excreción, cambios de comportamiento que eviten el contacto con los insecticidas, aunque los vectores sean susceptibles a estos, son también importantes (Fonseca & Quíñones, 2005).












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

Figura 5. Principales mecanismos descritos 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).

2.7.1.1 Resistencia Metabólica

En la resistencia asociada al incremento en la tasa de detoxificación se involucran principalmente tres familias enzimáticas las cuales son las carboxilesterasas, glutatión S-transferasas (GST) y monooxigenasas (figura 5). La actividad de una o más de estas enzimas es regularmente elevada en poblaciones de insectos resistentes, pero en contraste con la resistencia dada por alteraciones en el sitio blanco, no se conocen totalmente los mecanismos moleculares de esta resistencia metabólica. La identificación de enzimas involucradas en la resistencia a insecticidas se complica además por la complejidad de tales familias enzimáticas y las dificultades para identificar genes ortólogos entre diferentes especies de insectos (Ranson et al, 2002).

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).

2.7.1.2 Alteración en el sitio blanco

La resistencia asociada a alteraciones en el sitio blanco está mediada por la presencia de mutaciones no silentes en genes estructurales, canales de sodio (para), receptores del ácido amino-butírico (GABA) y acetilcolinesterasa (AChE), para que dichas mutaciones sean seleccionadas favorablemente, el cambio en el aminoácido debe disminuir la unión al insecticida sin causar pérdida de la función primaria del sitio blanco como es el caso del canal de sodio (Fonseca & Quíñones, 2005). Por lo tanto, el número de posibles sustituciones de aminoácidos es limitado y comúnmente se encuentran mutaciones idénticas asociadas con resistencia a través de tasa altamente divergentes. El grado de deterioro de la función, ocasionado por la mutación que confiere resistencia, se refleja en la eficacia biológica de los individuos resistentes en ausencia de selección por el insecticida. Este costo en la eficacia biológica tiene importantes implicaciones para la persistencia de resistencia y/o reversión a la susceptibilidad en poblaciones de campo (Berticat et al., 2002).

2.7.1.2.1 Resistencia Knockdown (Kdr)

La resistencia (*kdr*) (por sus siglas en inglés: knockdown resistance) es un mecanismo de resistencia seleccionado por insecticidas piretroides y DDT, este elemento es uno de las mayores formas de resistencia a estos insecticidas y se ha asociado con mutaciones no sinónimas sobre los canales de sodio dependiente de voltaje (V_{gsc}) los cuales son blanco de este tipo de insecticidas (Srisawat et al., 2010). Las mutaciones se encuentran sobre alguno de los seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6) generalmente en los *p-loops* o *linkers* dentro de los cuatro dominios homólogos (I-IV) en los canales de sodio dependientes de voltaje (Figura 6).

El rápido efecto de derribo que caracteriza a los insecticidas DDT y piretroides, es ocasionado por la activación persistente de los canales de sodio. Esta activación se debe a la forma en que los insecticidas se unen al poro del canal, prolongando el mecanismo de inactivación dependiente de voltaje. La reducción en la sensibilidad del canal de sodio dependiente de voltaje a la unión de los insecticidas es la causa del fenotipo resistente conocido como “*kdr*” presente en varias especies de insectos. (Bobadilla-Utrera 2010)

2.8 Canal de sodio

El canal de sodio es el responsable de la iniciación y propagación del potencial de acción a lo largo del axón. Este canal forma un poro en la membrana que es altamente selectivo a iones de sodio. La apertura o cierre del canal es regulado por dos procesos, activación e inactivación; cuando una neurona está en reposo el canal de sodio está cerrado y cuando la membrana de la neurona esta despolarizada el canal de sodio está abierto. La entrada de iones sodio a través del canal lo activa lo que causa una despolarización de la membrana y una fase creciente del potencial de acción. Dentro de unos pocos milisegundos después de abierto el canal, este es rápidamente inactivado. El proceso de inactivación es el responsable de la fase descendente del potencial de acción y juega un rol importante en la terminación de un potencial de acción (Dong et al., 2014).

2.8.1 Estructura de canal de sodio

El canal de sodio está compuesto por una subunidad alfa y una o más subunidades beta. La subunidad alfa del canal tiene 4 dominios homólogos (I-IV), cada dominio posee 6 segmentos transmembranales. En cada dominio los segmentos de 1-4 (S1-S4) constituyen el módulo de detección de voltaje, mientras que los segmentos S5 y S6 y loop reentrante en la membrana (llamada región P) conectan las subunidades 5 y 6 formando el módulo el poro. Las subunidades beta (beta1-beta4) son pequeñas proteínas transmembranales que poseen un dominio inmunoglobulina extracelular, un solo segmento transmembrana y un corto dominio intracelular C-terminal.

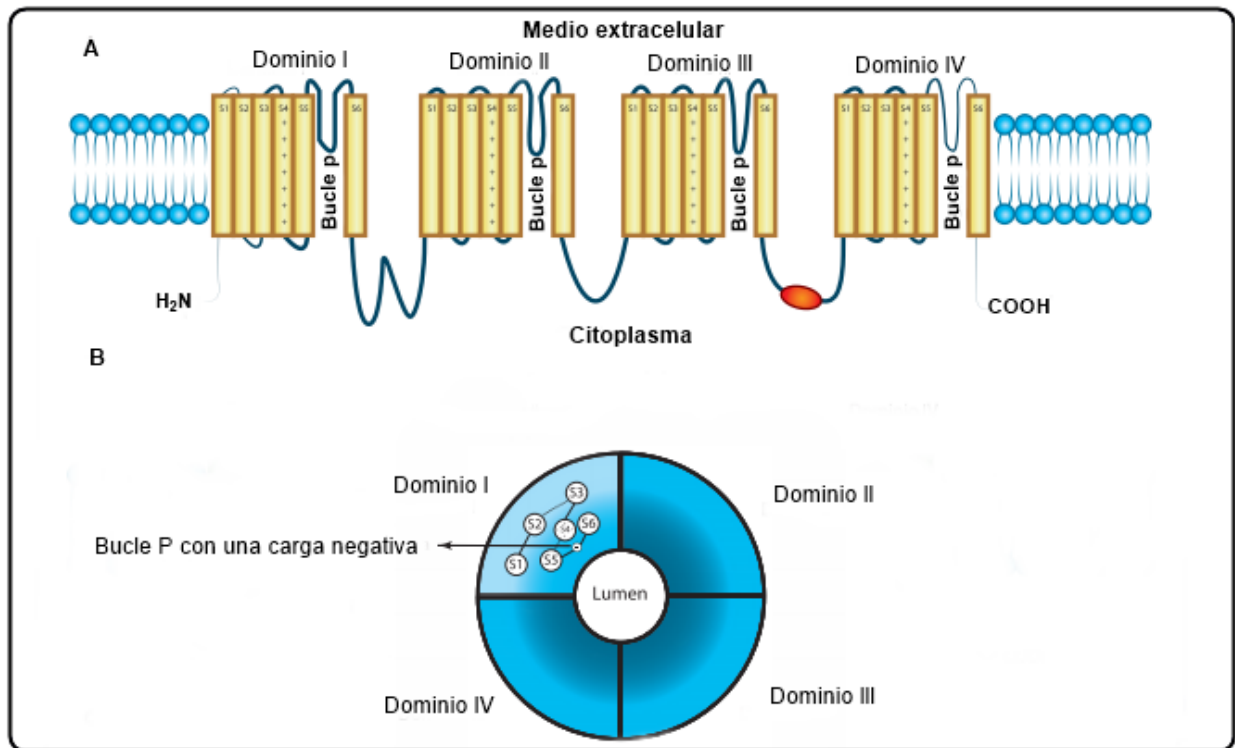


Figura 6. Estructura molecular del canal iónico dependientes de voltaje. A: estructura del canal de sodio dependiente de voltaje compuesta por una única cadena polipeptídica con cuatro dominios; B: vista frontal de un canal iónico inmerso en la membrana. Los cuatro dominios se pliegan para formar el canal por el que fluyen los iones. Los segmentos S5 y S6 junto con el bucle P de cada dominio forman el poro hidrófilo. Tomado de: (Alfonzo et al., 2017).

2.8.2 Canal de sodio – piretroides

Los insecticidas piretroides tienen un rápido efecto Knockdown pero el uso intensivo de DDT y piretroides ha conllevado al desarrollo de la resistencia knockdown (kdr) en muchas especies de insectos como *Anopheles* y *Aedes*. Los piretroides modifican la cinética de apertura del canal de sodio volviendo más lenta la activación e inactivación del canal. Existen dos clases de piretroides tipo I y tipo II. Los tipos I carecen del grupo ciano y tipo II como lambda-cialotrina presentan este grupo en la posición bencílico. Los piretroides tipo II prolongan la corriente de sodio durante un potencial de acción más que los tipos I (Hemingway et al. 2004).

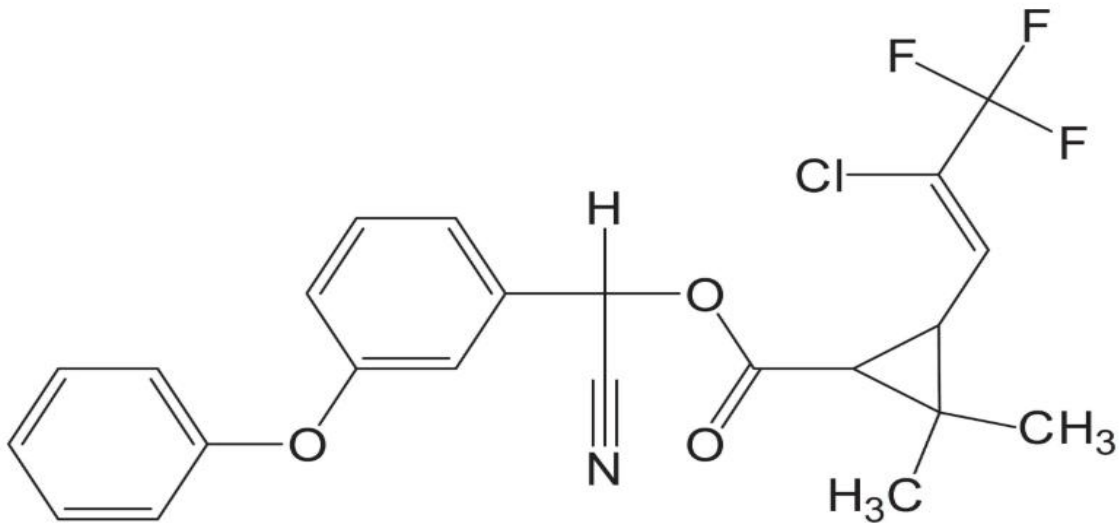


Figura 7. Estructura molecular del insecticida lambda-cialotrina, (Cifuentes et al., 2015).

3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

Los arbovirus circulantes en Colombia representan un problema prioritario en salud pública. El dengue ha presentado una reemergencia e intensa transmisión con tendencia fluctuante y creciente a través del tiempo. Desde el primer caso de dengue grave en 1989, en Puerto Berrio, Antioquia, se ha observado en el país una tendencia al incremento en el aumento de casos, al pasar de 5,2 casos por cada 100.000 habitantes en la década de los 90, a 18,1 casos por cada 100.000 habitantes en la presente década (INS 2016). En la actualidad a la semana epidemiológica 13 se han notificado al SIVIGILA 402 casos de dengue, mientras que en la semana epidemiológica 16 se notificaron a este mismo organismo 329 casos de Zika y 180 casos de Chikungunya. (Instituto Nacional de Salud 2018).

Desde el año 2004, el CHIKV ha expandido su distribución geográfica mundial, provocando epidemias sostenidas de magnitud sin precedentes en Asia y África (Ministerio de Salud y protección social 2014). La fiebre de Chikungunya es un problema de salud pública emergente en la Región de las Américas. A finales del año 2013 la OPS/OMS reporta la confirmación de casos de transmisión autóctona en la subregión del Caribe, Hasta la fecha al menos 20 países han confirmado transmisión y se han notificado al SIVIGILA 8.022 casos de Chikungunya hasta el año pasado (Instituto Nacional de Salud 2017).

Desde 2015 y hasta el 22 de enero de 2017, fueron 20 los países y territorios que confirmaron circulación autóctona del virus Zika en las Américas, con un mayor número de casos en Brasil y Colombia. En octubre del 2015 el Ministerio de Salud de Brasil relacionó la presencia de este virus con el aumento de casos de microcefalia, alertando sobre un incremento inusual de esta patología en el estado de Pernambuco, donde se detectaron en menos de un año 141 casos, cuando anualmente se reportaban tan solo 10 casos. También en Brasil, en noviembre de 2015, se verificó la presencia del genoma del virus Zika en muestras de tejidos y sangre de un recién nacido fallecido y portador de microcefalia (Organización Panamericana de la Salud/Organización mundial de la salud 2016).

Aedes aegypti es el principal vector de los virus anteriormente mencionados, se distribuye ampliamente por debajo de los 2200 metros sobre el nivel del mar, distribución que coincide con la ubicación de gran parte de la población colombiana. Las características climáticas cambiantes,

las condiciones sociales de alta migración, el déficit en la calidad de viviendas y la falta de acceso adecuado a servicios de agua potable y salud hacen que se den las condiciones adecuadas en muchas regiones del país para que el mosquito vector esté presente (Ministerio de Salud y protección social, 2014) y persistan los casos de Dengue, Chikungunya y ahora el Zika. Por tal razón, es necesario fortalecer las medidas de control de *Aedes aegypti* para contrarrestar la amplia distribución de este vector. Según Cárdenas 2008 en Cúcuta se detectó pérdida de susceptibilidad en larvas y adultos de *Ae. aegypti* en el barrio Ospina Pérez a insecticidas como temefos y lambda-cialotrina, (Hamid et al. 2017) en estudios realizados en indonesia ha reportado la ganancia de resistencia por parte de este mosquito a los diferentes tipos de insecticidas, como; Deltametrina, malation, permetrina, lambda-cialotrina, bendiocarb y ciflutrina, los cuales son utilizados en diferentes presentaciones en todo el mundo.

En la actualidad, el control del vector *Aedes aegypti* con insecticidas es el más importante método para prevenir la transmisión de estos arbovirus, entre los cuales se encuentran los piretroides. Estos insecticidas se caracterizan por su alta y rápida actividad en los insectos y la baja toxicidad para los mamíferos (Hirata et al., 2014). Sin embargo, su uso masivo genera presión de selección en las poblaciones de mosquitos que puede causar resistencia, manifestada por la presencia de mutaciones en el sitio blanco del compuesto químico, que para el caso de los piretroides son en el canal de sodio.

En Colombia a pesar de la alta prevalencia de arbovirosis transmitidos por *Ae. aegypti* y de la dependencia a los insecticidas para controlar las poblaciones de vectores, no se tiene un monitoreo de estatus de resistencia en el país (Fonseca et al., 2011). Por todo esto, se requiere la implementación en Norte de Santander y en especial en Cúcuta, de técnicas que permitan rápida y eficientemente la identificación y caracterización de los mecanismos por los cuales los mosquitos están adquiriendo resistencia a los insecticidas. Al respecto, este proyecto propone identificar mutaciones en el canal de sodio de mosquitos de diferentes barrios de Cúcuta asociados a la pérdida de susceptibilidad al insecticida lambda-cialotrina y correlacionar estas mutaciones con el fenotipo resistente. Adicionalmente, se propone diseñar nuevas herramientas moleculares para monitorear la aparición del fenotipo de resistencia de *Ae. aegypti* a insecticidas en la región de norte de Santander.

El proyecto tiene como propósito dar un soporte a los entes gubernamentales encargados del manejo de insecticidas para que se lleve a cabo de manera racional el control vectorial de insectos transmisores de Arbovirus en el departamento de Norte de Santander.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La resistencia al piretroide lambda-cialotrina en poblaciones de *Ae. aegypti* de Cúcuta es otorgada por mutaciones kdr?

5. HIPÓTESIS

H₀: Las poblaciones de *Ae. aegypti* de Cúcuta no son resistentes al insecticida piretroide Lambda-cialotrina

H₁: Las poblaciones de *Ae. aegypti* de Cúcuta son resistentes al insecticida piretroide Lambda-cialotrina

6. OBJETIVOS

6.1 GENERAL

Caracterizar el estado de resistencia a lambda-cialotrina y la identificación de mutaciones en la región codificante del canal de sodio en poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de Cúcuta Norte de Santander.

6.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar el estado de susceptibilidad de cuatro poblaciones de *Ae. aegypti* de Cúcuta al insecticida lambda-cialotrina.
- ✓ Identificar la presencia de mutaciones en el gen del canal de sodio de diferentes poblaciones de *Ae. aegypti* de Cúcuta.
- ✓ Determinar la frecuencia alélica de cada población resistente de *Ae. aegypti*
- ✓ Correlacionar la frecuencia de los alelos mutados y la resistencia de *Ae. aegypti* a la lambda-cialotrina

7. METODOLOGÍA

7.1 Area de estudio

La Ciudad de San José de Cúcuta se encuentra en el departamento de Norte de Santander al nororiente Colombiano en la Cordillera Oriental a los $7^{\circ} 54' 27''$ de latitud norte y $72^{\circ} 30' 17''$ de longitud al Oeste. Cuenta con 155 barrios distribuidos en diez comunas, la temperatura media del municipio es de 28°C , y su altitud media es de 320 msnm. (Cámara de comercio de Cúcuta 2016)

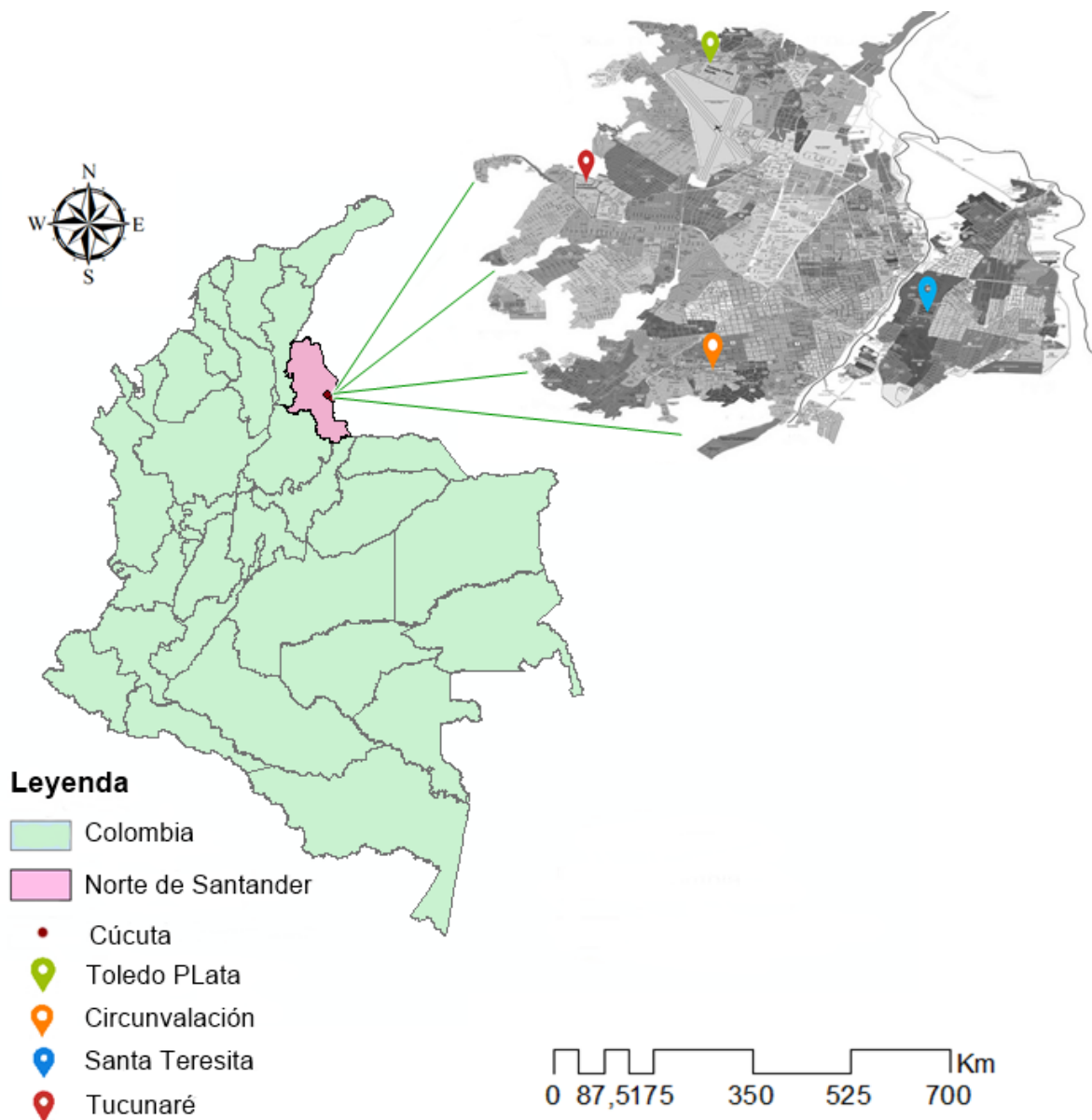


Figura 8. Mapa de Cúcuta y los barrios donde se recolectaron las muestras de larvas del mosquito *Ae. aegypti*. Toledo Plata (TP), Circunvalación (CI), Santa Teresita (ST), Tucunaré (TU).

Se evaluaron cuatro cepas de *Ae. Aegypti* provenientes de los barrios, Toledo Plata (TP) 7° 56' 46'' N 72° 30' 58'' W. Orientación norte, Circunvalación (CI) 7° 52' 51'' N 72° 30' 17'' W. Orientación sur, Santa Teresita (ST) 7° 53' 29'' N 72° 28' 54'' W. Posición oriente y Tucunaré (TU) 7° 55' 04'' N 72° 31' 54'' W. Posición occidente.

La selección de los barrios se hizo de manera aleatoria tomando como referencia una comuna en cada punto cardinal de la ciudad. Para la selección se tuvo en cuenta distancias mayores a tres kilómetros entre cada uno de los barrios.

7.2 Colecta del material biológico

En cada uno de los barrios muestreados se seleccionaron tres manzanas al azar y en cada una de estas, un mínimo de 13 casas, se realizó visita domiciliaria e inspección entomológica en compañía de técnicos de la secretaria de salud Municipal.

En cada vivienda se inspeccionaron albercas bajas y criaderos diversos para formas inmaduras de *Aedes* como; llantas, floreros, canecas, entre otros.

Se recolectaron larvas, las cuales fueron transferidas en tubos falcón de 50 ml debidamente rotulados, utilizando agua del mismo criadero. El material entomológico fue trasladado a los laboratorios de la universidad de pamplona sede villa del rosario donde se transfirieron a recipientes más grandes, para su posterior transporte a la ciudad de Medellín.

7.3 Obtención de la F1 de *Ae aegypti* en el laboratorio

En las instalaciones del grupo de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas de la Sede de Investigación Universitaria de la universidad de Antioquia (SIU), en el insectario, en condiciones controladas de temperatura de 27°C ± 2°C, humedad relativa 65% ± 5% y fotoperiodos de 12/12.

Las larvas que se obtuvieron en campo se transfirieron a bandejas plásticas de 16.5 Cm de ancho x 11.5 Cm de alto x 30 Cm con tapa enmallada y un volumen de 500 ml de agua reposada, se alimentó con comida para peces (Truchina) todos los días con una cantidad de 2 gramos hasta pasar al estadio de pupa.

Posteriormente se separaron las pupas en recipientes con tapa enmallada de 1750 ml a un volumen de 600 ml hasta la emergencia del adulto, que a su vez fue transferidos a jaulas de cría para colonias de 30 x 30 x 30 Cm.

Los mosquitos machos se alimentaron con sacarosa al 10% los días 1, 3 y 5 de cada semana, y las hembras el día tres de cada semana con sangre de ratón (*Mus musculus* Linnaeus 1758) y (*Gallus gallus* Linnaeus 1758) del bioterio de la Sede de Investigación Universitaria (SIU).

Para el día cuarto de la semana se introdujo en cada jaula un vaso nuevo para ovoposición marca Darnel Murano de nueve onzas con volumen de agua reposada de 1/3 de onzas (90 ml) y papel filtro en la parte interna alrededor del vaso. Para la primera postura se retiró el papel el segundo día de la siguiente semana y se colocó uno nuevo el cuarto día para la segunda postura, rotulando con nombre, procedencia de la cepa, fecha y generación. Se mantuvieron en el área de almacenamiento de huevos en cámara húmeda durante 48 horas para su secado, posteriormente se almacenaron durante mínimo 10 días en bolsas Ziploc dentro de recipientes herméticos. Una vez se consiguió el número de huevos suficiente, se procedió a iniciar el ciclo, inundando los huevos para la obtención de F₁ de larvas, pupas y adultos. Para evitar contaminación de las cepas, se utilizaron pipetas pasteur, bandejas plásticas, recipientes para pupas, vasos desechables y jaulas diferentes para cada colonia.

7.4 Bioensayos para la población de campo

Para cada una de las poblaciones, se evaluó el estado de susceptibilidad/resistencia al insecticida piretroide (Lambda-cialotrina). Estos ensayos se realizaron en 20 larvas de tercer estadio tardío o cuarto estadio temprano de F₁, que fueron expuestas a seis concentraciones (Tabla 1), del insecticida grado técnico 98%, siguiendo el protocolo descrito por la OMS (1981).

Tabla 1. Concentraciones en partes por millón del insecticida lambda-cialotrina evaluadas en larvas de *Ae. aegypti* de Cúcuta

| <i>Concentraciones</i> | <i>Unidad</i> |
|------------------------|---------------|
| 0.0009 | ppm |
| 0.0018 | ppm |
| 0.0036 | ppm |
| 0.0072 | ppm |
| 0.015 | ppm |
| 0.03 | ppm |

La cepa de referencia Rockefeller susceptible a insecticidas, que ha estado en colonia desde la década de 1930 provista por el grupo de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas (BCEI) de la Universidad de Antioquia se usó como control, Realizando tres replicas en cada concentración cada una por triplicado para las poblaciones silvestres y la cepa Rockefeller.

La lectura de mortalidad se registró a las 24 horas después de poner en contacto las larvas con el insecticida, las concentraciones letales (CL_{50}) y los intervalos de confianza ($p < 0,05$) se calcularon para cada población de mosquitos. Los datos de concentración-mortalidad se sometieron a análisis Probit (Raymond 1985), y se estimaron intervalos de confianza del 95% para obtener los grados de resistencia (GR). Se obtuvieron grados de resistencia (GR50) dividiendo la concentración letal de la población por la concentración letal equivalente de la cepa de referencia Rockefeller. El GR se interpretó como susceptible (<5 veces), resistencia tolerante o moderada (de 5 a 10 veces) y alta resistencia (> 10 veces) (Pang et al., 2015). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7.5 Identificación de mutaciones

7.5.1 Extracción de ADN

El ADN de 60 mosquitos F_0 de *Aedes aegypti* recolectados en cada uno de los barrios de la ciudad de Cúcuta fue extraído mediante el método de Grind Buffer (Collins et al., 1987).

7.5.2 Genotipificación de la PCR específica de alelo (AS-PCR)

Las muestras se genotiparon en las posiciones 1255, 3046 y 4673 del gen del canal de sodio usando PCR alelo-específica (AS-PCR). Para esto, se utilizó un cebador específico de alelo para la mutación 419 (G1255T) (Granada et al., 2018); y cebadores específicos de alelos desarrollados previamente para las mutaciones 1016 (G3046A) y 1534 (T4673G) (Yanola et al., 2011), (Li et al., 2015). (Tabla 2). Cada reacción se realizó en un volumen final de 25 μ L que consiste en 10,75 μ l de H_2O para Pcr, 4 μ l de $MgCl_2$ [25 mM], 2,5 μ l de Tampón Buffer $(NH_2) SO_4$ (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), 1 μ l de cada cebador [10 μ M], 2,5 μ l mezcla de dNTPs [2 mM], 0,25 unidades de Taq Thermo polimerasa y 2 μ L de ADN genómico. Las reacciones de amplificación para las mutaciones V419L y V1016I se realizaron con una etapa de desnaturalización inicial de 3 min a 94 ° C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94 ° C, 30 s a 60 ° C y 60 s a 72 ° C, con 7 min a 72 ° C para la extensión final, las mismas condiciones fueron aplicadas para la mutación F1558C con la excepción de la temperatura de desnaturalización inicial que para el caso fue dos grados arriba, de acuerdo con las instrucciones del kit Taq Thermo DNA Polimerasa (Taq DNA Polymerase Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.)

Tabla 2. Cebadores específicos de alelos utilizados en la genotipificación de *Aedes aegypti* de Colombia.

| Mutación | Primers | Secuencia | Referencia |
|----------|--------------|----------------------|------------------------|
| V419L | PM1_Ext_419F | GATTCCTCCAGAACTCCACC | (Granada et al., 2018) |
| | PM1_Ext_419R | TCAATGGATTTGGGTGACAA | |
| | PM1_F_419Wt | CTTGGGTTCGTTCTACCTTG | |
| | PM1_F_419Mut | CTTGGGTTCGTTCTACCTTT | |

| | | | | |
|--------|---------------|-------------------------|------------------------|-------------------|
| V1016I | PM2_Ext_1016F | GCCACCGTAGTGATAGGAAATC | | |
| | PM2_Ext_1016R | CGGGTTAAGTTTCGTTTAGTAGC | | |
| | PM2_F_1016Wt | GTTTCCCACTCGCACAGGT | (Li et al., 2015) | |
| | PM2_F_1016Mut | GTTTCCCACTCGCACAGA | (Granada et al., 2018) | |
| F1534C | PM3_Ext_1534F | GGAGAACTACACGTGGGAGAAC | | |
| | PM3_Ext_1534R | CGCCACTGAAATTGAGAATAGC | | |
| | PM3_R_1534WT | GCGTGAAGAACGACCCGA | | (Li et al., 2015) |
| | PM3_R_1534Mut | GCGTGAAGAACGACCCGC | | |

Los productos de amplificación por PCR se separaron en un gel de agarosa al 1,5% en un tampón TBE, a 70 V durante 60 minutos. La cepa Rockefeller de *Ae. Aegypti* se usó como referencia para los alelos de tipo salvaje (V419, V1016 y F1534) del gen del canal de sodio.

7.6 Análisis poblacional

GENEPOP v.4.6 (Laboratoire de Genetique et Environnement, Montpellier, Francia, <http://genepop.curtin.edu.au/>) se usó para calcular las frecuencias alélicas, genotípicas y genotípicas esperadas. Los datos se probaron para la conformidad con el equilibrio de Hardy-Weinberg, corroborando el equilibrio por la prueba de Chi cuadrado.

Para evaluar si la presencia de dos o más mutaciones en el canal de sodio de *Aedes aegypti* está relacionada con la ganancia de resistencia se realizó un análisis de coocurrencia genética

8. RESULTADOS

8.1 Ensayos biológicos del insecticida Lambda-cialotrina

Los mosquitos de los cuatro barrios de Cúcuta evaluados presentaron diferentes niveles de resistencia a la lambda-cialotrina. Los grados de resistencia (GR) presentaron variaciones de 15.47 para la población de mosquitos de Toledo Plata (TP), 14.77 Santa Teresita (ST), 12.66 Circunvalación (CI), 11.95 Tucunaré (TU). (**Tabla 3**) muestra los valores de LC 50 y GR 50 obtenido para este insecticida.

Tabla 3. Tasa de resistencia a lambda-cialotrina de las poblaciones de *Aedes aegypti* estudiadas en el municipio de San José de Cúcuta, Colombia.

| <i>Población</i> | <i>Ubicación</i> | <i>LC</i> ⁵⁰ | <i>Límite de confianza</i> | <i>GR</i> ⁵⁰ | <i>Fenotipo</i> |
|-----------------------|------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------|
| <i>Rockefeller</i> | - | 0.000474 | 0.00039 - 0.000564 | - | - |
| <i>Toledo Plata</i> | Norte | 0.00733 | 0.00566 - 0.008 | 15.47 | Resistente |
| <i>Santa Teresita</i> | Oriente | 0.007 | 0.00566 - 0.008 | 14.77 | Resistente |
| <i>Circunvalación</i> | Sur | 0.006 | 0.00533 - 0.007 | 12.66 | Resistente |
| <i>Tucunaré</i> | Occidente | 0.00566 | 0.00466 - 0.006 | 11.95 | Resistente |

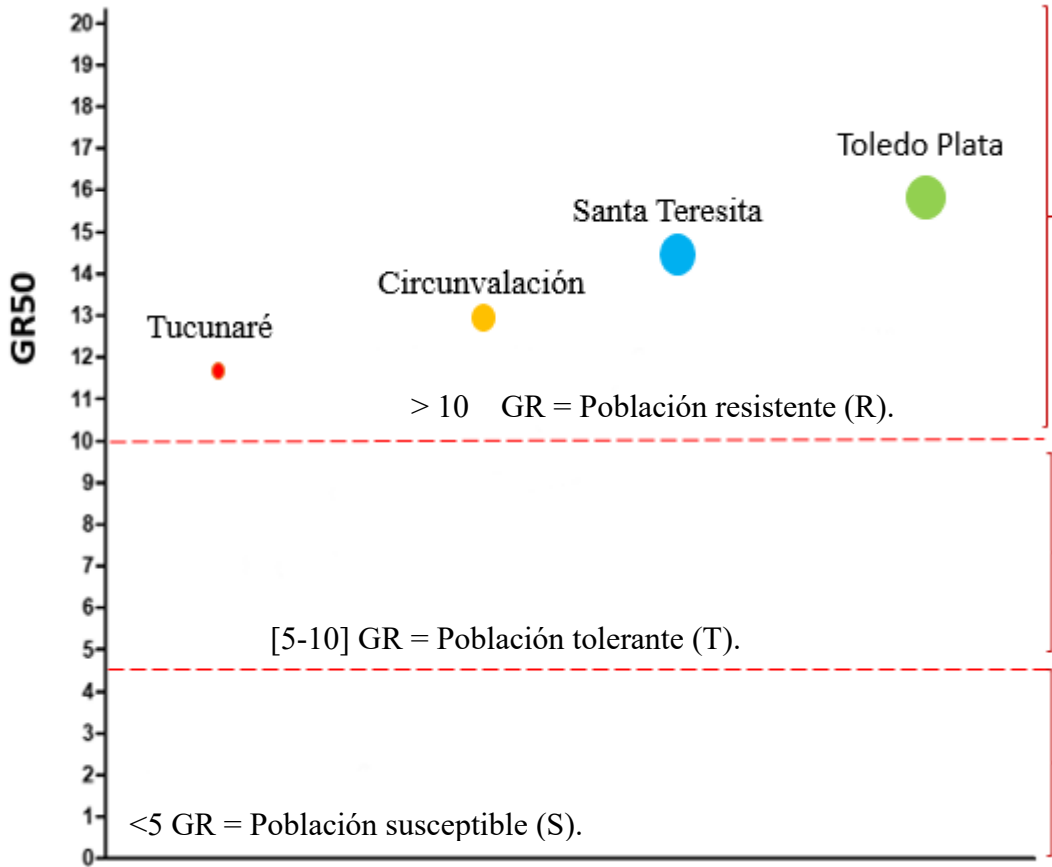


Figura 9. Grados de resistencia a lambda-cialotrina de las poblaciones de *Ae. aegypti* estudiadas en el municipio de San José de Cúcuta, Colombia

8.2 PCR específica de alelo (AS-PCR) para las mutaciones F1558C, V1016I, V419L

Para determinar las frecuencias alélicas de las tres mutaciones de cada barrio de Cúcuta, se genotipificó un mínimo de 60 mosquitos usando AS-PCR. (figuras. 10, 11, 12). Las frecuencias genotípicas de las mutaciones F1558C, V1016I, V419L para cada población se muestran en las (Tablas 4,5,6).

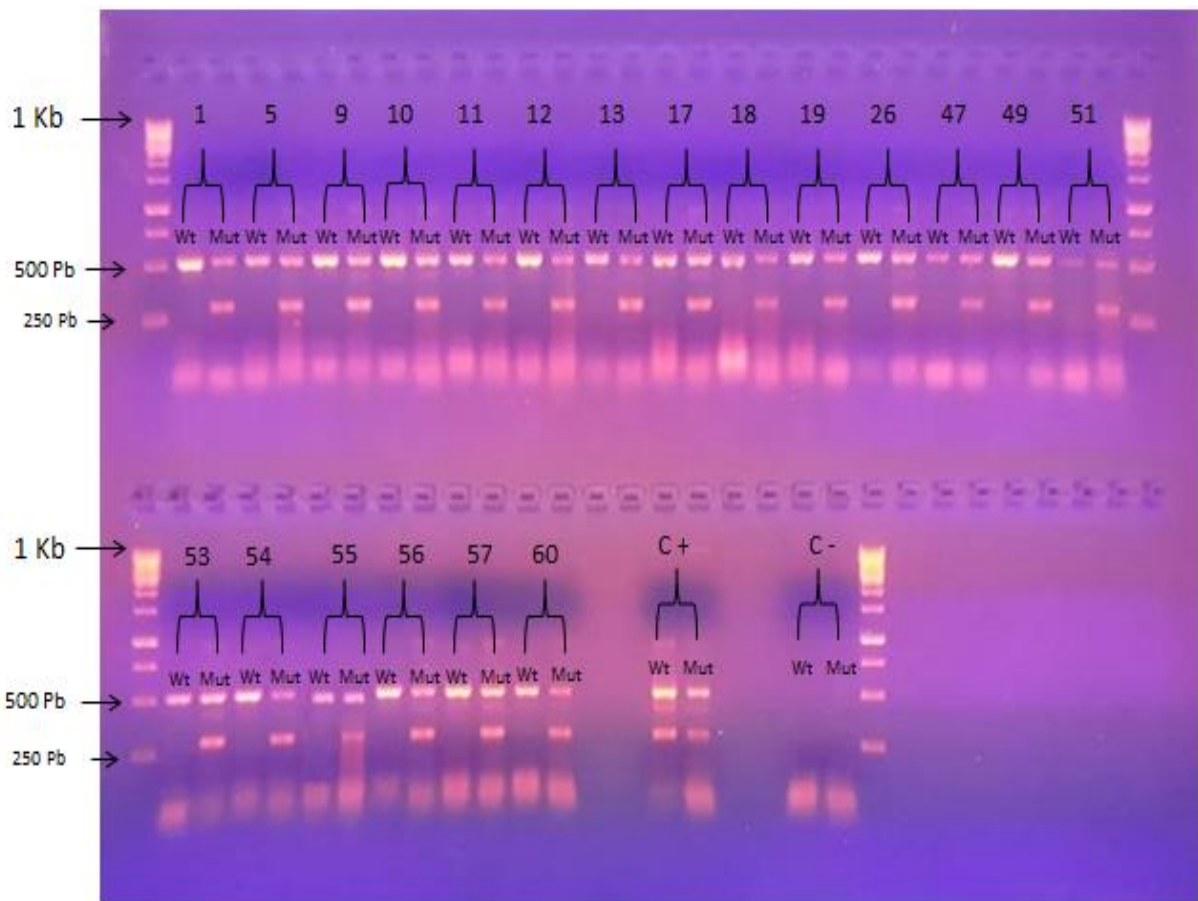


Figura 10. AS- PCR para la mutación F1558C, Electroforesis a 70V por 60 minutos en gel de agarosa de 1.5%. las bandas en 284 pb corresponden a la presencia del alelo wild type y mutado. Las bandas en 517 pb corresponden al control de reacción interna para el alelo wild type y mutado. C+: es el control positivo heterocigoto, C-: es el control negativo. Los carriles a los extremos representan el marcador de peso molecular de 1 kb. Cada número representa un mosquito al cual se le realizan dos AS-PCR una para el alelo wild type y otra para el alelo mutado.

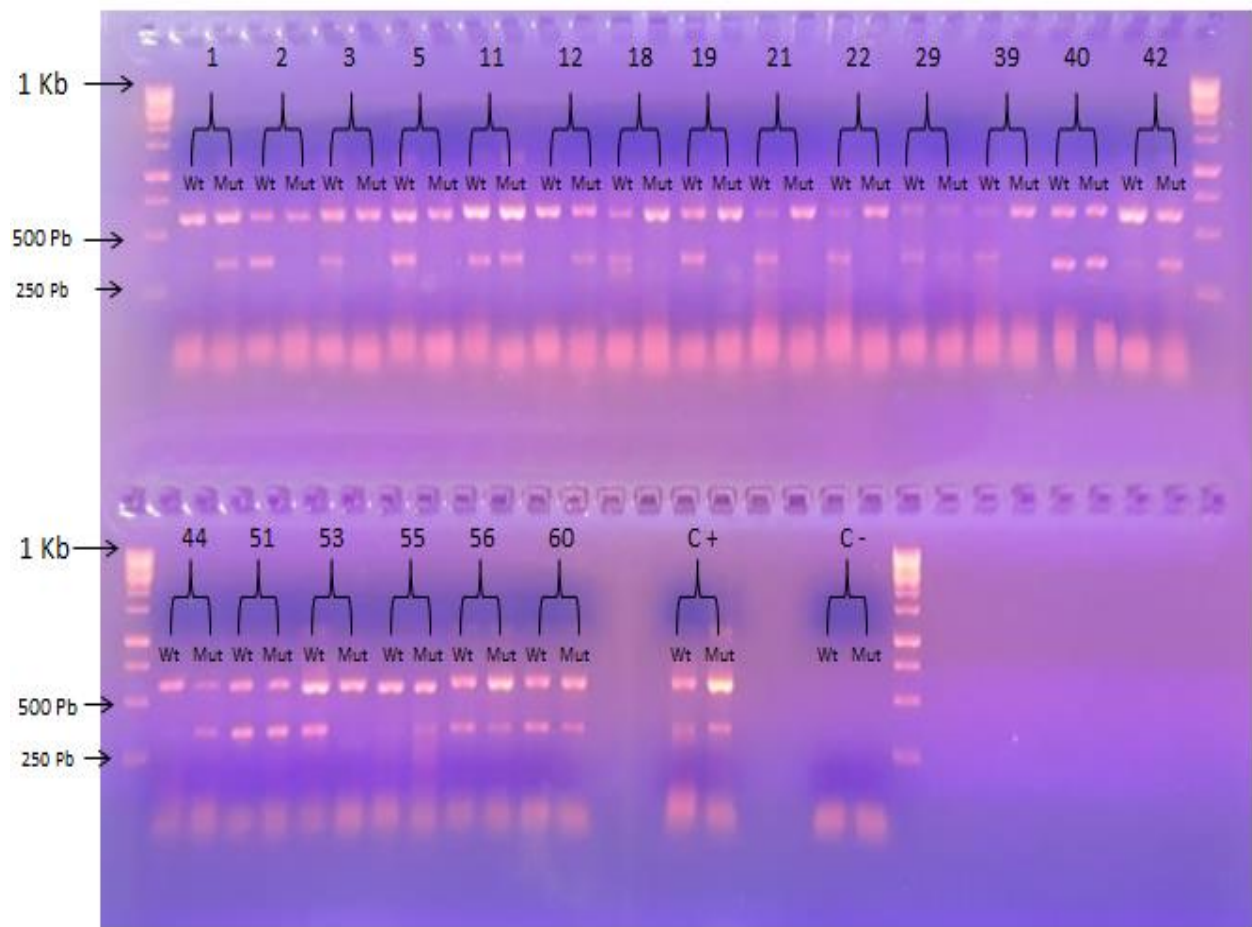


Figura 11. AS- PCR para la mutación V1016I, Electroforesis a 70V por 60 minutos en gel de agarosa de 1.5%. las bandas en 348 pb corresponden a la presencia del alelo wild type y mutado. Las bandas en 592 pb corresponden al control de reacción interna para el alelo wild type y mutado. C+: es el control positivo heterocigoto, C-: es el control negativo. Los carriles a los extremos representan el marcador de peso molecular de 1 kb. Cada número representa un mosquito al cual se le realizan dos (AS-PCR) una para el alelo wild type y otra para el alelo mutado.

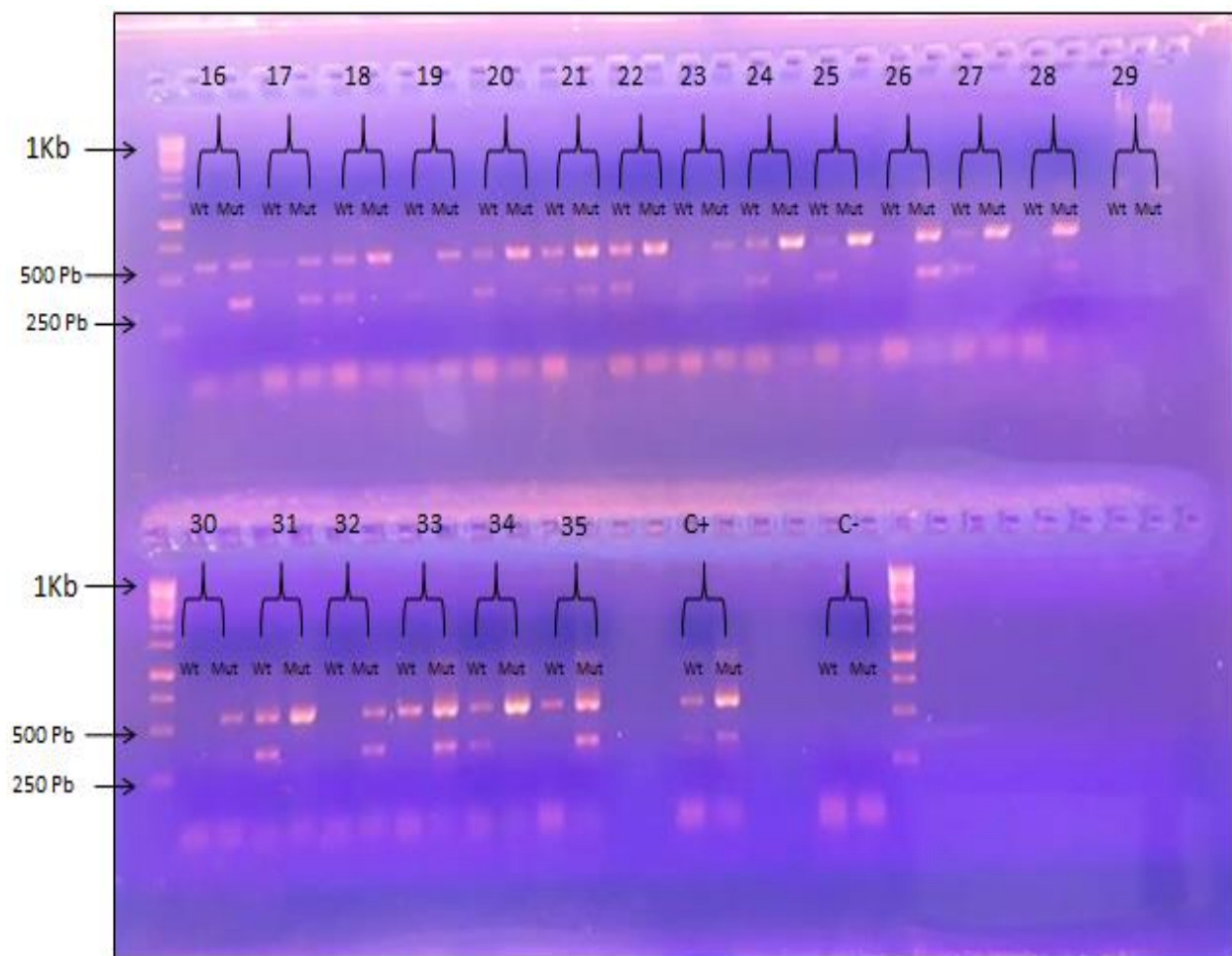


Figura 12. AS- PCR para la mutación V419L, Electroforesis a 70V por 60 minutos en gel de agarosa de 1.5%. las bandas en 344 pb corresponden a la presencia del alelo wild type y mutado. Las bandas en 555 pb corresponden al control de reacción interna para el alelo wild type y mutado. C+: es el control positivo heterocigoto, C-: es el control negativo. Los carriles a los extremos representan el marcador de peso molecular de 1 kb. Cada número representa un mosquito al cual se le realizan dos (AS-PCR) una para el alelo wild type y otra para el alelo mutado.

No hubo diferencia en la frecuencia del alelo 1558C, este presentó valores de 1.0 en los cuatro barrios evaluados de Cúcuta (**Tabla 4**). Todas las frecuencias de genotipos de las cuatro poblaciones se probaron para la conformidad con el equilibrio de Hardy-Weinberg. (**Tablas 7,8,9,10**). En las (**Figuras 13,14,15**) se muestra un análisis comparativo entre las frecuencias alélicas y la relación de resistencia de estos tres alelos en los cuatro barrios estudiados de Cúcuta.

Los tres genotipos en la posición V1016I se observaron en los cuatro barrios (V / V - V / I e I / I), la frecuencia del alelo mutante 1016I en (TU), (ST), y (CI), fue de 0.21, 0.33, y 0.35, respectivamente, en comparación con 0,51 (TP). (**Tabla 5**)

Para la mutación V419L, se observaron los tres genotipos (V / V - V / L y L / L) en los cuatro barrios evaluados, siendo el genotipo heterocigoto (V419L) poco frecuente en los cuatro barrios, con valores de 0,17 (TP) y (ST), 0.16 (CI), 0.12 (TU). Sin embargo, fue alta la frecuencia del alelo mutante 419L en todos los barrios: (TP) 0.65, (ST) 0.55, (CI) 0.59, (TU) 0.62 (**Tabla 6**).

Tabla 4: Frecuencias genotípicas y alélicas para la mutación F1558C en *Ae. aegypti* de cuatro barrios estudiados en Cúcuta.

| <i>Población</i> | <i>Frecuencia genotípica</i> | | | <i>Frecuencia alélica</i> | |
|-----------------------|------------------------------|--------|--------|---------------------------|-------|
| | H. Wt | Hetero | H. Mut | F1558 | 1558C |
| <i>Toledo Plata</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Santa Teresita</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Circunvalación</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Tucunaré</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |

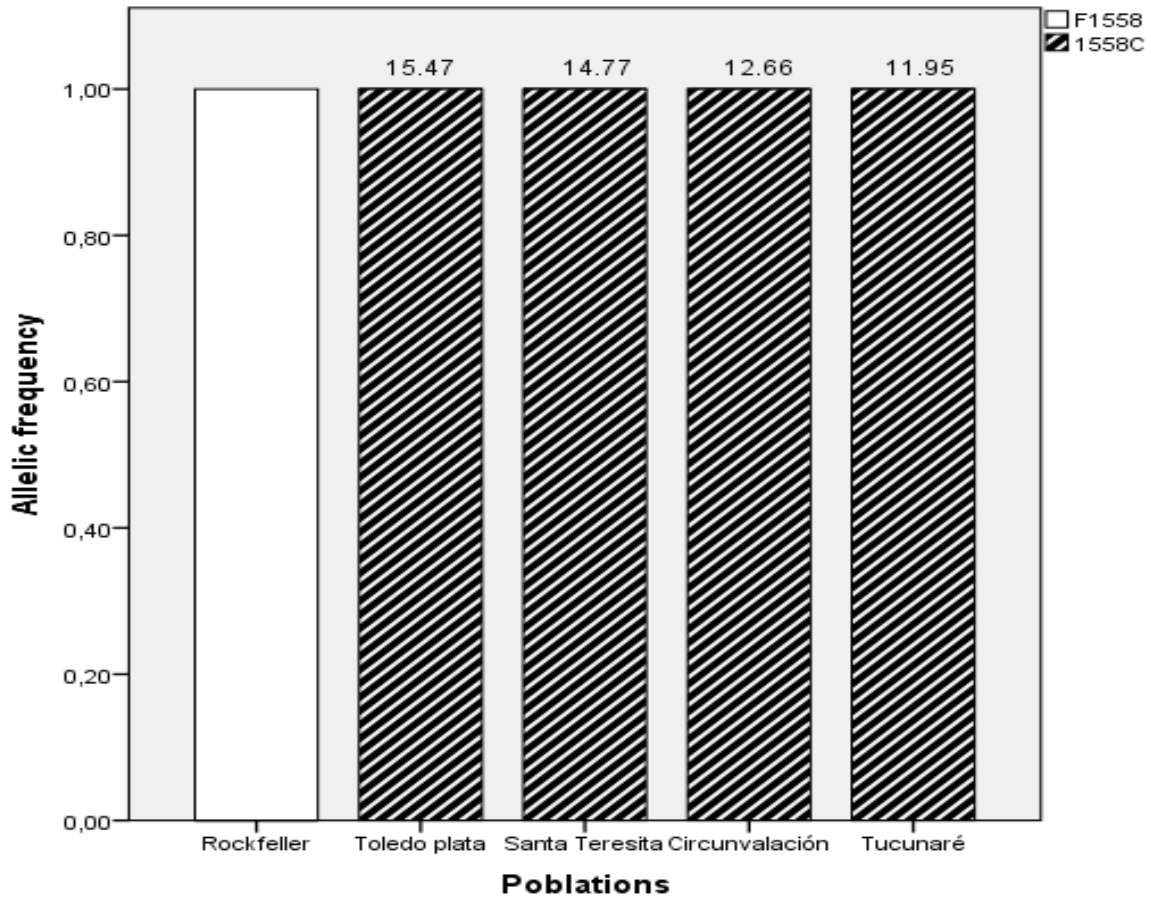


Figura 13. Comparación de frecuencias alélicas para la mutación F1558C, en *Aedes aegypti* de cuatro barrios estudiados en Cúcuta. El valor GR para mosquitos de cada barrio se muestra en la parte superior de cada columna.

Tabla 5: Frecuencias genotípicas y alélicas para la mutación V1016I en *Ae. aegypti* de cuatro barrios estudiados en Cúcuta.

| <i>Población</i> | <i>Frecuencia genotípica</i> | | | <i>Frecuencia alélica</i> | |
|-----------------------|------------------------------|--------|--------|---------------------------|-------|
| | H. Wt | Hetero | H. Mut | V1016 | 1016I |
| <i>Toledo Plata</i> | 0.17 | 0.64 | 0.19 | 0.49 | 0.51 |
| <i>Santa Teresita</i> | 0.46 | 0.41 | 0.13 | 0.67 | 0.33 |
| <i>Circunvalación</i> | 0.43 | 0.43 | 0.14 | 0.65 | 0.35 |
| <i>Tucunaré</i> | 0.6 | 0.38 | 0.02 | 0.79 | 0.21 |

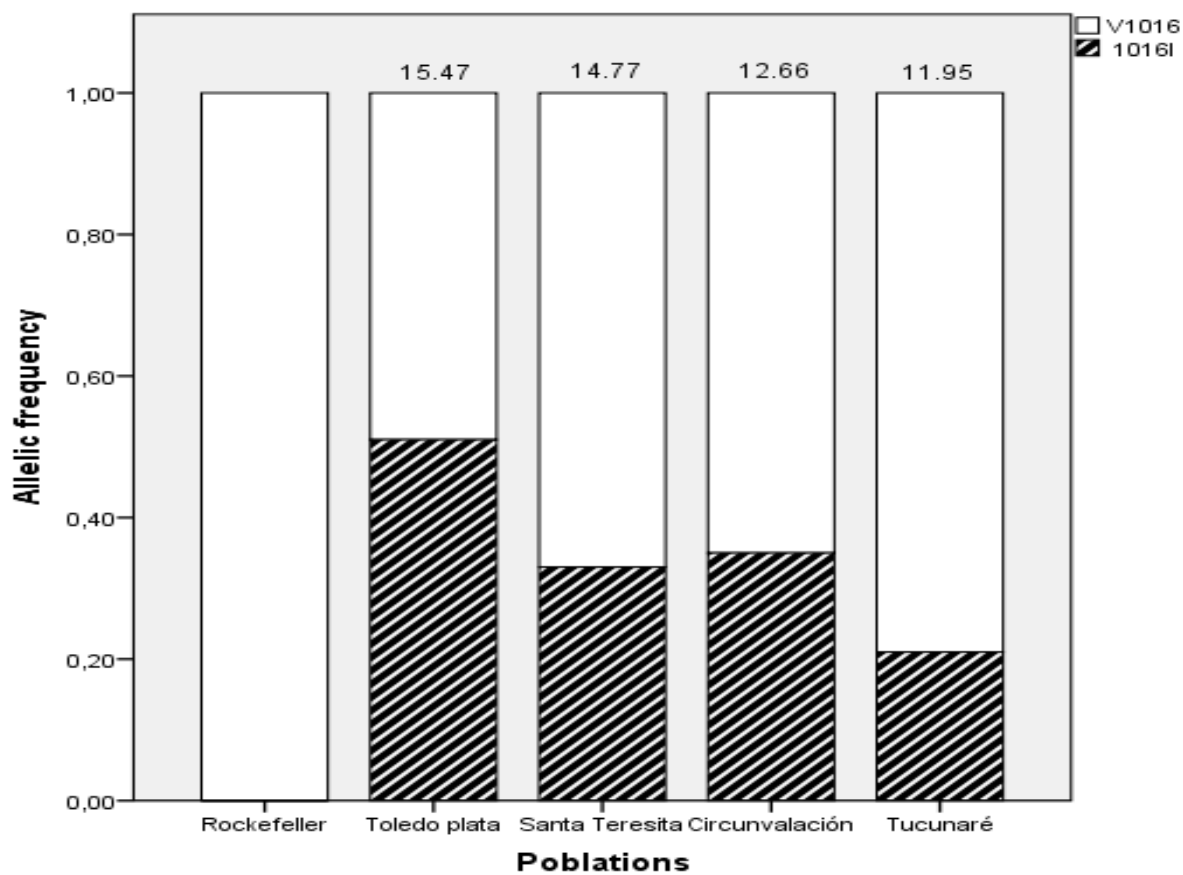


Figura 14. Comparación de frecuencias alélicas para la mutación V1016I, en *Aedes aegypti* de cuatro barrios estudiados en Cúcuta. El valor GR para mosquitos de cada barrio se muestra en la parte superior de cada columna.

Tabla 6: Frecuencias genotípicas y alélicas para la mutación V419L en *Ae. aegypti* de cuatro barrios estudiados en Cúcuta.

| <i>Población</i> | <i>Frecuencia genotípica</i> | | | <i>Frecuencia alélica</i> | |
|-----------------------|------------------------------|--------|--------|---------------------------|------|
| | H. Wt | Hetero | H. Mut | V419 | 419L |
| <i>Toledo Plata</i> | 0.26 | 0.17 | 0.57 | 0.35 | 0.65 |
| <i>Santa Teresita</i> | 0.46 | 0.17 | 0.37 | 0.55 | 0.45 |
| <i>Circunvalación</i> | 0.33 | 0.16 | 0.51 | 0.41 | 0.59 |
| <i>Tucunaré</i> | 0.32 | 0.12 | 0.56 | 0.38 | 0.62 |

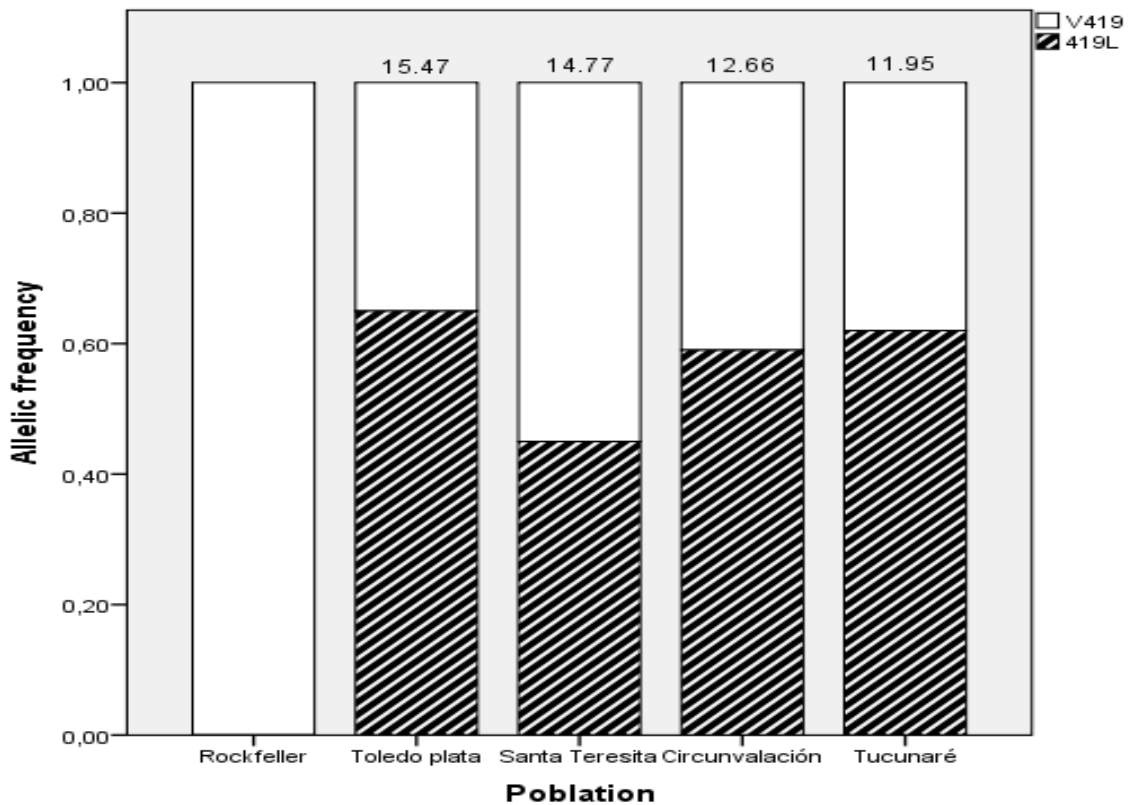


Figura 15. Comparación de frecuencias alélicas para la mutación V419L, en *Aedes aegypti* de cuatro barrios estudiados en Cúcuta. El valor GR para mosquitos de cada barrio se muestra en la parte superior de cada columna.

Tabla 7. Genotipos y valores asociados para la evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante Chi cuadrado de las mutaciones del canal de sodio en *Aedes aegypti* de la población Toledo Plata de Cúcuta, Norte de Santander.

| <i>Población: Toledo Plata</i> | | | | <i>Equilibrio de Hardy – Weinberg mediante X^2</i> | | | |
|--------------------------------|-----|-------|-----------|---|------------------------|---------------------|--------|
| <i>Genotipo (419)</i> | Obs | Esp | Obs - Esp | Δ | Δ^2/ Esp | Equilibrio de H - W | P |
| V/V | 14 | 6.36 | 14 - 6.36 | 7.64 | 9.17 | | |
| V/L | 9 | 24.38 | 9 - 24.38 | -15.38 | 9.70 | NO | 0.0073 |
| L/L | 30 | 22.26 | 30 - 2.26 | 7.74 | 2.69 | | |

$$gL = 3-2 = 1 \quad \% \text{ error} = 0.05 \quad X^2 T = 3.841 \quad X^2 Ca = 21.56$$

| <i>Población: Toledo Plata</i> | | | | <i>Equilibrio de Hardy – Weinberg mediante X^2</i> | | | |
|--------------------------------|-----|-------|-----------|---|------------------------|---------------------|--------|
| <i>Genotipo (1016)</i> | Obs | Esp | Obs - Esp | Δ | Δ^2/ Esp | Equilibrio de H – W | P |
| V/V | 9 | 12.72 | 9 - 12.72 | -3.72 | 1.08 | | |
| V/I | 34 | 26.5 | 34 - 26.5 | 7.5 | 2.12 | | |
| I/I | 10 | 13.78 | 10 - 3.78 | -3.78 | 1.03 | NO | 0.0079 |

$$gL = 3-2 = 1 \quad \% \text{ error} = 0.05 \quad X^2 T = 3.841 \quad X^2 Ca = 4.23$$

| <i>Población: Toledo Plata</i> | | | | <i>Equilibrio de Hardy – Weinberg mediante X^2</i> | | | |
|--------------------------------|-----|-----|-----------|---|------------------------|---------------------|------|
| <i>Genotipo (1558)</i> | Obs | Esp | Obs - Esp | Δ | Δ^2/ Esp | Equilibrio de H - W | P |
| F/F | 0 | 0 | 0 - 0 | 0 | 0 | | |
| F/C | 0 | 0 | 0 - 0 | 0 | 0 | SI | 0.96 |
| C/C | 54 | 54 | 54 - 54 | 0 | 0 | | |

$$gL = 3-2 = 1 \quad \% \text{ error} = 0.05 \quad X^2 T = 3.841 \quad X^2 Ca = 0$$

Tabla 8. Genotipos y valores asociados para la evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante Chi cuadrado de las mutaciones del canal de sodio en *Aedes aegypti* de la población Santa Teresita de Cúcuta, Norte de Santander.

| <i>Población: Santa Teresita</i> | | | <i>Equilibrio de Hardy – Weinberg mediante X^2</i> | | | | |
|----------------------------------|-----|------|---|----------|------------------------|---------------------|--------|
| <i>Genotipo (419)</i> | Obs | Esp | Obs - Esp | Δ | Δ^2/ Esp | Equilibrio de H - W | P |
| V/V | 25 | 16.5 | 25 - 6.5 | 8.8 | 4.7 | | |
| V/L | 9 | 27 | 9 - 27 | -18 | 12 | NO | 0.0070 |
| L/L | 20 | 10.8 | 20 - 0.8 | 9.2 | 7.8 | | |

$$gL = 3-2 = 1 \quad \% \text{ error} = 0.05 \quad X^2 T = 3.841 \quad X^2 Ca = 24.5$$

| <i>Población: Santa Teresita</i> | | | <i>Equilibrio de Hardy – Weinberg mediante X^2</i> | | | | |
|----------------------------------|-----|-----|---|----------|------------------------|---------------------|------|
| <i>Genotipo (1016)</i> | Obs | Esp | Obs - Esp | Δ | Δ^2/ Esp | Equilibrio de H - W | P |
| V/V | 25 | 24 | 25 - 24 | 1 | 0.04 | | |
| V/I | 22 | 24 | 22 - 24 | -2 | 0.17 | SI | 0.86 |
| I/I | 7 | 6 | 7 - 6 | 1 | 0.17 | | |

$$gL = 3-2 = 1 \quad \% \text{ error} = 0.05 \quad X^2 T = 3.841 \quad X^2 Ca = 0.38$$

| <i>Población: Santa Teresita</i> | | | <i>Equilibrio de Hardy – Weinberg mediante X^2</i> | | | | |
|----------------------------------|-----|-----|---|----------|------------------------|---------------------|------|
| <i>Genotipo (1558)</i> | Obs | Esp | Obs - Esp | Δ | Δ^2/ Esp | Equilibrio de H - W | P |
| F/F | 0 | 0 | 0 - 0 | 0 | 0 | | |
| F/C | 0 | 0 | 0 - 0 | 0 | 0 | SI | 0.96 |
| C/C | 54 | 54 | 54 - 54 | 0 | 0 | | |

$$gL = 3-2 = 1 \quad \% \text{ error} = 0.05 \quad X^2 T = 3.841 \quad X^2 Ca = 0$$

Tabla 9. Genotipos y valores asociados para la evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante Chi cuadrado de las mutaciones del canal de sodio en *Aedes aegypti*, población Circunvalación de Cúcuta, Norte de Santander.

| <i>Población: Circunvalación</i> | | | | <i>Equilibrio de Hardy – Weinberg mediante X^2</i> | | | |
|----------------------------------|-----|-----|-----------|---|------------------------|---------------------|--------|
| <i>Genotipo (419)</i> | Obs | Esp | Obs - Esp | Δ | Δ^2/ Esp | Equilibrio de H - W | P |
| V/V | 17 | 9 | 17 - 9 | 8 | 7.1 | | |
| V/L | 8 | 24 | 8 - 24 | -16 | 10.6 | NO | 0.0075 |
| L/L | 26 | 18 | 26 - 18 | 8 | 3.5 | | |

$$gL = 3-2 = 1 \quad \% \text{ error} = 0.05 \quad X^2 T = 3.841 \quad X^2 Ca = 21.2$$

| <i>Población: Circunvalación</i> | | | | <i>Equilibrio de Hardy – Weinberg mediante X^2</i> | | | |
|----------------------------------|-----|-------|-----------|---|------------------------|---------------------|------|
| <i>Genotipo (1016)</i> | Obs | Esp | Obs - Esp | Δ | Δ^2/ Esp | Equilibrio de H - W | P |
| V/V | 22 | 21.42 | 22 - 1.42 | 0.58 | 0.01 | | |
| V/L | 22 | 23.46 | 22 - 2.46 | 1.46 | 0.09 | SI | 0.88 |
| L/L | 7 | 6.12 | 7 - 6.12 | 0.88 | 0.12 | | |

$$gL = 3-2 = 1 \quad \% \text{ error} = 0.05 \quad X^2 T = 3.841 \quad X^2 Ca = 0.22$$

| <i>Población: Circunvalación</i> | | | | <i>Equilibrio de Hardy – Weinberg mediante X^2</i> | | | |
|----------------------------------|-----|-----|-----------|---|------------------------|---------------------|------|
| <i>Genotipo (1558)</i> | Obs | Esp | Obs - Esp | Δ | Δ^2/ Esp | Equilibrio de H - W | P |
| F/F | 0 | 0 | 0 - 0 | 0 | 0 | | |
| F/C | 0 | 0 | 0 - 0 | 0 | 0 | SI | 0.96 |
| C/C | 54 | 54 | 54 - 54 | 0 | 0 | | |

$$gL = 3-2 = 1 \quad \% \text{ error} = 0.05 \quad X^2 T = 3.841 \quad X^2 Ca = 0$$

Tabla 10. Genotipos y valores asociados para la evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante Chi cuadrado de las mutaciones del canal de sodio en *Aedes aegypti*, población Tucunaré de Cúcuta, Norte de Santander.

| <i>Población: Tucunaré</i> | | | | <i>Equilibrio de Hardy – Weinberg mediante X^2</i> | | | |
|----------------------------|-----|------|-----------|---|------------------------|---------------------|--------|
| <i>Genotipo (419)</i> | Obs | Esp | Obs - Esp | Δ | Δ^2/ Esp | Equilibrio de H - W | P |
| V/V | 16 | 7.5 | 16 -7.5 | 8.5 | 9.63 | | |
| V/L | 6 | 23.5 | 6 - 23.5 | 17.5 | 13.03 | NO | 0.0068 |
| L/L | 28 | 19 | 28 -19 | 9 | 4.26 | | |

$$gL = 3-2 = 1 \quad \% \text{ error} = 0.05 \quad X^2 T = 3.841 \quad X^2 Ca = 26.92$$

| <i>Población: Tucunaré</i> | | | | <i>Equilibrio de Hardy – Weinberg mediante X^2</i> | | | |
|----------------------------|-----|------|-----------|---|------------------------|---------------------|------|
| <i>Genotipo (1016)</i> | Obs | Esp | Obs - Esp | Δ | Δ^2/ Esp | Equilibrio de H - W | P |
| V/V | 30 | 31.5 | 30 -31.5 | 1.5 | 0.07 | | 0.84 |
| V/I | 19 | 16 | 19 - 16 | 3 | 0.56 | SI | |
| I/I | 1 | 2 | 1 -2 | 1 | 0.5 | | |

$$gL = 3-2 = 1 \quad \% \text{ error} = 0.05 \quad X^2 T = 3.841 \quad X^2 Ca = 1.13$$

| <i>Población: Tucunaré</i> | | | | <i>Equilibrio de Hardy – Weinberg mediante X^2</i> | | | |
|----------------------------|-----|-----|-----------|---|------------------------|---------------------|------|
| <i>Genotipo (1558)</i> | Obs | Esp | Obs - Esp | Δ | Δ^2/ Esp | Equilibrio de H - W | P |
| F/F | 0 | 0 | 0 - 0 | 0 | 0 | | 0.96 |
| F/C | 0 | 0 | 0 - 0 | 0 | 0 | SI | |
| C/C | 54 | 54 | 54 - 54 | 0 | 0 | | |

$$gL = 3-2 = 1 \quad \% \text{ error} = 0.05 \quad X^2 T = 3.841 \quad X^2 Ca = 0$$

8.3 Correlación de resistencia con las frecuencias alélicas de las diferentes mutaciones

la frecuencia de la mutación 1558C no se correlacionó directamente con la resistencia a lambda-cialotrina, por otra parte, se observó una correlación positiva entre la frecuencia de los alelos 1016I y 419L la resistencia a lambda-cialotrina solo en la población de Toledo Plata. Las otras tres poblaciones presentaron fluctuaciones en la frecuencia de estos alelos.

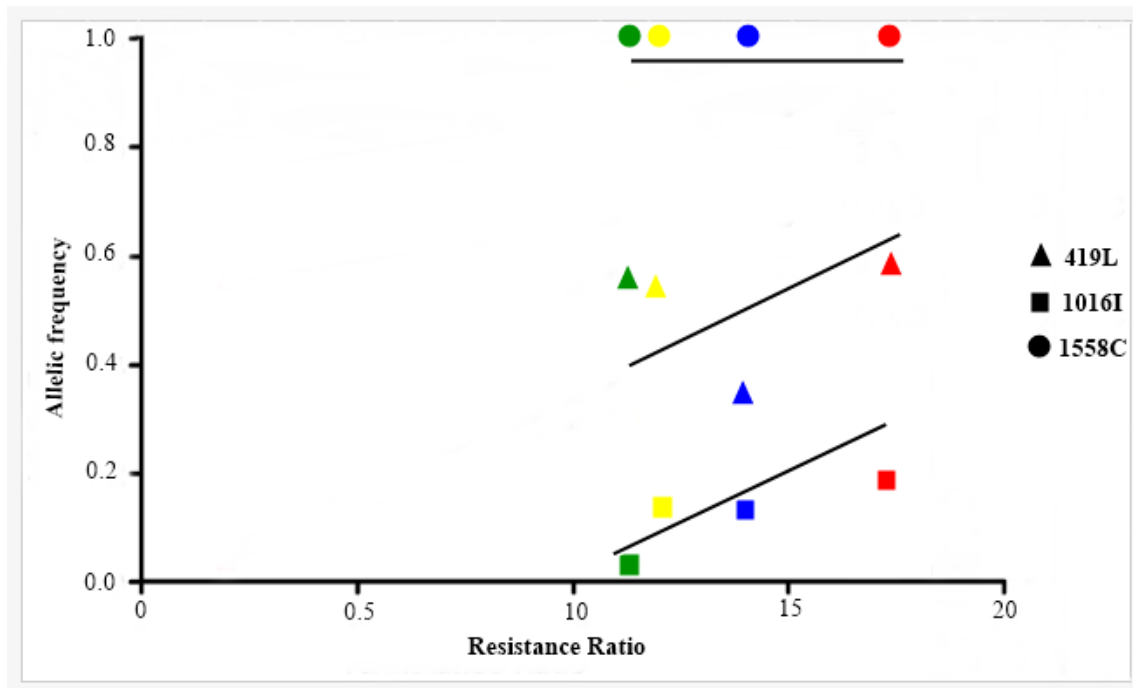


Figura 16. Correlación entre la frecuencia de alelos mutados kdr (1534C, 1016I, 419L) y la resistencia a la lambda-cialotrina en poblaciones de *Aedes aegypti* y (Rojo: Toledo plata, azul: Santa Teresita; amarillo: Circunvalación y verde: Tucunaré).

8.4 Mutaciones en combinación

Tabla 11. Haplotipos observados en poblaciones de mosquitos *Aedes aegypti* de Toledo Plata, Santa Teresita, Circunvalación y Tucunaré.

| <i>Haplotipos</i> | <i>TP</i> | <i>ST</i> | <i>CI</i> | <i>TU</i> | <i>Total</i> | <i>%</i> |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|----------|
| <i>V419L/V1016/1558C</i> | 1 | 2 | 3 | 1 | 7 | 3.4 |
| <i>419L/1016I/1558C</i> | 8 | 6 | 6 | 0 | 20 | 9.6 |
| <i>V419/V1016/1558C</i> | 5 | 23 | 14 | 10 | 52 | 25 |
| <i>419L/V1016/1558C</i> | 3 | 0 | 5 | 16 | 24 | 11.5 |
| <i>V419/1016I/1558C</i> | 0 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1.4 |
| <i>419L/V1016I/1558C</i> | 19 | 12 | 15 | 9 | 55 | 26.4 |
| <i>V419L/1016I/1558C</i> | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| <i>V419L/V1016I/1558C</i> | 7 | 9 | 5 | 6 | 27 | 13 |
| <i>V419/V1016I/1558C</i> | 8 | 1 | 2 | 7 | 17 | 8.7 |
| <i>Total</i> | 53 | 54 | 51 | 50 | 208 | 100 |

9. DISCUSIONES

9.1 Bioensayos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informa hoy de los progresos notables alcanzados por la lucha contra las enfermedades tropicales desde 2007. Se estima que, solo en 2015, se ha tratado a 1000 millones de afectados. El dengue se considera una enfermedad reemergente en países tropicales; se estima que 390 millones de casos ocurren anualmente y que más del 55 % de la población mundial se encuentra en riesgo de transmisión en 128 países donde habitan 824 millones de personas (Bhatt et al., 2013).

Según fuentes de información del Sistema Nacional de Vigilancia (SIVIGILA) en nuestro país 758 municipios han registrado casos de dengue, lo que ubica a Colombia como un país hiperendémico. los casos transmitidos se han mantenido, y en los últimos 10 años se ha presentado un aumento debido a brotes de arbovirosis como Zika y Chikungunya, asociadas al vector *Ae. Aegypti*.

Una de las formas más comunes utilizadas a lo largo de la historia para el control del vector transmisor de estas enfermedades virales ha sido el uso de diversos tipos de insecticidas químicos, Cúcuta toma un papel relevante en este tipo de estudios ya que una de las teorías de cómo se dio la reinfestación en el país fue proveniente de Maracaibo Venezuela en 1883, y hasta 1912 el mosquito logró acomodarse en la ciudad y causar todas las epidemias registradas hasta entonces (Boshell et al., 1986), probablemente esta situación causó en Cúcuta el uso de insecticidas de manera intensiva y extensiva.

Con el fin de conocer el estado de susceptibilidad del mosquito *Ae. Aegypti* a los insecticidas, evaluamos los niveles de resistencia al piretroide lambda-cialotrina en cuatro barrios del municipio de San José de Cúcuta (Santa Teresita, Toledo Plata, Circunvalación y Tucunaré). Los resultados de los análisis indicaron resistencia en las cuatro poblaciones evaluadas con GR de 15.47 (TP), 14.77 (ST), 12.66 (CI), 11.95 (TU). (**Tabla 3**). Nuestros resultados coinciden con Cárdenas (2008) que en estudios similares en esta misma ciudad detectó pérdida de susceptibilidad en larvas y adultos de *Ae. aegypti* en el barrio Ospina Pérez a insecticidas como temefós y lambda-cialotrina. Aunque los piretroides se empezaron a usar desde el año 2000 en esta ciudad, se demuestra que la aplicación de estos insecticidas les ha otorgado resistencia, lo que significa un problema al

momento de realizar control del vector *Ae. Aegypti*, mediante este compuesto químico. por otra parte, Chaverra-Rodriguez et al., (2012) en el barrio los Comuneros evidencia la resistencia a la lambda-cialotrina otorgando perdida de susceptibilidad a la presencia de alelos resistentes en esta población. Con la finalidad de saber si la resistencia a la lambda-cialotrina se encuentra en todos los mosquitos de Cúcuta y su área metropolitana, se sugieren más estudios en las diferentes comunas y barrios de este municipio.

Santacoloma et al., (2009) en estudios de susceptibilidad a DDT, Deltametrina y lambda-cialotrina en Colombia encontraron resistencia a este último en 8 de las 13 poblaciones evaluadas. Maestre-Serrano et al (2010) evaluó el estado de susceptibilidad en el departamento de atlántico reportando perdida de susceptibilidad a la lambda-cialotrina en 4 de las 6 cepas evaluadas de *Ae. Aegypti*.

Estos estudios muestran un rápido desarrollo de la resistencia a los piretroides en Colombia, sin embargo, se sugiere nuevos estudios en estas zonas para evaluar el estado actual de susceptibilidad a insecticidas, especialmente a la lambda-cialotrina.

Recientemente la resistencia a este piretroide ha sido documentada en estudios, en otros municipios de Colombia. La Mesa Cundinamarca & Bucaramanga, Murcia Ramírez, (2015) y Granada et al., (2018) quienes reportaron susceptibilidad en Bello y perdida de susceptibilidad en Villavicencio y Riohacha, en Bali Indonesia, Hamid et al., (2017) en trabajos con mutaciones (kdr) en tres zonas de esa ciudad, reportaron resistencia a diferentes tipos de insecticidas entre ellos a la lambda-cialotrina.

9.2 Mutación F1558C

La mutación F1558C antes conocida como F1534C, consiste en el cambio de una Fenilalanina por una Cisteína en la proteína que codifica para el canal de sodio regulado por voltaje (Vgsc), fue reportada para Colombia en el año 2016 en poblaciones de mosquitos de la región caribe, en el departamento de Sucre por Atencia et al., la cual es asociada con la resistencia cruzada a DDT y Piretroides Permetrina, estudios realizados en *Ae. Aegypti* en México, (Aponte et al., 2013), Brasil (Linss et al., 2014), India (Kushwah et al., 2015) y Venezuela (Álvarez et al., 2015). obtuvieron igual resultado que en Colombia.

La frecuencia del alelo mutado 1558C en las cuatro poblaciones evaluadas fue de 1.0, (**Tabla 4**) para un 100% de este alelo, lo que sugiere según nuestro estudio, este polimorfismo de nucleótido simple se encuentra fijado en el genoma de la especie de estudio de las poblaciones evaluadas y que probablemente está estrechamente relacionado con la resistencia a el insecticida DDT. Sin embargo, se sugiere evaluar esta mutación en otros barrios de Cúcuta.

La presencia 100% del alelo 1558C se tornan de manera normal y coherente teniendo en cuenta que el uso de este organoclorado en américa se dio a mediados de los años 50, debido a la alta incidencia de paludismo en diferentes partes del mundo (Montilla & Alvarado, 2015), sobre todo en países tropicales lo que pudo ocasionar una presión de selección de este insecticida sobre *Ae. aegypti* durante casi tres décadas en el departamento de Norte de Santander. Granada et al., (2018) en poblaciones de Riohacha, Villavicencio y Bello encontraron la frecuencia para el alelo 1558C más alta en la primera ciudad, este resultado puede afirmar, además, una de las teorías de que la reinfestacion del vector fue proveniente de Venezuela por Cúcuta la cual requirió un tratamiento especial, entre otras razones por tener una cepa de *Ae. aegypti* resistente al DDT (Boshell et al., 1986) que probablemente se dispersó hacia la guajira y a otros lugares del país.

9.3 Mutación V1016I

Otra de las mutaciones evaluadas fue la V1016I, se reportó en Colombia por primera vez en el año 2014 en la región caribe, los resultados de esta investigación no asociaron esta mutación con la resistencia al piretroide lambda-cialotrina. Aguirre-Obando et al., (2015) en estudios en poblaciones de mosquitos en Colombia lograron encontrar esta mutación a baja frecuencia y se relacionó con resistencia a organofosforados. Aunque la resistencia a Temefos ya se había reportado para nuestro país por Grisales et al., (2013).

En nuestro estudio se determinó para el alelo 1016I frecuencias de (0.51 - Toledo plata, 0.33 - Santa Teresita, 0.35 - Circunvalación, 0.21 - Tucunare). (**Tabla 5**) estos resultados muestran que existe una frecuencia relativamente alta de este alelo en las poblaciones de *Ae. Aegypti* de Cúcuta y que probablemente puede llegar a aumentar si se sigue haciendo un uso incontrolado de los insecticidas. Granada et al (2018), evaluaron esta mutación en poblaciones de Villavicencio, Riohacha y Bello, hallando frecuencias alélicas similares a las reportadas en este trabajo, a

excepción de la última ciudad donde se obtuvo una frecuencia de 0.06. por otra parte, Maestre-Serrano et al., (2014), en la región caribe, en los municipios de Soledad, Barranquilla, Valledupar, San Juan, Sincelejo, Montería, Ciénega y Cartagena, reportó la presencia de la mutación V1016I, y frecuencias alélicas entre 0.10 y 0.35 a excepción de las dos últimas ciudades que fueron de 0.07 y 0.09 respectivamente. Según este estudio, esta mutación ha sido relacionada con resistencia a piretroides Deltametrina, Permetrina y ciflutrín, pero no a la lambda-cialotrina, estos resultados coinciden con nuestro trabajo, lo cual nos lleva a suponer que la resistencia a este piretroide no está relacionada exclusivamente por esta mutación, sino que probablemente presente una resistencia cruzada, o que posiblemente actúen en sinergia con una o dos de las más de 10 mutaciones que se han identificado hasta el momento en el canal de sodio para *Ae. aegypti*. Por lo tanto, se sugieren estudios adicionales para determinar la posible sinergia y la relación con la resistencia a este insecticida.

9.4 Mutación V419L

Por ultimo evaluamos una tercera mutación, la V419L, reportada recientemente para Colombia, por Granada et al., (2018). En este caso la presencia del alelo 419L fue mayor con respecto al alelo 1016I, con valores de (0.65 - Toledo Plata, 0.45 - Santa Teresita, 0.59 - Circunvalación, 0.62 - Tucunare). (**Tabla 6**) estos resultados sugieren que esta mutación presentada en el dominio I del canal de sodio apareció primero que la V1016I, o que presenta mayor frecuencia alélica con respecto a la 1016 a causa de la presión constante con piretroides que se ha hecho desde el año 2000, debido a los constantes brotes de arbovirosis como Zika y Chikungunya, se sugiere además, que este primer dominio tiene un efecto relevante sobre la resistencia a este insecticida, sin embargo se recomiendan estudios más profundos en genómica funcional que puedan precisar el papel de la mutación V419L y su funcionalidad en el canal de sodio relacionada con la resistencia a la lambda-cialotrina. Estos resultados coinciden con los de Haddit et al (2017), en lo cual apoyamos su afirmación de que los altos niveles de resistencia a los piretroides en las larvas son el resultado tanto de la detoxificación metabólica mejorada como de las mutaciones kdr. En nuestro trabajo se demostró que no necesariamente una población debe presentar una alta frecuencia del alelo mutado para ser resistente, por el contrario, se observaron poblaciones con frecuencias alélicas bajas y un GR alto y viceversa, (**Figuras 14, 15**) la posible explicación a

este fenómeno puede atribuirse a los antecedentes genéticos de cada población, al uso diferencial de insecticidas y a la frecuencia con la que se aplican tales insecticidas, sin embargo se sugieren en futuras investigaciones estudios adicionales en citogenética y proteómica.

Otra de las posibles razones podría ser el costo biológico que tendría la especie al mutar para adquirir resistencia a los insecticidas. Martins et al., (2012) estudió el efecto de la resistencia a los insecticidas en la especie *Ae. aegypti*, reportando afectación en los procesos fisiológicos y reproductivos, de tal manera que sus resultados arrojaron un retraso progresivo significativo en el desarrollo de larvas, reducción en el número de huevos ovopositados y viabilidad de los mismos eclosionados durante diferentes generaciones, sin embargo, hay que tener en cuenta que las presiones se realizaron en el laboratorio bajo condiciones ambientales controladas.

Con base en nuestros resultados proponemos la existencia de una posible sinergia entre la mutación V419L y V1016I, que otorga resistencia al piretroide lambda-cialotrina, ponemos como argumento la aparición del alelo mutado 419L y 1016I en el mismo haplotipo en un 50% de todos los mosquitos evaluados en las cuatro poblaciones. (**Tabla 11**). Sin embargo, se requieren más estudios para comprobar el efecto de las mutaciones dobles V419L y V1016I. Granada et al (2018) al igual que nosotros reportan esta posible sinergia.

10. CONCLUSIONES

Las cuatro poblaciones de *Ae. aegypti* de Cúcuta son resistentes al insecticida piretroide lambda-cialotrina, ello puede atribuirse al uso indiscriminado del insecticida para controlar tales poblaciones.

Se identificaron tres mutaciones en el gen del canal de sodio de los mosquitos *Ae. aegypti* en las cuatro poblaciones de Cúcuta, la mutación V419L, V1016I, y F1558C, esta última relacionada con la resistencia a otros tipos de insecticidas.

La resistencia encontrada a la lambda-cialotrina en las poblaciones de Cúcuta no solo puede explicarse por la presencia de frecuencias alélicas relativamente altas, puede atribuirse también a actividades metabólicas enzimáticas, resistencia cuticular y otros mecanismos de resistencia. Ello debido a que no existe una relación directamente proporcional entre la resistencia y la frecuencia de los alelos mutado entre las poblaciones evaluadas.

No se encontró una correlación positiva entre la frecuencia de alelos mutados y la resistencia a la lambda-cialotrina con excepción de la población Toledo plata, los otros barrios presentaron variación entre la frecuencia y la resistencia.

11. RECOMENDACIONES

Se recomienda abolir paulatinamente el uso de insecticidas para el control del vector *Ae. aegypti* en Cúcuta, de igual manera se sugiere fortalecer los controles de tipo físico y biológico, implementando el uso de *Bacillus thuringiensis*, *Macrocyclus albidus*, *Gambusia affinis* como medidas de control larval.

Implementar estrategias que logren concientizar a las comunidades que se encuentran en un mayor grado de vulnerabilidad, de tal manera que se alcance el desarrollo de buenas prácticas socio-culturales para la prevención y control efectivo del *Ae. aegypti*

A los entes gubernamentales se les recomienda la implementación de la vigilancia molecular y metabólica del vector *Ae. aegypti*, también la realización de futuras investigaciones que logren determinar otros mecanismos asociados a la resistencia. Esto con el fin de implementar programas efectivos para el control del vector transmisor de arbovirosis como Dengue, Zika, Chikungunya, entre otros.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Achudume, A. (2012). Insecticide. In A. i. InTech, *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management* (pp. 1: 3-22). Nigeria: Obafemi Awolowo University.
- Aguirre-Obando, O. A., Martins, A. J., & Navarro-Silva, M. A. (2017). First report of the Phe1534Cys kdr mutation in natural populations of *Aedes albopictus* from Brazil. *Parasites & vectors*, *10*(1), 160.
- Almazán, J. M. A., Breyse, M. M., Sáiz, C. J. C., & Rama, D. F. Electrofisiología celular
- Álvarez, L. C., Ponce, G., Saavedra-Rodríguez, K., López, B., & Flores, A. E. (2015). Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest management science*, *71*(6), 863-869.
- Ana María Blandón, Ángela Alarcón. (2015). Boletín Epidemiológico Semanal (BES) Instituto Nacional de Salud Dirección de Vigilancia Y Análisis de Riesgo En Salud Publica Semana Epidemiologia 51 de 2015 (20 Dic Al 26 Dic).
- Aponte, HA, Penilla, RP, Dzul-Manzanilla, F., Che-Mendoza, A., López, AD, Solís, F., ... y Rodríguez, AD (2013). El estado y los mecanismos de resistencia piretroide en *Aedes aegypti* del estado de Guerrero, México. *Bioquímica y fisiología de plaguicidas*, *107* (2), 226-234.
- Arredondo-García, J. L., Méndez-Herrera, A., & Medina-Cortina, H. (2016). Arbovirus in Latin America. *Acta pediátrica de México*, *37*(2), 111-131.
- Arrington, LC, Edman, JD, y Scott, TW (2001). ¿Por qué las hembras de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) se alimentan preferentemente y con frecuencia de sangre humana? *Diario de entomología médica*, *38* (3), 411-422.
- Atencia, M. C., de Jesús Pérez, M., Jaramillo, M. C., Caldera, S. M., Cochero, S., & Bejarano, E. E. (2016). Primer reporte de la mutación F1534C asociada con resistencia cruzada a DDT y piretroides en *Aedes aegypti* en Colombia. *Biomédica*, *36*(3), 432-437.
- Azevedo, RS, Silva, EV, Carvalho, VL, Rodrigues, SG, Neto, JP, Monteiro, HA ... Vasconcelos, P. (2009). Virus de la fiebre de Mayaro, amazonia brasileña. *Enfermedades infecciosas emergentes*, *15* (11), 1830-1832. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1511.090461>
- Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M., y Chevillon, C. (2002). Los genes de resistencia a los insecticidas inducen un costo de competencia de apareamiento en los mosquitos *Culex pipiens*. *Genetics Research*, *79* (1), 41-47.

- Bhatt, S., Gething, PW, Brady, OJ, Messina, JP, Farlow, AW, Moyes, CL, ... y Myers, MF (2013). La distribución global y la carga del dengue. *Nature*, 496 (7446), 504.
- Bisset Lazcano, J. A., Rodríguez, M. M., San Martín, J. L., Romero, J. E., & Montoya, R. (2009). Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 26, 229-234.
- Bobadilla Utrera, M. C. (2010). *Perfil de resistencia y mutación "kdr" asociada a insecticidas piretroides en Aedes aegypti (L.) (Diptera: Culicidae) de Veracruz, México* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Boshell, J., Groot, H., Gacharna, M., Márquez, G., González, M., Gaitán, M. O., ... & Martínez, M. (1986). Dengue en Colombia. *Biomédica*, 6(3-4), 101-106.
- BURBANO, DAHYANA BOLAÑOS. (2013). "DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES COLOMBIANAS DE *Aedes Aegypti* (Díptera: Culicidae) Y SU GRADO DE SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS DE USO EN SALUD PÚBLICA."
- CÁRDENAS, R. (2008). Evaluación del estado actual de la susceptibilidad a insecticidas en los principales vectores de malaria; dengue y fiebre amarilla urbana en Norte de Santander; Colombia zona fronteriza con Venezuela e Iniciación de la red de vigilancia de la resistencia a insecticidas. Tesis de Maestría. Magister Scientiae en Protozoología. Núcleo Universitario Rafael Rangel Universidad de los Andes ULA. 98 p.
- CASAFE, C. D. S. A. Fertilizantes, (2010). *Insecticidas y acaricidas CropLife Latinoamérica, Ciudad autónoma de Buenos Aires, Argentina*, 391, 392.
- Cifuentes, L., Flores, D., Madriz, L., & Vargas, R. (2015). OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LAMBDA-CIALOTRINA SOBRE ELECTRODOS DE PbO₂-Bi. *Química Nova*, 38(8), 1009-1013.
- Collins, FH, Mendez, MA, Rasmussen, MO, Mehaffey, PC, Besansky, NJ, y Finnerty, V. (1987). Una sonda de gen de ARN ribosomal diferencia especies miembro del complejo *Anopheles gambiae*. *El diario americano de medicina tropical e higiene*, 37(1), 37-41.
- Cortés, F. M., Gómez, S. Y., & Ocazonez, R. E. (2007). Subtipos de virus dengue serotipos 2, 3 y 4 aislados en el Departamento de Santander, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59(3), 0-0.
- Chaverra-Rodriguez, D., Jaramillo-Ocampo, N., & Fonseca-González, I. (2012). Selección artificial de resistencia a lambda-cialotrina en *Aedes aegypti* y resistencia cruzada a otros insecticidas. *Revista Colombiana de Entomología*, 38(1), 100-107.

- Chico Aldama, P. (2017). Ciclo de vida del *Aedes aegypti* y manifestaciones clínicas del dengue.
- Christophers, S. (1960). *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. *Aedes aegypti* (L.) *the Yellow Fever Mosquito: its Life History, Bionomics and Structure*.
- Díaz-Nieto, L. M., Maciá, A., Perotti, M. A., & Berón, C. M. (2013). Geographical limits of the southeastern distribution of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Argentina. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(1), e1963.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., ... & Zhorov, B. S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect biochemistry and molecular biology*, 50, 1-17. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.012>).
- Fonseca, I., & Quiñones, M. (2005). Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública. *Rev Colomb Entomol*, 31, 107-15.
- 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.
- Gast-Galvin, A. (1961). Una década de labor del Instituto Carlos Finlay de Colombia.
- Georghiou, GP (1990). Visión general de la resistencia a los insecticidas. En la *serie de simposios de ACS-American Chemical Society (EE . UU .)*.
- Granada, Y., Mejía-Jaramillo, AM, Strode, C., y Triana-Chavez, O. (2018). A Point Mutation V419L en el gen del canal de sodio de poblaciones naturales de *Aedes aegypti* está involucrado en la resistencia a la λ -cihalotrina en Colombia. *Insectos*, 9 (1), 23. <http://www.mdpi.com/2075-4450/9/1/23/html>
- Grisales, N., Poupardin, R., Gomez, S., Fonseca-Gonzalez, I., Ranson, H., & Lenhart, A. (2013). Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia compromises dengue vector control. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(9), e2438.
- Hamid, P. H., Prastowo, J., Ghiffari, A., Taubert, A., & Hermosilla, C. (2017). *Aedes aegypti* resistance development to commonly used insecticides in Jakarta, Indonesia. *PloS one*, 12(12), e0189680. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0189680>
- Hamid, P. H., Prastowo, J., Widyasari, A., Taubert, A., & Hermosilla, C. (2017). Knockdown resistance (kdr) of the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* population in Denpasar, Bali, Indonesia. *Parasites & vectors*, 10(1), 283.

- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., & Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(7), 653-665.
- Hirata, K., Komagata, O., Itokawa, K., Yamamoto, A., Tomita, T., & Kasai, S. (2014). A single crossing-over event in voltage-sensitive Na⁺ channel genes may cause critical failure of dengue mosquito control by insecticides. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(8), e3085. (<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003085>).
- Instituto Nacional de Salud. (2014). Vectores de Dengue - Chikungunya, Estado Actual.
- Instituto Nacional de Salud. (2018). Boletín Epidemiológico Semana 13 y 16.
- 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.
- Juliano, S. A., & Philip Lounibos, L. (2005). Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. *Ecology letters*, 8(5), 558-574.
- Kushwah, R. B. S., 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. (<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003332>).
- Li, C. X., Kaufman, P. E., Xue, R. D., Zhao, M. H., Wang, G., Yan, T., ... & Zhang, H. D. (2015). Relationship between insecticide resistance and kdr mutations in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southern China. *Parasites & vectors*, 8(1), 325. (<http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/325>).
- Linss, JGB, Brito, LP, García, GA, Araki, AS, Bruno, RV, Lima, JBP, ... & Martins, AJ (2014). Distribución y diseminación de las mutaciones Val1016Ile y Phe1534Cys Kdr en poblaciones naturales brasileñas de *Aedes aegypti*. *Parásitos y vectores*, 7(1), 25.
- Lounibos, L. P. (2002). Invasions by insect vectors of human disease. *Annual review of entomology*, 47(1), 233-266.
- McCall, P. J. (2007). Control of dengue vectors: tools and strategies. In *Report of the Scientific Working Group meeting on Dengue, Geneva, 1-5 October 2006* (pp. 110-119).
- Maestre-Serrano, R., Gomez-Camargo, D., Ponce-Garcia, G., & Flores, A. E. (2014). Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the

- Colombian Caribbean Region. *Pesticide biochemistry and physiology*, 116, 63-73.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048357514001679>
- Maestre, R., Rey, G., De Las Salas, J., Vergara, C., Santacoloma, L., & Goenaga, S. (2010). Susceptibility status of *Aedes aegypti* to insecticides in Atlántico (Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, 36(2), 242-248.
- Martínez, E. (1998). Dengue y dengue hemorrágico. (Ed.), Centro de Impresiones, Universidad Nacional de Quilmes.
- Martins, AJ, Brito, LP, Linss, JGB, Rivas, GBDS, Machado, R., Bruno, RV, ... y Peixoto, AA (2013). Evidencia de duplicación de genes en el gen del canal de sodio dependiente de voltaje de *Aedes aegypti*. *Evolución, medicina y salud pública*, 2013 (1), 148-160. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3868448&tool=pmcentrez&endertype=abstract>).
- Ministerio de Salud y protección social. (2014). Lineamientos de Vigilancia En Salud Pública, Entomológica Y de Laboratorio En Transmisión Autóctona Del Virus Chikungunya En Colombia Fase II.
- Montero, Guillermo. (2009). Biología de *Aedes Aegypti*. Retrieved (http://www.produccion-animal.com.ar/fauna/79-Aedes_aegypti.pdf).
- Montilla, A. D. J., & Moreno, M. A. (2015). Implicaciones sociales y ambientales del uso del Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT). Análisis del caso en tierras venezolanas. *Ambiente y Desarrollo*, 19(37), 101-114.
- Morales, A. J. R. (2015). No era suficiente con dengue y chikungunya: llegó también Zika. *Archivos de medicina*, 11(2), 3.
- Mullen, G. R., & Durden, L. A. (Eds.). (2009). *Medical and veterinary entomology*. Academic press.
- Murcia Ramírez, C. H. *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)* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá).
- OMS. (1992). Resistencia de los Vectores de Enfermedades a los Plaguicidas. 15° Informe del Comité de Expertos de la OMS en Biología de Vectores y Lucha Antivectorial (Serie de Informes Técnicos N° 818). Ginebra. Suiza.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2009). DENGUE GUIAS PARA EL DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL.

- Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. (2016). CONSIDERACIONES PROVISIONALES SOBRE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS ZIKA EN MUJERES GESTANTES
- Ortiz, O. G. P., & Argote, C. C. (2016). Identificación de los factores de riesgo determinantes en la transmisión del dengue en el municipio de Cúcuta en los años 2007 a 2011. *Revista Científica del Departamento de Medicina*, 2(1), 7-28.
- Padilla, J. C., Lizarazo, F. E., Murillo, O. L., Mendigaña, F. A., Pachón, E., & Vera, M. J. (2017). Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. *Biomédica*, 37, 27-40.
- PAHO, O. (1994). Declaración de la Conferencia Interamericana sobre Sociedad, Violencia y Salud.
- Pang, SC, Chiang, LP, Tan, CH, Vythilingam, I., Lam-Phua, SG, y Ng, LC (2015). La baja eficacia de la red tratada con deltametrina contra el *aedes aegypti* de Singapur está asociada con la resistencia de tipo kdr. *Trop Biomed*, 32, 140-150. https://umexpert.um.edu.my/file/publication/00012030_126920.pdf
- Pozzetto, B., Memmi, M., & Garraud, O. (2015). Is transfusion-transmitted dengue fever a potential public health threat?. *World journal of virology*, 4(2), 113. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4419115/>
- Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M. V., ... & Feyereisen, R. (2002). Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, 298(5591), 179-181.
- Raymond, M., & Rousset, F. (2004). GENEPOP (version 3.4): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. Laboratoire de Genetique et Environment, Montpellier, France.
- Rodríguez, S., & Karmy, Q. (2011). *Frecuencia de la mutación KDR ILE1, 016 en aedes aegypti (díptera: culicidae) en zonas de riesgo de dengue en México* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Santacoloma Varón, L., Chaves Córdoba, B., & Brochero, H. L. (2010). Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 27, 66-73.
- Service, M. (2014). *Medical Entomology for Students*. Liverpool School of Tropical Medicine: Cambridge University Press.

- Tabachnick, W. J. (1991). Evolutionary genetics and arthropod-borne disease: the yellow fever mosquito. *American Entomologist*, 37(1), 14-26.
- Undurraga, E. A., Betancourt-Cravioto, M., Ramos-Castañeda, J., Martínez-Vega, R., Méndez-Galván, J., Gubler, D. J., ... & Tapia-Conyer, R. (2015). Economic and disease burden of dengue in Mexico. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(3), e0003547.
- Uribarren-Berrueta, T. Dengue, fiebre Chikungunya y otros arbovirus. Recursos en virología. México (2015). Acceso: 15 de noviembre del 2015.
- Yanola, J., Somboon, P., Walton, C., Nachaiwieng, W., & Prapanthadara, L. A. (2010). A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(3), 127-131. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.10.005>
- Yanola, J., Somboon, P., Walton, C., Nachaiwieng, W., Somwang, P., y Prapanthadara, LA (2011). Ensayos de alto rendimiento para la detección de la mutación F1534C en el gen del canal de sodio dependiente de la permetrina en *Aedes aegypti* resistente a la permetrina y la distribución de esta mutación en toda Tailandia. *Tropical Medicine & International Health*, 16 (4), 501-509.
- Zhang, H. W., Liu, Y., Hu, T., Zhou, R. M., Chen, J. S., Qian, D., ... & Wang, Z. Q. (2015). Knockdown resistance of *Anopheles sinensis* in Henan province, China. *Malaria journal*, 14(1), 137. (<http://www.malariajournal.com/content/14/1/137>). <http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/es/>