

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Relación entre la expresión proteica total y las proteínas asociadas al mecanismo de acción en larvas de *Aedes aegypti* tratadas con los xenobióticos R-limoneno, S-carvona, citronelal y su mezcla.

Thomas Santiago Vanegas Estevez

Trabajo final de grado para optar al título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Director

Jonny Edward Duque Luna, Ph.D.

Doctor en Ciencias Biológicas

Codirector:

Stelia Carolina Méndez Sánchez Ph.D.

Doctora en Bioquímica

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Bucaramanga

2021

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Dedicatoria

A mi familia, en especial a mi abuelo Gonzalo Estévez, sin su guía y apoyo nada podría haber sido posible.

A mi esposa por su apoyo constante, por su paciencia y amor, ha sido la coincidencia más bella en mi vida.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Agradecimientos

Al finalizar esta etapa quisiera agradecer a mis abuelos, quienes a lo largo de toda mi vida me han apoyado de forma incondicional y han impulsado este gran sueño.

A mi madre, quien desde niño me inculco que la única forma de llegar lejos en la vida era a través del conocimiento y la realización profesional.

Al grupo de investigación CINTROP y al GIBIM por brindarme su apoyo y siempre responder a mis inquietudes.

A mis compañeros de maestría por brindarme su amistad, en especial a Mary Elizabeth Salazar a quien en diversas ocasiones moleste con preguntas e inquietudes, siempre estuvo dispuesta a brindar una mano con la mejor actitud y disposición.

A mis directores de proyecto, Jonny Edwuar Duque y Stelia Carolina Méndez, por su paciencia, darme la oportunidad de realizar no solo este trabajo, sino, aumentar mis conocimientos más allá de lo que enmarca mi perfil profesional.

A la Universidad Industrial de Santander en la cual desarrolle este proceso, a mis profesores por haber compartido conmigo sus conocimientos a través estos años

Agradecimientos a Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato **RC-FP44842-212-2018**. Programa Bio-Reto XXI-15:50.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Contenido

	Pág.
Introducción.....	13
1. Justificación.....	16
2. Pregunta de investigación.....	18
3. Objetivos.....	19
3.1 General	19
3.2 específicos:	19
4. Marco teórico.....	20
4.1 Dengue, Zika y chikungunya.....	20
4.2 Mecanismos de detoxificación	21
4.3 Mecanismos de acción.....	22
4.4 Insecticidas sintéticos	24
4.5 Aceites esenciales como insecticidas de origen botánico.....	25
4.6 Proteómica diferencial.....	28
5. Materiales Y Métodos	29
5.1 Material biológico	29
5.2 Bioensayos.....	30
5.2.1 Actividad larvicida	31
5.2.2 Tratamiento de larvas para realizar el aislamiento de las proteínas	34

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

5.2.3 Aislamiento de proteínas	35
5.2.4 Electroforesis en dos dimensiones.....	38
5.2.5 Análisis de las imágenes de los geles 2D.	39
5.2.6 Espectrometría de Masas e Identificación de proteínas	40
5.2.7 Análisis estadístico	40
6. Resultados.....	41
6.1 Selección de la mejor mezcla	41
6.1.1 Determinación de la CL50 y CL95	43
6.2 Extracción de proteínas para electroforesis	46
7. Discusión	61
8. Conclusiones.....	67
Referencia Bibliograficas.....	69
Apéndices.....	81

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Lista De Tablas

Tabla 1. Concentraciones múltiples para estudios de concentración letal 50 y 95.....	43
Tabla 2. Figura Electroforesis bidimensional de proteínas mitocondriales.....	51
Tabla 3. Proteínas que muestran expresión diferenciada en más de un tratamiento.....	52
Tabla 4. Proteínas identificadas mediante comparación con macroproyecto de transcriptoma de <i>Aedes aegypti</i> , clasificadas según su función y desempeño de su expresión.....	55

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama general de procedimiento en orden lógico.....	31
Figura 2. Modelo de montaje para la prueba de selección de la mejor mezcla a estudiar.	32
Figura 3. Modelo de montaje para la fase de tratamiento previo de las larvas.	34
Figura 4. Porcentaje de mortalidad de cada mezcla.....	42
Figura 5. Mortalidad de concentraciones múltiples de la mezcla 1:1:1(50% de la CL ₅₀ de cada CM).	44
Figura 6. Disminución en la proporción de cada componente al emplearlos en la mezcla.	45
Figura 7. Disminución en la proporción de cada componente al emplearlos en la mezcla.	45
Figura 8. Electroforesis bidimensional de la extracción proteica total de larvas de <i>Aedes aegypti</i> en 4 estadio.	48
Figura 9. Control proteínas mitocondriales en pH 3-10.	49
Figura 10.	53
Figura 11. Representación general de las proteínas con expresión diferenciada y su ubicación en la mitocondria.	60

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Lista de Apéndices

Apéndices 1. Composición de mezclas diagnosticas	81
Apéndices 2. Comparación entre dos métodos de homogenización vs congelamiento en gel al 12% de acrilamida.....	81
Apéndice 3. Variación del buffer de lisis.....	82
Apéndices 4. Comparación 100 larvas 2x vs 500 larvas 10x en gel al 15% de acrilamida	83
Apéndice 5. Tabla de resumen de proteínas de interés dependiendo del tipo de análisis (en base a control o a mezcla).....	84
Apéndice 6. Tabla de expresión diferenciada de proteínas relevantes solo en R-Limoneno.	86
Apéndice 7. Tabla de expresión diferenciada de proteínas relevantes solo en S-Carvona.	87
Apéndice 8. Tabla de expresión diferenciada de proteínas relevantes solo en Citronelal.	88
Anexo 9. Tabla de expresión diferenciada de proteínas relevantes solo en la Mezcla de los tres CM.	89

Resumen

Título: Relación entre la expresión proteica total y las proteínas asociadas al mecanismo de acción en larvas de *Aedes aegypti* tratadas con los xenobióticos R-limoneno, S-carvona, citronelal y su mezcla.*

Autor: Thomas Santiago Vanegas Estévez**

Palabras Clave: Proteómica, Aceites esenciales, *mecanismo de acción*.

Debido al amplio impacto ambiental causado por los insecticidas sintéticos, la selección de ingredientes naturales para el diseño de insecticidas a partir de aceites esenciales (AE) útiles en el control de *Aedes aegypti* son una necesidad a causa de la escasez de productos efectivos y amigables con el medio ambiente. El objetivo de este estudio fue analizar la expresión diferencial de proteínas mitocondriales de larvas de *Ae. aegypti* (entre L3 y L4) tratadas con metabolitos preseleccionados con acción insecticida comprobada como R-limoneno, S-carvona, citronelal y la mejor mezcla de los tres compuestos. Paralelamente se identificó el posible mecanismo de acción o detoxificación de estas moléculas en el insecto. Los compuestos mayoritarios fueron seleccionados por inducir concentraciones letales (CL) de $CL_{50} \leq 50$ ppm y también con la hipótesis que potencian el efecto insecticida a partir de su mezcla. Se expusieron larvas de *Ae. aegypti* a cada metabolito y con la mezcla seleccionada a concentraciones subletales (CL_{20}). Posteriormente, se realizó electroforesis bidimensional y se analizaron las variaciones en la expresión de cada proteína (spot) empleado el programa PDQuest. Se seleccionaron las proteínas con una expresión diferenciada de mínimo 1,5 veces para el caso de sobre expresión, y máximo de 0,5 veces para regulación negativa comparando cada tratamiento con el control negativo. Se detectaron un total de 38 proteínas de interés, de las cuales la mezcla (1:1:1) presentó la mayor variación, así como efectos sinérgicos y potenciadores de la acción insecticida de cada compuesto. El estudio encontró una reducción en la expresión de citocromo p450 como posible mecanismo de acción, y una sobreexpresión de peroxiredoxina-6 relacionada con la detoxificación, además de otras proteínas previamente no descritas para este tipo de estudio.

* Tesis de maestría.

** Facultad de salud. Escuela de Medicina. Director Jonny Edward Duque Luna. Coodirectora Stelia Carolina Méndez Sánchez.

Abstract

Title: Relationship between total proteins and protein expression associated with the mechanism of action from *Aedes aegypti* larvae treated with the xenobiotics R-limonene, S-carvone, citronellal, and their mixture.*

Author: Thomas Santiago Vanegas Estévez**

Keywords: Proteomics, Essential oils, mechanism of action.

Due to the broad environmental impact caused by pesticides, the selection of natural ingredients for the design of insecticides from essential oils (EA) useful in the control of *Aedes aegypti* is a necessity due to the lack of adequate and friendly products with the environment. The objective of this study was to analyze the differential expression of mitochondrial proteins from *Ae. aegypti* larvae (between L3 and L4) treated with preselected metabolites with proven insecticidal action such as R-limonene, S-carvone, citronellal, and the best mixture of the three compounds. In parallel, the possible mechanism of action or detoxification of these molecules in the insect was identified. The major compounds were selected for inducing lethal concentration (LC) of $LC_{50} \leq 50$ ppm and also with the hypothesis that they enhance the insecticidal effect in their mixture. *Ae. aegypti* larvae were exposed to each metabolite and the selected mixture at sublethal concentrations (LC_{20}). Subsequently, two-dimensional electrophoresis was performed, and the variations in the expression of each protein (spot) were analyzed using the PDQuest program. Proteins with a differentiated expression of at least 1.5 twice for the case of overexpression, and a maximum of 0.5 twice by negative regulation were selected, comparing each treatment with the negative control. A total of 38 proteins of interest were detected, of which the mixture (1: 1: 1) presented the more significant variation, as well as synergistic effects and enhancers of the insecticidal action of each compound. The study found a reduction in the expression of cytochrome p450 as a possible mechanism of action, and an overexpression of peroxyredoxin-6 related to detoxification, in addition to other proteins not previously described for this type of study.

* Master's Thesis.

** Faculty of health. Medicine School. Director Jonny Edward Duque Luna. Co-director Stelia Carolina Méndez Sánchez.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Introducción

Para mantener el control de los vectores que transmiten enfermedades al hombre, se emplean de manera amplia insecticidas sintéticos que han dado lugar a varios problemas que afectan el hombre y el medio ambiente (Naqqash et al., 2016). En algunos casos estos compuestos se han detectado en los alimentos, en concentraciones mayores a las recomendadas (> 10 ppm) afectando la salud humana, en exposición prolongada puede causar cáncer a la dosis máxima (M. Chen et al., 2015; Lindgren et al., 1968). Además de esto, la aplicación masiva de insecticidas conlleva al desarrollo de poblaciones de insectos resistentes a sus compuestos activos. En estos casos la resistencia contra un mismo grupo químico puede generar un fenómeno conocido como resistencia cruzada, en el que también los insectos adquieren resistencia contra otros insecticidas con base en el mismo agente activo, por ejemplo, al ser resistentes a un piretroide lo será por otro insecticida con este principio activo (Nauen, 2007). En Colombia se ha demostrado resistencia activa contra temefos, un organofosforado ampliamente usado como larvicida en *Ae. aegypti*, de los insectos colectados en doce diferentes departamentos se reportó aproximadamente que el 70% de estas poblaciones de *Ae. aegypti* fueron resistentes para este insecticida (Conde et al., 2015). De acuerdo con esto, los AEs resultan una alternativa de uso y así contribuir con la prevención los problemas que generan los insecticidas sintéticos como la resistencia y contaminación ambiental. De esta forma, los AEs resultarían de ser comprobado una opción de remplazo o de aplicación integrada con los insecticidas sintéticos (Koul et al., 2008; Muturi et al., 2018; Regnault-Roger et al., 2012). Después de realizar la correspondiente revisión bibliográfica sobre los mecanismos de acción de los AEs y sus componentes mayoritarios, empleando los buscadores Pubmed, Sciencedirect,

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Elsevier y SciELO, a través de las palabras claves: *Aedes aegypti*, essential oils, *Mechanism of action* se encontraron más de 900 artículos en el año 2018. Sin embargo, no se observó ninguna información científica que se relacione con la expresión de proteínas relacionada con la toxicidad de insecticidas en zancudos vectores de diferentes enfermedades (Andrade-Ochoa et al., 2017).

A la fecha poco se conoce sobre cómo funciona el mecanismo de acción de los AEs con acción insecticida, como tampoco, la forma que interactúan estos AE entre sí. La explicación más lógica de esta falta de información es que no se discrimina la acción insecticida entre sus componentes, asumiendo que el efecto biocida se debe “solo” a su componente mayoritario. En este sentido, es común que no exista información sobre la interacción con los demás constituyentes, siendo necesario profundizar en estudios sobre el mecanismo de acción, por lo que es razonable que un análisis de alteración en la expresión proteica contribuya a comprender los efectos de la asociación de mezclas con uno o más compuestos mayoritarios en la actividad insecticida. Razón por la cuál es necesario estudiar cada metabolito de forma independiente con el objetivo de determinar su respuesta el insecto y así mediante la determinación de las proteínas alteradas, se podría inferir sobre los posibles mecanismos de acción de cada compuesto de forma independiente. Igualmente con este estudio se puede conocer sobre las proteínas de la desintoxicación que se accionan en el insecto (Badii & Garza Almanza, 2007; Sarkar et al., 2018; Short et al., 2018).

Por las razones expuestas anteriormente, el presente trabajo de investigación pretendió analizar las alteraciones en la expresión proteica de larvas (total y mitocondrial) de *Aedes aegypti* cuando fueron usados los compuestos R-limoneno, S-Carvona, Citronelal y su mezcla como larvicidas.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

La selección de estos compuestos fue debido a su efectividad demostrada en trabajos realizados anteriormente por el grupo de investigación, principalmente la disertación titulada ‘‘Diseño de un insecticida a partir de metabolitos secundarios de plantas de la familia piperaceae que afecten la bioenergética mitocondrial del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)’’(Duque Lizarazo, 2017). En este trabajo se realizó un análisis *in silico* empleando los programas OSIRIS DataWarrior Software libre y Molinspiration Cheminformatics Software, para analizar 110 metabolitos secundarios encontrados en 10 plantas del género *Piper* con actividad insecticida contra *Ae. aegypti* reportados en la literatura. Como resultado de este trabajo se detectó que 67 de estos compuestos cumplían con los parámetros de Lipinski para ser considerados como candidatos a fármacos, los cuales se seleccionaron para realizar análisis de toxicidad y así reducir su número a 45 metabolitos. Posteriormente, se seleccionaron 12 compuestos cuando se estimaron las CL_{50} relativas, la cual se calculó teniendo en cuenta la CL_{50} del aceite esencial en relación al porcentaje de cada compuesto en el mismo (Borrero-Landazabal et al., 2020). Con la información de los anteriores estudios, análisis *in silico*, las pruebas toxicológicas y la disposición comercial de los patrones de referencia (Merck[®] y Sigma aldrich[®]) se seleccionaron 3 metabolitos (R-Limoneno, S-Carvona y Citronelal) y así conocer sobre su expresión diferenciada de proteínas.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

1. Justificación

Los zancudos son insectos que actúan como vectores de diferentes enfermedades al hombre, por ejemplo dengue, Zika, y chikungunya que deben ser controlados para evitar que se conviertan en un problema de salud pública (Muñoz V. et al., 2014). Se ha evidenciado en las zonas tropicales y subtropicales, la falta de un control poblacional adecuado de los vectores se refleja finalmente en la endemicidad de enfermedades como el dengue. Una consecuencia de no existir un control adecuado de insectos vectores es reflejada en el subdesarrollo social y económico. Básicamente, porque países como Colombia destinan parte del dinero del estado en programas de tratamiento y asistencia de estas enfermedades en lugar de invertir en prevenirlas (Muñoz V. et al., 2014). Esto hace menester de la aplicación de programas que mitiguen el impacto de esta problemática, por ejemplo, que analicen a profundidad sobre los diferentes métodos de control de zancudos con respecto a la forma en que deben ser usados de acuerdo con su mecanismo de acción (Muñoz V. et al., 2014).

El uso intensivo de insecticidas sintéticos en el control de los mosquitos ha generado problemas como el impacto negativo en el medio ambiente por la contaminación, así como el desarrollo de poblaciones resistentes y también los efectos indeseables de toxicidad en otros organismos (De la Cruz et al., 2014). Debido a la alta incidencia de poblaciones de insectos resistentes a los insecticidas tradicionalmente utilizados, en la actualidad se buscan nuevos métodos para el control de zancudos (Sarkar et al., 2018). La opción de productos naturales de origen vegetal con actividad insecticida, resultan una alternativa válida de uso combinado junto con los insecticidas sintéticos

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

convencionales para el control de una amplia variedad de vectores (Leyva et al., 2008; Maggi, 2004; Pavela & Benelli, 2016). Por esta razón se han elaborado diferentes estudios acerca de la acción insecticida de los aceites esenciales en mosquitos, como lo expresa Pavela (Pavela, 2015), con resultados prometedores, atribuyendo su actividad insecticida probablemente al compuesto mayoritario (Leyva et al., 2017).

De acuerdo con las revisiones bibliográficas se evidencia que la utilización de compuestos mayoritarios provenientes de diferentes AEs en el control de *Ae. aegypti*, pueden tener alta actividad larvicida presentando alguno de ellos valores de CL_{50} menores a 10 ppm. La potencialidad de estos compuestos varía según la especie vegetal, su origen, su composición y el mecanismo de acción en el insecto (Dias & Moraes, 2014; Pavela, 2015). En cuanto a la composición química de los AEs con mejor efecto insecticida, se encuentran principalmente monoterpenos, y sesquiterpenos en menor proporción (Pavela & Benelli, 2016). En este contexto y evidenciando la carencia de estudios que evalúen los compuestos mayoritarios de forma individual, en este trabajo se busca identificar si se presenta la expresión de proteínas diferenciales útiles para el diseño de insecticidas con larvas de *Ae. aegypti* tratadas con las moléculas R-limoneno, S-carvona, citronelal y su mezcla. Se espera que al conocer las proteínas expresadas con la aplicación de estas moléculas se pueda obtener información sobre el mecanismo de acción de los compuestos estudiados y así seleccionar compuestos con mecanismos complementarios que puedan tener efectos sinérgicos mejorando la actividad de cada compuesto cuando se aplican de forma conjunta (Kwiatkowski et al., 2018), en este caso se pretende que una mezcla de compuestos mejore el efecto insecticida, lo que a su vez reduce considerablemente la cantidad de cada compuesto sin disminuir su letalidad.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Al día de hoy, en los estudios relacionados con la determinación del mecanismo de acción de los AEs, el análisis se ha realizado determinando la acción del compuesto mayoritario sobre un objetivo específico, no se han desarrollado estudios de amplio rango para ver la interacción sobre otras estructuras proteicas diferentes a las de estudio más frecuentes como es el caso de acetilcolinesterasa (Borrero-Landazabal et al., 2020), por lo tanto, este proyecto contribuye con el esclarecimiento de que proteínas se expresan en un tratamiento específico, así como su relación con la susceptibilidad a los compuestos mayoritarios en larvas de *Ae. aegypti*. La importancia de estudiar la actividad proteica en los componentes puros ofrece resultados específicos sobre la diana farmacológica del compuesto, e incluso, permiten generar modelos predictivos basados en la relación entre su estructura y la actividad de cada molécula. Finalmente, con las posibles proteínas que se expresan bajo los diferentes tratamientos se contribuye con dilucidar los posibles mecanismos de acción de cada una de estas moléculas, con la proyección de generar mezclas con múltiples efectos insecticidas (Andrade-Ochoa et al., 2017; Liu et al., 2005).

2. Pregunta De Investigación

¿Cuáles son las proteínas relacionadas con los mecanismos de acción o de detoxificación de larvas de *Aedes aegypti* tratadas con los metabolitos R-limoneno, S-carvona y citronelal o su mezcla?

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

3. Objetivos

3.1 General

Analizar la expresión diferencial de proteínas totales de larvas entre tercer y cuarto estadio de *Aedes aegypti* tratadas con los metabolitos R-limoneno, S-carvona, citronelal y su mezcla con el fin de identificar posibles mecanismos de acción o mecanismos de detoxificación.

3.2 Específicos:

- Evaluar la actividad larvicida en larvas de *Aedes aegypti* entre tercer y cuarto estadio de mezclas de los tres metabolitos (R-limoneno, S-carvona, citronelal), y determinando las CL_{50} y CL_{95} de la mejor mezcla.
- Identificación de las variaciones en la expresión proteica en larvas de *Aedes aegypti* entre tercer y cuarto estadio tratadas con las moléculas R-limoneno, S-carvona y citronelal y su mejor mezcla.
- Relacionar las proteínas con expresión diferenciada en larvas tratadas con los R-limoneno, S-carvona y citronelal con los posibles mecanismos de acción y de detoxificación en mosquitos.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

4. Marco Teórico

4.1 Dengue, Zika y chikungunya

A nivel mundial se llevan a cabo múltiples esfuerzos por mantener el control poblacional de *Ae. aegypti*, principal vector de enfermedades virales como el dengue y Zika pertenecientes a la familia *flaviviridae*, mientras que al virus del chikungunya se le incluye en la familia *Togaviridae* (Vicenzi et al., 2018). Estas dolencias se han propagado a través del mundo en lugares con climas tropicales y subtropicales. El dengue (DENV) fue descrito por primera vez tras las epidemias de 1779 y 1780 en Asia, África y América del Norte, para el año 1952 el virus Chikungunya (CHIKV) fue aislado a partir de un brote ocurrido al sur de Tanzania, casi simultáneamente, en 1947 fue aislado el virus Zika (ZIKV) a partir de monos Rhesus (*Macaca mulatta*) en Uganda, pero no fue hasta 1954 que se produjeron los primeros brotes en humanos (Powell et al., 2018).

Según la Organización Mundial de la Salud, para el año 2016 se reportaron 2.338.848 casos de dengue para el continente americano, siendo los más afectados los países ubicados en el cono sur (Argentina, Chile, Paraguay, Uruguay y los estados más al sur de Brasil: Paraná, Río Grande del Sur, Santa Catarina y São Paulo); de estos, 103.822 casos reportados correspondieron a Colombia, en el cual fueron confirmados 45.809 para los 4 serotipos del virus (World Health Organization, 2017c). Para el año 2017 se reportaron 61.613 casos de chikungunya en las américas, de los cuales,

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

1.053 corresponden a Colombia, mientras que para Zika se registraron en promedio 293 casos semanales en América del Sur (World Health Organization, 2017a, 2017b).

Para el año 2019 se reportaron 3.139.335 casos de dengue, siendo este el mayor registrado en la historia de dengue en las Américas, superando en 30% al número de casos reportados en el año epidémico 2015 mostrando un crecimiento importante en la transmisión de estas enfermedades (World Health Organization, 2020).

Disminuir los índices de infestación de *Ae. aegypti* representa un importante paso para prevenir las enfermedades que transmite. Con este propósito se han empleado principalmente insecticidas sintéticos que han generado efectos negativos a nivel ambiental, efectos tóxicos en especies no objetivo y la resistencia a estos mismos (organoclorados, organofosforados, carbamatos piretroides, neonicotinoides y ryanoides). Algunos de estos insecticidas, como es el caso del temefos (un organofosforado) ha sido empleado de manera generalizada en Colombia, lo que ha generado altos niveles de resistencia a este insecticida, para evitar esto se buscan alternativas menos nocivas (Badii & Garza Almanza, 2007; Thomson & Vijan, 2016).

4.2 Mecanismos de detoxificación

Las diversas formas de detoxificación de los insectos representan un mecanismo de defensa frente a las sustancias tóxicas que los afectan. Estos procesos intrínsecos del insecto implican un sistema rápido de detoxificación o secuestro de las moléculas de los insecticidas con el objetivo de degradarlas o eliminarlas del organismo. Las principales enzimas implicadas en los sistemas de

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

detoxificación incluyen: citocromo P450 (Inicia la oxidación para la biotransformación de pesticidas y otros xenobióticos orgánicos), glutatión S-transferasa (aumenta la solubilidad de los insecticidas lo que facilita su excreción), y algunas esterasas (degradación de organofosforados y carbamatos a sustancias más hidrosolubles facilitando su excreción) (Badii & Garza Almanza, 2007).

En el caso de los AEs, los insectos utilizan toda su gama de mecanismos de defensa para la degradación enzimática de sus componentes. Las enzimas que usan para desintoxicar y eliminar estos compuestos son las oxidasas, reductasas, esterasas, hidrolasas y transferasas (Waliwitiya et al., 2012).

De manera más amplia los insectos tienen las oxidasas con un efecto general; otras esterasas que le confieren resistencia a organofosforados, organoclorados y piretroides; Carboxiesterasas que le ayudan contra malatión y fentoato; Glutatión-S-transferasas contra organofosforados; DDTasa (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano cloruro-liasa, 4-tiocinobutilo propionato, entre otros) que actúan contra clorados del grupo OC-DDT; y las hidrolasas que actúan contra fosforados, entre otros (Badii & Garza Almanza, 2007; Metcalf, 1955).

4.3 Mecanismos de acción

El mecanismo de acción de una sustancia con objetivo farmacológico depende de muchas variables, de manera amplia se resume como la forma en la que una sustancia química cumple su función determinada, es la forma como interactúa con los componentes macromoleculares del

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

organismo, indicando el receptor o sitio de acción (“blanco”) de un compuesto y que efecto causa, en nuestro caso, es la forma en la que un compuesto ocasiona la muerte del insecto (Hilal-Dandan & Brunton, 2014; Jankowska et al., 2018).

Tras la realización de la revisión bibliográfica se evidenció poca información sobre el mecanismo de acción de los AEs cuando son empleados como insecticidas sobre *Ae. aegypti*. En otros modelos animales se han estudiado algunos mecanismos de acción de los AEs, y en algunos casos se evidencio que los AEs pueden llegar a afectar los métodos de detoxificación frente al mismo, los mecanismos de detoxificación involucran todo proceso que actúa en defensa del efecto causado por el tóxico, tratando de mantener la homeóstasis del organismo (Liao et al., 2016). En el caso de *Sitophilus zeamais* (Coleóptera: Curculionidae) o gorgojo del cereal tratado con el AE de *Melaleuca alternifolia* se ha encontrado que su mecanismo de acción presenta un efecto sobre la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), mientras que al mismo tiempo presenta inhibición significativa de dos enzimas detoxificantes, la glutatión S-transferasa (GST) y la carboxilesterasa (CarE), de esta forma se puede observar como el AE de cierta forma neutraliza el mecanismo de detoxificación para ejercer acción sobre la acetilcolinesterasa, lo que finaliza en la muerte del insecto. Hay que tener en cuenta que en estos casos se estudió el AE en su forma completa siendo su componente mayoritario el Terpinen-4-ol (40.09%), sin embargo esto no aclara si el efecto sobre estas moléculas corresponde a este compuesto o a algunos de los otros componentes presentes en menor proporción (Liao et al., 2016).

De manera general los compuestos para los que se han realizado estudios de determinación de actividad enzimática, ya sea su efecto causado por insecticidas sintéticos o por AEs, se han determinado por el análisis de la actividad enzimática en relación con su porcentaje de inhibición,

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

aunque en estos casos el estudio se centra solo en las enzimas de interés (acetilcolinesterasa, NADH oxidasa, entre otras) creando un marco limitado con respecto a todas las demás alteraciones que pueden estar causando estos insecticidas (Borrero-Landazabal et al., 2020; Carreño et al., 2014; Castillo-morales et al., 2019; Ekert et al., 2014).

4.4 Insecticidas sintéticos

A nivel mundial hay una gran variedad de insecticidas sintéticos, principalmente de compuestos organofosforados y carbamatos utilizados para control de vectores, siendo su principal objetivo su estado larvario o el adulto. Además de esto, también se utilizan otros grupos de plaguicidas como piretroides, bipiridilos y fenoxiacéticos así como los organoclorados (prohibidos en algunos países y en Colombia)(Orjuela et al., 2018). El temefos es un organofosforado utilizado ampliamente en Colombia por su actividad larvicida debido a su efecto residual, sin embargo, por su uso indiscriminado ha generado altos niveles de resistencia en poblaciones silvestres de *Ae. aegypti* (Conde et al., 2015). Para el caso del DDT un organoclorado prohibido en Colombia y para el cual se suspendió su uso oficial a finales de la década de 1960, sin embargo, aún se detectan niveles de resistencia con mortalidades en mosquitos inferiores al 13,5% a dosis recomendadas (150 ppm dosis efectiva en 30 min) en *Ae. aegypti* (Maestre et al., 2010; Santacoloma Varón et al., 2010).

El malatión es un organofosforado empleado ampliamente en el control de plagas, principalmente en agricultura, debido a varios factores entre los que resaltan su baja toxicidad contra los mamíferos y su bajo precio. Presenta actividad por contacto, ingestión e inhalación.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Interfiere en sistema nervioso por inhibición de la colinesterasa mediante la acción de su metabolito oxidado (malaoxón) que inhibe la enzima acetilcolinesterasa en los diversos sitios donde está presente en el sistema nervioso central, las divisiones simpática y parasimpática del sistema nervioso autónomo y la unión neuromuscular (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999).

Al revisar la literatura se encuentra que se han desarrollado estudios de cuantificación de proteínas en respuesta a exposición a insecticidas sintéticos (el temefos interfiere la transmisión de los impulsos nerviosos por inhibición de la colinesterasa), o la medición del efecto de estos sobre proteínas por determinación específica de la actividad enzimática de las proteínas a estudiar (Citocromo p450, glutatión S-transferasa entre otras), hasta la fecha los estudios no específicos de proteómica que se han desarrollado analizando el efecto producido por la exposición a estos insecticidas se han llevado a cabo en fracciones específicas del insecto, sin considerarla realización del análisis proteómico total del mismo (Games et al., 2016; Ishak et al., 2016, 2017; Norris et al., 2018).

4.5 Aceites esenciales como insecticidas de origen botánico

Los AEs extraídos de plantas nativas y exóticas han sido estudiados de manera amplia mostrando grandes beneficios (Pavela, 2015). Entre los cuales se destaca el efecto plaguicida contra una amplia gama de insectos patógenos, en algunos pocos casos un menor efecto tóxico para mamíferos como por ejemplo para roedores se reportan CL_{50} por encima de 8.000 mg/kg, por

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

otro lado se considera que hay un menor impacto ambiental con el uso de estos productos (Isman, 2000).

Los AEs son mezclas de sustancias producidas por las plantas de manera natural a través de rutas metabólicas secundarias, estas sustancias juegan un papel importante en la vida de la planta ya que presentan actividad muy variada yendo desde el sistema natural de defensa, pasando por reguladores internos de respuesta a la temperatura, hasta llegar a atrayentes para polinizadores involucrados en la reproducción de las plantas (Regnault-Roger et al., 2012). Las sustancias por las que se componen los AEs se clasifican en dos grupos químicos pertenecientes a los terpenos: en su mayoría monoterpenos y en menores cantidades sesquiterpenos (Pavela & Benelli, 2016).

De manera generalizada la toxicidad de los AEs ha sido estudiada como un todo, sin evaluar la toxicidad de sus componentes individuales, atribuyendo generalmente su actividad insecticida al compuesto mayoritario (Pavela, 2015), en algunos casos estos componentes entran en la clasificación de xenobióticos, (xeno del griego “extraño”, y bio “vida”) son compuestos de baja o nula expresión en la naturaleza o dentro de un organismo determinado (Murray et al., 2013). En el caso particular de *Lippia alba* quimiotipo LA3, mejor conocida como pronto alivio, presenta dos de los tres compuestos que se tratan en este estudio (Limoneno: 5,25% y Carvona: 71,54%), según su proporción solo carvona es el compuesto mayoritario (Porfírio et al., 2017), reportando una actividad larvicida contra *Ae. aegypti* para este AE con una CL₅₀ de 44,26 ppm. Por otro lado, el Limoneno se encuentra en una proporción de 71,3% en el AE de *Citrus sinensis*, presentando una CL₅₀ sobre larvas de *Aedes aegypti* de 20,61 ppm, y el compuesto Citronelal es compuesto mayoritario en el AE de *Eucalyptus citriodora*, mostrando este AE una CL₅₀ de 71,22 ppm. Cabe

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

resaltar que estos estudios fueron realizados con AEs y no con el compuesto mayoritario usado de manera individual como insecticida (Vera et al., 2014).

En estudios recientes se muestran análisis individuales de dichos compuestos que han demostrado que la relación entre la CL_{50} del AE y la del compuesto mayoritario no son necesariamente proporcionales, y que al compuesto mayoritario no se le puede atribuir toda la acción insecticida (Borrero-Landazabal et al., 2020; Id et al., 2018). En trabajos previos realizados por el grupo de investigación se estudiaron diferentes compuestos de AE encontrados en 10 especies de plantas del género *Piper* (Duque Lizarazo, 2017). De este trabajo se seleccionaron 110 compuestos que fueron estudiados in silico a través de las herramientas informáticas Molinspiration y Osiris DataWarrior teniendo en cuenta los parámetros de lipinski que permiten evaluar cualitativamente el nivel de actividad de un compuesto químico al cumplir alguna determinada función farmacológica o de actividad biológica (Peso molecular <500 g/mol, Aceptores de enlaces por puentes de hidrogeno ≤ 10 , donadores de enlaces por puentes de hidrogeno ≥ 5 , coeficiente de reparto octanol-agua $[\log P] < 5$) (Lipinski et al., 2001), además de esto se revisó su toxicidad y la CL_{50} relativa reduciendo este número a 12 compuestos, posterior a este análisis se decidió emplear tres compuestos mayoritarios que presentaron un mayor desempeño con respecto a su concentración efectiva (Duque Lizarazo, 2017).

De igual forma que con los insecticidas sintéticos, en el caso de los AE se ha analizado el efecto insecticida causado sobre determinadas proteínas de manera específica, esto quiere decir que se busca el efecto o la alteración que ocasionan, en proteínas determinadas de antemano, por lo que se descuida el efecto potencial en otras áreas del metabolismo, demostrando un vacío de conocimiento que podría llevar al mejoramiento del potencial insecticida (Seo et al., 2015). Por

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

esta razón en el presente estudio se demostró el efecto de estos tres metabolitos, tanto de forma individual como conjunta, sobre proteínas con alteración debida a la exposición a estos compuestos.

4.6 Proteómica diferencial

Las nuevas técnicas de análisis e identificación de proteínas han permitido realizar pruebas en muestras con un amplio panel proteico, la identificación mediante proteómica diferencial ha demostrado ser una excelente opción mediante la comparación entre estados basales y alterados de una muestras complejas, permitiendo identificar puntualmente las proteínas alteradas y facilitando su separación para su posterior identificación (Ujcikova et al., 2020). De esta forma su aplicación ha demostrado una gran utilidad al intentar determinar los efectos causados por el contacto con diversas moléculas, en especial aquellas con efecto insecticida. Mediante la realización de un análisis comparativo, es posible establecer que proteínas presentan alteraciones expresión proteica, determinar el tipo de alteración (up-regulation o down-regulation) y seleccionar cada proteína para su posterior identificación (Mano et al., 2019).

Al realizar una búsqueda extensa se detecta que hasta la fecha no se ha realizado una extracción proteica partiendo de la totalidad del cuerpo de *Ae. aegypti* y tampoco en ninguno de sus estadios no embrionarios, se han realizado extracciones proteicas de diversas partes obtenidas por disección de los individuos, lo que plantea un desafío considerable debido a la complejidad y la diversidad de las proteínas esperadas (Marinotti et al., 2014; Morais F et al., 2016). Otra posibilidad es

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

analizar las variaciones en la expresión de proteínas pertenecientes a las mitocondrias extraídas de la totalidad del cuerpo de las larvas, ya que este procedimiento se encuentra estandarizado en el laboratorio, con extracciones satisfactorias, no solo en cantidad de proteína, si no también, en calidad e integridad de las mismas mitocondrias, evitando así degradaciones indeseadas por parte de proteasas pertenecientes a la misma larva, a dada la importancia de las mitocondrias a nivel celular, la convierte en un excelente objetivo para este estudio (Borrero et al., 2017).

5. Materiales Y Métodos

5.1 Material biológico

Para realizar los bioensayos se emplearon larvas de zancudos obtenidas de la colonia *Aedes aegypti* Rockefeller que se mantienen en jaulas de cría (40x40x40 cm) con un fotoperiodo de luz de 12 horas y 12 de oscuridad, temperatura de $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del $70\pm 5\%$. Se uso una solución azucarada de miel al 10% para su alimentación (CENAPRECE, n.d.), las larvas necesarias para los procedimientos se obtuvieron de la colonia establecida en el laboratorio alimentando las hembras de los zancudos con rata albina (*Rattus norvegicus*) de raza winstar WI IOPS AF/Han suministrada por el bioterio de la Universidad Industrial de Santander, todo el proceso de experimentación siguió las disposiciones de la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y cuenta con el aval del comité de

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

ética en investigación científica (CEINCI) consignada en el acta N°04 del 15 de marzo del 2019 (Colindres & Cerna, 2012; Vera et al., 2014). Para la recolección de los huevos, se emplearon recipientes con agua recubiertos con papel filtro donde las hembras colocan sus huevos, que posteriormente se colocaron en bandejas de crecimiento con agua mineral libre de cloro y se adiciono alimento para peces marca TetraMin Tropical Flakes (Colindres & Cerna, 2012).

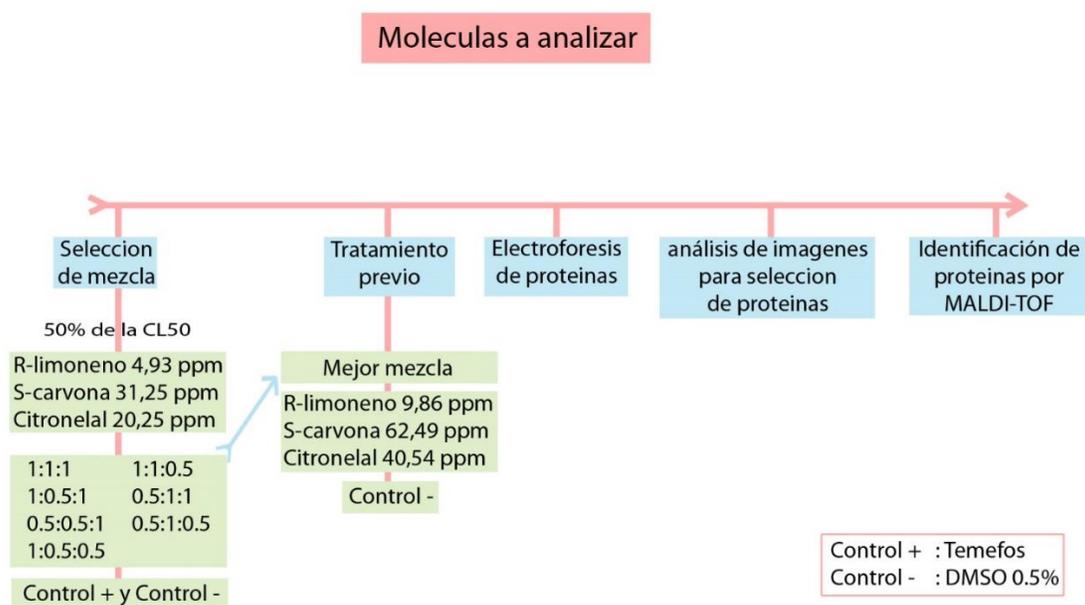
5.2 Bioensayos

De manera general se puede apreciar el orden lógico en el cual se llevaron a cabo las diferentes pruebas necesarias para el desarrollo de los objetivos de este proyecto (Figura 1). Se puede apreciar cómo fue identificada la mejor de 7 posibles mezclas realizadas en base al 50% por ciento de las respectivas CL_{50} , posteriormente se identificó la CL_{50} y CL_{95} de la mezcla seleccionada y junto con los 3 xenobióticos estudiados se llevó acabo el tratamiento previo a las larvas que fueron empleadas para la electroforesis, posteriormente se analizaron las imágenes de electroforesis para determinar que proteínas serian identificadas por medio de MALDI-TOF.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Figura 1.

Diagrama general de procedimiento en orden lógico



Nota. Se inicia seleccionando la mejor formulación para la mezcla de los tres CM, para así poder realizar el tratamiento previo a la extracción de proteínas.

5.2.1 Actividad larvicida

Se seleccionaron cinco larvas entre tercer y cuarto estadio larval para cada una de las mezclas analizadas. Estas fueron depositadas en vasos con un volumen final de 50 mL de agua libre de cloro, además de esto contenían cada una de las concentraciones ya estudiadas, cada solución estudiada fue preparada el mismo día de la prueba y el proceso se repitió individualmente para

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

cada réplica (tres replicas por cada tratamiento). La mezcla de los tres xenobióticos estudiados estuvo compuesta por una fracción de las CL_{50} reportadas para cada uno de estos compuestos. Se estudió una composición de esta mezcla al 50% de sus CL_{50} reportadas (R-limoneno; 4.93 ppm, S-carvona; 31.25 ppm, citronelal; 20.25 ppm) en siete variaciones de formulación diferentes (1:1:1, 1:1:0.5, 1:0.5:1, 0.5:1:1, 0.5:0.5:1, 0.5:1:0.5 y 1:0.5:0.5) como se aprecia en la Figura 2, se realizaron lecturas cada 2, 6, 12, 24 y 48 horas con el fin de elegir la mezcla que presento mejor rendimiento (menores concentraciones con mayor letalidad) para continuar a la fase de análisis proteómico. Cada concentración evaluada tuvo un tratamiento con temefos como control positivo y se empleó DMSO al 0.5% como control negativo, esto fue realizado por triplicado en días diferentes. Una vez seleccionada la mezcla con mejor rendimiento se procedió a determinar la CL_{50} y CL_{95} mediante el análisis de mortalidad en siete variaciones de su concentración, esto se realizó por cuadruplicado en tres días diferentes (Duque Lizarazo, 2017).

Figura 2.

Modelo de montaje para la prueba de selección de la mejor mezcla a estudiar.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES



Nota. Tratamientos: 1:1:1 (T1); 1:1:0,5 (T2); 1:0,5:1 (T3); 0,5:1:1(T4); 0,5:0,5:1 (T5); 0,5:1:0,5 (T6); 1:0,5:0,5 (T7). El número "1" representa el 50% de la CL₅₀, y el 0,5 representa la mitad de "1".

Al seleccionar las concentraciones múltiples para estudio de CL₅₀ y CL₉₅ de la mezcla seleccionada, se encontró un inconveniente, ya que se está tratando con una mezcla de tres compuestos importantes que debían mantener su proporción relativa, por lo que se optó por seleccionar las diferentes concentraciones de manera porcentual, y a continuación identificar las concentraciones individuales correspondientes como se ve en la tabla 1. Posteriormente se realizó el respectivo ajuste a la concentración total de cada mezcla proporcional para poder analizar los datos mediante el programa probit y así definir las diferentes concentraciones letales.

Una vez establecida la mejor mezcla se realizó la determinación de su CL₅₀ y CL₉₅ siguiendo los protocolos estándar de la OMS. Cuando las larvas se encontraban en estadio Larval L3 y L4, se depositaron cinco larvas en recipientes plásticos con 50 mL de agua libre de cloro y se realizó la evaluación de la actividad insecticida a diferentes concentraciones exploratorias. Cada concentración evaluada tuvo cuatro réplicas más un tratamiento control de DMSO al 0.5% como

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

control negativo y temefos como control positivo. Este procedimiento se repitió en tres días diferentes. Los resultados fueron analizados por métodos estadísticos empleando el programa Probit (Lei & Sun, 2018).

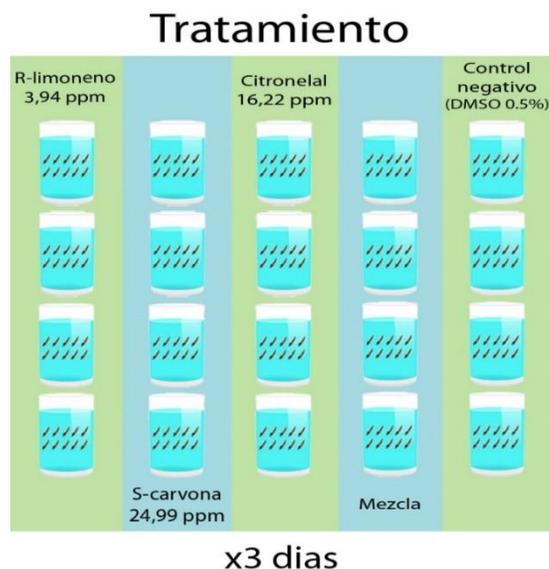
5.2.2 *Tratamiento de larvas para realizar el aislamiento de las proteínas*

Las larvas de *Ae. aegypti* fueron obtenidas a partir de los huevos recolectados de la colonia de cría, se mantuvieron en crecimiento hasta llegar entre el tercero y cuarto estadio larval, se seleccionaron 2000 larvas para cada tratamiento que fueron depositadas en recipientes con un volumen final de 700 mL, cada recipiente con larvas fue tratado con la CL_{20} teórica de cada compuesto R-limoneno (3,94 ppm), S-carvona (24,99 ppm), citronelal (16,22 ppm), control negativo (DMSO 0.5%), y la CL_{20} de la mejor fórmula de mezcla de los tres metabolitos seleccionada anteriormente. Las larvas fueron expuestas durante 24 horas a cada uno de estos xenobióticos y su mezcla (Duque Lizarazo, 2017). Se realizaron 4 réplicas y los experimentos se realizaron en tres días diferentes, el procedimiento se realizó como se aprecia en la Figura 3. Cada proceso se repitió por separado para cada replica y se llevó a cabo en el área de pruebas biológicas adecuada para moléculas nuevas del laboratorio de entomología medica de la Universidad Industrial de Santander.

Figura 3.

Modelo de montaje para la fase de tratamiento previo de las larvas.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES



Nota. Este material se empleó en el análisis por electroforesis. La mezcla seleccionada fue el tratamiento 1 (CL20 de la proporción 1:1:1 al 50% de la CL₅₀ de cada CM), R-Limoneno 3,94 ppm, S-Carvona 24,99 ppm ppm, Citronelal 16,22 ppm ppm, se empleó DMSO al 0,5% como control negativo.

Para el aislamiento de proteínas se tomaron las larvas vivas resultantes de los tratamientos con los compuestos mayoritarios, se maceraron con 1:10 (peso/volumen) del buffer de extracción (tris-HCL y buffer de tratamiento SDS 1:1). Para este proceso se maceraron las larvas un homogeneizador de perlas por 32 ciclos de 10 segundos a 350 rpm con intervalos de baño de hielo por 30 segundos (Paredes, 2003).

5.2.3 Aislamiento de proteínas

Posterior a la obtención de las larvas de *Ae. aegypti* tratadas con los diferentes metabolitos, se seleccionaron las larvas con movimiento rápido y vigorosas con el fin de evitar la degradación de

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

las proteínas y se prepararon estas muestras para realizar el análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional (2D).

Se probó y optimizó la composición del buffer empleado para la separación de proteínas de membrana, teniendo en cuenta que pueden tener regiones más hidrofóbicas que otras (dominios transmembrana). (Garfín, 2003).

Extracción proteínas totales

Para la extracción de proteínas se tomó como base buffer de lisis (Urea 7M, tiourea 2M, triton x100 0,5%, formalitos 1,2%, DDT 20 mM) del cual se agregaron 200 µL a tres extracciones diferentes con 5, 25, 50 larvas, esto se llevó a un homogeneizador de perlas BeadBug D1030 de Benchmark-Scientific cumpliendo ciclos de 30 segundos de baño de hielo y 5 segundos en el homogeneizador a 250 rpm (70 ciclos).

Se realizó un comparativo entre los diferentes tamaños de perlas para la homogenización sin encontrar una diferencia importante entre la utilización de perlas grandes o pequeñas, se identificó la posibilidad de reducir la cantidad de ciclos en las perlas grandes, además de aumentar la cantidad de larvas para maximizar la concentración de proteínas extraídas, finalmente se estandarizo el proceso a 30 ciclos de 10 segundos de agitación a 350 rpm seguidos de 30 segundos en baño de hielo.

Posterior a la extracción de proteínas, se analizó la calidad de estas por electroforesis unidimensional encontrando una degradación importante, por lo que se optó por emplear el buffer

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

de lisis G (7 M urea, 2 M tiourea, triton x100 0,5%, formalitos 1,2%, DDT 10mM, SDS 0,5% tris 100 mM, ortovanadato 1 mM, PMSF 1 mM, EDTA1 mM, coctel de inhibidores 2x por cada 100 larvas en 100 μ L de buffer).

Extracción proteínas Mitocondriales

En la extracción de proteínas mitocondriales primero se realizo una homogenización empleando un embolo de tipo VanPotter en un medio isotónico con BSA (Sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM, BSA 0.1% a un pH de 7.2) para ello se seleccionaron aproximadamente 2000 larvas entre estadios 3 y 4, las cuales se les realizaron 10 lavados con agua declorada, y 10 lavados con agua tipo 1 con el fin de retirar todas las impurezas restantes a los procedimientos de cría, y en este caso los excedentes a los tratamientos a los que se sometieron las larvas. Las larvas se separaron empleando tela tipo tul para retirar la mayor cantidad de liquido y se depositaron en el recipiente de homogenización, en este punto se agregaron 10 mL de medio con BSA (todos los materiales y procesos implementados en este método debían estar a 4°C con el objetivo de evitar la degradación tanto de mitocondrias como de las proteínas presentes).

Se realizan de 5 a 10 inmersiones del pistilo Van Potter para efectuar una breve fragmentación de las larvas y facilitar la fase de homogenización. Posteriormente se realizaron 25 inmersiones de forma lenta y continua, fijándose en llegar hasta el fondo del contenedor para evitar la formación de grumos, hasta obtener una mezcla homogénea y consistente. Una vez finalizado se procedio a filtrar la suspensión obtenida empleando fibra de vidrio previamente humedecida con agua tipo 1 en una jeringa de 25 mL, la suspensión filtrada se recolecto en un tubo falcón de 50 mL y se

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

procedio a centrifugar a 300 x g por 5 minutos, se conservo el sobrenadante. Posteriormente se realizo una centrifugación a 8000 x g por 10 minutos, luego se descarto el sobrenadante y el pellet se resuspendio cuidadosamente en el mismo volumen de medio con BSA empleando un pincel de punta fina para evitar fraccionamiento de las mitocondrias. Nuevamente se realizo un centrifugado a 7000 x g por 10 minutos, se descarto el sobrenadante, y se resuspendio el pellet en 10 mL de medio SIN BSA (Sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM a un pH de 7.2). El último proceso de centrifugado se realizo a 7000 x g por 10 minutos y se descarto el sobrenadante, en este caso el pellet se resuspendio en 200 µL buffer de lisis G. Las proteínas aisladas se reservaron a -80°C hasta su implementación.

5.2.4 *Electroforesis en dos dimensiones*

Las muestras de proteínas fueron analizadas inicialmente por SDS-PAGE (1D) usando marcadores de proteínas de peso molecular de amplio rango (6.5 a 200 kDa). Posteriormente, se llevó a cabo la separación por electroforesis bidimensional (2D) de las proteínas obtenidas de las larvas tratadas con los metabolitos y el control negativo. Para ello, se llevó a cabo la focalización isoelectrica de las proteínas aplicando las proteínas en tiras IPG de 7 cm (Biorad). Las tiras para focalización isoelectrica (rango de pH 3-10), se rehidrataron por 12 h por rehidratación pasiva. La focalización isoelectrica de las proteínas fue llevada a cabo en una celda Protean IEF cell (Bio-Rad) hasta alcanzar 10000 V/tira IPG de 7 cm (tiempo total aproximado de 4 horas). Después de la primera dimensión, las tiras fueron sometidas a un paso de reducción y otro de alquilación de 10 min cada uno, empleando un buffer de equilibrarían (6 M urea, 30% [P/v] glicerol, 2% [P/v]

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

SDS en 50 mM buffer Tris-HCl pH 8.8). En la primera etapa, se añadió 0.1% DTT al buffer de equilibración y 4% de Iodoacetamida en la segunda etapa de equilibración. La segunda dimensión se realizó por la técnica SDS-PAGE en geles del 12% de poliacrilamida empleando la cámara Protean xii Cell (Bio-Rad), y una fuente de poder Power Pac HC (Bio-Rad) a 130V por una hora y media. Al terminar la electroforesis se tiñeron los geles usando azul de Coomassie G-250 al 0,1% por una hora y dos fases de decolorado (decolorante fuerte [50% metanol] por una hora y seguido por decolorante débil [5% de metanol] por 12 horas).

5.2.5 *Análisis de las imágenes de los geles 2D.*

Tras obtener el gel bidimensional de cada tratamiento, un total de tres replicas por tratamiento (larvas tratadas con los metabolitos y control), fueron sometidos a un análisis *in silico* siguiendo los siguientes pasos:

- Se realizó el proceso de digitalización de imágenes empleando el programa imageLab, las imágenes fueron obtenidas en un escáner de alta resolución Biorad Gel Doc XR+.
- Posteriormente se empleó el software PDQuest Advanced versión 8.0.1 (Bio-Rad). para detectar los spots de proteínas y determinar las variaciones en la intensidad de su expresión, masa molecular y pI.
- Las proteínas se consideraron diferencialmente expresadas cuando los niveles de intensidad de cada spot cambian (aumentando o disminuyendo) comparado al control. Con niveles de expresión disminuidos por debajo de 0,5 o aumentados a más de 1,5 veces.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

5.2.6 *Espectrometría de Masas e Identificación de proteínas*

Los spots de proteínas expresados de manera diferencial se extrajeron del gel, se destiñeron en etanol (30% v/v) y se lavaron con una solución de acetonitrilo al 50% (v/v) conteniendo NH_4HCO_3 25 mM por 20 min. La solución de lavado se reemplazó por una solución de acetonitrilo 100% y se incubó por 10 min. Los fragmentos de gel se trataron con tripsina para la digestión de proteínas en el gel. Los péptidos derivados de la digestión triptica se analizaron usando un equipo Ultraflex III MALDI-TOF (Brucker Daltonics) calibrado con BSA (proteína estándar). Una muestra de 1 μL se mezcló en 1 μL de solución de matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico 15mg/mL, acetonitrilo al 50% en 0.1% ácido tri-fluoroacético) y se aplicó a la placa de MALDI (1 μL por duplicado). Después de la cristalización a temperatura ambiente, se analizaron las muestras por espectrometría de masas (MS) operado en modo reflector para adquisición de los espectros de MS. Las proteínas se identificaron a partir de los perfiles peptídicos. Los espectros de masas fueron transformados al formato genérico de MASCOT y comparados con los disponibles en base de datos SwissProt usando el software Mascot 2.1 (Matrix Science). Posteriormente se compararon los hallazgos con secuencias de proteínas relacionadas según la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y se realizó un BLAST para analizar niveles de similitud con *Ae. aegypti*.

5.2.7 *Análisis estadístico*

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

El análisis estadístico de los datos para la determinación de CL_{50} se realizó empleando el software PoloPlus, empleando las pruebas de normalidad correspondientes, Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, y ANOVA de una vía y posteriormente en test de Tukey *posthoc* en el caso requerido, finalmente se determinó la CL_{50} mediante análisis Probit (Lei & Sun, 2018; McHugh, 2011). Para el análisis de imágenes de electroforesis obtenidas con el software Imagelab de Biorad, se empleó en programa PDQuest para análisis de expresión diferencial, determinación del punto isoeléctrico y peso molecular. La determinación de expresión diferenciada se realizó teniendo en cuenta un aumento superior a 1,5 veces con respecto al control para el caso de sobre expresión proteica, e inferior a 0,5 veces para el caso de regulación negativa en la expresión proteica manejando la estadística por defecto de este programa (t de student) (J. Chen et al., 2019).

6. Resultados

6.1 Selección de la mejor mezcla

Las pruebas para selección de la mejor mezcla se realizaron según la formulación expresada en la tabla del Anexo 1. Los resultados indican que la mezcla de los tres xenobióticos con su CL_{50} individual ocasionó una mortalidad del 100% a las 24 horas, y al disminuir estas concentraciones a la mitad de la CL_{50} (CL_{25}) de cada CM, el nivel de mortalidad en la mezcla no disminuyó, además de esto, se aprecia una relación directa entre composición y mortalidad, al disminuir la

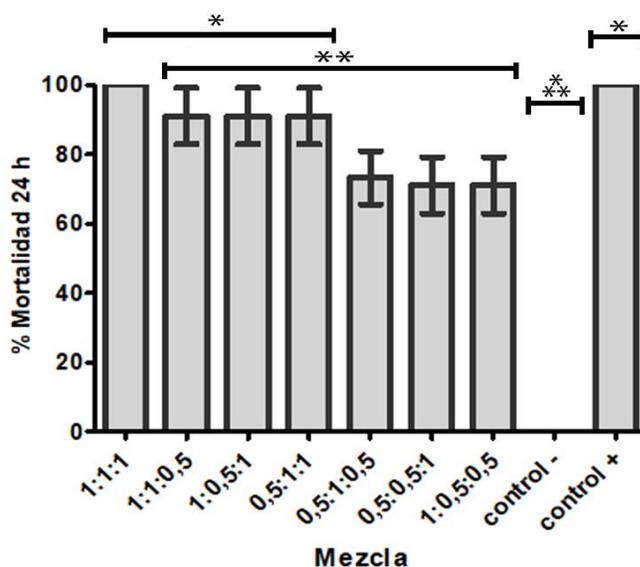
PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

concentración de uno o dos de estos compuestos de nuevo a la mitad, lo que permitió agruparlos en tres grupos. Primero, mezcla con los compuestos al 50% de su CL_{50} (1:1:1), segundo mezclas con uno de estos compuestos reducido al 25% (1:1:0.5, 1:0.5:1, 0.5:1:1), y tercero la mezcla con dos de sus compuestos reducidos al 25% (0.5:0.5:1, 0.5:1:0.5 y 1:0.5:0.5) como se aprecia en la Figura 4.

Al realizar el análisis estadístico de los datos anteriormente mencionados encontramos que los datos guardan una relación no paramétrica por lo que se realizó el test Kruskal-Wallis, como se aprecia en la gráfica 1, se encontró diferencia estadística solo entre el primer y tercer grupo, entre el primer grupo y el segundo no se encontró diferencia estadística pero debido que en el segundo grupo disminuye el rendimiento de mortalidad causado por la mezcla se optó por elegir al grupo de la mezcla 1:1:1 bajo nuestro criterio como la mejor, y fue seleccionada para continuar con las pruebas correspondientes.

Figura 4.

Porcentaje de mortalidad de cada mezcla.



PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Nota. Solo hay diferencias estadísticas entre el grupo 1 y el 3. Grupo 1(), grupo 2(**), grupo 3(***)*. 1:1:1 (R-limoneno 4,93 ppm: S-carvona 31,25 ppm: Citronelal 20,25 ppm). (composición de cada mezcla en Anexo 2).

Kruskal-Wallis test: H (7, N= 24) p=0,02.

6.1.1 Determinación de la CL₅₀ y CL₉₅

Para la determinación de las CL₅₀ y CL₉₅ primero se realizó el análisis estadístico de los resultados empleando la prueba de ANOVA de una vía y posterior mente en test de Tukey *poshoc* (Tabla 1). Se encontró que por debajo de la cuarta concentración diagnóstica correspondiente al 50% de la mezcla 1:1:1 con concentración total de 28,22 ppm la mortalidad fue casi nula como se puede apreciar en la gráfica 5, donde al comparar resultados no se encontró diferencia estadística entre la concentración 4 y las posteriores que no expresaron mortalidad.

Tabla 1.

Concentraciones múltiples para estudios de concentración letal 50 y 95.

mezcla	% de mezcla	Concentración (ppm)			[Total] ppm ^a	% Mortalidad ± DS 24h
		R-limoneno	S-carvona	Citronelal		
1	100	4,9	31,3	20,3	56,4	90,8 ± 1,5 ^A
2	90	4,4	28,1	18,2	50,8	67,5 ± 2 ^B
3	85	4,2	26,6	17,2	48,0	35,8 ± 4 ^C
4	50	2,5	15,6	10,1	28,2	4,2 ± 1,5 ^D
5	25	1,2	7,8	5,1	14,1	0 ± 0 ^D
6	10	0,5	3,1	2,0	5,6	0 ± 0 ^D
7	5	0,3	1,6	1,0	2,8	0 ± 0 ^D
C -	Control -	0	0	0	0	0 ± 0 ^D

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

C + Control + 100 100 100 0.005 100^A

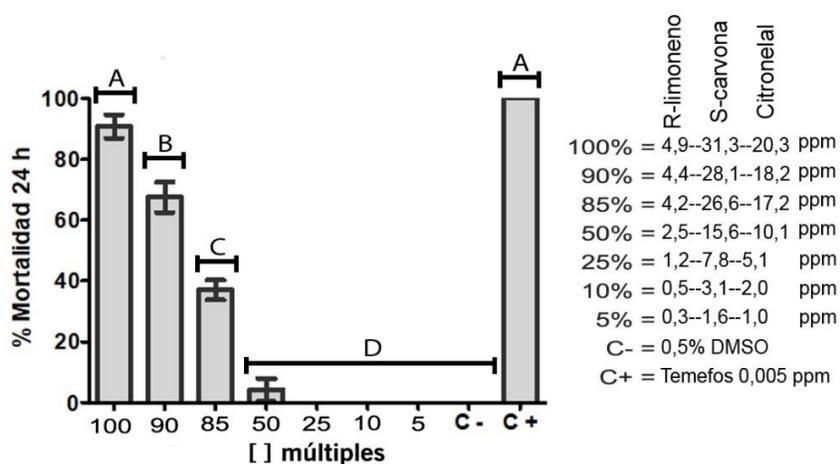
Nota. One-way ANOVA Tukey poshoc test $p < 0,05$.

a: sumatoria de concentraciones de compuestos individuales.

A,B,C,D: letra diferente presenta diferencia estadística

Figura 5.

Mortalidad de concentraciones múltiples de la mezcla 1:1:1 (50% de la CL₅₀ de cada CM).



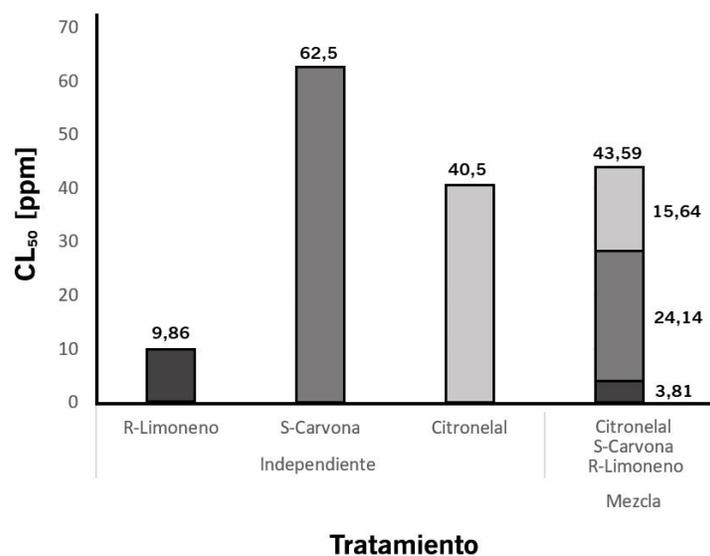
Nota. Letra diferente presenta diferencia estadística (A, B, C, D). One-way ANOVA Tukey poshoc test $p < 0,05$.

Al analizar los datos anteriormente mencionados se determinó la CL₅₀ para la mezcla 1:1:1 siendo esta de 43,6 ppm, al revisar un análisis a la composición de esta CL₅₀ de cada uno de los terpenos (R-limoneno 3,8 ppm, S-carvona 24,1 ppm y citronelal 15,6 ppm) encontramos una reducción de 61,35 % entre las CL₅₀ individuales y la presencia de cada compuesto en la mezcla (Gráfica 6). Para el caso de las CL₉₅ se determinó en 64,6 ppm (R-limoneno 5,6 ppm, S-carvona 35,8 ppm y citronelal 23,2 ppm) encontramos una reducción promedio de 71,5 % entre las CL₉₅ individuales y la presencia de cada compuesto en la mezcla (Gráfica 7).

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Figura 6.

Disminución en la proporción de cada componente al emplearlos en la mezcla.

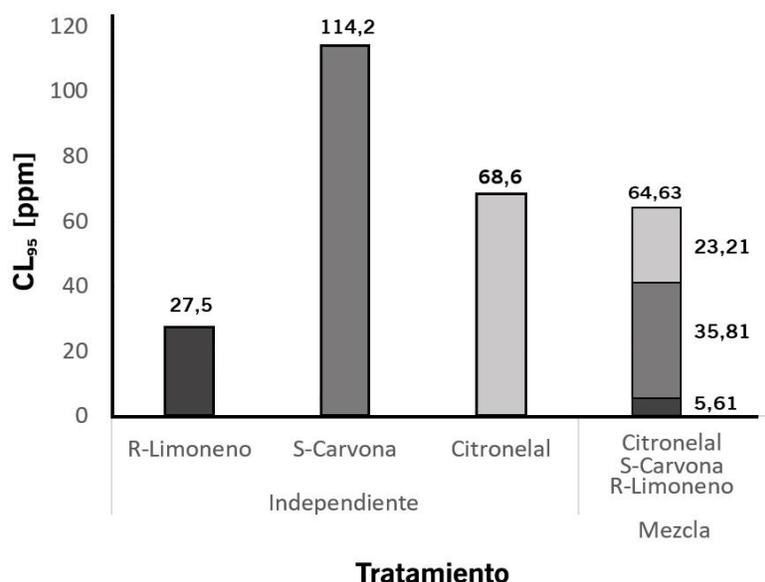


Nota. Se aprecia una disminución de un 61,35% en comparación al emplear cada CM de forma –independiente. [] concentración.

Figura 7.

Disminución en la proporción de cada componente al emplearlos en la mezcla.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES



Nota. Se aprecia una disminución promedio de un 71,5% en comparación al emplear cada CM de forma – independiente. [] concentración.

6.2 Extracción de proteínas para electroforesis

Se analizó la variante del tamaño de las perlas del homogenizador en las cuales no se observó diferencia importante entre la utilización de perlas grandes o pequeñas, pero si se identificó la posibilidad de reducir la cantidad de ciclos en las perlas grandes, además de aumentar la cantidad de larvas para maximizar la concentración de proteínas extraídas, finalmente se estandarizó el proceso a 30 ciclos de 10 segundos de agitación a 350 rpm seguidos de 30 segundos en baño de hielo.

Al realizar la electroforesis de las muestras anteriormente mencionadas se encontró una completa degradación de las proteínas por lo que se decidió probar otros métodos de extracción

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

con la mayor cantidad de larvas para asegurar una buena concentración de proteínas, así se decidió comparar el homogenizado entre el sistema de perlas y Van-Potter, entre extracción normal y previamente congelada con nitrógeno líquido (Anexo 2).

Al no encontrarse bandas en la electroforesis se decidió probar con diversas variaciones en la composición del buffer de lisis. Cada una de estas fue montada por triplicado y se analizaron cantidades de 50 larvas hasta la 5ta variación del Buffer de lisis (buffer D, Anexo 3), en este punto se realizaron diferentes extracciones de prueba variando no solo la composición del buffer, sino también la proporción de larvas de *Ae. aegypti* para verificación de protocolos, obteniéndose en el mejor de los casos una cuantificación de proteínas de 18 mg/mL (empleando el buffer de lisis A), por lo que se decidió aumentar la cantidad de larvas a 100 individuos.

A pesar de esto se seguía apreciando una alta degradación de proteínas, por lo que se dedujo que el problema debía ser ocasionado por altas concentraciones de proteasas, como medida se empleó el coctel inhibidor de proteasas para uso general marca Research Products International, en concentraciones 1x (recomendada) y 2x, adicionalmente se analizó si omitir la fase de desnaturalización (elevación a 80°C por 5 minutos) contribuiría a tener mejores resultados. Sin embargo, no se evidenciaron bandas en los geles de electroforesis de estas muestras.

Posteriormente, se hicieron pruebas con un aumento a 3x del cocktail de inhibidores para aumentar resolución de las bandas sin éxito, por lo que se optó por aumentar el número de larvas a 500 y se probó con una concentración del cocktail 5x y 10x, la extracción con 5x no dio bandas visibles por lo que se procedió a comparar el proceso entre 100 y 500 larvas (Anexo 4), no en tanto, aun se evidencia un alto grado de degradación proteica.

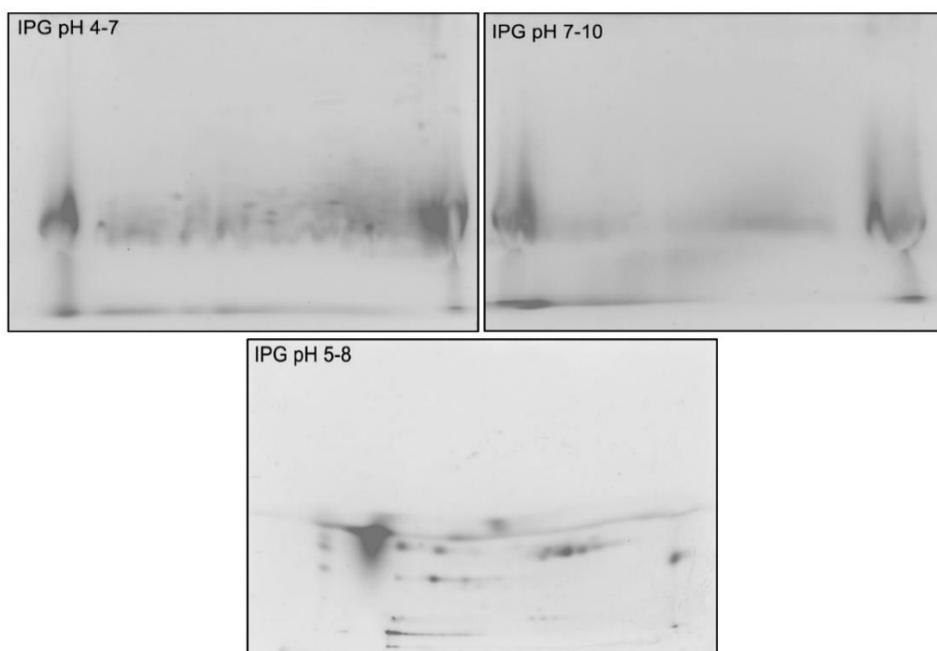
PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

A este punto se tomó la decisión de continuar con la extracción utilizando 500 larvas y el buffer de lisis G, para emplearlo en la fase de electroforesis en 2D. Todas las extracciones de proteínas descritas hasta aquí presentaban un máximo de concentración de 12,94 mg/mL de proteínas y un volumen final de aproximadamente 450 μ L a un pH de 7.

Tras las primeras pruebas en electroforesis bidimensional empleando tiras de IPG en tres rangos de pH diferentes 5-8, 4-7 y 7-10 (Figura 8), y teniendo en cuenta los resultados en pruebas de electroforesis de una sola dimensión, se determinó que la calidad de las proteínas aisladas por estos métodos no es la adecuada para la identificación de proteínas. Esto al compararse con la calidad y cantidad de los *spots* obtenidos en otros análisis similares (Cancino-rodezno et al., 2012; Morais F et al., 2016; Popova-butler & Dean, 2009).

Figura 8.

Electroforesis bidimensional de la extracción proteica total de larvas de Aedes aegypti en 4 estadio.



PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

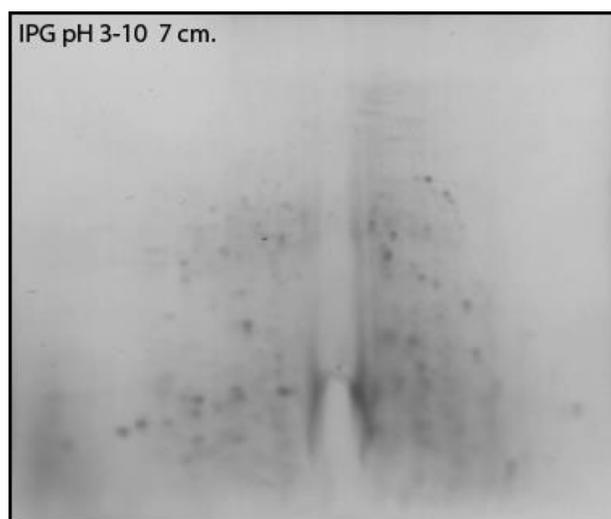
Con base en lo anteriormente mencionado, con el objetivo de dar continuidad al estudio y resolver la pregunta de investigación, se optó por analizar el mecanismo de acción de los CM usando proteínas mitocondriales, teniendo en cuenta que en estudios previos del laboratorio se demostró que los CM en estudio presentan como diana farmacológica la mitocondria, el estudio con proteínas mitocondriales se encuentra validado en el laboratorio, y se han estudiado de manera amplia debido a su gran importancia para el funcionamiento celular, lo cual las convierte en una diana de análisis de gran relevancia para este proyecto (Duque Lizarazo, 2017).

Manteniendo el buffer G (Urea 7M, tiourea 2M, triton x100 0,5%, chaps 4%, formalitos 1,2%, DTT 20mM, SDS 0,5%, tris 100nM, ortovanadato 1mM, PMSF 1mM, EDTA 1mM, cocktail inhibidores 10x), y empleando electroforesis bidimensional en rango de pH de 3 a 10 se obtuvieron imágenes del perfil proteico mitocondrial de cada uno de los tratamientos, la mezcla de los tres compuestos y el control negativo (DMSO 0.5%). Al realizar los diversos tratamientos con la CL50 de cada sustancia a estudiar, se observó deterioro de las proteínas extraídas atribuible a la concentración de cada tratamiento, por lo que se optó por reducir la dosis de trabajo a una CL₂₀ con el objetivo de mejorar la calidad de cada extracción proteica (Figura 9).

Figura 9.

Control proteínas mitocondriales en pH 3-10.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES



Posterior al análisis de cada grupo de imágenes empleando el programa PDQuest se encontraron diferencias en la expresión proteica, las cuales fueron consignadas en el anexo 5 donde se aprecian 60 proteínas con algún tipo de alteración dependiendo del análisis realizado. Para los tratamientos se encontraron en promedio 65 spots de proteínas en promedio, al comparar el control con cada tratamiento y teniendo en cuenta una diferencia mínima con un ratio de 1,5 para sobre expresión y de 0,5 para inhibición con respecto a la expresión del control, se encontraron: en el Citronelal 14 proteínas, con *S*-carvona se encontraron 11 proteínas, en *R*-limoneno se encontraron 8 proteínas, y en la mezcla de los tres compuestos se encontraron 18 proteínas con variación significativa en su expresión (Tabla 2). Cabe resaltar la presencia de una proteína aumentada 5,8 veces en la comparación del control con la mezcla de los 3 compuestos. Como análisis adicional se realizó la comparación entre cada uno de los tratamientos y la mezcla demostrando un panel más amplio de proteínas diferenciadas, mientras que en las comparaciones con el control arrojan un promedio de 12 proteínas con expresión diferencial, en el segundo grupo de análisis (comparación mezcla

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

versus CM) se encuentra un promedio de 21 proteínas. Resaltando entre estas una proteína que presenta un ratio de 0.019, muy baja expresión en el tratamiento individual con S-Carvona y una proteína alterada en los tres compuestos con un ratio de 0.036 en el tratamiento con Citronelal.

Tabla 2.

Figura Electroforesis bidimensional de proteínas mitocondriales.

	Tratamiento	N.º de proteínas	expresión Diferenciada	down regulation $\leq 0,5$	up regulation				total
					1,5 a 2,0	2,1 a 2,5	2,6 a 3,0	> 3,1	
Control vs	R-Limoneno	61	8	2	3	1	1	1	38
	S-Carvona	57	11	5	0	3	2	1	
	Citronelal	60	14	4	4	3	2	1	
	Mezcla	77	18	11	3	1	1	2	
Mezcla vs	R-Limoneno	69	16	7	1	1	1	6	46
	S-Carvona	62	27	19	3	1	0	4	
	Citronelal	68	20	13	1	1	1	4	

Nota. Resumen de las proteínas diferenciales encontradas según su tipo de regulación.

Además de esto, se encontraron coincidencias en proteínas que muestran variaciones entre los diferentes tratamientos (Tabla 3). De esta forma encontramos posibles similitudes en el efecto ocasionado por exposición a los tratamientos, mostrando como 6 de las 11 proteínas encontradas se encuentran en la mezcla, siendo la proteína 9 de gran interés debido a que presenta una sobre expresión en citronelal de 2,6 con respecto al control mientras que presenta un aumento de 5,8 veces en la comparación de la mezcla con respecto al control. Siendo una proteína con un peso molecular aproximado de 59,7 kDa y un punto isoelectrico en rango de pH 6,3 estimado por su

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

localización en el gel, Figura 10. Y en menor medida, pero de igual importancia se puede apreciar un efecto potenciador del citronelal y del R-limoneno a favor de S-carvona en la proteína 1, viéndose un aumento en la expresión de 2,8 veces a 4,2 de ratio al compararlo en la mezcla.

Tabla 3.

Proteínas que muestran expresión diferenciada en más de un tratamiento.

Proteína	ID	Control vs				Promedio	
		Mezcla	S-Carvona	R-Limoneno	Citronelal	PI	MW
1	201	4,2	2,8	a		3,4	23,0
2	1102	a	2,0	1,7	a	4,9	24,4
3	1402	a	0,5	a	1,7	5,0	35,8
4	1403	0,4	0,5	a	a	5,0	36,1
5	2103	a	2,7	1,8	0,4	5,7	20,7
6	2401	0,4	0,4	a	a	5,5	36,9
7	3102	a	2,1	2,0	a	5,2	24,9
8	4701	0,5	0,5	a	1,6	5,8	37,8
9	5802	5,8	a	a	2,6	6,3	59,7
10	6201	a	a	2,7	0,4	7,7	25,3
11	7301	0,5	a	0,4	a	7,8	35,8

Nota. Punto isoeléctrico (PI). Peso molecular (MW). Identificación de proteínas (ID). a- presencia de proteína, pero sin variación relevante comparada con el control, descartada debido a que la variación se encuentra entre 0,5 y 1,5.

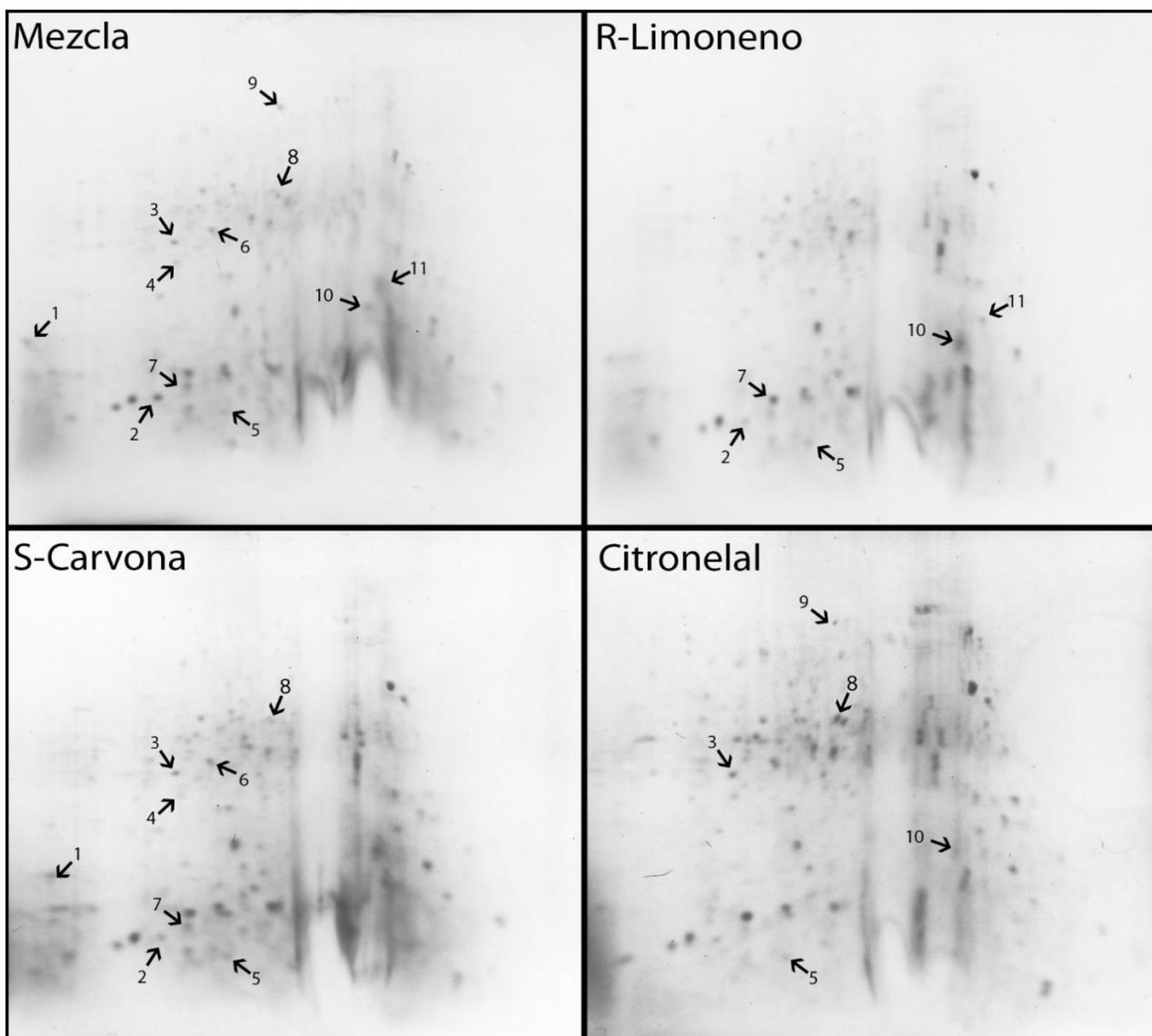
En el caso de la comparación entre la mezcla y cada CM, el promedio de proteínas diferenciales fue de 21 proteínas, en estos casos se encontró una proteína de importancia (proteína 11) ya que

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

no solo se ve alterada con respecto al control sino que en el estudio de comportamiento individual versus la mezcla se encontró potenciada considerablemente, ya que para el caso de Citronelal se expresa en un ratio de 0,036 con respecto a la mezcla comprobando así la potenciación del efecto en la mezcla (proteína 6403, ID 11).

Figura 10.

Disposición de las proteínas que presentan coincidencia entre los diferentes tratamientos y la mezcla.



PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Posteriormente se analizaron los datos obtenidos por espectrometría de masas empleando el programa Flexanalysis versión 3.3 (Build 80), seguido de análisis por la base de datos disponible en internet matrixscience, con el objetivo mejorar la identificación con proteínas se realizó un proceso de BLAST apareando las proteínas identificadas con proteínas de *Ae. aegypti* (o en su defecto proteínas con cadenas ampliamente conservadas), y así relacionarlas con el efecto causado por cada compuesto estudiado (Tabla 4).

De las 38 proteínas de interés y teniendo en cuenta la identificación, el número de proteínas de interés se redujo a 25, siendo la proteína 53 representada por dos posibilidades, 13 proteínas con una identificación insatisfactoria, y una que no pudo ser aislada. La función que desarrolla cada proteína en la mitocondria y el efecto causado sobre ellas por cada tratamiento se pueden agrupar en seis categorías (complejos mitocondriales, detoxificantes, mecanismo de acción, membrana, mitoribosomas, transcripción y traducción) lo cual lo podemos apreciar de forma general en la Figura 11.

Tabla 4.

Proteínas identificadas mediante comparación con macroproyecto de transcriptoma de Aedes aegypti, clasificadas según su función y desempeño de su expresión.

ID Protein	Control vs				Blast de proteina	% Identificación	Función	Referencia	
	Mezcla	S-Carvona	R-Limoneno	Citronelal					
13	1101	a	2,0	a	a	Proteína desacoplante mitocondrial 2 [Aedes aegypti]	55,02	Las UCP son proteínas transportadoras mitocondriales que crean fugas de protones a través de la membrana mitocondrial interna, desacoplando así la fosforilación oxidativa de la síntesis de ATP. Como resultado, la energía se disipa en forma de calor.	UniProt
32	3802	a	a	a	2,7	Probable Adenilosuccinato sintetasa [Aedes aegypti]	37,04*	Cataliza el primer paso comprometido en la biosíntesis de AMP de IMP.	UniProt
50	7303	0,4	a	a	a	Adenilato quinasa [Aedes aegypti]	61,24	Cataliza la transferencia reversible del grupo fosfato terminal entre ATP y AMP	UniProt
46	6706	0,3	a	a	a	Factor de elongación de la transcripción GreA [Wolbachia endosimbiosis de Aedes albopictus]	47,1*	Necesario para el alargamiento eficaz de la transcripción de la ARN polimerasa más allá de los sitios de detención codificados por molde	UniProt
19	2102	a	3,5	a	a	Proteína de choque térmico de 60 kDa, mitocondrial [Aedes aegypti]	52,58	Chaperonina implicada en la importación de proteínas mitocondriales y ensamblaje macromolecular.	UniProt
26	3304	a	a	3,1	a	Probable factor de elongación 2 isoforma X2 [Aedes aegypti]	35,95*	Cataliza el movimiento coordinado de las dos moléculas de ARNt, el	UniProt

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

								ARNm y los cambios conformacionales en el ribosoma.	
47	6804	1,5	a	a	a	Prolina - tRNA ligasa [Wolbachia endosimbiosis de Aedes albopictus]	55,1	Cataliza la unión de la prolina al ARNt	UniProt
51	7602	1,5	a	a	a	Chaperón de ARN ProQ [Serratia fonticola]	93,67	Chaperona de ARN con actividades significativas de unión de ARN, intercambio de cadenas de ARN y duplexación de ARN. Puede regular la actividad de ProP a través de un mecanismo postranscripcional basado en ARN.	UniProt
53	7801	2,7	a	a	a	ARN polimerasa dirigida por ADN, mitocondrial isoforma X2 [Aedes aegypti]	39,15*	La ARN polimerasa dependiente de ADN cataliza la transcripción del ADN mitocondrial en ARN . Componente del complejo de iniciación de la transcripción mitocondrial	UniProt
53	7801	2,7	a	a	a	Argininosuccinato sintasa [Aedes aegypti]	44,67*	Cataliza la formación de arginosuccinato a partir de aspartato, citrulina y ATP y, junto con ASL, es responsable de la biosíntesis de arginina en la mayoría de los tejidos corporales	UniProt
22	2701	a	a	a	1,5	Timidilato quinasa [Aedes albopictus]	45,83*	Cataliza la conversión de dTMP a dTDP.	UniProt

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

45	6702	a	a	a	1,8	Proteína de choque térmico de 60 kDa, mitocondrial [<i>Aedes aegypti</i>]	53,67	Chaperonina implicada en la importación de proteínas mitocondriales y ensamblaje macromolecular.	UniProt
9	5802	5,8	a	a	2,6	Proteína del complejo de poros nucleares Nup107 [<i>Aedes aegypti</i>]**	39,02*	Desempeña un papel en el ensamblaje y / o mantenimiento del complejo de poros nucleares	UniProt
41	5601	0,4	a	a	a	Proteína del complejo de poros nucleares Nup107 [<i>Aedes aegypti</i>]**	39,02*	Desempeña un papel en el ensamblaje y / o mantenimiento del complejo de poros nucleares	UniProt
2	1102	a	2,0	1,7	a	Proteína similar a la cinesina KIF13A isoforma X5 [<i>Aedes aegypti</i>]	37,4*	participa en el transporte intracelular y regula varios procesos, como el transporte del receptor de manosa-6-fosfato (M6PR) a la membrana plasmática	UniProt
37	5304	1,9	a	a	a	Subunidad de translocasas de membrana interna de importación mitocondrial Tim17-A isoforma X2 [<i>Aedes albopictus</i>]	70,78	Componente esencial del complejo TIM23, un complejo que media la translocación de proteínas que contienen péptidos de tránsito a través de la membrana interna mitocondrial	UniProt
1	201	4,2	2,8	a	a	Proteína ribosomal 30S, S3 [<i>Wolbachia endosimbiosis de Aedes albopictus</i>]	40,87*	Une la parte inferior del cabezal de la subunidad 30S. Se une al ARNm en el ribosoma 70S y lo coloca para la traducción	UniProt

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

7	3102	a	2,1	2,0	a	Peroxiredoxina-6 [<i>Aedes aegypti</i>]	60,55	Desempeña un papel en la protección celular contra el estrés oxidativo al desintoxicar los peróxidos y en la homeostasis de los fosfolípidos.	UniProt
5	2103	a	2,7	1,8	0,4	CDP-diacilglicerol pirofosfatasa [<i>Serratia fonticola</i>]	56,43	Actividad catalítica, componente integral de la membrana	UniProt
10	6201	a	a	2,7	0,4	Lipoproteína LPS de ensamblaje de LptE [<i>Serratia fonticola</i>]	52,35	Junto con LptD, participa en el ensamblaje de lipopolisacárido (LPS) en la superficie de la membrana externa. Requerido para el correcto montaje de LptD	UniProt
4	1403	0,4	0,5	a	a	Factor de iniciación de la traducción IF-2, mitocondrial [<i>Aedes aegypti</i>]	37,24*	Uno de los componentes esenciales para el inicio de la síntesis de proteínas. Protege el formilmetionil-tRNA de la hidrólisis espontánea y promueve su unión a las subunidades ribosómicas 30S.	UniProt
11	7301	0,5	a	0,4	a	Factor de elongación alpha 1 [<i>Aedes aegypti</i>]	53,67	Esta proteína promueve la unión de aminoacil-tRNA dependiente de GTP al sitio A de los ribosomas durante la biosíntesis de proteínas	UniProt
52	7701	a	a	0,5	a	Proteína ribosomal 30S, S16 [<i>Wolbachia endosimbiosis de Aedes albopictus</i>]	68,75	Las fusiones en marco con el factor de maduración del ribosoma rimM suprimen las mutaciones en este último (probablemente debido a una mayor expresión de rimM) y	UniProt

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

60	9102	a	a	a	0,4		se encuentran en los ribosomas 70S traduccionalmente activos.		
						Proteína ribosomal 30S, S16 [Wolbachia endosimbiosis de Aedes albopictus]	68,75	Las fusiones en marco con el factor de maduración del ribosoma rimM suprimen las mutaciones en este último (probablemente debido a una mayor expresión de rimM) y se encuentran en los ribosomas 70S traduccionalmente activos.	UniProt
44	6502	0,3	a	a	a	Citocromo P450 [Aedes aegypti]	29,38*	esta enzima participa en una vía de transporte de electrones dependiente de NADPH. Oxida una variedad de compuestos estructuralmente no relacionados, incluidos esteroides, ácidos grasos y xenobióticos.	UniProt

Complejos mitocondriales
Transcripción y traducción
Membrana

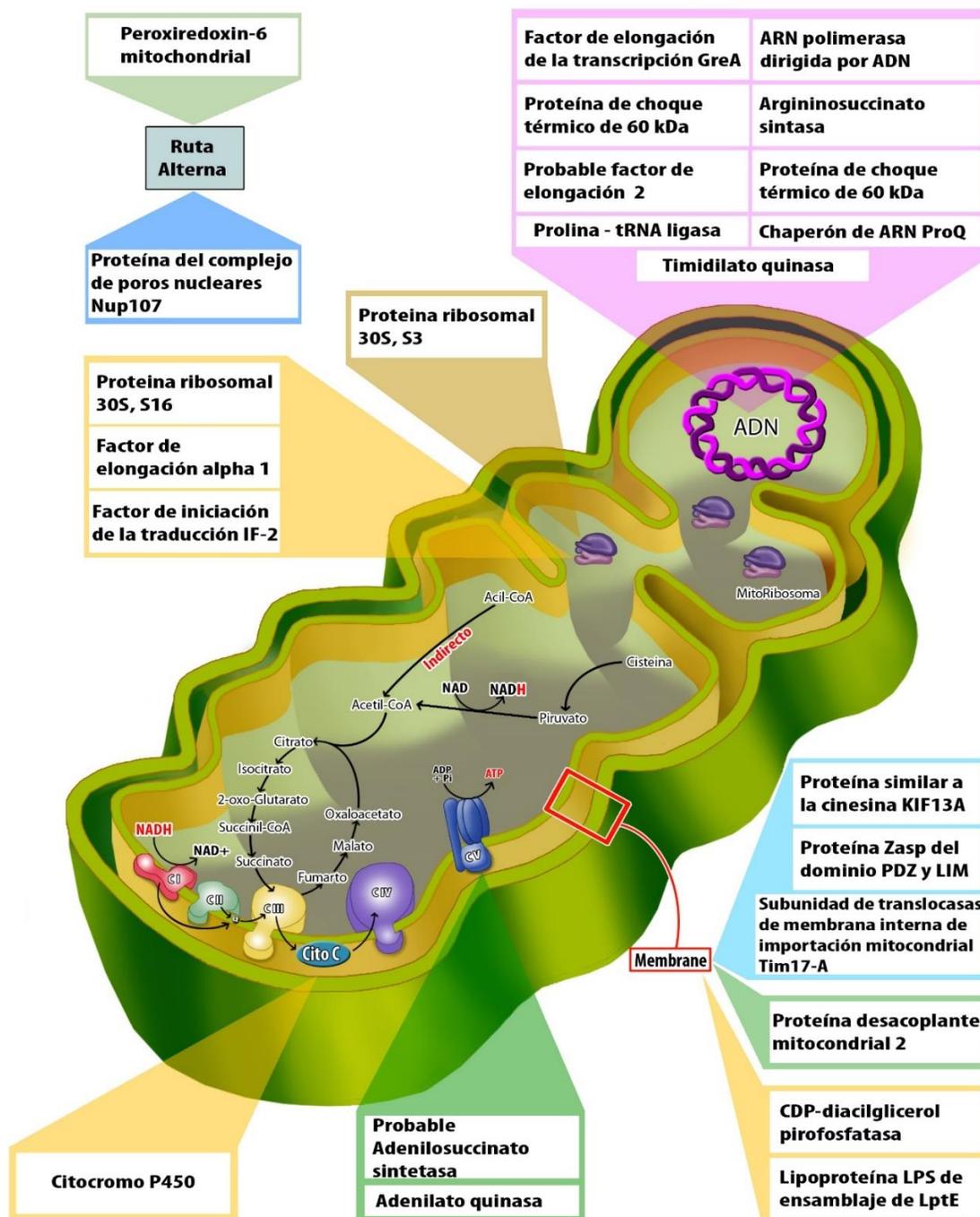
Mitoribosomas
Detoxificante
Mecanismo de acción

Nota. (*)Proteínas con un porcentaje de identificación inferior a 50% se recomienda corroboración por secuenciación de novo;

(**)Se consideran proteínas contaminantes.

Figura 11.

Representación general de las proteínas con expresión diferenciada y su ubicación en la mitocondria.



Nota. Complejos mitocondriales (■), transcripción y traducción (■), Membrana (■), Mitorribosomas (■),

Detoxificantes (■), Mecanismo de acción (■).

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

7. Discusión

Los AEs han demostrado ser fuentes de metabolitos importantes para el diseño de insecticidas naturales como alternativa para control vectorial. En el presente estudio se analizó el efecto insecticida de tres compuestos mayoritarios de forma individual y conjunta contra larvas de *Ae. aegypti*. Al analizar los resultados de mortalidad de CL_{50} de los diferentes metabolitos y compararlos con las concentraciones de estos en la mezcla, se encontró una considerable reducción en la concentración de los componentes de la mezcla, encontrando una reducción del 61,35 % en la comparación de cada uno de los CM. Esto demuestra un posible tipo de relación potenciadora al combinar estos tres compuestos, demostrando que la función cumplida por cada uno de estos compuestos afecta de forma directa la actividad larvicida de la mezcla como se puede apreciar en la gráfica 6. Se puede considerar que la reducción al 50% de un solo componente sin importar cual sea afecta de forma similar su actividad, igualmente se aprecia el mismo efecto en el caso de la reducción del 50% de la proporción de dos CM de la mezcla (Gnankiné & Bassolé, 2017).

Pese a los esfuerzos realizados y teniendo en cuenta los diversos protocolos revisados se encontró que por los métodos ensayados no fue posible lograr la extracción proteica de larva total con calidad suficiente para visualizar en la electroforesis unidimensional y en la electroforesis en 2D. A pesar de encontrar altas concentraciones de proteínas se aprecia una amplia degradación de estas, aun empleando altos niveles de inhibidores de proteasas, debido a esto no se pudieron

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

obtener imágenes de electroforesis bidimensional compatibles con lo esperado según la literatura de extracciones proteicas de partes puntuales de la larva (Cancino-rodezno et al., 2012; Popova-butler & Dean, 2009). Por lo que se optó por realizar las pruebas en la fracción mitocondrial extraída de la totalidad de la larva de *Ae. aegypti*.

En experimentos previos realizados en el laboratorio se contaba con un protocolo validado para la extracción de mitocondrias parcialmente fragmentadas, lo que aseguraba un estado proteico de calidad adecuado. Al limitarse solo a la fracción mitocondrial se aumenta la calidad de estas extracciones proteicas y se obtiene un marco de comportamiento general de las mitocondrias de toda la larva. Esta diferencia en la calidad proteica pudo deberse en primera instancia a una dilución de las enzimas que degradan la muestra, ya que en los protocolos desarrollados para muestras de larva total se emplean 200 μ L de buffer de extracción con coctel de inhibidores, mientras que para la extracción mitocondrial primero se realiza una separación de la fracción mitocondrial en 10 mL de buffer de extracción con BSA. En segunda instancia, la muestra también puede verse afectada por el tiempo, debido a la exposición a sustancias propias de la larva ya que en la extracción proteica total el proceso de macerado expone las proteínas a una alta densidad de enzimas propias de la larva, mientras que en el proceso de purificación de las mitocondrias se realizan múltiples lavados para la purificación de la muestra antes de resuspender en el volumen final de buffer con coctel de inhibidores. Este conjunto de diferencias entre los dos procesos puede ser el responsable del cambio en la calidad de la muestra (Borrero et al., 2017; Murray et al., 2013; Yañiquez Vedia et al., 2019).

En cuanto a la expresión diferencial de estas proteínas, al comparar el comportamiento de las proteínas en el control frente a los tratamientos individuales y su mezcla, se encontraron 11

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

proteínas con expresión diferenciada en mas de un tratamiento (Tabla 3). En el caso particular de la proteína número 9 se puede apreciar una relación sinérgica que aumenta la sobre expresión de esta proteína, siendo en el tratamiento individual con citronelal 2,6 veces mayor la expresión con respecto al control, mientras que en el tratamiento con la mezcla se encuentra potenciada hasta llegar a 5,8 veces más con respecto al control, demostrando un efecto de potenciación de la actividad insecticida por sinergia con los demás componentes de la mezcla (Abbassy et al., 2009).

Al intentar analizar las 11 proteínas más a profundidad se encontró que no se pudo identificar 3 de ellas, la proteína 1 (proteína ribosomal 30S, S3) presenta un efecto potenciador, apreciado al aumentar su efecto de 2,8 en S-Carvona a 4,2 en la mezcla. Se encontró la proteína 2 con función en la membrana y con expresión aumentada (Proteína similar a la cinesina KIF13A isoforma X5) en S-carvona y en R-limoneno. Se reportó una proteína de poro nuclear (Proteína del complejo de poros nucleares Nup107) posiblemente se deba a contaminación de fragmentos nucleares dentro del aislado, esta proteína pasa a fase de confirmación. Se clasificó la proteína 7 (peroxiredoxina-6) como la única proteína identificada y relacionada con un posible mecanismo de detoxificación. Finalmente se clasificaron 4 proteínas como posibles mecanismos de acción, dos de estas relacionadas con la integridad de la membrana proteínas 5 y 10 (CDP-diacilglicerol pirofosfatasa y Lipoproteína LPS de ensamblaje de LptE) y dos relacionadas con la traducción, proteínas 4 y 11 (Factor de iniciación de la traducción IF-2 mitocondrial y el factor de elongación alfa 1).

Para el caso de la peroxiredoxina-6 mitocondrial única proteína encontrada con relación a efectos detoxificantes encontramos que se ve aumentada en el tratamiento con R-limoneno y S-carvona. Al no verse modificada su expresión en la mezcla sugiere una inhabilidad por parte de la

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

mitocondria para defenderse de la intoxicación por este medio en presencia de los tres compuestos pudiéndose deber a un efecto sinérgico.

Al revisar de forma mas especifica las variaciones de cada uno de los tratamientos, y excluyendo las proteínas de expresión diferencial cruzada con otros tratamientos, se hace necesario realizar un análisis específico de cada proteína en cada tratamiento, el cual se describe a continuación.

Tratamiento con R-limoneno:

Se puede determinar que tan solo 7 de las 25 proteínas identificadas manifiestan una diferencia en su expresión en el tratamiento individual con R-Limoneno (anexo 6). Se encontró una proteína relacionada con el proceso de traducción para la síntesis de proteínas (probable factor de elongación 2 isoforma X2) esta proteína solo se encontró alterada en el tratamiento con R-Limoneno, presentando un aumento de 3,1 veces con respecto al control correspondiente a la necesidad de aumento de síntesis proteicas por exposición a tóxicos. Esto también corresponde al hallazgo de una proteína de membrana (Proteína similar a la cinesina KIF13A isoforma X5) relacionada con el transporte de receptores de membrana. Se encontró un aumento de 2 veces en la expresión de la única proteína relacionada con mecanismos de detoxificación (peroxiredoxina-6) que desempeña un papel importante en la protección contra el estrés oxidativo. Para este tratamiento se encontraron 4 proteínas relacionadas con posibles mecanismos de acción, una reducción del 50% en la expresión de la “Proteína ribosomal 30S, S16” y una reducción a un 40% en el “factor de elongación alfa 1” sugiere posibles mecanismos basados en la reducción en la producción de proteínas viables, la presencia de aumento en la expresión de dos proteínas de

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

membrana (Lipoproteína LPS de ensamblaje de LptE y la CDP-diacilglicerol pirofosfatasa) sugieren daño a nivel de la misma por lo que se aumentan las proteínas relacionadas con estabilidad y reparación de la misma.

Tratamiento con S-Carvona:

De las 25 proteínas identificadas, 7 se expresan en este tratamiento, y solo dos de ellas se expresan de manera única como reacción a este tratamiento (anexo 7). De estas se aislaron 5 proteínas relacionadas de forma general con procesos de integridad y mantenimiento de proteínas y membrana mitocondrial, resaltando la presencia de la “Proteína de choque térmico de 60 kDa” la cual se expresa en condiciones de estrés en la matriz y se aumentó su expresión 3,5 veces. Demostrando así un alto grado de afectación siendo necesaria la intervención de la peroxiredoxina-6 proteína de protección contra estrés oxidativo. Por último, la presencia del “Factor de iniciación de la traducción IF-2” de forma reducida demuestra efectos en la síntesis adecuada de proteínas.

Tratamiento con Citronelal:

De las proteínas identificadas, 7 de ellas presentaban expresión diferencial al tratamiento con citronelal, mientras que solo 4 de ellas se expresan de forma única en este tratamiento (anexo 8). Se encontraron dos proteínas relacionadas con procesos de síntesis de proteína y calidad de las mismas (Timidilato quinasa, Proteína de choque térmico de 60 kDa), junto con una proteína de biosíntesis de AMP (probable Adenilosuccinato sintetasa) se sobre expresan de manera única en este tratamiento. Se encontró una proteína mitoribosomal (proteína ribosomal 30S, S16) con expresión reducida a un 40%, esta proteína está implicada en procesos de maduración del ribosoma y suprimen las mutaciones en este en ribosomas tradicionalmente activos lo que sugiere un posible

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

mecanismo de acción. De igual forma se encontró reducida la expresión de dos proteínas relacionadas con la integridad de la membrana (CDP-diacilglicerol pirofosfatasa, Lipoproteína LPS de ensamblaje de LptE) posibilitándolas como otros medios de acción de este tratamiento.

Tratamiento con mezcla de los tres CM:

Se encontraron 13 proteínas con expresión diferenciada en el tratamiento con la mezcla de los tres CM, siendo 9 de estas de única expresión en este tratamiento (anexo 9), demostrando la actividad sinérgica de sus compuestos puesto que en los tratamientos individuales no se aprecia expresión diferenciada en ninguna de ellas. Se encontró una proteína aumentada relacionada con la integridad de membrana estando esto relacionado con encontrado en los tratamientos individuales. Hay que resaltar la presencia de 8 proteínas relacionadas con la producción de proteínas, desde la expresión aumentada de la unidad ribosomal (proteína ribosomal 30S, S3), hasta las diversas proteínas que intervienen en el proceso traduccional y postraduccional (Argininosuccinato sintasa, ARN polimerasa dirigida por ADN-mitocondrial, Chaperón de ARN ProQ, Prolina - tRNA ligasa y la Factor de elongación de la transcripción). Se clasificaron como posibles mecanismos de acción a tres de las proteínas encontradas, dos de ellas relacionadas con la biosíntesis de proteínas (Factor de iniciación de la traducción IF-2 y el factor de elongación alfa 1). Se encontró una fuerte reducción en la expresión de la Citocromo P450 siendo esta de tan solo el 30% comparada con el control.(Borrero et al., 2017).

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

8. Conclusiones

Los resultados del presente estudio sobre el efecto larvicida de compuestos mayoritarios de aceites naturales individuales y en su mezcla, acusaron un efecto sinérgico en la mortalidad de larvas, determinando una CL_{50} de 43,58 ppm y la CL_{95} de la misma en 64,53 ppm, demostrando una reducción en la proporción individual de cada CM en un 61,35% en relación con la mezcla.

Se realizaron los procedimientos correspondientes para el análisis del perfil proteico expresado por cada tratamiento y el control negativo con el propósito de identificar las variaciones causadas por la exposición a estos xenobióticos, de acuerdo con esto se encontraron un promedio de 16 proteínas con expresión diferenciada por cada tratamiento, de estas se seleccionaron 11 que comparten expresión diferenciada en más de un tratamiento (Tabla 3 y figura 6).

Por otra parte, se demostró el efecto sinérgico entre los tres compuestos, al observar la expresión de la proteína número 1. Se puede apreciar la expresión de esta proteína en rangos normales en los tratamientos con R-Limoneno y Citronelal, mientras que en S-Carvona se observa un aumento de 2,8 veces, y al revisar la expresión de esta proteína en el tratamiento con la mezcla se observa un aumento de 4.2 veces, lo que demuestra que aunque los compuestos R-Limoneno y Citronelal no presentan un efecto por sí solos, son capaces de mejorar la actividad producida por S-Carvona al estar presentes los tres compuestos, por lo cual podemos inferir que esta proteína se puede encontrar relacionada con el posible mecanismo de acción tanto del citronelal como de la mezcla de los tres compuestos. Específicamente se encontraron 9 proteínas con expresión diferenciada

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

únicamente en la mezcla lo que demuestra un efecto sinérgico de amplio alcance. Hacen falta llevarse a cabo más pruebas para poder determinar esto.

Finalmente podemos mencionar que las 11 proteínas enumeradas en la tabla 3, 7 de ellas están indudablemente relacionadas con algunos de los principales procesos afectados por los tratamientos, una proteína de estabilidad de la membrana mitocondrial (proteína 2), la proteína 1 con la estructura ribosomal y traducción de proteínas, y demostrando un efecto sinérgico ya que se ve alterada en mayor medida en la mezcla, la proteína 7 con actividad detoxificante y demostrando un efecto potenciador de la actividad insecticida, ya que no se ve alterada en la mezcla lo que sugiere una inhabilidad para defenderse por parte del insecto. y 4 proteínas (4, 5, 10 y 11) relacionadas con los diversos mecanismos de acción en mitocondrias de larvas de *Ae. aegypti* tratadas con los metabolitos R-limoneno, S-carvona y citronelal o su mezcla. Demostrando que los métodos estudiados en este trabajo aumentan el panorama de identificación de los efectos causados a la exposición a los diferentes compuestos mayoritarios.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Referencia Bibliograficas

- Abbassy, M. A., Abdelgaleil, S. A. M., & Rabie, R. Y. A. (2009). Insecticidal and synergistic effects of *Majorana hortensis* essential oil and some of its major constituents. *The Netherlands Entomological Society*, 225–232. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00854.x>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1999). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons, U.S. Department of health & amp; Human services, public health service, agency for toxic substances and disease registry, Washington, D.C., august, 1985. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology*, 18(2), 141–147. <https://doi.org/10.3109/15569529909037564>
- Andrade-Ochoa, S., Sánchez-Torres, L. E., Nevárez-Moorillón, G. V., Camacho, A. D., & Noguera-Torres, B. (2017). Aceites esenciales y sus componentes como una alternativa en el control de mosquitos vectores de enfermedades. *Biomedica*, 37(Supl 2), 24–243. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.347>
- Badii, M. H., & Garza Almanza, V. (2007). Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. *CULCyT//Impacto Ecologico*, 18(4), 9–25.
- Borrero-Landazabal, M. A., Duque, J. E., & Mendez-sanchez, S. C. (2020). Insecticide design using in silico and in vivo analysis of different pharmacological targets in *Aedes aegypti*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 108664. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108664>

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

- Borrero, M. A., Carreño, A. L., & Kouznetsov, V. V. (2017). Alterations of mitochondrial electron transport chain and oxidative stress induced by alkaloid-like α -aminonitriles on *Aedes aegypti* larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 11(November), 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.11.006>
- Cancino-rodezno, A., Lozano, L., Oppert, C., Castro, J. I., Lanz-mendoza, H., Jurat-fuentes, J. L., Evans, A. E., Gill, S. S., Sobero, M., & Encarnacio, S. (2012). Comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037034>
- Carreño, A. L., Vargas, L. Y., Duque L., J. E., & Kouznetsov, V. V. (2014). Design , synthesis , acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girsensohnine analogs on *Aedes aegypti* , vector of dengue fever. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 78, 392–400.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.067>
- Castillo-morales, R. M., Carreño, A. L., Mendez-sanchez, S. C., Antônio, M., Da, N., Stashenko, E. E., & Duque, J. E. (2019). Mitochondrial affectation , DNA damage and AChE inhibition induced by *Salvia officinalis* essential oil on *Aedes aegypti* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 221(December 2018), 29–37.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.03.006>
- CENAPRECE. (n.d.). Guía para la instalación y mantenimiento del insectario de *Aedes aegypti*. *Secretaría de Salud de México*, 1–29.
- Chen, J., Hung, C., Keller, J. J., Lin, H., & Wu, Y. (2019). Proteomic analysis of retinal pigment epithelium cells after exposure to UVA radiation. *BMC Ophthalmology*, 1–13.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Chen, M., Chang, C.-H., Tao, L., & Lu, C. (2015). Residential exposure to pesticide during childhood and childhood cancers: A meta-analysis. *Pediatrics*, *136*(4), 719–729.

<https://doi.org/10.1542/peds.2015-0006>

Colindres, D. M., & Cerna, E. F. (2012). Organización de una colonia de *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) para estudios de resistencia a pesticidas. *Revista Portal de La Ciencia*, *2*(March 2015).

Conde, M., Orjuela, L. I., Castellanos, C. A., & Herrera-varela, M. (2015). Evaluación de la sensibilidad a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) del departamento de Caldas , Colombia , en 2007 y 2011. *Biomédica*, *35*, 43–52.

De la Cruz, C. M., Rodríguez, C., & Ocaña, F. J. (2014). Susceptibilidad y resistencia a insecticida en mosquito transmisor del dengue. *Salud En Tabasco*, *20*(2), 54–59.

Dias, C. N., & Moraes, D. F. C. (2014). Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. *Parasitology Research*, *113*(2), 565–592.

<https://doi.org/10.1007/s00436-013-3687-6>

Duque Lizarazo, F. M. (2017). Diseño de un insecticida a partir de metabolitos secundarios de plantas de la familia piperaceae que afecten la bioenergética mitocondrial del mosquito *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae). *Tesis*, 1–82.

Ekert, E. Van, Heylen, K., Rougé, P., Powell, C. A., Shatters, R. G., Smagghe, G., & Borovsky, D. (2014). *Aedes aegypti* juvenile hormone acid methyl transferase , the ultimate enzyme in the biosynthetic pathway of juvenile hormone III , exhibits substrate control. *JOURNAL OF*

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

INSECT PHYSIOLOGY, 64, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.03.001>

Games, P. D., Alves, S. N., Katz, B. B., Tomich, J. M., & Serrão, J. E. (2016). Differential protein expression in the midgut of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes induced by the insecticide temephos. *Medical and Veterinary Entomology*, 11.

<https://doi.org/10.1111/mve.12172>

Garfin, D. E. (2003). Two-dimensional gel electrophoresis: An overview. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(5), 263–272. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00506-5](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00506-5)

Gnankiné, O., & Bassolé, I. H. N. (2017). Essential oils as an alternative to pyrethroids ' resistance against Anopheles species complex giles. *Molecules*, 22.

<https://doi.org/10.3390/molecules22101321>

Hilal-Dandan, R., & Brunton, L. (2014). *Goodman & Gilman Manual de farmacologia y terapeutica 12a dicion*. McGrawHill. isbn: 9786071512154

Id, P. V., Venkatesan, R., Ramkumar, G., & Karthi, S. (2018). Comparative analysis of major mosquito vectors response to seed-Derived essential oil and seed pod-derived extract from *Acacia nilotica*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(388), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijerph15020388>

Ishak, I. H., Kamgang, B., Ibrahim, S. S., Riveron, J. M., Irving, H., & Wondji, C. S. (2017). Pyrethroid resistance in Malaysian populations of dengue vector *Aedes aegypti* is mediated by CYP9 family of cytochrome P450 genes. *PLoS ONE*, 1–20.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005302>

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

- Ishak, I. H., Riveron, J. M., Ibrahim, S. S., & Stott, R. (2016). The Cytochrome P450 gene CYP6P12 confers pyrethroid resistance in *kdr*-free Malaysian populations of the dengue vector *Aedes albopictus*. *Nature Publishing Group, April*, 1–13.
<https://doi.org/10.1038/srep24707>
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *ELSEVIER, 19*, 603–608. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00079-X)
- Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszowska, J., & Stankiewicz, M. (2018). Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system — A Review. *Molecules*, 1–20.
<https://doi.org/10.3390/molecules23010034>
- Koul, O., Walia, S., & Dhaliwal, G. S. (2008). Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. *Biopesticides International, 4*(1), 63–84. <https://doi.org/0973-483X/08/63-84>
- Kwiatkowski, P., Pruss, A., Grygorcewicz, B., Wojciuk, B., Dołęgowska, B., Giedrys-Kalemba, S., Kochan, E., & Sienkiewicz, M. (2018). Preliminary study on the antibacterial activity of essential oils alone and in combination with gentamicin against extended-spectrum β -lactamase-producing and new delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Microbial Drug Resistance, 00*(00), mdr.2018.0051.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0051>
- Lei, C., & Sun, X. (2018). Comparing lethal dose ratios using probit regression with arbitrary slopes. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 1–10.
- Leyva, M., French, L., Pino, O., Montada, D., Morejón, G., & Marquetti, M. del C. (2017).

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Plantas con actividad insecticida : una alternativa natural contra mosquitos. Estado actual de la temática en la región de las Americas. *Biomed*, 28(3), 89–115.

Leyva, M., Tacoronte, J. E., Marquetti, M. del C., Scull, R., Montada, D., Rodríguez, Y., & Bruzón, R. Y. (2008). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev Cubana de Med Trop*, 60(1), 78–82.

Liao, M., Xiao, J., Zhou, L., Liu, Y., Wu, X., Hua, R., Wang, R., & Cao, H. (2016). Insecticidal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and RNA-seq analysis of *Sitophilus zeamais* transcriptome in response to oil fumigation. *PLOS One*, 1–19.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167748>

Lindgren, D. L., Sinclair, W. B., & Vincen'f, L. E. (1968). Residues in raw and processed foods resulting from post-harvest insecticidal treatments By. *Residue Reviews / Rückstands-Berichte*.

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advance Drug Delivery Reviews*, 46, 3–26.

Liu, C. H., Mishra, A. K., Tan, R. X., Tang, C., Yang, H., & Shen, Y. F. (2005). Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. *Bioresource Technology*, 97, 1969–1973. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.09.002>

Maestre, R., Rey, G., De Las Salas, J., Vergara, C., Santacoloma, L., Goenaga, S., &

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

- Carrasquilla, M. C. (2010). Estado de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* a insecticidas en Atlántico (Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, 36(36), 242–248.
- Maggi, M. E. (2004). Insecticidas Naturales Riesgos y Beneficios. *Agencia Cordoba Ciencia-Unidad CEPROCOR*, 1, 1–9.
- Mano, C., Jariyapan, N., Sor-Suwan, S., Roytrakul, S., & Kittisenachai, S. (2019). Protein expression in female salivary glands of pyrethroid - susceptible and resistant strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & Vectors*, 12, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3374-2>
- Marinotti, O., Ngo, T., Kojin, B. B., Chou, S., Nguyen, B., Juhn, J., Carballar-lejarazú, R., Marinotti, P. N., Jiang, X., Walter, M. F., Tu, Z., Gershon, P. D., & James, A. A. (2014). Integrated proteomic and transcriptomic analysis of the *Aedes aegypti* eggshell. *BMC Developmental Biology*, 1–11.
- McHugh, mary L. (2011). Multiple comparison analysis testing in ANOVA. *Biochemia Medica*, 21(2), 203–209.
- Metcalf, R. L. (1955). Basis for insect resistance to insecticides. *American Physiological Society*, 35, 197–232.
- Morais F, K., Magallanes, M. J., Baracat-pereira, M. C., & Ferreira M, G. (2016). Proteomic analysis of *Aedes aegypti* midgut during post-embryonic development and of the female mosquitoes fed different diets. *Parasitology International*. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.08.008>

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

- Muñoz V., J. A., Staschenko, E., & Ocampo D., C. B. (2014). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 40(2), 198–202.
- Murray, R. K., Kennelly, P. J., Bender, D. A., Rodwell, V. W., Botham, K. M., & Weil, P. A. (2013). *Harper Bioquímica ilustrada 29ª Edición*.
- Muturi, E. J., Ramirez, J. L., Zilkowski, B., Flor-Weiler, L. B., & Rooney, A. P. (2018). Ovicidal and larvicidal effects of garlic and asafoetida essential oils against west Nile virus vectors. *Journal of Insect Science (Online)*, 18(2), 0–5. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iey036>
- Naqqash, M. N., Gökçe, A., Bakhsh, A., & Salim, M. (2016). Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitology Research*, 115(4), 1363–1373. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4898-9>
- Nauen, R. (2007). Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science*, 1106(December 2006), 1100–1106. <https://doi.org/10.1002/ps.1406>
- Norris, E. J., Johnson, J. B., Gross, A. D., Bartholomay, L. C., & Coats, J. R. (2018). *Plant essential oils enhance diverse pyrethroids detoxification enzyme processes*. 1–20. <https://doi.org/10.3390/insects9040132>
- Orjuela, L. I., Morales, J. A., Ahumada, M. L., Rios, J. F., González, J. J., Yañez, J., Rosales, A., Cabarcas, D. M., Venegas, J., Yasnot, M. F., & Quiñones, M. L. (2018). Insecticide resistance and its intensity in populations of Malaria vectors in Colombia. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9163543>

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Paredes, J. (2003). Manual practico para la deteccion electroforetica de isoenzimas y otras proteinas. *Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT*, 1, 280.

Pavela, R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 174–187.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.050>

Pavela, R., & Benelli, G. (2016). Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends in Plant Science*, 21(12), 1000–1007.

<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>

Popova-butler, A., & Dean, D. H. (2009). Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. *Journal of Insect Physiology Journal*, 55, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.12.008>

Porfírio, E. M., Melo, H. M., Pereira, A. M. G., Cavalcante, T. T. A., Gomes, G. A., De Carvalho, M. G., Costa, R. A., & Catunda, F. E. A. (2017). In vitro antibacterial and antibiofilm activity of *Lippia alba* essential oil, citral, and carvone against *Staphylococcus aureus*. *Scientific World Journal*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/4962707>

Powell, J. R., Gloria-Soria, A., & Kotsakiozi, P. (2018). Recent history of *Aedes aegypti* : vector genomics and epidemiology records. *Bioscience*, 68(11), 854–860.

<https://doi.org/10.1093/biosci/biy119>

Regnault-Roger, C., Vincent, C., & Arnason, J. T. (2012). Essential oils in insect control: Low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomology*, 57(1), 405–424.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100554>

Santacoloma Varón, L., Chaves Córdoba, B., & Brochero, H. L. (2010). Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT , deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. *Panam Salud Publica*, 27(1), 66–73.

Sarkar, M., Akulwad, A., Kshirsagar, R., & Muthukrishnan, S. (2018). Comparative bio-efficacy and synergism of new generation polyfluorobenzyl and conventional pyrethroids against *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae). *Journal of Economic Entomology*, XX(April), 1–6. <https://doi.org/10.1093/jee/toy100>

Seo, S., Jung, C. S., Kang, J., Lee, H. R., Kim, S. W., Hyun, J., & Park, I. (2015). Larvicidal and acetylcholine esterase inhibitory activity of Apiaceae plant essential oils and their constituents against *Aedes albopictus* , and formulation development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10–35. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03586>

Short, S. M., Van Tol, S., Smith, B., Dong, Y., & Dimopoulos, G. (2018). The mosquito adulticidal *Chromobacterium sp.* Panama causes transgenerational impacts on fitness parameters and elicits xenobiotic gene responses. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2822-8>

Thomson, M., & Vijan, A. (2016). Environmental friendly bio-pesticides : A Review. *Journal of Agriculture and Allied Sciences*, 5(2), 31–39.

Ujcikova, H., Kristina, C., JAGR, M., Roubalova, L., Vosahlikova, M., & Svoboda, P. (2020).

Proteomic analysis of protein composition of rat hippocampus exposed to morphine for 10

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

days ; comparison with animals after 20 days of morphine withdrawal. *PLoS ONE*, 1–25.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231721>

Vera, S. S., Zambrano, D. F., Méndez-Sánchez, S. C., Rodríguez-Sanabria, F., Stashenko, E. E., & Duque Luna, J. E. (2014). Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 113(7), 2647–2654.

<https://doi.org/10.1007/s00436-014-3917-6>

Vicenzi, E., Pagani, I., Ghezzi, S., Taylor, S. L., Rudd, T. R., Lima, M. A., Skidmore, M. A., & Yates, E. A. (2018). Subverting the mechanisms of cell death : flavivirus manipulation of host cell responses to infection. *PORTLAND PRESS*, 1–9.

<https://doi.org/10.1042/bst20170399>

Waliwitiya, R., Nicholson, R. A., Kennedy, C. J., Lowenberger, A., Waliwitiya, R., Nicholson, R. A., Kennedy, C. J., & Lowenberger, C. A. (2012). The synergistic effects of insecticidal essential oils and piperonyl butoxide on biotransformational enzyme activities in *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). *BioOne*, 49(3), 614–623.

World Health Organization. (2017a). Número de casos reportados de chikungunya en países o territorios de las Américas 2017 (por semanas) Casos acumulados Semana Epidemiológica. *World Health Organization*, 2017, 6524.

World Health Organization. (2017b). Zika - Actualización epidemiológica. *World Health Organization*, 1–5.

World Health Organization, P. A. H. O. (2017c). Number of Reported Cases of Dengue and

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country: Figures for 2016. *World Health Organization*, 2016, 0–2.

World Health Organization, P. A. H. O. (2020). Actualización epidemiológica dengue 2019. *World Health Organization*, 1–21.

Yañiquez Vedia, J., Huanca, S., Tejada, L., Aliaga- Rossel, E., Peñarrieta, M., & Mollinedo, P. (2019). Determination of the temperature, pH and concentration parameters for α -amilasa mg a new enzyme. *REVISTA BOLIVIANA DE QUÍMICA*, 36, 51–59.
<https://doi.org/10.34098/2078-3949.36.1.5>

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Apéndices

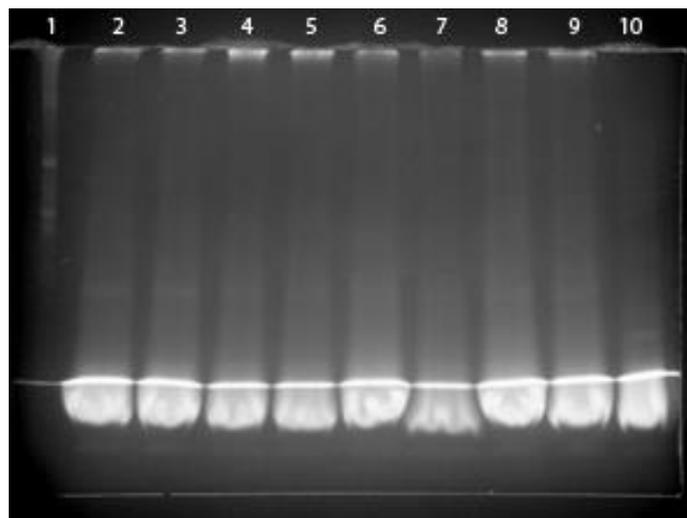
Apéndices 1. Composición de mezclas diagnosticas

	Proporción	Concentración (ppm)			% M ± DS 24h
		R-limoneno	S-carvona	Citronelal	
	CL ₅₀	9,86	62,50	40,50	100 ± 0
1	1:1:1	4,93	31,25	20,25	100 ± 0
2	1:1:0,5	4,93	31,25	10,13	91,11 ± 1,1
3	1:0,5:1	4,93	15,63	20,25	88,89 ± 2,0
4	0,5:1:1	2,47	31,25	20,25	91,11 ± 1,5
5	0,5:0,5:1	2,47	15,63	20,25	73,33 ± 1,7
6	0,5:1:0,5	2,47	31,25	10,13	71,11 ± 0,5
7	1:0,5:0,5	4,93	15,63	10,13	71,11 ± 1,5
8	Control -	0	0	0	0 ± 0
9	Control +	Temefos 0.005			100 ± 0

Nota. composición de cada mezcla estudiada y resultados de mortalidad obtenidos por cada una. Kruskal-Wallis test: H (7, N= 24) p=0,02

Apéndices 2. Comparación entre dos métodos de homogenización vs congelamiento en gel al 12% de acrilamida.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES



Nota. Comparación de métodos de extracción: 1- marcador de peso moléculas, 2 y 3- extracción con perlas, 4 y 5- extracción con perlas y congelamiento con nitrógeno líquido, 6 y 8- extracción con Van-Potter, 9 y 10- extracción con Van-Potter y nitrógeno, el poso 7 se omitió debido a deformidad en el poso.

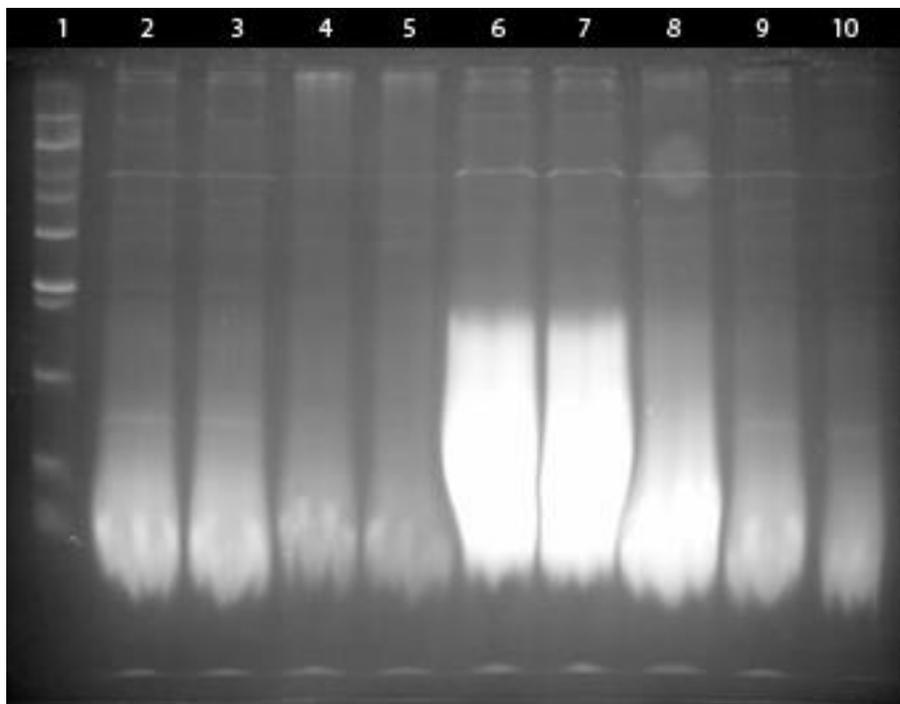
Apéndice 3. Variación del buffer de lisis

Buffer	Urea (M)	Tiourea (M)	triton x100 (%)	Chaps (%)	Farmalitos (%)	DTT (mM)	SDS (%)	Tris (mM)	Ortovanadato (mM)	PMSF (mM)	EDTA (mM)	cocktail inhibidor
A	7	2	0,5	4	1,20	20	0,5					
B	7	2	0,5	4	1,20	20	0,5		0,5	1	1	
C	10	3	1,0	4	2,00	150	0,5	40	2	2	2	
B.2	7	2	0,5	4	1,20	20	0,5	30	0,5	1	1	1 X
D	7	2	0,5	4	1,20	20	0,5	30	1	1	1	2 X
E	7	2	0,5	4	1,20	20	0,5	30	1	1	1	3 X
F	7	2	0,5	4	1,20	20	0,5	100	1	1	1	5 X
G	7	2	0,5	4	1,20	20	0,5	100	1	1	1	10 X

Nota. Composición de los diferentes buffers de lisis probados para extracción de proteínas de larva total de *Aedes aegypti*.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Apéndices 4. Comparación 100 larvas 2x vs 500 larvas 10x en gel al 15% de acrilamida



Nota. Electroforesis, posos: 1- marcador de peso, 2 y 3- buffer D 100 larvas sin calentar, 4 y 5- buffer D 2x 100 larvas calentado a 60°C por 5 minutos, 6 y 7- buffer G 10X 500 larvas sin calentar, 8- buffer G 10X 500 larvas calentado a 60°C por 5 minutos, 9 y 10- buffer D 100 larvas sin calentar prueba 2 horas a temperatura ambiente.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes Aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Apéndice 5. Tabla de resumen de proteínas de interés dependiendo del tipo de análisis (en base a control o a mezcla).

ID	Protein	Control			Mezcla			Promedio		
		Mezcla	S-Carvona	R-Limoneno	Citronelal	S-Carvona	R-Limoneno	Citronelal	PI	WM
1	201	4,2	2,8	0,9*		0,3	0,6		3,4	23,0
12	1001	1,6*	2,0*	1,5*	0,3	0,2	0,8*	2,6*	5,0	13,0
13	1101	1,0*	2,0	1,3*	1,1*	1,9	1,6*	0,6	4,5	24,6
2	1102	1,7*	2,0	1,7	0,6*	0,9*	1,0*	0,1	4,9	24,4
14	1202	1,0*	1,1*	1,0*	0,9*	0,1*	0,1	1,1*	4,8	21,4
15	1204	1,3*	2,6*	1,3*	1,2*	0,4*	0,4	0,3*	3,9	20,4
16	1401	1,1*	0,8*	0,6	2,3	0,2	0,6	1,0*	4,6	31,4
3	1402	1,2	0,5	1,2*	1,7	0,2*	0,3*	0,8*	5,0	35,8
4	1403	0,4	0,5	0,6	0,8*	0,6*	3,1	1,7*	5,0	36,1
17	1602	1,0*	3,0*	1,0*	4,2	0,4	1,6*	3,4	3,9	29,0
18	1701	1,3*	3,1*	1,3*	2,2	0,3*	0,4*	0,5	3,6	40,3
19	2102	1,5*	3,5	2,1*	0,8*	1,2	1,3*	0,1	5,2	23,8
5	2103	0,8*	2,7	1,8	0,4	1,4*	3,0	1,0*	5,7	20,7
20	2202	0,6*	1,8*	0,9*	0,6*	0,5	0,5	1,3*	4,8	20,9
21	2303	1,1*	0,9*	0,8*	0,6	0,3	0,8	0,4	4,8	24,9
6	2401	0,4	0,4	0,8*	1,3	1,6*	0,3*	0,8*	5,5	36,9
22	2701	1,0*	0,5*	0,8*	1,5	0,5*	1,4*	0,8*	5,4	37,5
23	3001	0,4*	0,9*	2,3	0,6	1,4*	9,1	1,6*	5,5	11,4
7	3102	1,7*	2,1	2,0	1,5*	0,3*	0,6*	1,1*	5,2	24,9
59	3201	0,9*	0,9*	0,9*	1,1*	0,3*	0,7*	0,4	5,6	20,4
24	3301	0,8	1,7*	0,8*	1,1*	0,3	1,3*	0,8	5,5	42,8
25	3303	1,4*	1,4*	0,9*	0,8*	1,2	0,6	0,7	6,0	23,5
26	3304	1,5*	1,6*	3,1	0,8*	1,5*	1,8*	1,0*	6,0	26,4
27	3402	1,5*	1,4*	0,8*	0,8*	1,0*	4,2*	0,1	5,2	28,0
28	3502	0,8*	0,8*	1,4*	0,9*	0,3	1,8*	0,4*	6,0	27,3
29	3503	0,8*	0,7*	1,0*	0,8*	2,5*	2,3	0,3	5,3	29,2
30	3601	1,1	1,5*	1,4*	1,1*	0,9*	3,0*	2,1	6,0	49,5
31	3607	1,4*	0,7*	0,8*	2,1	1,0	2,6*	1,0*	5,3	30,1
32	3802	0,8*	2,7*	1,3*	2,7	0,3*	0,9*	1,5*	5,4	51,2
33	4201	1,2*	1,7*	0,8*	0,8*	1,5	1,2*	0,6	6,1	21,4
34	4501	0,6*	0,5*	0,8*	1,8*	1,3*	3,1*	1,8*	6,2	40,8

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE Aedes Aegypti BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

35	4602	1,0*	0,7*	0,8*	0,7*	0,1*	0,5	1,3*	5,9	29,0
8	4701	0,5	0,5*	1,1*	1,6	0,3	1,3	0,4	5,8	37,8
36	5102	2,1	1,9*	1,2*	0,5*	0,1	0,2	0,6*	5,9	34,0
37	5304	1,9	0,5*	1,0*	1,5*	0,1	0,1*	0,5*	6,1	43,8
38	5402	1,0*	1,2*	1,0*	1,1*	0,1	1,6*	0,2	6,0	26,7
39	5403	10,0*	2,1*	1,4*	1,3*	0,2	0,5	0,8*	6,1	26,4
40	5501	0,4	2,0*	1,4*	1,2*	1,7*	1,3*	0,6	6,5	44,9
41	5601	0,4	1,0*	1,2*	1,1*	0,1	1,5*	1,4*	7,1	42,3
9	5802	5,8	6,5*	1,0*	2,6	0,2	2,2*	1,7*	6,3	59,7
10	6201	0,9*	1,1*	2,7	0,4	3,2	6,3	2,8	7,7	25,3
42	6401	0,6*	1,0*	1,2*	1,4*	3,1	5,4	3,2	7,3	27,3
43	6403	0,8*	1,5*	1,0*	1,1*	0,0	0,2*	1,3*	6,1	26,7
44	6502	0,3	1,6*	1,2*	1,4*	0,4	1,0*	0,4*	7,0	44,7
45	6702	0,9*	0,6*	1,0*	1,8	0,5*	2,5*	1,4*	7,8	45,8
46	6706	0,3	2,2*	0,7*	0,8*	5,0*	3,2*	1,1*	7,0	50,6
47	6804	1,5	0,7*	1,0*	0,9*	0,9*	0,3*	2,6*	7,4	67,8
48	6809	0,4	2,6*	1,3*	1,0*	1,8*	3,0*	4,4	7,0	64,9
49	7201	0,8*	1,3	1,0*	0,9*	1,2*	1,5*	0,5	8,0	28,3
11	7301	0,5	1,1*	0,4	1,1*	0,4	0,5	0,0	7,8	35,8
50	7303	0,4	0,6*	0,9*	0,9*	1,9	4,1	1,5	8,0	42,5
51	7602	1,5	1,5*	0,6*	0,6*	6,0	4,2*	1,1*	7,4	46,5
52	7701	1,1*	0,6*	0,5	0,9*	1,2	3,5	1,1*	7,9	43,2
53	7801	2,7	1,1*	1,0*	0,6*	0,2*	1,1*	1,4*	7,4	50,8
54	8201	0,7*	1,1*	0,6*	0,6*	0,9*	0,9	0,3	8,6	21,4
55	8401	0,6*	0,8*	1,1*	1,0*	0,8*	2,0	4,5	8,2	25,1
56	8402	1,0*	1,0*	0,6	0,6	7,8	7,3*	0,1	7,8	29,7
57	8601	1,6*	4,5*	0,6*	0,6*	0,1	0,7*	1,3*	8,2	22,5
58	8803	0,4	0,8*	1,1*	1,8*	0,4*	1,1*	1,1*	8,0	49,0
61	9003	0,7*	0,8*	1,2*	0,9*	0,8*	2,5	1,7*	8,8	10,5
60	9102	0,5*	1,0*	1,4*	0,4	2,1	2,7*	0,3*	9,5	20,4

Nota. letra roja: proteínas que no son de interés en este análisis; Resaltado: proteínas de interés; si la proteína no aparece resaltada pero cumple con el valor numérico para inclusión, se descartaron debido a que el análisis no paso las pruebas de normalidad efectuadas implementando el programa PDQuest. El punto isoeléctrico (PI) se estimó teniendo en cuenta la posición relativa del spot en cada gel.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Apéndice 6. Tabla de expresión diferenciada de proteínas relevantes solo en R-Limoneno.

ID Protein	Control				Blast protein	% Identificación
	Mezcla	S-Carvona	R-Limoneno	Citronelal		
26 3304	a	a	3,1	a	Probable factor de elongación 2 isoforma X2 [Aedes aegypti]	35,95*
2 1102	a	2,0	1,7	a	Proteína similar a la cinesina KIF13A isoforma X5 [Aedes aegypti]	37,4*
7 3102	a	2,1	2,0	a	Peroxiredoxina-6 [Aedes aegypti]	60,55
5 2103	a	2,7	1,8	0,4	CDP-diacilglicerol pirofosfatasa [Serratia fonticola]	56,43
10 6201	a	a	2,7	0,4	Lipoproteína LPS de ensamblaje de LptE [Serratia fonticola]	52,35
11 7301	0,5	a	0,4	a	Factor de elongación alpha 1 [Aedes aegypti]	53,67
52 7701	a	a	0,5	a	Proteína ribosomal 30S, S16 [Wolbachia endosimbiosis de Aedes albopictus]	68,75

Transcripción y traducción

Membrana

Detoxificante

Mecanismo de acción

Nota. () proteínas para corroboración de identidad.*

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Apéndice 7. Tabla de expresión diferenciada de proteínas relevantes solo en S-Carvona.

ID Protein	Control				Blast protein	% Identificación	
	Mezcla	S-Carvona	R-Limoneno	Citronelal			
13	1101	a	2,0	a	a	Proteína desacoplante mitocondrial 2 [Aedes aegypti]	55,02
19	2102	a	3,5	a	a	Proteína de choque térmico de 60 kDa, mitocondrial [Aedes aegypti]	52,58
2	1102	a	2,0	1,7	a	Proteína similar a la cinesina KIF13A isoforma X5 [Aedes aegypti]	37,4*
1	201	4,2	2,8	a		Proteína ribosomal 30S, S3 [Wolbachia endosimbiosis de Aedes albopictus]	40,87*
7	3102	a	2,1	2,0	a	Peroxiredoxina-6 [Aedes aegypti]	60,55
5	2103	a	2,7	1,8	0,4	CDP-diacilglicerol pirofosfatasa [Serratia fonticola]	56,43
4	1403	0,4	0,5	a	a	Factor de iniciación de la traducción IF-2, mitocondrial [Aedes aegypti]	37,24*

Complejos MITOCONDRIALES
Transcripción y traducción
Membrana
MitoRibosomas
Detoxificante
Mecanismo de acción

Nota. (*) proteínas para corroboración de identidad.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE Aedes Aegypti BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Apéndice 8. Tabla de expresión diferenciada de proteínas relevantes solo en Citronelal.

ID Protein	Control				Blast protein	% Identificación
	Mezcla	S-Carvona	R-Limoneno	Citronelal		
32 3802	a	a	a	2,7	Probable Adenilosuccinato sintetasa [Aedes aegypti]	37,04*
22 2701	a	a	a	1,5	Timidilato quinasa [Aedes albopictus]	45,83*
45 6702	a	a	a	1,8	Proteína de choque térmico de 60 kDa, mitocondrial [Aedes aegypti]	53,67
9 5802	5,8	a	a	2,6	Proteína del complejo de poros nucleares Nup107 [Aedes aegypti]*	39,02*
5 2103	a	2,7	1,8	0,4	CDP-diacilglicerol pirofosfatasa [Serratia fonticola]	56,43
10 6201	a	a	2,7	0,4	Lipoproteína LPS de ensamblaje de LptE [Serratia fonticola]	52,35
60 9102	a	a	a	0,4	Proteína ribosomal 30S, S16 [Wolbachia endosimbiosis de Aedes albopictus]	68,75

Complejos MITOCONDRIALES
Transcripción y traducción
Otros*
Mecanismo de acción

Nota. (*) proteínas para corroboración de identidad.

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

Anexo 9. Tabla de expresión diferenciada de proteínas relevantes solo en la Mezcla de los tres CM.

ID Protein	Control				Blast protein	% Identificación
	Mezcla	S-Carvona	R-Limoneno	Citronelal		
50 7303	0,4	a	a	a	Adenilato quinasa [<i>Aedes aegypti</i>]	61,24
46 6706	0,3	a	a	a	Factor de elongación de la transcripción GreA [<i>Wolbachia</i> endosimbiosis de <i>Aedes albopictus</i>]	47,1*
47 6804	1,5	a	a	a	Prolina - tRNA ligasa [<i>Wolbachia</i> endosimbiosis de <i>Aedes albopictus</i>]	55,1
51 7602	1,5	a	a	a	Chaperón de ARN ProQ [<i>Serratia fonticola</i>]	93,67
53 7801	2,7	a	a	a	ARN polimerasa dirigida por ADN, mitocondrial isoforma X2 [<i>Aedes aegypti</i>]	39,15*
53 7801	2,7	a	a	a	Argininosuccinato sintasa [<i>Aedes aegypti</i>]	44,67*
9 5802	5,8	a	a	2,6	Proteína del complejo de poros nucleares Nup107 [<i>Aedes aegypti</i>]*	39,02*
41 5601	0,4	a	a	a	Proteína del complejo de poros nucleares Nup107 [<i>Aedes aegypti</i>]*	39,02*
37 5304	1,9	a	a	a	Subunidad de translocasas de membrana interna de importación mitocondrial Tim17-A isoforma X2 [<i>Aedes albopictus</i>]	70,78
1 201	4,2	2,8	a		Proteína ribosomal 30S, S3 [<i>Wolbachia</i> endosimbiosis de <i>Aedes albopictus</i>]	40,87*
4 1403	0,4	0,5	a	a	Factor de iniciación de la traducción IF-2, mitocondrial [<i>Aedes aegypti</i>]	37,24*
11 7301	0,5	a	0,4	a	Factor de elongación alpha 1 [<i>Aedes aegypti</i>]	53,67

PERFIL PROTEICO MITOCONDRIAL EN LARVAS DE *Aedes aegypti* BAJO PRESIÓN CON XENOBIÓTICOS NATURALES

44	6502	0,3	a	a	a	Citocromo P450 [<i>Aedes aegypti</i>]	29,38*
-----------	------	-----	---	---	---	---	--------

Complejos MITOCONDRIALES
Transcripción y traducción
Otros
Membrana
MitoRibosomas
Mecanismo de acción

Nota. () proteínas para corroboración de identidad.*