

Determinación del perfil de proteínas odorantes y detección de señales electroantenográficas ante estimulación por moléculas repelentes en el sistema olfativo de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Johan Sebastián Portilla Pulido
Título a optar: Maestría en Química

Director del trabajo de investigación:
Jonny Edward Duque Luna, Ph.D
Doctor en Ciencias Biológicas con énfasis en Entomología Médica

Directora del trabajo de investigación:
Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D
Doctora en Ciencias Bioquímicas

Codirectora del trabajo de investigación:
María Carolina Velásquez Martínez, Ph.D
Doctora en Fisiología

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Maestría en Química
Bucaramanga
2021

Dedicatoria

Dedico este trabajo a todas las personas que me han acompañado en mi ejercicio profesional como químico y que estuvieron presentes durante el desarrollo de mi maestría. En especial, a aquellos que estuvieron en la fase culminante de mi posgrado, una etapa desafiante y llena de emociones mezcladas. A todos ellos, muchas gracias por acompañarme en esta parte tan importante de mi vida.

Johan Sebastián Portilla Pulido

“A hombros de gigantes”

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a Dios y a mi familia, en especial a mi madre, por brindarme la ayuda y valentía para terminar esta etapa de mi vida.

A los doctores Jonny Duque, Stelia Méndez y Carolina Velásquez, por darme la oportunidad de realizar la maestría en química y este proyecto de investigación.

A Ruth Castillo y María Fernanda Vidal, por brindarme no solo apoyo profesional, sino una mano amiga en momentos difíciles durante mi carrera profesional.

A los compañeros de los laboratorios 110 y 402 de Guatiguará por su acompañamiento durante mi pregrado y maestría.

Y en especial, a las personas que me acompañaron durante esta etapa final de la maestría, Aleja, Caro, Sebas y Sonia. Su apoyo incondicional me motiva a continuar mi camino como químico y científico.

Deseo agradecer a las personas con las que trabajé en la isla Put-in-bay, OH, United States, quienes me acompañaron durante mi sustentación y momentos difíciles en la última fase de mi maestría.

Y finalmente, a COLCIENCIAS por el financiamiento del proyecto Identificación de la actividad insecticida y/o repelente de xenobióticos mediante bioensayos y respuestas electroantenoográficas en *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* vectores del mal de Chagas, de la convocatoria 808 de 2018.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	17
1. Objetivos.....	20
1.1 Objetivo general.....	20
1.2 Objetivos específicos	20
2. Marco teórico.....	21
2.1 <i>Ae. aegypti</i> y enfermedades transmitidas por el vector.....	21
2.2 Sustancias repelentes	24
2.3 Sustancias repelentes: Acetato de geranilo, Nerolidol y α -bisabolol.....	26
2.4 Componentes de origen natural versus productos sintéticos comerciales	27
2.5 Proteínas del sistema olfativo de <i>Ae. aegypti</i>	29
2.6 Recepción de odorantes	33
2.8 Electroantenografía	36
2.9 Señales electroantenográficas	40
2.10 Estudios de proteómica enfocados en <i>Ae. aegypti</i>	43
3. Metodología.....	45
3.1 Material biológico: colonia de <i>Ae. aegypti</i>	46
3.2 Moléculas.....	46

3.3 Electroantenografía	47
3.4 Preparación del insecto para EAG y registros electroantenográficos	49
3.6 Análisis estadísticos	54
3.7 Análisis proteómico	54
3.7.1 Tratamiento de los zancudos.....	54
3.7.2 Extracción de proteína	55
3.7.3 Electroforesis bidimensional.....	56
3.7.3.1 Gel de electroforesis Isoelectroenfoque IEF	56
3.7.3.2 Equilibrio y gel de electroforesis SDS Page	57
3.7.4 Identificación y comparación de proteínas expresadas.....	58
3.7.5 Interacción proteína-proteína	59
3.8 Consideraciones éticas	59
3.8.1 Uso de animales	60
3.8.2 Manejo de sustancias químicas	61
4. Resultados.....	61
4.1 Electroantenografía	61
4.1.1 Registros de EAG de compuestos repelentes.....	61
4.1.2 Registro de EAG con diferentes mezclas de repelentes.....	67
4.1.3 Verificación de reducción de señal de EAG de amoníaco.....	73
4.1.4 Registros de EAG con aplicación simultánea de amoníaco y repelente	75

4.2 Identificación y comparación de proteínas expresadas.....	85
4.2.1 Interacción proteína-proteína:	130
5. Discusión de resultados.....	140
5.1 Electroantenografía	140
5.1.1 Registros de EAG de compuestos repelentes y mezclas de repelentes.....	141
5.1.2 Registros de EAG con aplicación simultánea de amoníaco y repelente	146
5.2 Identificación y comparación de proteínas expresadas.....	150
5.2.1 Análisis de la expresión diferencial y mecanismo de recepción: DEET vs control	152
5.2.2 Análisis de la expresión diferencial y mecanismo de recepción: Mezcla 1 vs contro	156
6. Conclusiones.....	165
7. Recomendaciones	167
Referencias bibliográficas.....	169
Apéndices.....	190

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Señales de electroantenografía (microvoltios $\pm$ desviación estándar, $\mu V \pm SEM$) de los compuestos acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol, DEET en diferentes concentraciones 0,5, 1, 10, 50 y 100 mg/mL.....	62
Tabla 2. Señales de electroantenografía (microvoltios $\pm$ desviación estándar, $\mu V \pm SEM$) de las mezclas 1, 2, 3, 4 en las concentraciones 50 y 100 mg/mL empleando un mosquito por réplica y concentración.....	68
Tabla 3. Señales de electroantenografía (microvoltios $\pm$ desviación estándar, $\mu V \pm SEM$) correspondientes al amoníaco en diferentes tiempos: inicial (0 minutos), 10, 15 y 20 minutos.	74
Tabla 4. Estímulo simultáneo atrayente (amoníaco) y repelente. Señales de electroantenografía (microvoltios $\pm$ desviación estándar, $\mu V \pm SEM$) de las sustancias acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol, DEET y las mezclas 1, 2, 3, 4 en las concentraciones 50 y 100 mg/mL	78
Tabla 5. Proteínas con expresión diferencial identificadas a través de espectrometría de masas MALDI-TOF MS correspondientes para el tratamiento con la mezcla 1.....	90
Tabla 6. Proteínas con expresión diferencial identificadas a través de espectrometría de masas MALDI-TOF MS correspondientes para el tratamiento con el repelente sintético DEET.....	96
Tabla 7. Función de cada una de las proteínas identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF MS correspondientes al tratamiento con la mezcla 1.....	102

Tabla 8. <i>Función de cada una de las proteínas identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF MS correspondientes al tratamiento con el repelente sintético DEET.....</i>	<i>115</i>
Tabla 9. <i>Lista de proteínas del diagrama de interacciones proteína-proteína realizado con el tratamiento de la mezcla 1 (acetato de geranilo, α-bisabolol, nerolidol) en concentración de 100 mg/mL.....</i>	<i>131</i>
Tabla 10. <i>Lista de proteínas del diagrama de interacciones proteína-proteína realizado con el tratamiento del repelente sintético DEET en concentración de 100 mg/mL.....</i>	<i>136</i>

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Ciclo de vida del zancudo Ae. aegypti.</i>	22
Figura 2. <i>Repelentes sintéticos utilizados en la industria</i>	24
Figura 3. <i>Sistema olfativo de Aedes aegypti.</i>	31
Figura 4. <i>Representación de los Receptores de odorantes ORs.</i>	32
Figura 5. <i>Mecanismo de recepción de odorantes en insectos</i>	34
Figura 6. <i>Representación esquemática de las sensilas en la antena del zancudo</i>	38
Figura 7. <i>Preparación del insecto para la medición de señales eléctricas por EAG para Rhodnius prolixus (insecto responsable de la transmisión del parásito Trypanosoma cruzi que causa la enfermedad de Chagas).....</i>	40
Figura 8. <i>Ejemplos de señales electrofisiológicas obtenidas para un insecto.....</i>	41
Figura 9. <i>Moléculas con actividad repelentes utilizados en los experimentos.</i>	47
Figura 10. <i>Montaje experimental para electroantenografía de zancudos.</i>	47
Figura 11. <i>Dispositivo empleado paraafilamiento electrolítico de electrodos de tungsteno.....</i>	50
Figura 12. <i>Aplicación de estímulos para obtención de señales electroantenográficas.....</i>	53
Figura 13. <i>Señales electroantenográficas y cambios porcentuales en la señal de amoniac al aplicar las sustancias repelentes</i>	64
Figura 14. <i>Patrones de señales electroantenográficos y cambios porcentuales en la señal de amoniac al aplicar las sustancias en mezcla.</i>	70

Figura 15. <i>Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en la señal de amoniaco al aplicar la mezcla 4 (acetato de geranilo y α-bisabolol).</i>	71
Figura 16. <i>Resumen de la reducción porcentual (promedio $\pm$ desviación estándar SEM) del estímulo de amoniaco en el sistema olfativo del mosquito al exponerse a las mezclas de los repelentes en las concentraciones a) 50 y b) 100 mg/mL</i>	72
Figura 17. <i>Registros de señales electroantenográficas correspondientes al amoniaco, una sustancia atrayente.....</i>	74
Figura 18. <i>Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoniaco y el repelente de forma simultánea junto con el α-bisabolol 50 mg/mL,</i>	79
Figura 19. <i>Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoniaco y el repelente nerolidol de forma simultánea.....</i>	81
Figura 20. <i>Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoniaco y el repelente sintético DEET de forma simultánea.</i>	82
Figura 21. <i>Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoniaco y la mezcla repelente 1 de forma simultánea.....</i>	83
Figura 22. <i>Resumen de la reducción porcentual del estímulo de amoniaco en el sistema olfativo del mosquito al exponerse a todas las sustancias y mezclas de los repelentes en simultáneo con el amoniaco en las concentraciones a) 50 y b) 100 mg/mL, respectivamente.....</i>	84
Figura 23. <i>Gel SDS page de una muestra de proteína de cabezas de hembras de Ae. aegypti....</i>	85

Figura 24. Geles de electroforesis bidimensional en el rango de pH de 3 a 10 correspondientes a proteínas de la cabeza de hembras de *Aedes aegypti* obtenidos para el control y el tratamiento..86

Figura 25. Diagrama de Venn de proteínas con expresión diferencial para los tratamientos con mezcla 1 y DEET 100 mg/mL.128

Figura 26. Clasificación de las proteínas según su función en la célula.128

Figura 28. Interactomas obtenidos por el software STRING teniendo en cuenta las proteínas identificadas obtenidas con el tratamiento de la mezcla 1134

Figura 29. Interactomas obtenidos por el software STRING teniendo en cuenta las proteínas identificadas obtenidas con el DEET como tratamiento.138

Figura 30. Posible interacción repelente-canal iónico A. La molécula atrayente se une a un sitio ortostérico el cual permite el paso de iones a través de la membrana, B. El mismo canal iónico posee diferentes sitios de unión, llamados sitios alostéricos, en los cuales otras moléculas pueden unirse. En el caso de los repelentes, es posible que este tipo de moléculas se una a sitios alostéricos e impida el funcionamiento adecuado del canal por un periodo de tiempo (Adaptado por Vidal M. CINTROP de: Dickens and Bohbot, 2013).....157

Figura 31. Efecto de enmascaramiento en repelentes.156

Figura 32. Posibles mecanismos de detoxificación utilizados por el mosquito mediante las enzimas aldo-ceto reductasa y glutatión-S-transferasa, proteínas sobre expresadas para el tratamiento con la mezcla.....175

Figura 33. Posible mecanismo de acción/recepción para el tratamiento con DEET.....177

Figura 34. <i>Posible mecanismo de acción/recepción para el tratamiento con la mezcla</i>	
<i>I</i>	179

Lista de apéndices

	Pág.
Apéndice A. Triplicado de geles de electroforesis bidimensional en el rango de pH de 3 a 10 correspondientes al control.....	204
Apéndice B. Triplicado de geles de electroforesis bidimensional en el rango de pH de 3 a 10 correspondientes al tratamiento con la mezcla 1	206
Apéndice C. Triplicado de geles de electroforesis bidimensional en el rango de pH de 3 a 10 correspondientes al tratamiento con el repelente sintético DEET en concentración de 100 mg/mL.....	207
Apéndice D. a) Patrones de señales electroantenográficos y cambios porcentuales en la señal de amoníaco al aplicar el compuesto acetato de geranilo, c) α -bisabolol, e) nerolidol y g) DEET.....	209
Apéndice E. Patrones de señales electroantenográficos y cambios porcentuales en la señal de amoníaco al aplicar la mezcla 2 en las concentraciones 50 y 100 mg/mL.....	210
Apéndice F. Patrones de señales electroantenográficos y cambios porcentuales en la señal de amoníaco al aplicar la mezcla 3 en las concentraciones 50 y 100 mg/mL.....	211
Apéndice G. Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoníaco y el repelente acetato de geranilo de forma simultánea.....	212
Apéndice H. Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoníaco y la mezcla repelente No. 2 de forma simultánea.	213

Apéndice I. Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoniaco y la mezcla repelente No. 3 de forma simultánea.	214
Apéndice J. Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoniaco y la mezcla repelente No. 4 de forma simultánea.....	215
Apéndice K. Análisis de proteínas con expresión diferencial a través del software PDQuest para la mezcla 1 y el DEET.....	216

Resumen

TÍTULO: DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE PROTEÍNAS ODORANTES Y DETECCIÓN DE SEÑALES ELECTROANTENOGRÁFICAS ANTE ESTIMULACIÓN POR MOLÉCULAS REPELENTES EN EL SISTEMA OLFATIVO DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

*

AUTOR: JOHAN SEBASTIÁN PORTILLA PULIDO**

PALABRAS CLAVE: Electroantenografía, Sistema olfativo de *Aedes aegypti*, Proteómica diferencial, Repelentes de origen natural, DEET.

DESCRIPCIÓN: Investigaciones sobre repelentes de origen natural surgen con el propósito de reemplazar de forma parcial o total productos como el DEET, del cual se ha demostrado toxicidad para el ser humano. El objetivo de este estudio fue analizar las señales electrofisiológicas neuronales de las antenas y la expresión diferencial de proteínas del mosquito para elucidar un posible mecanismo de acción o recepción de repelentes, previamente analizados en el laboratorio. Hembras adultas de *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller se usaron en los experimentos. Mediante electroantenografía, los insectos fueron conectados con electrodos para analizar señales eléctricas. A través de un flujo de aire se suministró los compuestos acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol y DEET en diferentes concentraciones y mezclas, aplicando antes y después de cada sustancia el amoníaco, un compuesto atrayente. Las señales obtenidas fueron computarizadas y analizadas luego de suministrar el amoníaco y el repelente. Para obtener la expresión de proteínas, se realizaron tratamientos a los mosquitos con DEET y la mezcla de los compuestos mencionados en concentraciones de 100 mg/mL. Posteriormente, las cabezas de los mosquitos fueron cortadas y se realizó la separación de proteínas por electroforesis bidimensional e identificación por MALDI-TOF-MS. Las señales de electroantenografía mostraron que todos los repelentes disminuyen la señal de amoníaco entre un 20 y 80%, es decir, un decrecimiento de la capacidad olfativa, destacando la mezcla de los 3 compuestos y DEET. Las proteínas encontradas mostraron que el DEET y la mezcla de los compuestos acusan mecanismos de acción diferentes. Con DEET, proteínas relacionadas a la sinapsis y producción de ATP se inhibieron; mientras que la mezcla, sobre-expresó proteínas de transporte, señalización y detoxificación. Los experimentos de electrofisiología y proteómica demostraron que los repelentes alteran la actividad de canales iónicos ionotrópicos, metabotrópicos y modifican procesos relacionados a la sinapsis neuronal y la producción de energía.

*Trabajo de investigación en Maestría en Química

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Jonny Edward Duque Luna, Ph.D, Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D. Codirectora: María Carolina Velásquez Martínez, Ph.D.

Abstract

TITLE: ODORANT BINDING PROTEINS PROFILE DETERMINATION & ELECTROANTENNOGRAPHIC SIGNALS DETECTION OF *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) OLFACTORY SYSTEM PREVIOUSLY EXPOSED TO REPELLENT MOLECULES*

AUTHOR: JOHAN SEBASTIÁN PORTILLA PULIDO**

KEY WORDS: Electroantennography, *Aedes aegypti* Olfactory system, differential proteomics, natural-based repellents, DEET.

DESCRIPTION: Research on natural-based repellents is aimed to replace synthetic repellents like DEET, which has shown high toxicity against human beings. The main purpose of this study was to analyze antennal neuronal electrophysiological signals, and protein differential expression to elucidate a possible action or reception mechanism of repellent molecules. Adult female mosquitoes *Aedes aegypti*, Rockefeller strain, was used in the experiments. The insects were connected through tungsten electrodes using electroantennography (EAG) to analyze electrical signals. To apply the volatiles, an air flux dragged the compounds: geranyl acetate, α -bisabolol, nerolidol, and DEET in different concentrations and mixtures. Before and after the repellent application, ammonia, an attractant molecule, was used as a signal reference. The electrical signals were computer-operated and analyzed following the application of ammonia and the repellents. Regarding the protein expression, mosquitoes were treated with 100 mg/mL of DEET, and the mixture of the natural-based compounds above mentioned. Approximately, 140 mosquitoes per treatment were used. After that, mosquitoes' heads were cleaved, and protein separation and identification through bidimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry (MS) were carried out. The EAG results showed a decrease between 20% to 80% of the ammonia's electrical signals, therefore, a decrease in the mosquito olfactive capacity. The natural-based compounds and DEET decreased the olfactory perception the most. The proteins identified through MS showed that DEET and the natural-based compounds have different action/reception mechanisms. Concerning DEET, proteins related to synapsis and ATP production were downregulated. On the other hand, with the mixture of the natural-based compounds, proteins pertained to transport, signaling, and detox proteins were over-expressed. In conclusion, the present study showed that the repellents disturb ion channel activity and modify protein processes related to neuronal synapsis and energy production.

*Master's in Chemistry research work

**Science Faculty, Chemistry Department. Director: Jonny Edward Duque Luna, PhD, Stelia Carolina Méndez Sánchez, PhD. Co-director: María Carolina Velásquez Martínez, PhD.

Introducción

A nivel mundial el zancudo *Aedes aegypti* es el principal vector de enfermedades virales como dengue, chikungunya y Zika. Estas dolencias afectan principalmente a la población humana ubicada en zonas tropicales y subtropicales, reportándose hasta 4 millones de casos durante el año 2019 (Colón-González, *et al.*, 2017; Tavares *et al.*, 2018; World Health Organization, 2020). Debido a esta problemática de salud pública mundial, se han aplicado estrategias de control poblacional de este vector con la aplicación de insecticidas organofosforados y piretroides; sin embargo, debido al uso prolongado de estas sustancias, los zancudos han adquirido resistencia, lo que reduce su eficacia en las actividades de control en campo (Achee *et al.*, 2019; Smith, *et al.*, 2016).

Es oportuno indicar que además de los insecticidas sintéticos tradicionales, existen alternativas que consisten en el uso de métodos de protección personal cuya finalidad es evitar la picadura del vector. Entre estos métodos se encuentra el uso de repelentes tópicos cuyos componentes principales son sustancias sintéticas como el DEET, IR3535, Picaridin y sustancias de origen natural como aceites esenciales (AE) y sus componentes mayoritarios (Hsu, *et al.*, 2013; Pennetier *et al.*, 2010; Tavares *et al.*, 2018). No obstante, el mecanismo de acción y recepción de estos compuestos no se conoce completamente, pues solo algunas proteínas implicadas han sido identificadas. Aun así, se cree que la efectividad de los repelentes se debe a la interacción de estas moléculas con proteínas de transporte y señalizadoras presentes en el sistema olfativo del zancudo (Del Mármol *et al.*, 2021; W. S. Leal, 2013).

En *Ae. aegypti* el mecanismo de recepción olfativo de moléculas con efecto biológico repelente no se conoce. Sin embargo, se han realizado aproximaciones con investigaciones enfocadas en el proceso de recepción de odorantes en el sistema olfativo de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Guo & Smith, 2017; Xu, *et al.*, 2005). Lo que se conoce del proceso es que los compuestos orgánicos volátiles provenientes de plantas y animales son captados por quimiorreceptores del mosquito, como las sensilas presentes en las antenas. Posteriormente, estos compuestos son transportados a través del sistema nervioso mediante proteínas de unión a odorantes (OBPs, por sus siglas en inglés). Estas proteínas tienen la función de captar, solubilizar y transportar diferentes tipos de moléculas volátiles mediante interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas en su sitio activo o bolsillo de unión (Northey *et al.*, 2016; Pelosi *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2008).

Las OBPs identificadas en varias especies de zancudos son de bajo peso molecular (15-20 kDa, 120-150 aminoácidos) solubles en medios acuosos e hidrofílicos, están altamente concentradas en la linfa sensilar de receptores olfativos como las antenas y palpos maxilares (Leal, 2013; Venthur & Zhou, 2018). Estudios de proteómica y genómica en especies de zancudos como *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* y *Anopheles gambiae* han mostrado que existen diversos grupos de estas proteínas (Deletre *et al.*, 2015; Rund *et al.*, 2013). Por otro lado, estudios de electrofisiología han intentado dilucidar la respuesta del zancudo frente a diferentes moléculas con actividad biológica mediante la medición del aumento o disminución de señales eléctricas del sistema nervioso del insecto (Jacob, 2018). Sin embargo, la escasez de investigaciones dedicadas al estudio del mecanismo de recepción de odorantes, como los repelentes, en zancudos ha impedido entender como interaccionan estos compuestos a nivel molecular. Comprender el proceso de recepción de repelentes de origen natural, sintéticos y odorantes en general en vectores como *Ae. aegypti*,

permitirá identificar procesos clave a nivel proteico con el fin de diseñar moléculas y reemplazar de forma parcial o total compuestos como DEET, IR3535 y otros repelentes sintéticos con efectos tóxicos para el ser humano. Además, conocer a mayor profundidad el sistema olfativo del mosquito permitirá implementar nuevas alternativas de protección contra el zancudo y creación de estrategias de control poblacional con una eficacia mayor a los actualmente conocidos.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Conocer el mecanismo de recepción de moléculas con actividad repelente en el sistema olfativo de *Ae. aegypti*.

1.2 Objetivos específicos

Identificar patrones de señales electroantenográficas en *Ae. aegypti* de moléculas con actividad repelente.

Analizar la expresión diferencial de proteínas del sistema olfativo de *Ae. aegypti* en presencia de moléculas con actividad repelente.

Relacionar los resultados obtenidos del análisis proteico y electroantenografía para comparar la efectividad repelente de moléculas sintéticas y origen natural a nivel molecular.

2. Marco teórico

2.1 *Ae. aegypti* y enfermedades transmitidas por el vector

Ae. aegypti pertenece a la familia Culicidae, orden Diptera, principal vector de enfermedades virales como dengue, chikungunya y Zika (Islam *et al.*, 2017; Messina *et al.*, 2016). Morfológicamente, los adultos del género *Aedes* se distinguen de otros zancudos por tener palpos maxilares más cortos y por adoptar una posición más horizontal sobre la superficie donde reposan para descansar. Se diferencian de la mayoría de los otros culícidos por la terminación aguda de su abdomen y por la ausencia de cerdas espiraculares. *Ae. aegypti* es un zancudo oscuro con bandas blancas basales en los segmentos tarsales de las patas (Bar & Andrew, 2013; Farnesi *et al.*, 2015).

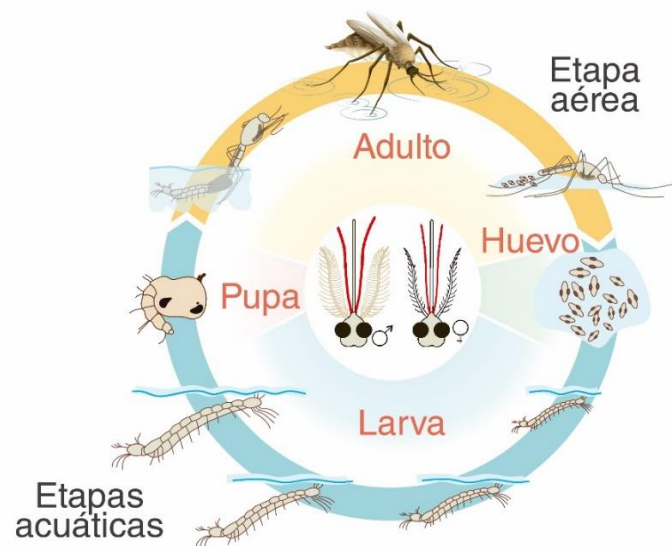
Como en otras especies de culícidos, el macho se distingue de la hembra por sus antenas plumosas y palpos maxilares más largos. El cuerpo del adulto es pequeño, menor de 5 mm de longitud, antenas con numerosos artejos, alas delgadas con venas en diferente proporción ornamentadas por escamas; la proboscis de la hembra está adaptada para chupar sangre. Tienen definida la región cefálica, torácica y abdominal, poseen exoesqueleto de quitina con escleritos (Farnesi *et al.*, 2015; Thirion, 2003).

El zancudo presenta un ciclo de vida holometábolo que va desde el huevo hasta la fase adulta (Figura 1). Este proceso toma entre 8-10 días, variando levemente de acuerdo con las condiciones medioambientales (Centers for Diseases and Control prevention CDC, 2012). Los huevos de *Ae. aegypti* son cilíndricos, alargados y de un tamaño aproximado entre 24-35 µm y son depositados por la hembra en diferentes tipos de contenedores con agua limpia estancada como

botellas, llantas, charcos y piscinas no tratadas (World Health Organization WHO, 2012). Una vez se encuentren en condiciones ideales, la larva emerge en el primer día, de lo contrario el huevo puede permanecer en estado de latencia durante varios meses (Marinotti *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2007).

Figura 1.

Ciclo de vida del zancudo Ae. aegypti. Adaptado por Vidal M. (CINTROP) de Centers for Diseases Control and prevention CDC.



El estado larvario se caracteriza por presentar varias etapas de crecimiento de L1 a L4 que se desarrollan únicamente en un medio acuoso para sobrevivir. Aunque pueden ser observadas a simple vista, son sensibles a la luz por lo que permanecen en movimiento constante. Además, se alimentan de detritus y materia orgánica (Centers for Diseases and Control prevention CDC, 2012b).

Al cabo de 4-5 días, la larva L4 pasa al estado de pupa, cuya forma es redondeada y similar a una crisálida, en este estado no se alimenta. Esta fase constituye el periodo de preparación morfológica y fisiológica para emerger después de 2-3 días como un individuo adulto (World Health Organization WHO, 2012). Estos últimos son de vida libre y pueden llegar a vivir hasta dos meses. Mientras que los machos se alimentan de exudados de plantas, las hembras se alimentan de sangre, necesaria para la producción de huevos. Una vez la hembra se ha alimentado y apareado con un macho, realiza la oviposición en lugares húmedos y con agua limpia estancada (Guha *et al.*, 2014; Hughes *et al.*, 2010).

Entre las enfermedades transmitidas por *Ae. aegypti*, se encuentra el dengue, producida por el arbovirus DENV serotipos I, II, III y IV. Esta es una dolencia que afecta anualmente a más de 2 millones de personas en América Latina y el Caribe. Debido a que presenta un amplio cuadro clínico, la enfermedad es difícil de reconocer y puede presentar complicaciones (dengue grave) representadas en trombocitopenia (disminución de las plaquetas en sangre) y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos cutáneos produciendo hemorragias (Murray, *et al.*, 2013). Actualmente, no existe una vacuna o cura a esta enfermedad viral, pero con el tratamiento adecuado de los síntomas se reducen los riesgos de muerte. Aproximadamente el 2,5% de los casos presentados a nivel mundial han causado la muerte de los pacientes (World Health Organization WHO, 2017).

Desde el año 2013, *Ae. aegypti* también se considera como principal transmisor de enfermedades reemergentes como el Zika y chikungunya, producidas por arbovirus y con un cuadro epidemiológico similar al Dengue. A pesar de la gravedad de las patologías asociadas a cada una de ellas, no tienen vacuna y su tratamiento es en algunos casos insuficiente. Desde el año 2015, se han reportado más de 1 millón de casos por Chikungunya y Zika en toda América Latina

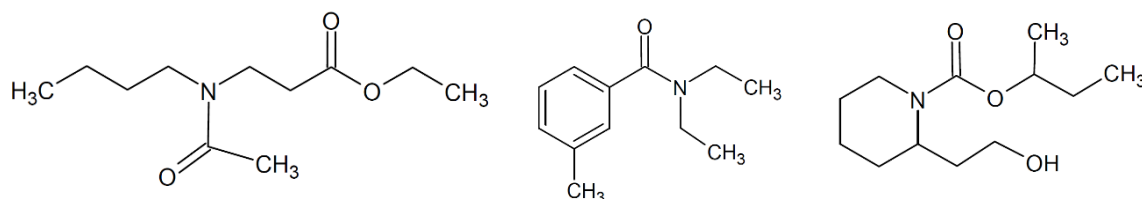
(Messina *et al.*, 2016; Yactayo *et al.*, 2016). Por lo tanto, para combatir contra estas enfermedades virales, los estudios se han enfocado en la prevención de la picadura del vector y su control poblacional.

2.2 Sustancias repelentes

El uso de los métodos de protección personal como repelentes ha demostrado ser efectivo para la prevención contra la picadura de *Ae. aegypti*. En la industria, la implementación de sustancias sintéticas como el DEET (*N,N*-dietil-*m*-toluamida), IR3535 (Etil butilacetilaminopropionato), Picaridín (1-(1-metilpropoxycarbonil)-2-(2-hidroxietil) piperidina) (Misni, Nor, & Ahmad, 2016; Tavares *et al.*, 2018) (Figura 2) brindan un tiempo prolongado de repelencia contra el vector entre 3 a 8 horas, siendo DEET aquella sustancia repelente con mayor periodo de efectividad reportado, hasta 8 horas de protección. Usualmente, estas sustancias están presentes en los productos comerciales como ingredientes activos en concentraciones entre 15-30% en volumen (Diaz, 2016; Pavela & Benelli, 2016; Tavares *et al.*, 2018).

Figura 2.

Repelentes sintéticos utilizados en la industria, Izquierda: IR3535, Centro: DEET, Derecha: Picaridin



A pesar de su efectividad como repelente, se han reportado efectos adversos como irritación cutánea y de mucosas de la vía respiratoria con la aplicación de estas sustancias sintéticas cuando están presentes en altas concentraciones. Además, se han reportado otros efectos no relacionados con la salud como es el daño de algunos materiales como fibras textiles, cuero y plástico (Jordan *et al.*, 2012; Maia & Moore, 2011).

Por otro lado, diversos compuestos derivados de plantas, como los aceites esenciales, han reportado actividad biológica repelente e insecticida y han sido extraídos y caracterizados con el fin de utilizarlos en métodos de prevención y control contra *Ae. aegypti* (Castillo *et al.*, 2017; Palanisami *et al.*, 2014; Phasomkusolsil & Soonwera, 2013). Muchos de los repelentes comerciales actuales contienen como ingredientes activos de aceites esenciales que reportan períodos de protección entre 60-120 minutos. Dichas sustancias, aunque útiles, presentan un tiempo de perdurabilidad reducido debido a su alta volatilidad.

Del mismo modo con los terpenos, compuestos mayoritarios de los aceites esenciales, presentan actividad repelente en varias especies de zancudo. En contraste con los aceites esenciales, los terpenos pueden presentar un efecto sinérgico (aumento de la actividad biológica) al ser implementados de forma individual. Esto se debe a que la mezcla de compuestos mayoritarios en los aceites esenciales provoca la volatilización de los compuestos, lo que causa pérdida en la efectividad como repelente. Sin embargo, la evaluación individual y en formulaciones sencillas del efecto repelente de terpenos puede mejorar los tiempos de protección contra la picadura de zancudos (Andrade-Ochoa *et al.*, 2018; Costa, *et al.*, 2017).

2.3 Sustancias repelentes: Acetato de geranilo, Nerolidol y α -bisabolol

Estudios preliminares en el Laboratorio de Entomología Médica del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) se han realizado con el fin de estudiar el efecto repelente de aceites esenciales y sus compuestos mayoritarios (Castillo *et al.*, 2017; Portilla-Pulido *et al.*, 2020; Vera *et al.*, 2014). Uno de estos estudios se enfocó en la interacción *in silico* proteína-ligando de una de las proteínas odorantes de *Ae. aegypti*, AegOBP1, con diferentes compuestos de origen natural y sintético. Dicho análisis *in silico* identificó de una selección de 20 compuestos de origen natural, cuatro sustancias que presentaron la mayor interacción con la proteína odorante evaluando parámetros fisicoquímicos como energía libre de Gibbs e interacciones débiles como puentes de hidrógeno. Las sustancias de origen natural seleccionadas de forma computacional fueron Acetato de geranilo, Nerolidol, Nerol, α -bisabolol y DEET (Portilla-Pulido, *et al.*, 2020).

Posteriormente, el efecto de protección de las sustancias mencionadas fue evaluado a través de pruebas de repelencia *in vivo* durante una hora, empleando concentraciones de 0,1, 10, 25% (v/v). Tomando como control positivo el DEET, sustancia repelente sintética con efecto conocido, se observó que las sustancias Acetato de geranilo, Nerolidol y α -bisabolol en las concentraciones 10% y 25% tenían un efecto similar al DEET durante el periodo de prueba (1 hora). Luego de esto, se realizaron los mismos experimentos *in vivo* con mezclas en concentraciones de 5% de cada compuesto de la siguiente forma, mezcla 1: nerolidol, acetato de geranilo y α -bisabolol, mezcla 2: acetato de geranilo y nerolidol, mezcla 3: nerolidol y bisabolol, mezcla 4: acetato de geranilo y bisabolol. De estas mezclas, las número 1, 2 y 3 presentaron efectos idénticos al DEET durante el periodo de prueba (1 hora) (Portilla-Pulido *et al.*, 2020).

Con el fin de observar posibles efectos citotóxicos con estas sustancias de origen natural, se realizaron pruebas *in vitro* con células normales de la línea celular *Vero* y *HepaRG*, células de riñón de mono verde africano e hígado humano, respectivamente. Las sustancias Acetato de geranilo y Nerolidol mostraron un efecto citotóxico muy bajo para las líneas celulares mostradas. Con estos dos compuestos se prepararon dos formulados con polietilenglicol y agua para observar la perdurabilidad en la piel de estos compuestos y su efectividad a lo largo del tiempo. El formulado de Acetato de geranilo y Nerolidol en concentraciones de 5% cada uno mostró una efectividad máxima de hasta 3 horas en comparación con el DEET empleado de forma comercial al 25% cuya efectividad es de hasta 8 horas. A pesar de esto, estudios posteriores para la evaluación de estas sustancias con diferentes formulados y concentraciones serán necesarias para encontrar un reemplazo parcial o total de la sustancia sintética DEET (Andrade-Ochoa *et al.*, 2018; Benelli & Pavela, 2018; Nogueira, *et al.*, 2016).

2.4 Componentes de origen natural versus productos sintéticos comerciales

En la actualidad hay interés en la industria farmacéutica y cosmética en el reemplazo de forma total o parcial de sustancias sintéticas, como DEET e IR3535, con efectos biológicos como repelentes e insecticidas. Esto se debe a que algunos de estos compuestos presentan efectos adversos como citotoxicidad cutánea, toxicidad a nivel pulmonar, afecciones a niños y mujeres embarazadas, entre otras. Además, la naturaleza química de estas sustancias impide su degradación en el medio ambiente, lo que provoca bioacumulación y contaminación. Además, se han reportado otros efectos adversos relacionados a la salud como toxicidad en el cuerpo humano. Esto se debe

principalmente a las concentraciones elevadas en formulaciones y el uso inadecuado de este tipo de productos (Silvério, *et al.*, 2020; Smith *et al.*, 2016).

El uso de sustancias de origen natural, como aceites esenciales y sus derivados, son una opción para reemplazar sustancias de interés farmacéutico y cosmético. Sin embargo, la gran mayoría de estas sustancias requieren un proceso exhaustivo para su obtención. Además, este tipo de moléculas son muy volátiles y su efectividad en algunos casos en comparación con las sustancias sintéticas es bastante reducido (Asbahani *et al.*, 2015). Esto a su vez, representa un elevado costo en la producción y la sustitución de las sustancias sintéticas por las de origen natural.

En esta investigación, las sustancias repelentes acetato de geranilo, bisabolol y nerolidol tienen como propósito reemplazar de forma parcial o total la sustancia sintética DEET. En este orden de ideas, conocer el mecanismo de acción y recepción de estos compuestos en el sistema olfativo de *Ae. aegypti*, permitirá a futuro diseñar formulaciones de los compuestos con o sin DEET. Algunas de estas formulaciones podrían mejorar la efectividad como repelente reduciendo la permeabilidad de las sustancias a través de la piel y reduciendo su volatilidad. Los compuestos de origen natural mencionados están presentes en diferentes plantas en variedad de concentraciones. Por ejemplo, el acetato de geranilo se encuentra en una concentración entre 2-10% en aceites esenciales de plantas como *Cymbopogon citratus*, *Acacia farnesiana* y *Cananga odorata* (Castillo *et al.*, 2017; Morón, *et al.*, 1996; Oyedele *et al.*, 2002; Tisserand & Young, 2014), α -bisabolol en concentraciones entre 2-27% en aceites esenciales de especies como *Populus balsamífera* y *Copaifera longsdorfii* (Contents, 2013; Tisserand & Young, 2014) y nerolidol en concentraciones entre 1-19% en aceites esenciales de plantas como *Tagetes lucida* (Castillo *et al.*, 2017; Elsevier, 2013; Tisserand & Young, 2014). Lo anterior, indica que es posible extraer dichas

sustancias de diversas fuentes con el fin de producir una formulación del compuesto o aceite de interés sin un elevado costo de producción.

Finalmente, el DEET es implementado en concentraciones entre 15-25% en formulaciones comerciales, lo que representa un nivel de riesgo elevado para las personas que utilizan dichos repelentes ya que se han reportado efectos nocivos como irritación, toxicidad pulmonar y se ha advertido de su uso en mujeres embarazadas (Swale, *et al.*, 2014; Tavares *et al.*, 2018). El uso de las sustancias derivadas de plantas, acetato de geranilo, α -bisabolol y nerolidol, con efectos repelentes de hasta 3 horas en concentraciones al 5% en formulación, permitirá reducir la concentración del DEET hasta 1-5% como máximo, si se implementan dichas sustancias de origen natural y sintético.

2.5 Proteínas del sistema olfativo de *Ae. aegypti*

El sistema olfativo y receptor de señales externas de los zancudos está compuesto principalmente por palpos maxilares, antenas y proboscis, todos presentes en la cabeza del insecto. A su vez, los palpos maxilares y antenas están compuestos por varias unidades receptoras especializadas llamadas sensilas, que contienen múltiples poros por donde entran compuestos volátiles presentes en el medio. Dentro de estos conductos se encuentran las Neuronas Receptoras Olfativas (ORNs) que sintetizan tres grandes familias de proteínas transmembrana: Receptores de Odorantes (ORs) (palpos maxilares y antenas), Receptores Ionotrópicos (IRs) (palpos maxilares y antenas) y Receptores Gustativos (GRs) (palpos maxilares y proboscis) y proteínas de transporte como las proteínas de unión a odorantes (OBP) (Figura 3) (Bohbot *et al.*, 2011; Guo & Smith, 2017; Sato *et al.*, 2008).

De manera general, estas proteínas transmembrana mencionadas para insectos, ORs, IRs y GRs, estructuralmente están compuestas por dos heterodímeros de siete dominios transmembrana cuyo extremo amino terminal se encuentra en la parte intracelular de la neurona y el extremo carboxi-terminal en la parte extracelular, contrario a como está formado en los mamíferos (Venthur & Zhou, 2018; Wicher, 2014). Funcionan como canales iónicos de calcio Ca^{2+} y potasio K^{+} y otros iones, mediados por la unión de ligandos a uno de los heterodímeros comúnmente llamado correceptor (Figura 4). Además, aunque no se ha descrito completamente, las proteínas transmembrana tienen unidas a su estructura proteínas G que desencadenan cascadas de señalización celular con el fin de activar el paso de iones y controlar el flujo de estos a través de la membrana de las neuronas (Bohbot & Dickens, 2012; Sato *et al.*, 2008; Venthur & Zhou, 2018).

En cuanto a la recepción de moléculas de cada proteína transmembrana, los ORs son los principales receptores del sistema olfativo ya que son capaces de captar una amplia gama de compuestos volátiles necesarios para la búsqueda de hospedero (Carey *et al.*, 2010; Kaupp, 2010). A través de estas proteínas son captados diferentes moléculas provenientes del sudor de mamíferos, la respiración y metabolismo de sustancias presentes en la piel. Entre estos compuestos se encuentran el ácido láctico, 1-octen-3-ol, 4-metilfenol, presentes en mayor concentración y otros como el indol, geranil acetona, 1-dodecanol y ácido hexenoico (Bohbot & Dickens, 2010; Davis & Bowen, 1994; Guha *et al.*, 2014). Por otro lado, los IRs son más sensibles a compuestos dirigidos a la búsqueda de hospedero y alimentación sanguínea como compuestos con grupos funcionales de aminas, ácidos carboxílicos y algunas feromonas importantes en la reproducción del insecto (Pitts *et al.*, 2017; Raji *et al.*, 2019). Finalmente, los receptores gustativos, sintetizados

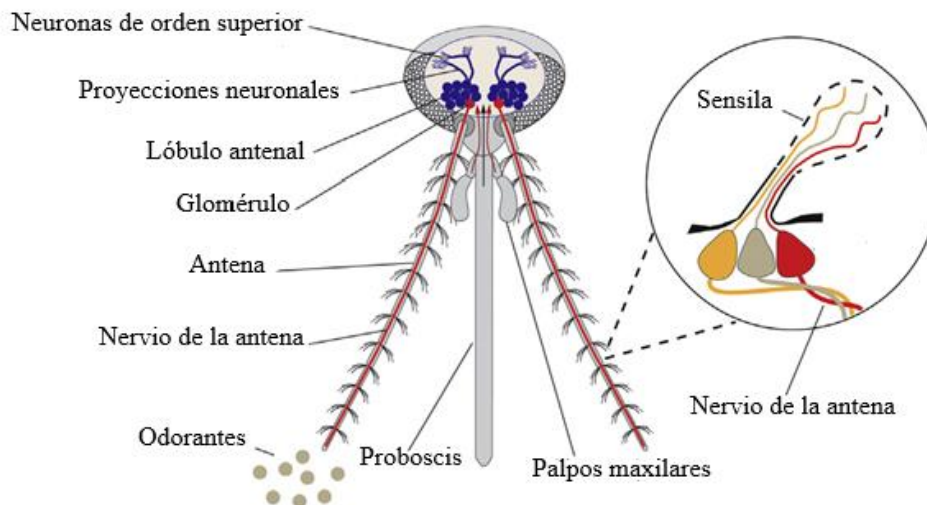
principalmente en la proboscis y palpos maxilares, son capaces de captar el dióxido de carbono, compuestos en estado líquido y sólido como azúcares (carbohidratos), sales inorgánicas, agua, componentes sanguíneos y deterrentes (Guo & Smith, 2017; Sparks *et al.*, 2018; Wicher, 2014).

Los compuestos volátiles recibidos por el zancudo son disipados rápidamente en el aire debido al calor corporal de los mamíferos, lo que permite al insecto realizar un seguimiento hasta la fuente. De este modo, el sistema olfativo de los zancudos está diseñado para detectar una variedad de señales necesarias para la búsqueda de lugares de reproducción, oviposición y alimentación sanguínea en el caso de las hembras (Guha *et al.*, 2014; Rund *et al.*, 2013; Seenivasagan, *et al.*, 2013). La importancia de estas proteínas transmembrana las convierten en diana para la búsqueda de nuevas alternativas para el control biológico de vectores de enfermedades. Existen algunos estudios recientes que se han centrado en la modificación de genes de estas proteínas con el fin de evitar la recepción de ciertos compuestos (Maringer *et al.*, 2017; McMeniman, 2015; Rund *et al.*, 2011). Sin embargo, estas investigaciones son escasas y tediosas debido a la estructura de estos complejos de proteínas, a pesar de esto, podría ayudar de forma significativa al diseño de compuestos con efecto biológico para el control biológico de vectores, repelentes y deterrentes.

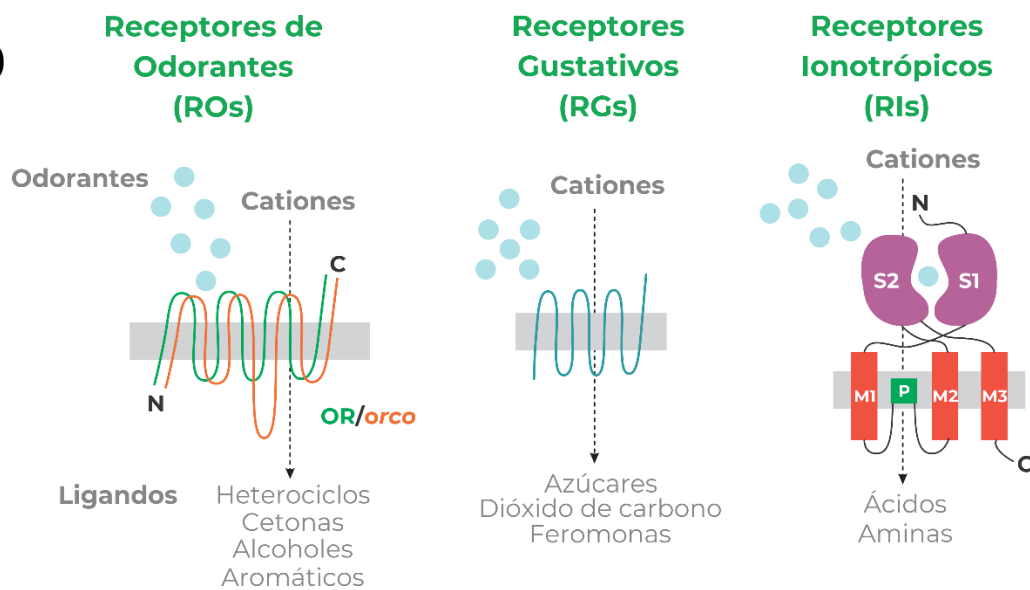
Figura 3.

Sistema olfativo de Aedes aegypti. a) El sistema olfativo del zancudo Ae. aegypti está conformado por antenas, palpos maxilares y proboscis. b) Representación de las proteínas del sistema olfativo, proteínas Receptoras de Olorantes ORs, Receptores ionotrópicos IRs, Receptores gustativos GRs. Adaptado por Vidal M. (CINTROP) de McMeniman, 2015.

a)

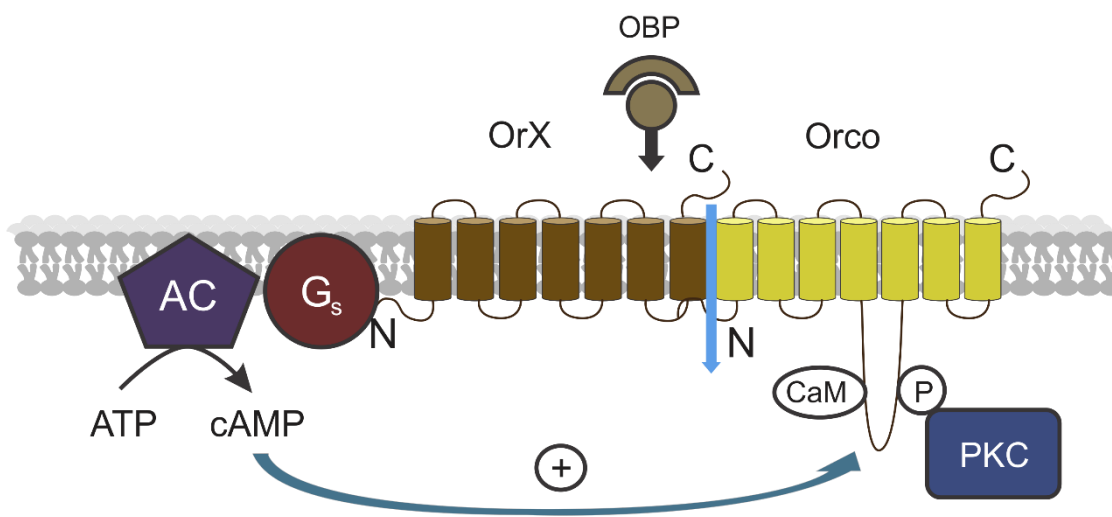


b)


Figura 4.

Representación de los Receptores de odorantes ORs. Una molécula de odorante se adhiere a una proteína de unión a odorantes OBPs y se une al receptor activando el flujo de iones y generando una corriente I. Al mismo tiempo, una proteína G unida al ORs, activa la enzima adenilil ciclase que produce adenosin

monofosfato cíclico cAMP. De este modo, la producción de cAMP activa el correceptor y la sensibilidad del receptor frente a diferentes moléculas odorantes provenientes del exterior. La actividad del correceptor es regulada por la fosforilación a través de la proteína quinasa C PKC y la calmodulina CaM. Adaptado por Vidal M. (CINTROP) de Wicher, 2014.



2.6 Recepción de odorantes

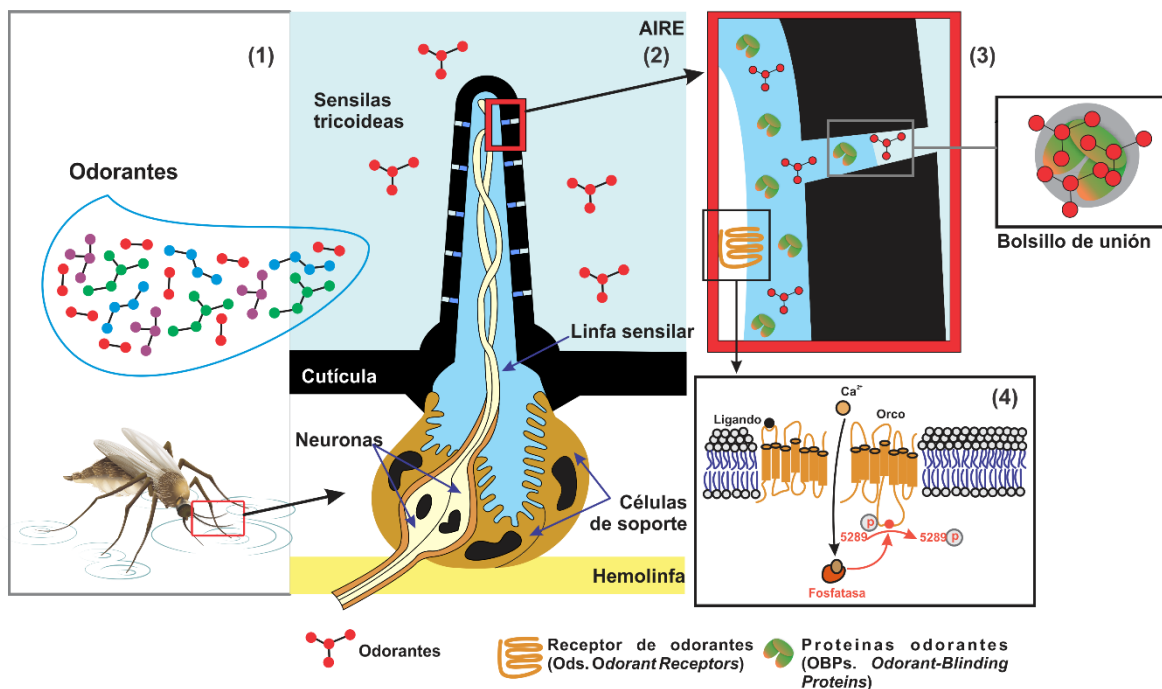
Los insectos tienen la capacidad de detectar una variedad de señales químicas mediante receptores sensoriales ubicados principalmente en las antenas y en los palpos maxilares. De acuerdo al tipo de señal química captada por el insecto, se genera una respuesta comportamental específica de atracción o repelencia (Bohbot & Dickens, 2010; Guo & Smith, 2017; Jacob, 2018; H. Liu *et al.*, 2016). Aunque es poco conocido el mecanismo de acción a nivel molecular en insectos de importancia médica, se han descrito aproximaciones de este proceso en la mosca de las fruta *Drosophila melanogaster* (Guo & Smith, 2017; Xu *et al.*, 2005). El efecto comportamental inicia con la recepción de Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) provenientes

de plantas y animales que son captados por sensilas, quimiorreceptores especializados presentes en las antenas. Estos COVs pasan a través de las sensilas hasta llegar a la linfa sensilar, un medio hidrofílico con un pH cercano a siete, donde son transportados mediante proteínas de unión a odorantes (OBPs). Estas OBPs se caracterizan por presentar una cavidad de unión (binding pocket) capaz de albergar en su interior moléculas mediante diferentes tipos de interacciones moleculares (Bohbot & Pitts, 2015; Leal & Leal, 2015; Leal, 2013; Northey *et al.*, 2016).

Figura 5.

Mecanismo de recepción de odorantes en insectos (Tomado de Portilla-Pulido, et al., 2020). En la figura:

(1) Las moléculas odorantes liberadas por animales y plantas llegan hasta las sensilas ubicadas en las antenas y palpos maxilares. (2) Al pasar a través de las sensilas, las moléculas odorantes llegan a la linfa sensilar. (3) Allí, se unen a proteínas de unión a odorantes (OBPs) para ser transportadas en un bolsillo de unión a través de la linfa sensilar hasta los receptores de odorantes (ROs). (4) Estos ROs ubicados en la membrana celular de neuronas receptoras olfativas (NROs) permiten la transformación de la señal química en una señal eléctrica; que desencadena una respuesta comportamental.



En *Ae. aegypti*, una de las proteínas de unión a odorantes caracterizada estructuralmente por difracción de rayos X, se conoce como AegOBP1 y se localiza en neuronas quimiorreceptoras de antenas y palpos maxilares (Jonathan D. Bohbot & Dickens, 2012). Esta proteína globular está conformada por 125 residuos de aminoácidos, con una cavidad de aproximada 2,3 nm de profundo y donde el sitio unión a los odorantes está conformado por arginina 23 (Arg23), tirosina 54 (Tyr54) e isoleucina 125 (Ile125) (Leite *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2008). Estos residuos interactúan con las moléculas odorantes mediante interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas, facilitando su transporte a través de la linfa sensorial. El complejo proteína-ligando, formado por la proteína de unión a odorante y la molécula odorante, llega a la membrana celular de dendritas de Neuronas Receptoras Olfativas (ORNs), donde se encuentran los receptores de odorantes (ORs). Las interacciones OBPs-ORs tienen lugar en un medio a pH bajo (5-6) que permite el cambio conformacional de la OBP y la posterior liberación de la molécula odorante en

los receptores (Bohbot & Pitts, 2015). Los ORs son proteínas especializadas formadas por heterodímeros receptor-correceptor que permiten el paso de iones a través de la membrana de la neurona (Benton, 2006; Xu *et al.*, 2014), lo que permite la transformación de una señal química en una señal eléctrica (Guo & Smith, 2017) (Figura 5). Dependiendo del tipo de sustancia odorante percibida, la respuesta generada en el zancudo corresponderá a una acción atrayente o repelente (Seenivasagan *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2014).

2.8 Electroantenografía

Los insectos utilizan señales provenientes de compuestos químicos volátiles dispersos en el medio ambiente para localizar su alimento, hospederos y facilitar su reproducción. A su vez, estas señales se transforman en pulsos eléctricos o flujo de iones mediadas por proteínas de canales iónicos presentes en las neuronas (Liu *et al.*, 2016). Debido a este flujo de iones, se produce un potencial eléctrico a través de la membrana que puede ser captada a través de electrodos. De este modo, la electroantenografía (EAG) es una técnica electrofisiológica que mide el flujo de iones debido a la estimulación de los receptores olfativos en el insecto al ser estimulados por moléculas volátiles (Jacob, 2018; Seenivasagan *et al.*, 2012).

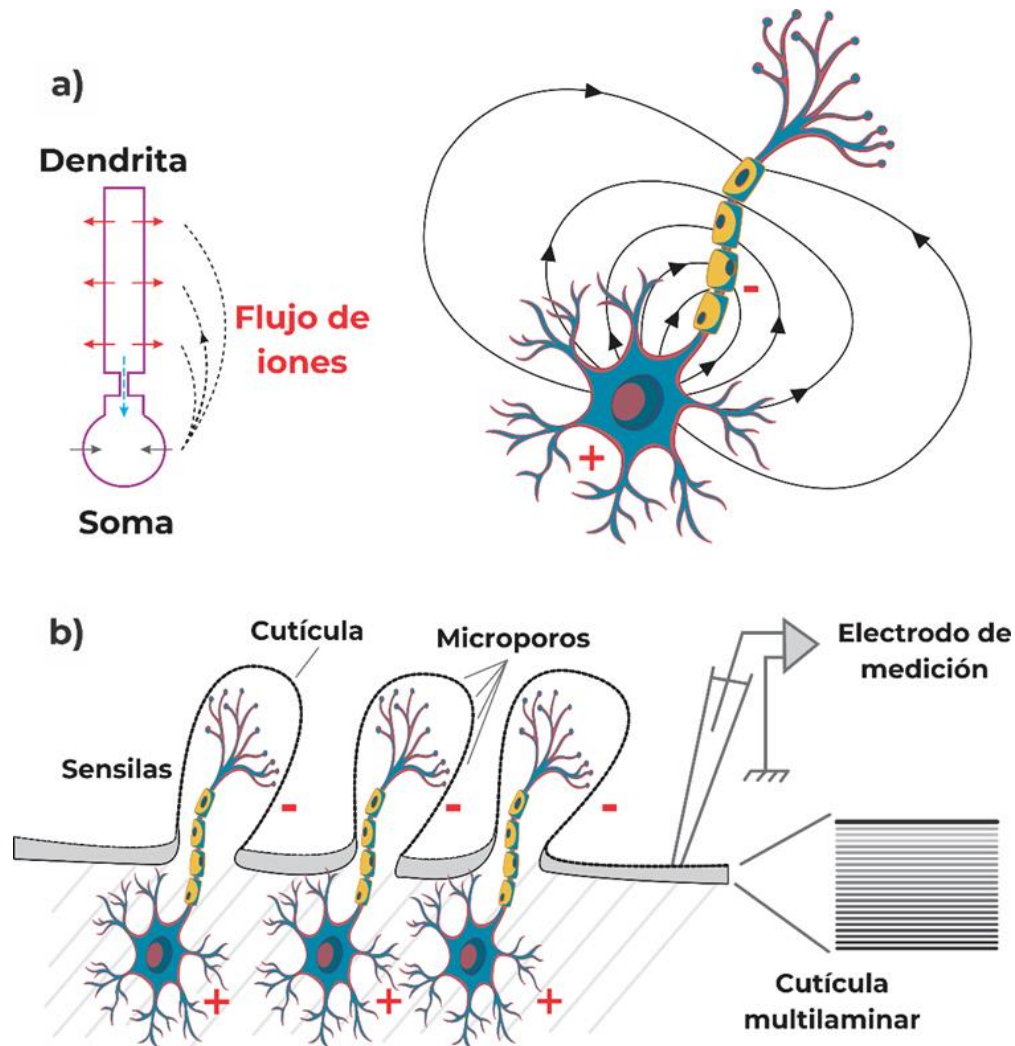
La EAG se fundamenta en el flujo de corriente hacia adentro y afuera de la membrana de la neurona de forma simultánea, lo que genera un dipolo en diferentes partes de la neurona, las

dendritas, el axón y el soma (Figura 6). Lo anterior, genera una despolarización o disminución en el potencial de membrana de la neurona que origina potenciales negativos. La sumatoria de este potencial, se traduce en una señal electroantenográfica medida a través de electrodos de tamaño milimétrico posicionados en las antenas. La amplitud de esta señal detectada dependerá del potencial de respuesta de cada neurona frente a un compuesto específico y la densidad de neuronas en las cercanías del electrodo empleado para la medición (Jacob, 2018; Olsson & Hansson, 2013).

En general, existen dos métodos para la medición de señales eléctricas, uno de estos emplea la antena disectada del insecto y en el otro se utiliza el insecto vivo para las mediciones. En el primer método, la antena del insecto es inmersa en solución buffer con el fin de mantener la integridad de las proteínas y demás biomoléculas involucradas en el proceso de recepción de volátiles. Posteriormente, se procede a la inserción de los electrodos y la medición de las señales ante estímulo con sustancias volátiles de interés. Este método fue empleado con frecuencia años atrás; sin embargo, el tiempo disponible para la medición era corto (pocos minutos), ya que una vez cortada la antena del insecto, su funcionamiento se ve afectado lo que modifica la señal captada y, por lo tanto, los resultados obtenidos (Deletre *et al.*, 2015; Guha *et al.*, 2014; May-concha, *et al.*, 2018; Seenivasagan *et al.*, 2009). Con la optimización del equipo empleado para la medición de señales, ha sido posible emplear el insecto vivo, de este modo, se pueden realizar múltiples réplicas antes de observar diferencias en la medición, siendo este el método más empleado actualmente para observar el comportamiento de señales eléctricas ante estímulos odorantes (Olsson & Hansson, 2013).

Figura 6.

Representación esquemática de las sensilas en la antena del zancudo, Adaptado por Vidal M (CINTROP) de Jacob, 2018. a) Cada neurona olfativa se representa con dos compartimientos, soma y dendrita, la neurona olfativa es activada cuando un flujo de corriente ingresa (flechas rojas) e induce un campo eléctrico que a su vez polariza las dendritas (derecha). b) La medición a través del electrodo de electroantenografía es una sumatoria de todos los potenciales eléctricos que fluyen por las neuronas olfativas activadas.

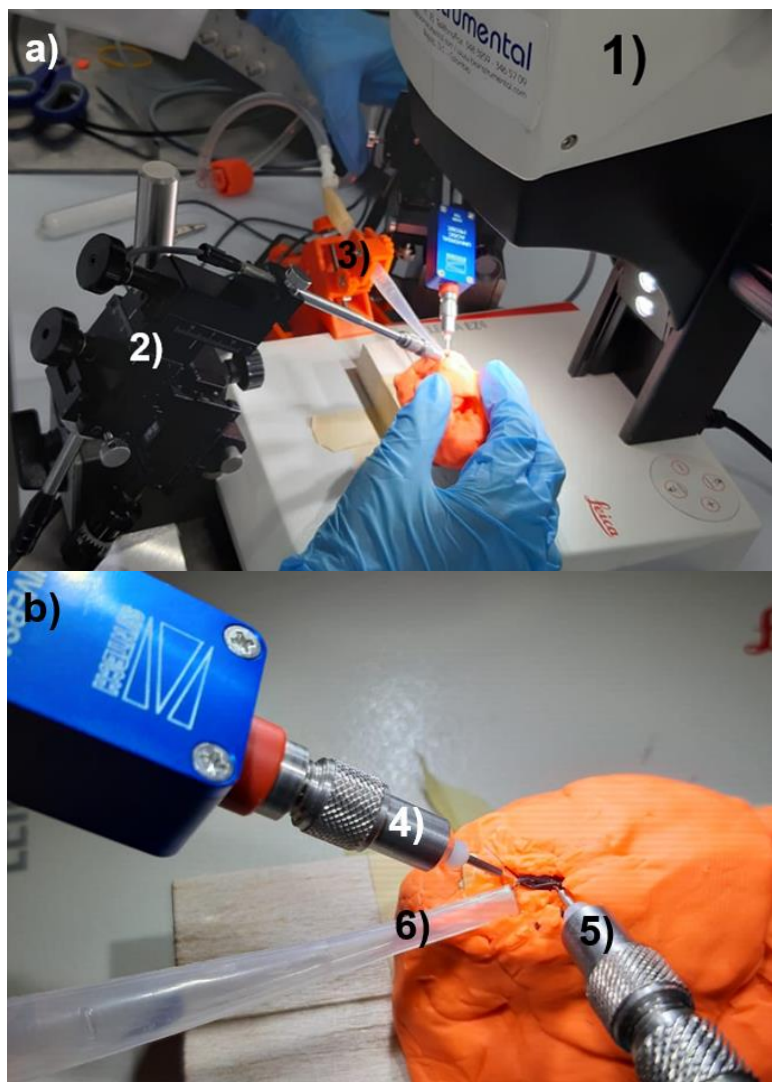


El equipo utilizado para la medición de señales eléctricas consta de un flujo de aire que cuenta con un compartimiento donde se colocan los compuestos a estudiar. Allí, el flujo generado arrastra las moléculas volátiles hasta una base donde el insecto es colocado (Figura 7). Además, se utiliza un par de electrodos como sistema de captación de electricidad, uno de referencia ubicado en la cabeza del insecto y otro de medición ubicado en la antena de este. Normalmente, estos electrodos son muy delgados (orden de milímetros) con el fin de penetrar la antena cuidadosamente sin dañarla. El electrodo de medición es fabricado con metales de tungsteno o plata, mientras que el electrodo de referencia suele ser de carbono o de tungsteno. Adicionalmente, se emplea un instrumento capaz de amplificar, procesar y filtrar la señal registrada en la antena. La señal eléctrica captada se asocia a la respuesta de EAG del insecto y se caracteriza por el bajo potencial en el orden de milivoltios (mV). Lo anterior, causa que la principal dificultad de esta técnica sea la amplificación y filtrado de señales para evitar que las interferencias que puedan distorsionar o camuflar la señal real captada por el equipo (Guha *et al.*, 2014; Olsson & Hansson, 2013).

Finalmente, avances de esta técnica de medición de señales eléctricas han permitido acoplar equipos de EAG con un cromatógrafo de gases. La separación por cromatografía de compuestos volátiles y posterior observación de la respuesta eléctrica generada en el insecto permite diferenciar y comparar entre compuestos que tengan actividad biológica significativa. De este modo, se pueden identificar compuestos provenientes de mezclas complejas, como aceites esenciales, con potencial biológico efecto insecticida, repelente o atrayente en vectores de enfermedades (Dekker *et al.*, 2011).

Figura 7.

*Preparación del insecto para la medición de señales eléctricas por EAG para *Rhodnius prolixus* (insecto responsable de la transmisión del parásito *Trypanosoma cruzi* que causa la enfermedad de Chagas). a) El insecto es dispuesto en una base con el fin de incrustar los electrodos con ayuda de un estereomicroscopio (1) y micromanipuladores (2). Además, un sistema de aire (3) arrastra las moléculas de interés directamente hasta el insecto. b) Los electrodos de medición (4) y referencia (5) son incrustados en la base de la antena (pedicelo) y ojo del insecto, respectivamente. El flujo de aire mencionado (6) llega directamente a la antena para percibir los estímulos de interés (Fotografías: Autor).*

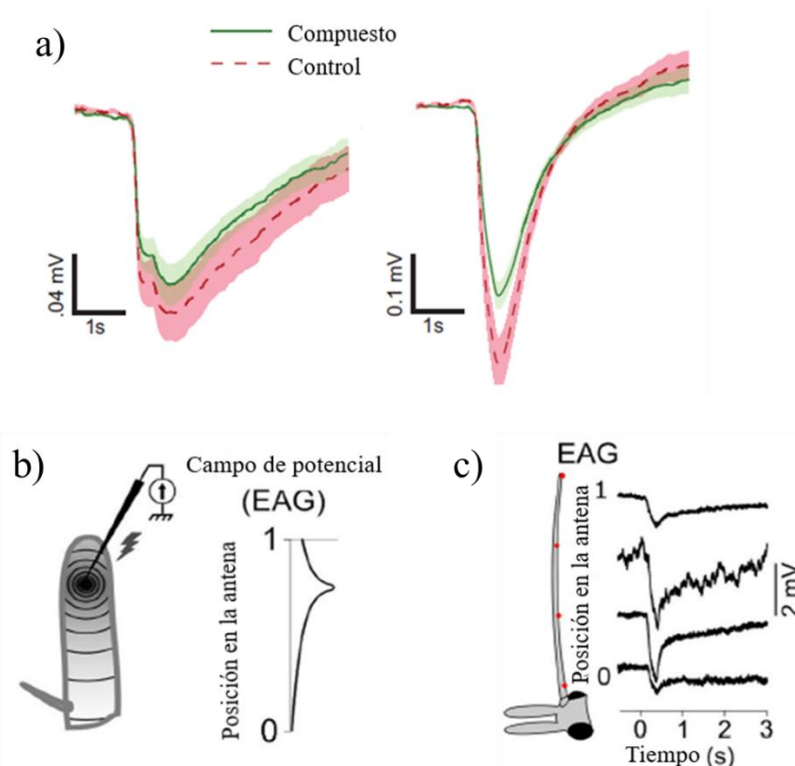


2.9 Señales electroantenográficas

Las señales obtenidas por el equipo de electroantenografía corresponden a curvas que gráficamente representan caídas o cambios en el potencial eléctrico a través de la membrana de la neurona durante un tiempo determinado (Figura 8a) (Rund *et al.*, 2013). La información básica que se puede obtener a partir de estas gráficas se relaciona con la forma de la señal que capta el equipo. Una señal más amplia en la escala de tiempo significa que se requiere más tiempo para que la membrana recupere su estado polarizado desde el momento de la estimulación. De forma similar, una señal con mayor amplitud en el eje de voltaje (mV) significa que una mayor cantidad de iones fluye a través de la membrana de las neuronas, es decir, mayor cantidad de neuronas olfativas activadas (Jacob, 2018). La información anterior, permite relacionar si una sustancia tiene un efecto biológico sobre el insecto (atrayente, repelente o insecticida); además, permite comparar la efectividad teniendo en cuenta otras moléculas como referencia cuya actividad sea conocida (Deletre *et al.*, 2015; Guha *et al.*, 2014).

Figura 8.

Ejemplos de señales electrofisiológicas obtenidas para un insecto. a) Señales obtenidas por la técnica de electrofisiología. b) Una corriente eléctrica proveniente de las neuronas activadas induce un campo eléctrico a lo largo de la antena y se torna más débil con la distancia de la fuente de la señal. c) Según la posición del electrodo en la antena la señal de EAG se torna más débil o fuerte debido a la cantidad de sensilas que contienen neuronas activadas por el estímulo odorante. Adaptado de Rund et al., 2013.



Por otro lado, dentro de los factores experimentales que dificultan la técnica de electroantenografía se encuentran el tipo y tiempo de medición de señales eléctricas. La medición se ve afectada principalmente por la posición del electrodo de registro en la antena del insecto (Figura 8b). Varios estudios han demostrado que la amplitud de la señal electroantenográfica es dependiente de la cantidad de neuronas olfativas activadas por un estímulo (Jacob, 2018). En la parte proximal del pedicelo de la antena se encuentran la mayor cantidad de sensilas, es decir, la mayor cantidad de neuronas olfativas que pueden ser estimuladas, de este modo, al medir sobre esta zona, el potencial generado es mayor y la señal de EAG tiene menor ruido. Así, el potencial eléctrico medido a través del electrodo es dependiente de la cantidad de sensilas en cierta zona de la antena del insecto. Por otro lado, el tiempo de medición es importante ya que la despolarización de la membrana por la estimulación con moléculas odorantes ocurre en fracciones de segundo. Por

lo tanto, la medición de la señal de EAG debe realizarse simultáneamente con la liberación del estímulo a través del flujo de aire del equipo ya que de esta forma se evitan señales no correspondientes a las moléculas en estudio (Jacob, 2018; Myrick & Baker, 2018; Olsson & Hansson, 2013).

2.10 Estudios de proteómica enfocados en *Ae. aegypti*

El desarrollo de las ciencias ómicas y tecnologías de aplicación a ciencias biológicas hacen posible el estudio de la información contenida en biomoléculas de un ser vivo a diferentes niveles: genético, con los nucleótidos que conforman el ADN y ARN mensajero (transcriptoma) y las proteínas (estructura primaria y secundaria). La aplicación de estas técnicas se centran en el entendimiento de la configuración molecular y estructural de las biomoléculas mencionadas que pueden ayudar a comprender, revelar principios y funciones a nivel celular con relación a un organismo que se quiere estudiar (Maringer *et al.*, 2017).

En salud pública la implementación de las ciencias ómicas, como proteómica y transcriptómica, tiene como objetivo integrar la información obtenida por estos procedimientos para solucionar problemas relacionados a la comprensión de enfermedades infecciosas, modo de acción de compuestos con efecto biológico y algunos procesos metabólicos (Pando-robles *et al.*, 2009). De forma más específica, se han estudiado aquellas enfermedades tropicales transmitidas por virus como el dengue, Zika y chikungunya con el fin de disminuir la población vulnerable. Sin embargo, los virus que conforman estas enfermedades tienen una estructura compleja y en algunos casos muta fácilmente en un hospedero, lo que impide la creación de una vacuna 100% efectiva frente al control de estas enfermedades virales (Logan, 2016; Sessions *et al.*, 2015). Por lo anterior,

para la prevención de estas, es necesario estudiar los vectores que las causan, entre estos se encuentra el zancudo *Ae. aegypti*.

Son diversas las investigaciones que se han realizado con este vector, algunas dirigidas a efecto biológico de moléculas como insecticidas (Faulde *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2016), repelentes (Balaji *et al.*, 2017; Castillo *et al.*, 2017; Tavares *et al.*, 2018) y la modificación genética del zancudo. Por ejemplo, algunos estudios de proteómica enfocados en huevos de *Ae. aegypti*, han demostrado que existen proteínas en la parte externa que proporcionan protección física antes de la eclosión (Marinotti *et al.*, 2014). De este modo, la corteza del huevo tiene propiedades que permiten resistir altas temperaturas, humedad y sequía incluso meses después del proceso de oviposición. El estudio proteómico del huevo del zancudo *Ae. aegypti*, es requerido para comprender la capacidad de adaptación del mosquito a factores ambientales y entender las diferencias con otros zancudos. De este modo, crear estrategias para hacer más vulnerable la corteza del huevo con el uso de sustancias químicas o modificaciones genéticas.

Los estudios de proteómica han revelado que las capas internas del huevo están compuestas por proteínas de membrana vitelina principalmente con pesos moleculares entre 10 a 15 kDa. Estas proteínas con aminoácidos hidrofóbicos que conforman las primeras capas del huevo permiten o impiden el paso de sustancias al interior de las capas internas del mismo (Edwards *et al.*, 1998). Además, existen proteínas con sitios de unión a quitina, la sustancia que recubre el huevo en la parte exterior. La interacción de estas proteínas con la quitina proporciona rigidez al huevo del zancudo antes de su eclosión (Farnesi *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2007). Finalmente, algunas proteínas de transporte de odorantes han sido identificadas en huevos de *Ae. aegypti* cuya función podría estar relacionada con el transporte de moléculas que puedan funcionar como quimioattractores para el esperma del zancudo durante la reproducción (Marinotti *et al.*, 2014).

Con respecto al sistema olfativo de *Ae. aegypti*, se han realizado avances para intentar comprender las interacciones del zancudo con compuestos provenientes de hospederos mamíferos. Publicaciones recientes para la identificación de proteínas odorantes de *Ae. aegypti* y *Anopheles gambiae* han mostrado la capacidad que tienen estas proteínas para unirse con compuestos volátiles específicos a través de interacciones de tipo hidrofílico e hidrofóbico que ocurren en la linfa sensilar del insecto (Leal, 2013; Rund *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2008). Algunas de estas proteínas captan compuestos con ciertas características estructurales como dobles enlaces, anillos de benceno, grupos hidroxilo y otros grupos oxigenados (Leal, 2013; Northey *et al.*, 2016). Estas características convierten a las proteínas odorantes y los receptores de odorantes, en un blanco a estudiar ya que podría facilitar el diseño de moléculas con efecto biológico y comportamental del zancudo y, de este modo, disminuir la población y prevenir la picadura del insecto.

En este trabajo se busca distinguir cambios en la expresión proteica en presencia de compuestos con efecto repelente de origen sintético y natural, y de este modo identificar y confirmar la presencia de algunas proteínas que estén involucradas en el proceso de recepción de este tipo de moléculas. Lo anterior, permitiría a futuro implementar de forma más eficaz este tipo de moléculas y diseñar nuevas moléculas sin efectos tóxicos en seres vivos.

3. Metodología

3.1 Material biológico: colonia de *Ae. aegypti*

Los ensayos de electroantenografía y proteómica diferencial se llevaron a cabo con una colonia de *Ae. aegypti* cepa Rockefeller, dispuesta en jaulas de seguridad y almacenada en un insectario a una temperatura de 25 ± 5 °C, humedad relativa de 70 ± 5 % y fotoperiodo 12:12. Los mosquitos macho fueron continuamente alimentados con una solución de miel (carbohidratos) al 10% (v/v) aproximadamente. A las hembras se les suministró periódicamente alimentación sanguínea para la obtención de huevos con ratas albinas tipo Wistar (WI IOPS AF/Han strain) facilitadas por el bioterio de la Universidad Industrial de Santander, cumpliendo las disposiciones de la Ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Las larvas eclosionadas se almacenaron en recipientes de plástico y alimentadas con 0,5 g de alimento para peces Tetramin Tropical Flakes® tres veces por semana. Para los ensayos de electroantenografía y proteómica diferencial se seleccionaron hembras adultas sin alimentar con sangre entre 3-10 días después de emerger de su estado larval.

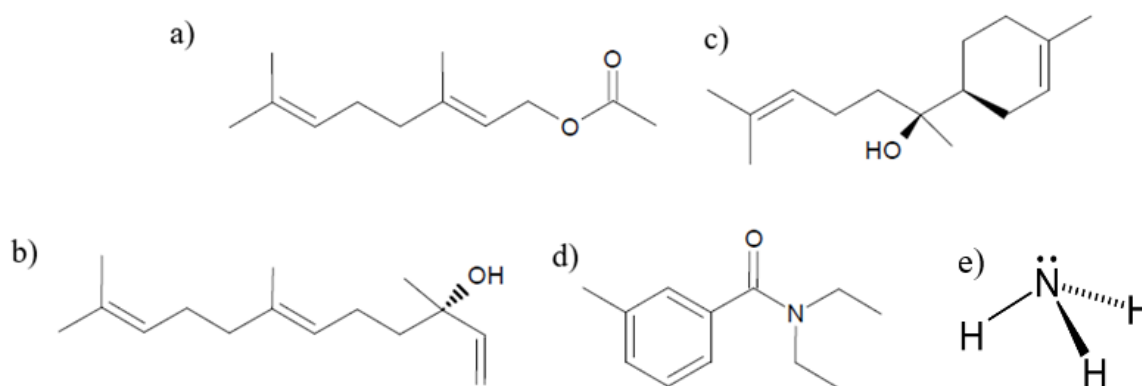
3.2 Moléculas

Las moléculas evaluadas en esta investigación fueron seleccionadas de acuerdo con resultados previos realizados por el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) en la búsqueda de compuestos con actividad repelente. Los compuestos terpénicos que se utilizaron son compuestos secundarios derivados de aceites esenciales, Acetato de geranilo, α -bisabolol y Nerolidol (Merck ©), todos con actividad repelente en *Ae. aegypti* (Portilla-Pulido,

et al., 2020). El compuesto repelente de referencia fue el compuesto sintético DEET y como referencia para las señales electroantenográficas, se empleó el amoniac, una sustancia atrayente para los mosquitos (Figura 9).

Figura 9.

Moléculas con actividad repelentes utilizados en los experimentos. a) Acetato de geranilo b) Nerolidol c) α -bisabolol d) DEET e) Amoniac, una sustancia atrayente para el mosquito.

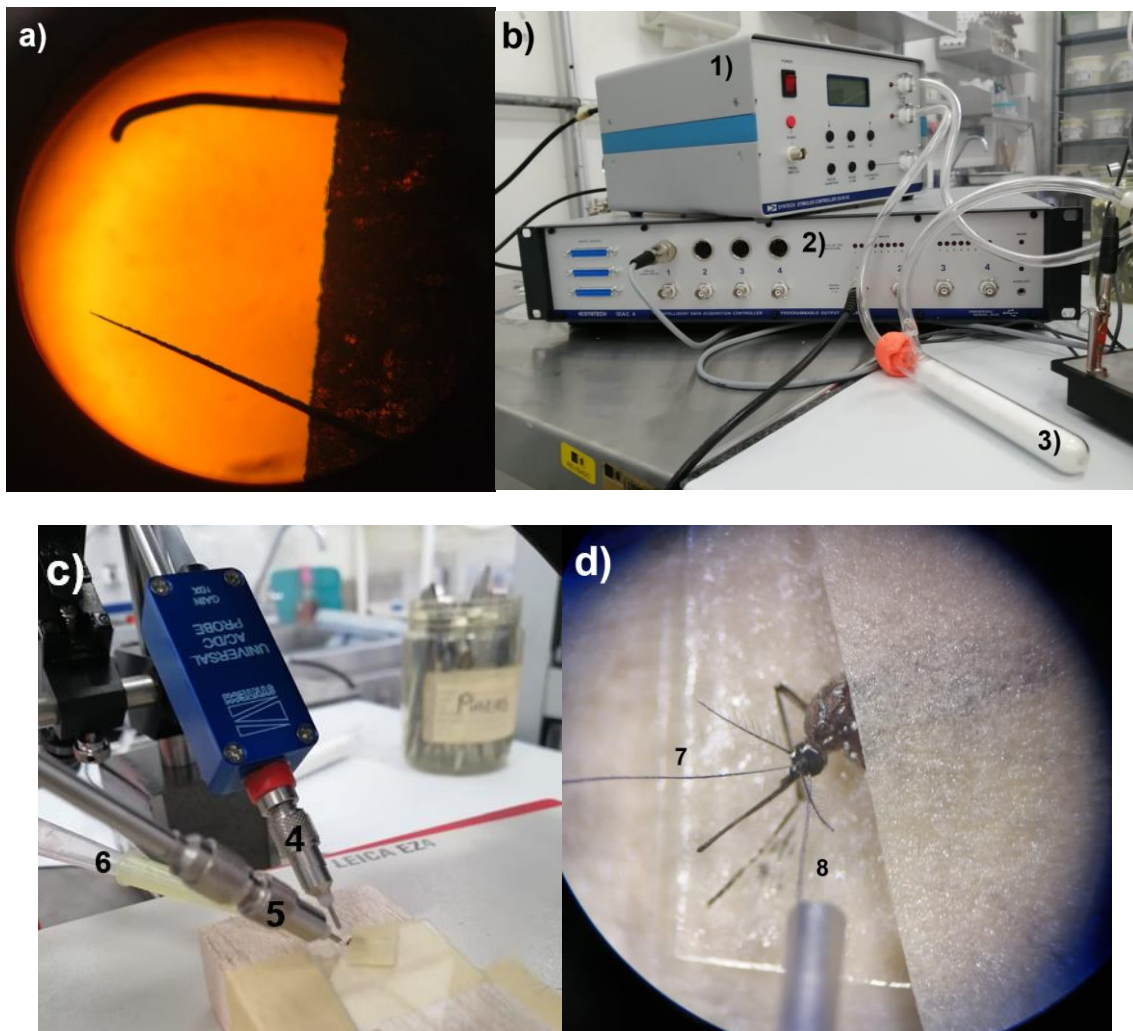


3.3 Electroantenografía

Figura 10.

Montaje experimental para electroantenografía de zancudos. a) Afilamiento electrolítico con NaOH de electrodos de Tungsteno (arriba electrodo sin afilar, abajo electrodo afilado). b) El equipo de electroantenografía consta de un sistema controlador de flujo de aire que permite llevar las moléculas volátiles directamente hasta el insecto (1) y un sistema de adquisición de datos inteligente (Synthec) (2). Además, se muestra el compartimiento donde se coloca el papel filtro impregnado con las sustancias de

interés (3), por este tubo de ensayo con salida lateral pasa el flujo de aire hacia el insecto. c) Los electrodos son posicionados en unos dispositivos (holders) que permiten la manipulación facilitada en los 3 planos x, y, z, (4) el electrodo de medición es incrustado en la antena mientras que el electrodo de referencia (5) en el ojo del insecto. Además, desde el tubo de ensayo con salida lateral (3) fluye el aire con los estímulos transportados hasta (6) donde son liberados finalmente en el mosquito montado. (d) Los electrodos incrustados se muestran en (7) para el electrodo de medición y (8) para el de referencia. Fotografías: Autor.

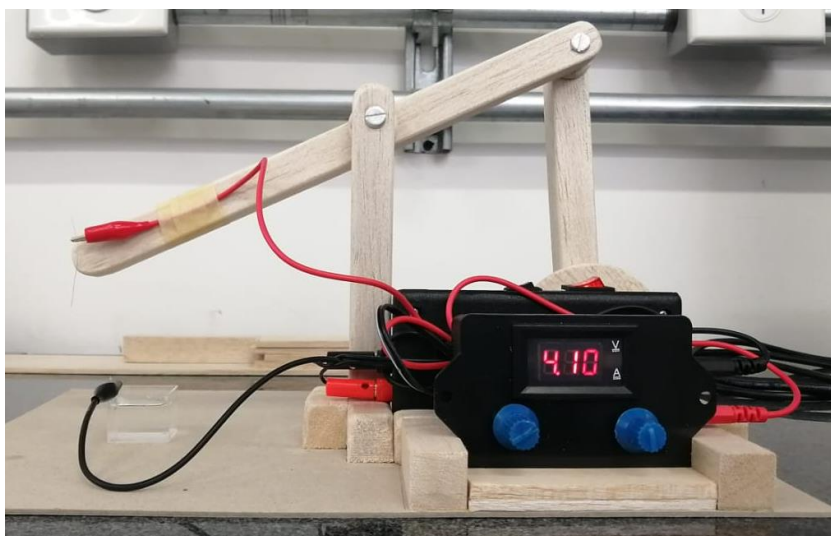


3.4 Preparación del insecto para EAG y registros electroantenográficos

Para evaluar la respuesta eléctrica de la antena del zancudo ante la exposición de compuestos con actividad repelente, se realizaron registros de electroantenograma (EAG). Para esto, se tomaron hembras adultas de *Ae. aegypti* entre 3-10 días de emergidas, sin alimentar con sangre (Gerber *et al.*, 1994). Cada insecto fue anestesiado colocándolo en un congelador de nevera a -5 °C durante 1 minuto. Posteriormente, el zancudo se fijó cuidadosamente en un portaobjetos de microscopio con cinta adhesiva como se muestra en la Figura 10d y luego en la plataforma de madera donde permaneció inmovilizado exponiendo las antenas y ojos para el experimento. La plataforma con el insecto fijado se colocó bajo un estereomicroscopio (Leica EZ4) con el objetivo de visualizar el preparado. El electrodo de referencia se insertó en el ojo expuesto, mientras que el electrodo de registro se insertó en la base del pedicelo de la antena. Se utilizaron electrodos de registro y de referencia de Tungsteno (0,25 mm, Sigma Aldrich). Dichos electrodos se afilaron electrolíticamente mediante inmersión repetida de la punta en una solución de hidróxido de sodio NaOH (1 M, 3-5 V, Sigma Aldrich) hasta obtener un diámetro aproximado de 0,05 – 1 milímetro (mm) (Olsson & Hansson, 2013) (Figura 11). El registro de EAG se inició 2 minutos después de alistar la preparación del insecto. Las señales antenográficas se amplificaron (1000x) con un preamplificador (Universal Single Probe, type PRS-1, Syntech, Alemania) y digitalizaron (IDAC-4, Syntech, Alemania). Las señales se visualizaron, grabaron y analizaron en un computador utilizando el Software Autospike (Syntech, Alemania) (Olsson & Hansson, 2013).

Figura 11.

Dispositivo empleado para afilamiento electrolítico de electrodos de tungsteno. El movimiento repetitivo hacia arriba y abajo afila el electrodo de tungsteno en la solución de NaOH por la cual fluye corriente eléctrica. Fotografía: Autor.



3.5 Estímulo olfatorio y registro del electroantenograma

Los pulsos de aire se hicieron pasar a través de un tubo de ensayo con salida lateral donde se contenían los compuestos a evaluar. Este tubo de ensayo se acopló con mangueras de plástico que transportaron los compuestos hacia la preparación del insecto en la base de madera. El aire filtrado se administró como control antes y después de cada experimento (eliminación del *background*) (Figura 10b).

Cada uno de los compuestos repelentes a evaluar, se aplicaron en una pequeña pieza de papel filtro (Whatman No. 1) en diferentes concentraciones: 0,5, 1, 10, 50 y 100 mg/mL en acetona para la liberación simultánea amoníaco y repelente en el primer tipo de montaje. Luego de la aplicación en el trozo de papel filtro, se dejó secar durante 1 minuto para eliminación completa del solvente. El amoníaco fue empleado en una concentración de 25% con el fin de obtener señales EAG de alta intensidad para todos los experimentos (Jason Pitts *et al.*, 2017). En esta primera parte, un mosquito fue empleado para aplicar todas las concentraciones entre 0,5 a 100 mg/mL con un estímulo inicial y final de amoníaco y con pulsos de 8 segundos de aire (*background*) entre cada concentración. El trozo de papel filtro se colocó dentro del tubo de ensayo con salida lateral acoplado al controlador de flujo de aire. Para cada compuesto se empleó un tubo de ensayo diferente, al igual que los tubos de conexión y la preparación del insecto (un zancudo por réplica, con un número mínimo de réplicas de N=7 por experimento). Adicional a los compuestos individuales, se implementaron las siguientes mezclas en concentraciones 50 y 100 mg/mL de cada compuesto aplicando cada concentración por separado y no en conjunto como fue realizado para las concentraciones entre 0,5-100 mg/mL. Mezcla 1: Acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol, mezcla 2: acetato de geranilo y nerolidol, mezcla 3: nerolidol y bisabolol, mezcla 4: acetato de geranilo y bisabolol. Para estos experimentos un mosquito fue utilizado para la concentración de 50 mg/mL y otro para 100 mg/mL con cada mezcla y réplica realizada.

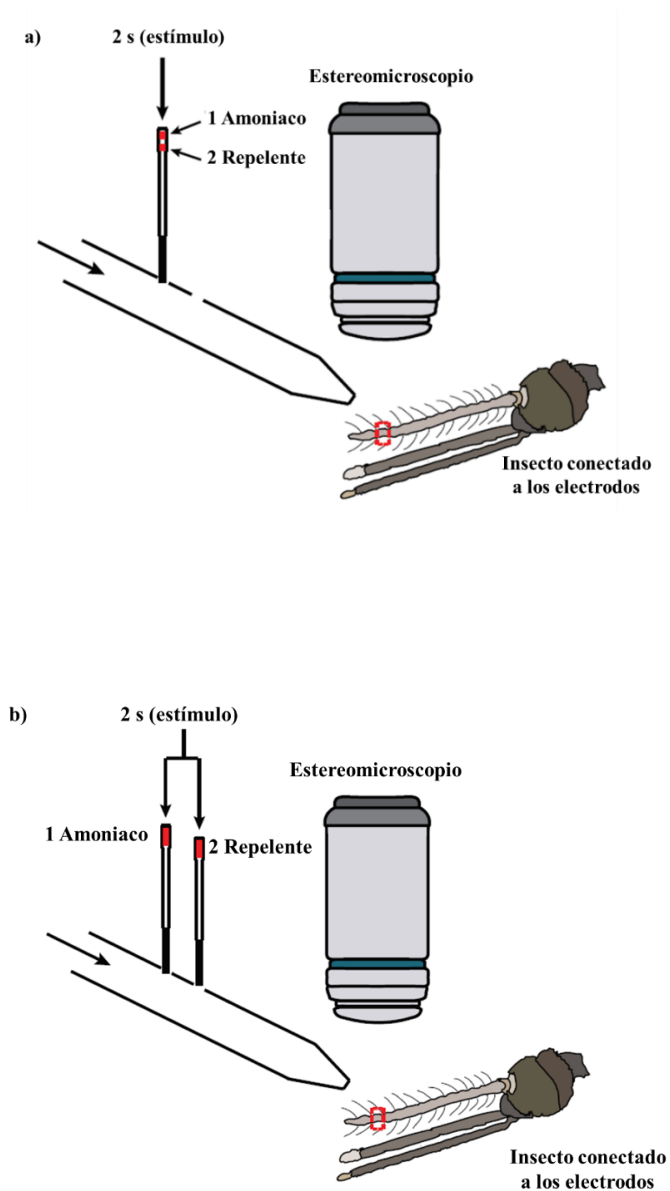
Los compuestos repelentes Acetato de geranilo, α -bisabolol, Nerolidol, DEET se administraron mediante una bomba de flujo de aire controlado (*Stimulus controller unit, type CS-55*, Syntech, Alemania) para la evaluación de la actividad electroantenográfica en los zancudos. La bomba de flujo de aire se programó con una secuencia de tres pulsos de aire: 25 mL/s de flujo,

10 segundos para cada pulso, con intervalos de 2 segundos para el flujo de aire que contenía los compuestos repelentes y 8 segundos de únicamente aire empleado como *background*. Antes y después de aplicar cada sustancia repelente, se aplicó un pulso de amoníaco al 25%, una sustancia atrayente para el mosquito. Esto se realizó con el fin de garantizar que el insecto fuese estimulado de forma eficaz con los compuestos durante todo el experimento y observar el cambio en la señal electroantenográfica. En el caso de los compuestos repelentes, como control positivo se empleó el repelente sintético DEET. Adicionalmente, se realizó otro tipo de montaje, que consistió en la liberación simultánea de estímulos de amoníaco y repelente a través del flujo de aire para observar el cambio inicial de la señal del atrayente (amoníaco) (Figura 12). De este modo, se obtuvo un patrón de señales teniendo en cuenta los cambios iniciales y finales del estímulo de amoníaco en la escala de mV al exponer al mosquito a las moléculas repelentes.

Para el segundo tipo de montaje, se realizó la liberación simultánea de amoníaco y repelente. Para esto, se emplearon los compuestos individuales acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol, DEET y las mezclas, mezcla 1, mezcla 2, mezcla 3 y mezcla 4 en concentraciones de 50 y 100 mg/mL (Figura 12), primero se realizó un estímulo de amoníaco al 25% seguido de la liberación simultánea amoníaco-repelente. Para este tipo de montaje se implementó un mosquito por cada concentración y sustancia con un número mínimo de réplicas de N=7 por cada experimento.

Figura 12.

Aplicación de estímulos para obtención de señales electroantenográficas. a) El estímulo aplicado por el flujo de aire consistió en un pulso inicial de amoníaco seguido del repelente a una concentración específica. b) El estímulo consistió en la aplicación simultánea de amoníaco y repelente a una concentración.



3.6 Análisis estadísticos

Las respuestas de señal eléctrica obtenidas por el equipo de electroantenografía fueron calculadas mediante el promedio de la amplitud máxima (mV) como respuesta a cada pulso de aire administrado con las moléculas a evaluar. Las señales de electroantenografía se compararon según el cambio en la escala de mV o μ V teniendo en cuenta el amoníaco antes y después de la aplicación del repelente. Los datos se sometieron a pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Cuando los datos presentaron distribución normal, se les aplicó pruebas de comparación de medias de una vía (ANOVA) y posteriormente, una prueba Tukey o una prueba de t-student cuando fue necesario. Cuando la distribución de los datos no fue normal, se aplicaron pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis). Las comparaciones se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor fue de $p < 0,05$. El software que se empleó para los análisis estadísticos fue Statistic V11 (Statsoft) y GradPad Prism 5.

3.7 Análisis proteómico

3.7.1 Tratamiento de los zancudos

Aproximadamente 140 hembras adultas de *Ae. aegypti* de 3-10 días de emergidas, no alimentadas con sangre, fueron almacenadas en una jaula de seguridad para zancudos completamente sellada con vinipel plástico. Esto se realizó con el fin de evitar la rápida volatilización de los repelentes dentro de la jaula y mantener aproximadamente la misma cantidad de moléculas en la jaula durante la exposición del mosquito a la sustancia. Se impregnó un papel

filtro con soluciones individuales a 100 mg/mL en acetona de la mezcla 1 (acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol, cada uno a 100 mg/mL) y como control positivo la sustancia DEET a 100 mg/mL. Luego de aplicar la sustancia en el papel filtro, se dejó volatilizar el solvente durante 1 minuto y se colocó en la jaula junto con los mosquitos. Teniendo en cuenta que la duración de los experimentos de EAG supera los 10 minutos y que los experimentos *in vivo* de repelencia tienen una duración entre 1 a 3 horas como tiempo máximo (Portilla-Pulido *et al.*, 2020), se seleccionó un periodo de tratamiento de 45 minutos, en el cual, el mosquito fue expuesto ante los repelentes de origen natural y sintético. Este periodo de tratamiento se seleccionó con el fin de observar la expresión diferencial de las proteínas del sistema olfativo en etapas tempranas del mecanismo de acción. Al finalizar, la jaula se dispuso en un congelador a -20 °C por 20 min con el fin de sacrificar todos los mosquitos y mantener la integridad de los tejidos y evitar la degradación de proteínas. Como control de estos experimentos de proteómica diferencial, se utilizaron zancudos sin exponerse a los compuestos repelentes mencionados bajo las mismas condiciones experimentales previamente mencionadas.

3.7.2 Extracción de proteínas

Las proteínas totales fueron extraídas de aproximadamente 140 cabezas de hembras adultas de *Ae. aegypti* de 3-10 días de emergidas, no alimentadas con sangre. Las cabezas fueron escindidas con ayuda de pinzas entomológicas (Biologika) disponiendo el insecto en un estereoscopio (Leica Zoom 2000). Posteriormente, las cabezas cortadas se colocaron en un vial *ependorf* con 250 μ L de buffer de lisis (7 M Urea, 2 M Tiourea, Triton X-100, 0,5%, formalitos 1,2%, DTT 20 mM, CHAPS 4% p/v) a 4 °C. El vial *ependorf* con el contenido se colocó en un

homogeneizador de tipo Van Potter con el fin de triturar de forma homogénea los tejidos de la cabeza del mosquito y extraer la mayor cantidad de proteína de los tejidos. La homogeneización se realizó por un periodo máximo de 5 minutos hasta maceración completa en una temperatura de 4 °C en un baño de hielo. Posteriormente, el contenido se centrifugó a 12000g y 4 °C durante 15 minutos (Microfuge® 20R Centrifuge) y se tomó únicamente el sobrenadante. Finalmente, la muestra centrifugada se colocó en otro vial *ependorf* y la concentración de proteína se determinó con el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando una curva de calibración de albúmina sérica bovina BSA. La muestra fue almacenada a -75 °C hasta ser empleada para electroforesis bidimensional.

3.7.3 Electroforesis bidimensional

3.7.3.1 Gel de electroforesis Isoelectroenfoque IEF. Se preparó una solución de buffer de rehidratación y la muestra según la cantidad de proteína extraída. Se emplearon tiras de gradiente no lineal de pH inmovilizado IPG (Immobilized pH gradient), con rango de pH de 3 a 10, que fueron hidratadas con una solución buffer (Buffer de rehidratación 7M Urea, 2M Thiourea, 1% CHAPS, 20 mM DTT, 0,25% de fomalitos del mismo rango de pH de las tiras y azul de bromofenol 0,1%). Después se dejaron rehidratar las tiras durante 16 horas. Luego de ese tiempo, se trasladaron las tiras a una bandeja o cámara de Isoelectroenfoque IEF (Protean i12 IEF Cell). Se estableció una rampa o gradiente lineal de voltaje entre 300-10000 V (300 V durante 30 min, 700 V durante 30 min, 1000 V durante 30 min, 1500 V durante 60 min, 2000 V durante 60 min,

3000 V durante 60 min, 7000 V durante 60 min, 10000 V durante 60 min) y una rampa rápida hasta alcanzar 80 kV/h.

3.7.3.2 Equilibrio y gel de electroforesis SDS Page. Antes de pasar la muestra por el gel SDS, las tiras de pH fueron tratadas con buffer de equilibrio por 15 minutos en agitación. El primer buffer de equilibrio contenía 50 mM de Tris-HCl pH 8,8, 6 M Urea, 20% glicerol, 2% SDS y 1% DTT. En el segundo tratamiento el buffer contenía yodoacetamida 2,5% en lugar de DTT. Después del proceso de equilibrio se preparó el gel de poliacrilamida 12,5% en la cámara de electroforesis (Bio-Rad) y se colocó la tira obtenida por IEF. Al montaje de electroforesis se adicionó buffer de corrida (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% w/v SDS, 0,2% azul de bromofenol, 200 mM DTT). Finalmente, se conectó la cámara a una fuente de poder (Bio-Rad) a 150 V durante 1 hora.

Al finalizar el experimento bidimensional, se realizó una tinción de las proteínas del gel de electroforesis con azul de Coomassie G250 y los geles obtenidos fueron registrados en un fotodocumentador (Gel-doc de Bio-Rad). Los experimentos de gel bidimensional se realizaron por triplicado para cada tratamiento. Luego, estos geles fueron analizados utilizando el software PD Quest. Mediante el PD Quest, se obtuvieron aquellos spots con diferencias significativas en la expresión diferencial con ayuda del parámetro *foldchange*, un valor relativo indicó el cambio en la expresión de una proteína teniendo como referencia el control del experimento (sobre expresión $\geq 2,0$ en intensidad relativa; inhibición $\leq 0,5$ en intensidad relativa) realizando las comparaciones control (sin tratamiento) vs DEET, control (sin tratamiento) vs mezcla de compuestos (mezcla 1: acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol).

3.7.4 Identificación y comparación de proteínas con expresión diferencial después de tratamiento con la mezcla 1 y el DEET

Las proteínas encontradas con expresión diferenciada, sobreexpresión o inhibición, se escogieron para ser analizados por espectrometría de masas en tiempo de vuelo MALDI-TOF MS. A estos spots se les realizó un proceso de extracción, decoloración con acetonitrilo (ACN) al 50% y ácido trifluoroacético (TFA) al 1% y posteriormente una digestión con la proteasa tripsina para obtener péptidos. Después del tratamiento triptico, los péptidos fueron sembrados en un *target* de espectrometría de masas (Bruker) con matriz de ácido α -ciano hidroxicinámico (HCCA) en concentración de 20 mg/mL disuelto en 50% de ACN y 1% de TFA, la relación muestra/matriz sembrada fue 2:1. Las proteínas tripsinizadas fueron analizadas en el espectrómetro de masas de la Universidad Industrial de Santander. Respecto a los patrones para espectrometría de masas se empleó una mezcla de los péptidos bombesina, bradiquinina, reninsustrato y leu-encefalina a 100 ppm cada uno. Los espectros de masas fueron visualizados a través del programa Flexanalysis (Brucker).

Las masas tripticas fueron posteriormente analizadas por el software online Mascot (<http://www.matrixscience.com>) en conjunto con las bases de datos de SwissProt para la identificación de la proteína con su nombre y score. Los parámetros para la obtención del nombre y score fueron los siguientes: Base de datos SwissProt, Enzima de digestión: tripsina, con un máximo de 1 o 2 escisiones “perdidas” o no realizadas por la proteasa durante el proceso de digestión, taxonomía: todas las entradas disponibles, modificaciones fijas: carbamidometil (C), modificaciones variables: oxidación, tolerancia peptídica de 0,5, 1 y 1,5 Da, para un total de 6 posibles proteínas por espectro analizado. De las proteínas obtenidas, la función de estas fue

consultada en la base de datos de Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) o en artículos científicos en la literatura. La selección de las proteínas entre las posibles arrojadas por el software MASCOT se realizó según el *score* y la función de la proteína encontrada. El valor del *score* es una probabilidad de la semejanza del espectro de masas obtenido experimentalmente en comparación a la literatura, a mayor valor de *score* mayor es la certeza en la identificación de dicha proteína (Koenig *et al.*, 2008).

3.7.5 Interacción proteína-proteína

Las proteínas identificadas a través de espectrometría de masas MALDI-TOF MS, fueron seleccionadas para realizar un análisis de posibles interacciones proteína-proteína a través de la herramienta online STRING (<https://string-db.org/>). La lista de proteínas fue introducida en la sección de múltiples proteínas (por nombre) seleccionando como organismo de referencia la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Como ajustes avanzados se seleccionó: full STRING *network* (network type), confianza media (valor relativo de 0,4) y el rango de error estadístico, en escala media (5%). La modificación del estilo de los interactomas se realizó con el programa gratuito Cytoscape, en el cual se modificó el tamaño, etiqueta, color y ubicación de los interactores (Szklarczyk *et al.*, 2011).

3.8 Consideraciones éticas

De acuerdo con lo definido en el artículo 11 de la Resolución No. 008430 del Ministerio de Salud de Colombia, 4 de octubre de 1993, este proyecto presentó un riesgo de clasificación mínimo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que se evaluaron moléculas en insectos y no en humanos. En este sentido, para proteger al investigador, los experimentos se realizaron con todos los implementos de seguridad: guantes, tapabocas, bata, máscara de seguridad y campana de extracción de gases, si fue necesario. Además, se tuvo en cuenta las políticas de seguridad de la sede del Parque Tecnológico Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander.

Con el fin de evitar todo riesgo biológico, en este proyecto se utilizaron insectos del insectario del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (Laboratorio de Entomología Médica) libres de virus y otros patógenos y de referencia (Cepa Rockefeller de *Ae. aegypti*). Los zancudos se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad en jaulas de seguridad. Este proyecto fue avalado por el Comité de Ética en Investigación Científica (CEINCI) de la Universidad Industrial de Santander durante la reunión registrada en el acta No. 8 del día 22 de mayo de 2020.

3.8.1 Uso de animales

En relación con el uso de animales, con el fin de suministrar a las hembras de *Ae. aegypti* alimentación sanguínea para la obtención de huevos, se emplearon ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de raza Wistar WI IOPS AF/Han, facilitadas por el bioterio de la Universidad Industrial de Santander, cumpliendo las disposiciones de la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

3.8.2 Manejo de sustancias químicas

El Parque Tecnológico Guatiguará genera residuos en cantidades y características de interés sanitario y ambiental (biológicos, químicos y desechos sólidos, entre otros) que merecen un manejo, clasificación, almacenamiento y una disposición final adecuada. Para la gestión integral de estos residuos, se tuvieron en cuenta los lineamientos descritos en la normatividad legal vigente, como la Ley novena de 1979, Código Sanitario Nacional; el Decreto 4741 del 2005 por el cual se reglamenta el manejo de residuos peligrosos en Colombia y el Decreto 351 de febrero de 2014, el cual armoniza y actualiza ambiental y sanitariamente la gestión integral de los residuos generados en la atención en salud y otras actividades en Colombia. Es así como en el año 2008 se formuló y elaboró el PLAN DE GESTIÓN INTEGRAL DE RESIDUOS SÓLIDOS – PGIRS de la Sede Guatiguará, el cual fue viabilizado por la Coordinación de la Sede y por la Secretaría Departamental de Santander.

4. Resultados

4.1 Electroantenografía

4.1.1 Registros de EAG de compuestos repelentes

Con el fin de observar los cambios en señales electroantenográficas en el sistema nervioso de *Ae. aegypti*, se expusieron los mosquitos a diferentes compuestos: Acetato de geranilo, nerolidol, α -bisabolol y DEET, en concentraciones 0,5, 1, 10, 50 y 100 mg/mL. Para las cuatro

sustancias, se registraron señales de electroantenografía con valores de amplitud entre 0 y 200 μV , el amoníaco aplicado de forma inicial presentó valores de alta intensidad en la escala de μV , entre 1197 y 1983 μV ; además, la señal aplicada al final del experimento presentó reducciones porcentuales entre 36,5 a 79,% con diferencias estadísticas significativas al comparar las señales de amoníaco aplicadas al inicio y final del experimento (ANOVA de una vía, Posthoc Prueba Tukey) (Tabla 1).

Tabla 1.

*Señales de electroantenografía empleando todas las concentraciones de repelente en el mosquito. Señales de electroantenografía (microvoltios $\pm$ desviación estándar, $\mu\text{V} \pm \text{SEM}$) de los compuestos acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol, DEET en las concentraciones 0,5, 1, 10, 50 y 100 mg/mL, con un estímulo inicial y final de amoníaco. Para cada una de las sustancias se muestra el cambio porcentual de la señal de amoníaco luego de implementar los repelentes en las concentraciones mencionadas. (**) y (***) indican diferencias estadísticas significativas entre las señales EAG de amoníaco antes y después de aplicar las sustancias repelentes mencionadas. ANOVA de una vía, (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$, posthoc Prueba Tukey.*

Sustancia	Señal de electroantenografía ($\mu\text{V} \pm \text{SEM}$)						NH ₃ final	Reducción (%)
	NH ₃ inicial	0,5 mg/mL	1 mg/mL	10 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL		
Acetato	1197,0						911,4	
de	$\pm$	168,6 $\pm$	177,1 $\pm$	154,3 $\pm$	125,7 $\pm$	117,1 $\pm$	$\pm$	36,5 $\pm$ 10,2
geranilo	216,0	34,6	43,5	47,0	34,6	28,1	183,5	

α-bisabolol	1940,0						397,1	
	$\pm$	0,0 $\pm$	0,0 $\pm$	0,0 $\pm$	0,0 $\pm$	0,0 $\pm$	$\pm$	79,5 $\pm$ 6,0***
	120,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	115,4	
Nerolidol	1983,0						574,3	
	$\pm$	194,3 $\pm$	200,0 $\pm$	160,0 $\pm$	145,7 $\pm$	134,3 $\pm$	$\pm$	71,0 $\pm$ 5,2***
	170,1	47,0	24,3	28,3	16,2	18,4	103,8	
DEET	1757,0						997,1	
	$\pm$	171,4 $\pm$	177,1 $\pm$	128,6 $\pm$	128,6 $\pm$	117,1 $\pm$	$\pm$	43,2 $\pm$ 12,9**
	200,3	44,0	62,4	48,8	49,5	28,8	226,2	

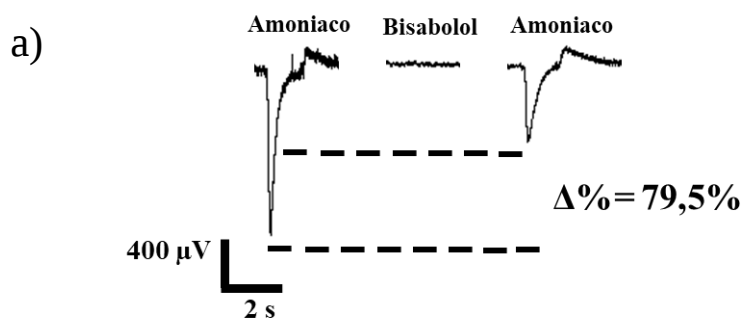
Al aplicar amoníaco, luego de estimular con diferentes sustancias repelentes, se observó que la amplitud EAG correspondiente al amoníaco disminuyó de forma estadísticamente significativa. En el caso del nerolidol (ANOVA de una vía, $F(6,42)=73,36$, $p < 0,0001$; Posthoc Prueba Tukey $p < 0,001$) y α -bisabolol (ANOVA de una vía, $F(6,42)=131,5$, $p < 0,0001$; Posthoc Prueba Tukey $p < 0,001$) las señales post- tratamiento de amoníaco luego de aplicar el repelente disminuyeron de forma estadísticamente significativa (Figura 13). Lo anterior, indica una posible inhibición del sistema olfativo durante la recepción de atrayentes como amoníaco debido a la presencia de estos compuestos repelentes. De igual forma, al aplicar el DEET, las señales post- tratamiento de amoníaco cambiaron de forma significativa (ANOVA de una vía, $F(6,42)=27,95$, $p < 0,0001$; Posthoc Prueba Tukey $p < 0,01$) (Figura 13). De todas las moléculas, el acetato de geranilo fue el único repelente cuyos valores de amplitud post- tratamiento de amoníaco no cambiaron significativamente (Apéndice D).

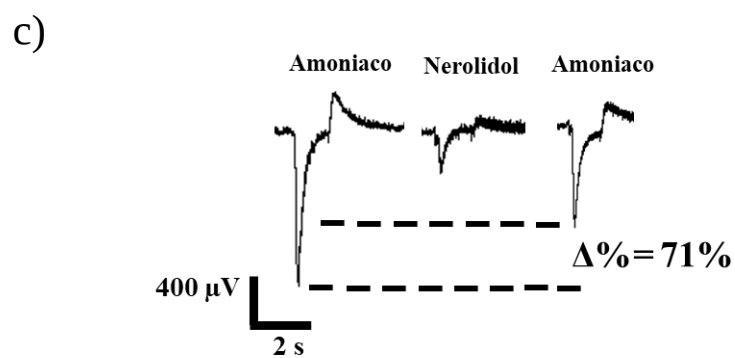
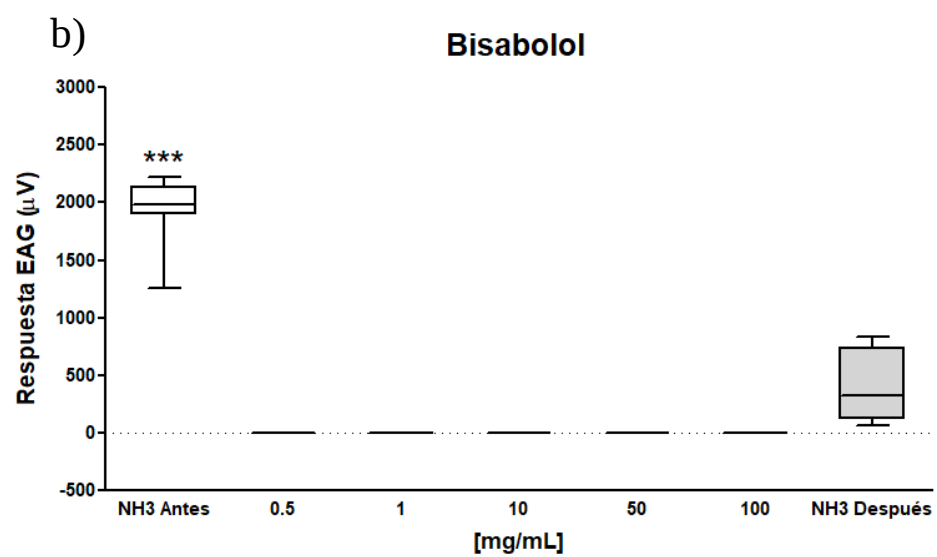
En cada gráfica de la Figura 13, se pueden observar los patrones de señales de EAG para todas las sustancias en diferentes concentraciones. Allí, se evidencia que las señales de amoníaco

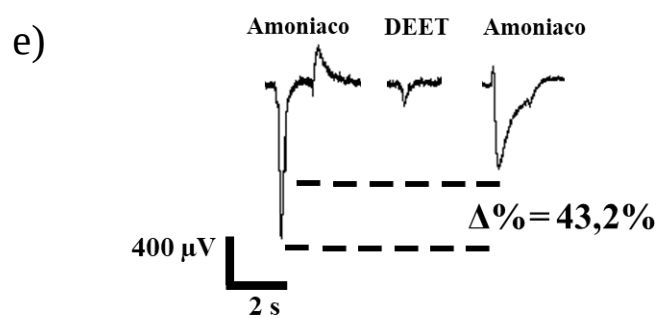
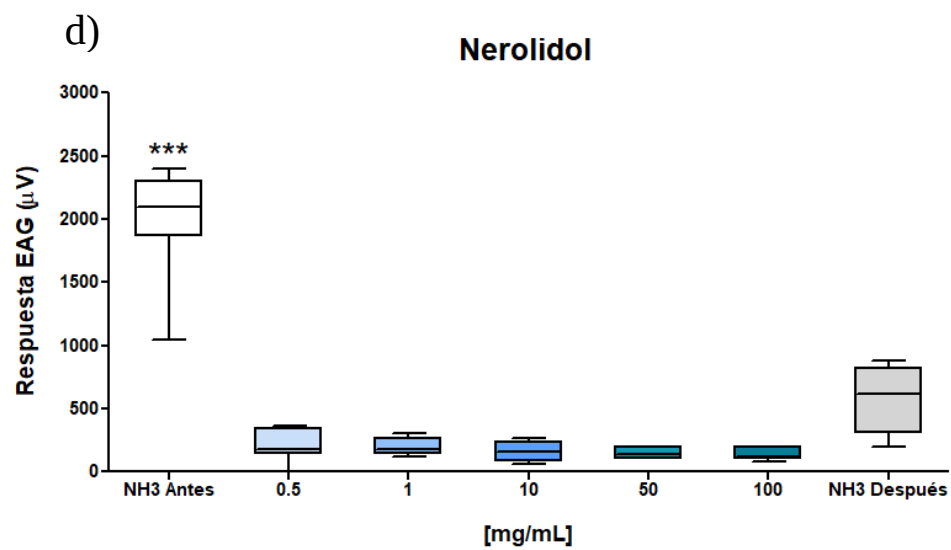
presentan altos valores en la escala de milivoltios (mV) o microvoltios (μV). Adicionalmente, al final de cada pulso de amoníaco se presentó una pequeña elevación justo después de regresar a la línea base, lo que representa el periodo de recuperación o repolarización de la membrana neuronal. En contraste, para los compuestos individuales no presentaron señales con valores superiores a $200 \mu\text{V}$ (Tabla 1). En las figuras para cada una de las moléculas, se muestra un porcentaje que indica el cambio en los valores obtenidos de amoníaco antes y después de aplicar el repelente. En el primer conjunto de experimentos, α -bisabolol, DEET y nerolidol alteraron en mayor proporción la señal captada.

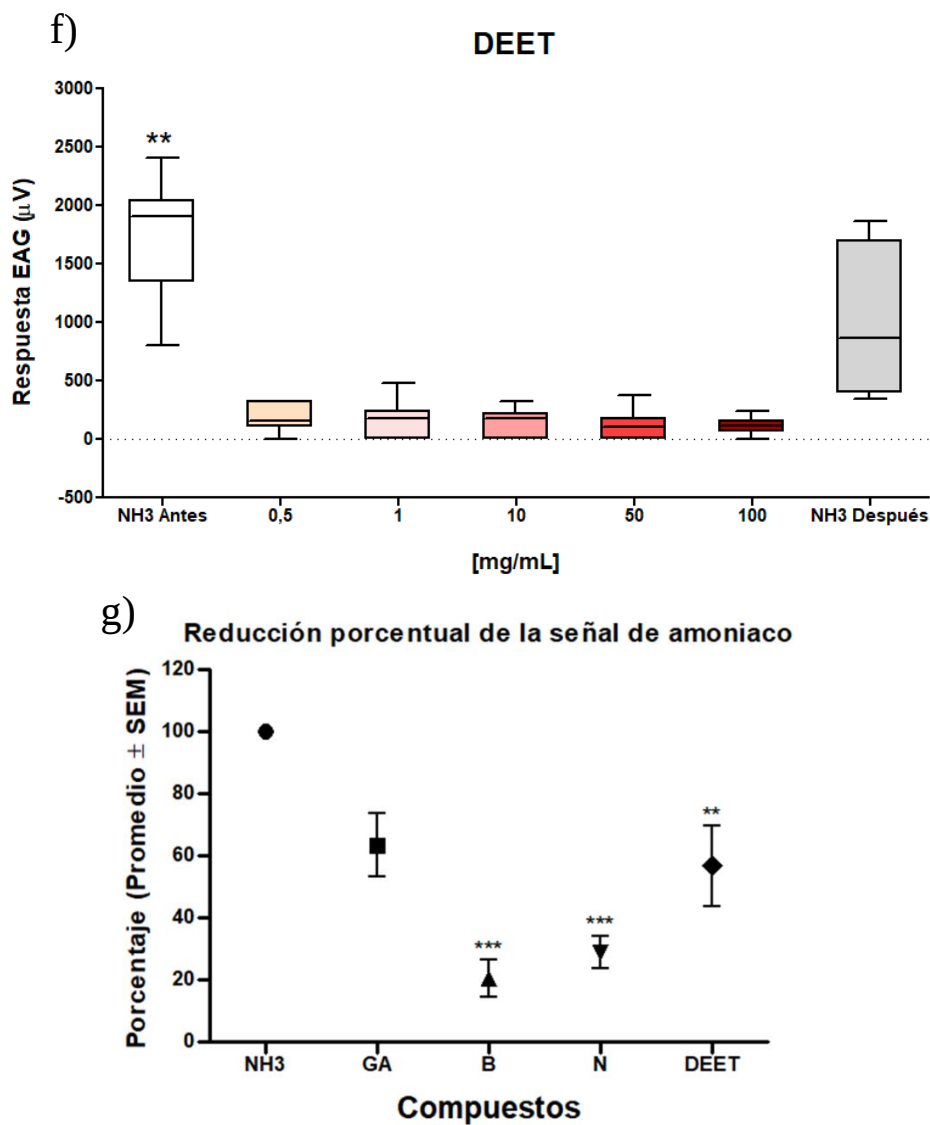
Figura 13.

*Señales electroantenográficas y cambios porcentuales en la señal de amoníaco al aplicar las sustancias, a) α -bisabolol, c) nerolidol y e) DEET en las concentraciones 0,5, 1, 10, 50 y 100 mg/mL, con un estímulo pre y post tratamiento de amoníaco. Registros de señales de electroantenografía para las sustancias, b) α -bisabolol, d) nerolidol, f) DEET en todas las concentraciones mencionadas, g) Resumen de la reducción porcentual (promedio $\pm$ desviación estándar SEM) del estímulo de amoníaco en el sistema olfativo del mosquito al exponerse a los repelentes en todas las concentraciones mencionadas (NH_3 : amoníaco, GA: acetato de geranilo, B: α -bisabolol, N: nerolidol). (**) y (***) indican diferencias estadísticas significativas entre las señales EAG de amoníaco antes y después de aplicar las sustancias repelentes mencionadas. ANOVA de una vía, (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$, posthoc Prueba Tukey.*









4.1.2 Registro de EAG con diferentes mezclas de repelentes

Respecto a las mezclas 1 a 4 (mezcla 1: acetato de geranilo, α -bisabolol y nerolidol, mezcla 2: acetato de geranilo y nerolidol, mezcla 3: nerolidol y α -bisabolol, mezcla 4: acetato de geranilo y α -bisabolol), se observó el mismo comportamiento en las señales de EAG. Para estas mezclas se

obtuvieron valores de amplitud bajos en la escala de μV , entre 135 y 277,8 μV para cada mezcla (Tabla 2).

En comparación con los compuestos utilizados de forma individual, todas las mezclas en concentración 50 y 100 mg/mL, presentaron cambios de amplitud en las señales post- tratamiento de amoníaco estadísticamente significativas, tal como se describe a continuación. La mezcla 1 presentó diferencias estadísticas significativas en ambas concentraciones (Figura 14). En cuanto a la mezcla 1 [50 mg/mL], el estadístico correspondiente fue (ANOVA de una vía, $F(2,18)=154,8, p < 0,0001$; Posthoc Prueba Tukey $p < 0,001$) y en el caso de la mezcla 1 en concentración de 100 mg/mL (ANOVA de una vía, $F(2,21)=62,86, p < 0,0001$; Posthoc Prueba Tukey $p < 0,05$). De igual forma, las mezclas 2 y 3 (Apéndices E y F) y mezcla 4 (Figura 15) presentaron diferencias estadísticas significativas al comparar las señales post- tratamiento de amoníaco presentando los siguientes estadísticos: mezcla 4 en concentración 50 mg/mL (ANOVA de una vía, $F(2,21)=25,06, p < 0,0001$; Posthoc Prueba Tukey $p < 0,01$) y mezcla 4 en concentración 100 mg/mL (ANOVA de una vía, $F(2,21)=29,99, p < 0,0001$; Posthoc Prueba Tukey $p < 0,01$). Al comparar los resultados mostrados en la Figura 13, para compuestos individuales y para las mezclas de las Figuras 14, 15, apéndices E y F, se puede observar que la señal post- tratamiento de amoníaco cambia en mayor proporción cuando se implementan todas las concentraciones en un solo experimento (0,5, 1, 10, 50 y 100 mg/mL) (Figura 13g). Esto indica que la disminución en la capacidad olfativa se debe a la exposición prolongada con el repelente y, por lo tanto, produce la alteración en la transducción de señales eléctricas y probablemente paso de iones a través de la membrana neuronal.

Tabla 2.

Señales de electroantenografía (microvoltios $\pm$ desviación estándar, $\mu V \pm SEM$) de las mezclas 1, 2, 3, 4 en las concentraciones 50 y 100 mg/mL empleando un mosquito por réplica y concentración. Para cada

experimento se aplicó un pulso inicial y final de amoníaco. Además, en cada una de las concentraciones se muestra la reducción porcentual de la señal de amoníaco luego de implementar las mezclas en las concentraciones mencionadas. Mezcla 1 (acetato de geranilo, α -bisabolol y nerolidol), mezcla 2 (acetato de geranilo y nerolidol), mezcla 3 (nerolidol y α -bisabolol), mezcla 4 (acetato de geranilo y α -bisabolol). (*), (**) y (***) indica diferencias estadísticas significativas entre las señales EAG de amoníaco antes y después de aplicar las sustancias repelentes mencionadas. ANOVA de una vía, (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$, posthoc Prueba Tukey.

Señal de electroantenografía ($\mu\text{V} \pm \text{SEM}$)								
Mezcla	NH ₃ inicial	50 mg/mL	NH ₃ final	Reducción (%)	NH ₃ inicial	100 mg/mL	NH ₃ final	Reducción (%)
1	1806,0 $\pm$	220,0 $\pm$	1351,0	25,2 $\pm$	2355,0 $\pm$	197,5 $\pm$	1768,0	
	55,0	29,0	$\pm$ 95,2	5,3***	146,4	23,7	$\pm$	25,0 $\pm$ 8,2*
							193,3	
2	1751,0 $\pm$	277,8 $\pm$	1476,0	15,7 $\pm$ 5,5*	2154,0 $\pm$	222,9 $\pm$	1594 $\pm$	26,0 $\pm$ 6,8**
	56,1	41,02	$\pm$ 96,5		215,7	24,8	146,2	
3	2680,0 $\pm$	245,7 $\pm$	1857,0	30,7 $\pm$ 8,5*	2760,0 $\pm$	254,3 $\pm$	1886,0	32,0 $\pm$ 9,4*
	255,6	23,4	$\pm$ 226,9		303,7	29,2	$\pm$	
							258,8	
4	1898,0 $\pm$	155,0 $\pm$	1045,0	45 $\pm$ 11,1*	1995,0 $\pm$	135,0 $\pm$	1020,0	51,0 $\pm$ 7,7*
	213,6	27,7	$\pm$ 211,0		249,2	33,33	$\pm$	
							152,9	

En lo concerniente a las mezclas, con cada uno de los estímulos repelentes, se obtuvieron señales entre 135 y 277,8 μV (Tabla 2). Para el amoníaco, se observó el mismo patrón de alta intensidad en la escala de microvoltios (μV) y cambio en la señal luego de la aplicación de las

mezclas de repelente. En las Figuras 14 y 15 se pueden observar los patrones de electroantenografía obtenidos por las mezclas. Al igual que en los anteriores experimentos, las mezclas alteraron la señal obtenida de amoníaco después de aplicar el repelente, siendo estadísticamente significativas al comparar las señales del atrayente (ANOVA de una vía, Posthoc Prueba Tukey). Este efecto indica que aplicar sustancias repelentes de forma individual o en mezcla, también producen inhibición del sistema olfativo del mosquito.

Figura 14.

Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en la señal de amoníaco al aplicar la mezcla 1 (acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol). a) mezcla 1 [50 mg/mL], c) mezcla 1 [100 mg/mL] con un estímulo pre y post tratamiento de amoníaco. Registros de señales de electroantenografía para la mezcla 1, b) mezcla 1 [50 mg/mL], d) mezcla 1 [100 mg/mL]. () y (***) indica diferencias estadísticas significativas entre las señales EAG de amoníaco antes y después de aplicar las sustancias repelentes mencionadas. ANOVA de una vía, (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$, posthoc Prueba Tukey. Junto con cada gráfica, se muestran los patrones de señales de EAG y su cambio porcentual antes y después de la aplicación del repelente.*

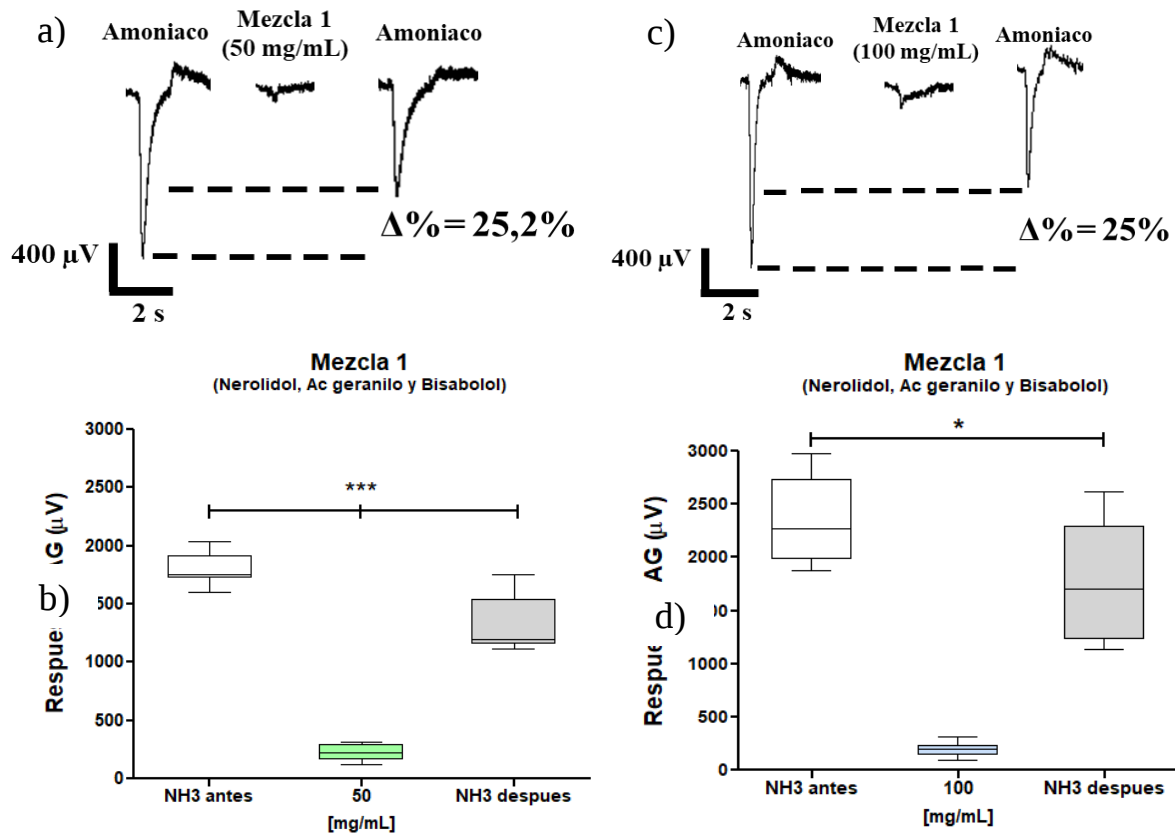


Figura 15.

Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en la señal de amoniaco al aplicar la mezcla 4 (acetato de geranilo y α -bisabolol). a) mezcla 4 [50 mg/mL], c) mezcla 4 [100 mg/mL] con un estímulo pre y post tratamiento de amoniaco. Registros de señales de electroantenografía para la mezcla 4, b) mezcla 4 [50 mg/mL], d) mezcla 3 [100 mg/mL]. (*) indica diferencias estadísticas significativas entre las señales EAG de amoniaco antes y después de aplicar las sustancias repelentes mencionadas. ANOVA de una vía, (*) $p < 0,05$, posthoc Prueba Tukey. Junto con cada gráfica, se muestran los patrones de señales de EAG y su cambio porcentual antes y después de la aplicación del repelente.

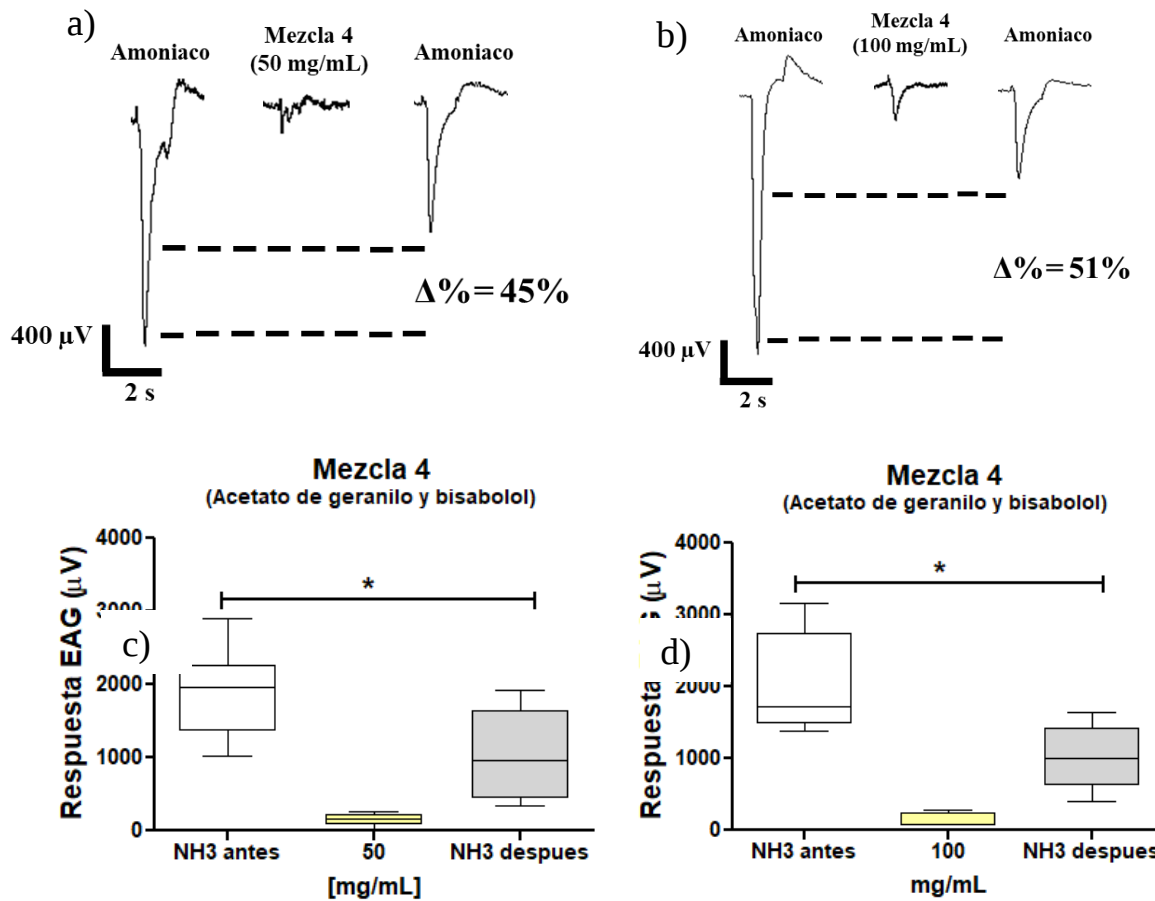
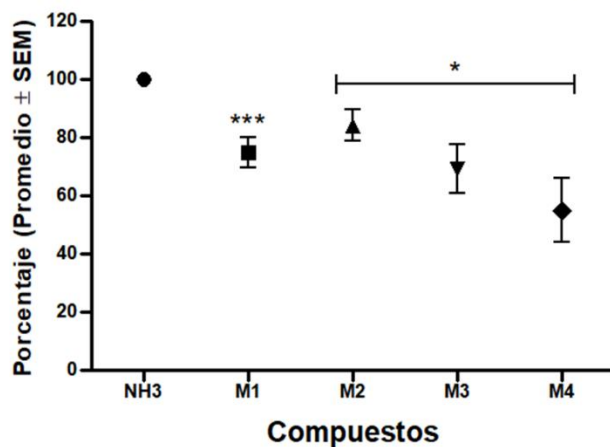


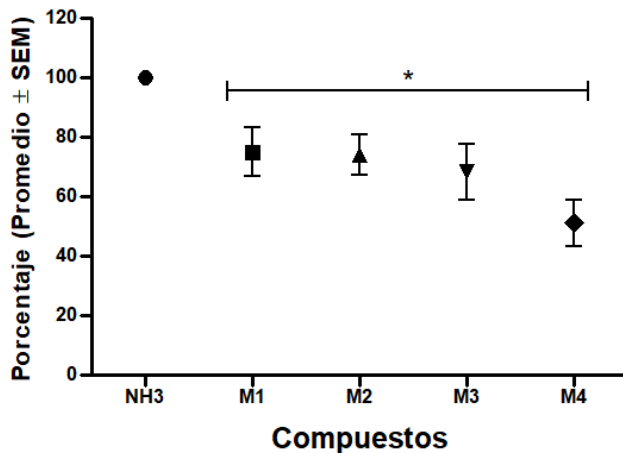
Figura 16.

Resumen de la reducción porcentual (promedio $\pm$ desviación estándar SEM) del estímulo de amoniaco en el sistema olfativo del mosquito al exponerse a las mezclas de los repelentes en las concentraciones a) 50 y b) 100 mg/mL (NH₃: amoniaco, M1: mezcla 1, M2: mezcla 2, M3: mezcla 3, M4: Mezcla 4). (*), (**) y (***) indica diferencias estadísticas significativas entre las señales EAG de amoniaco antes y después de aplicar las sustancias repelentes mencionadas. ANOVA de una vía, (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, posthoc Prueba Tukey. Mezcla 1 (acetato de geranilo, α -bisabolol y nerolidol), mezcla 2 (acetato de geranilo y nerolidol), mezcla 3 (nerolidol y α -bisabolol), mezcla 4 (acetato de geranilo y α -bisabolol).

a) Reducción porcentual de la señal de amoniaco (50 mg/mL)



b) Reducción porcentual de la señal de amoniaco (100 mg/mL)



4.1.3 Verificación de reducción de señal de EAG de amoniaco

Al contrastar los resultados obtenidos en ambos experimentos, no se obtienen diferencias estadísticas significativas si se utiliza un único zancudo para todas las concentraciones (0,5, 1, 10, 50 y 100 mg/mL) versus un zancudo para las mezclas a 50 y 100 mg/mL. Esto se presentó ya que en ambas metodologías la señal correspondiente al amoniaco y los compuestos repelentes son similares en valores numéricos y la reducción porcentual de la señal de amoniaco fue similar

(Figura 13i y Figura 16). Así, en los siguientes experimentos se utilizó un zancudo por cada concentración y por cada sustancia con el mismo número de réplicas descrito en metodología. Con el fin de verificar que dicha reducción de la señal de amoníaco se debía a las sustancias repelentes aplicadas y no al tiempo de conexión del mosquito, se midieron registros de electroantenografía únicamente con el amoníaco en los tiempos 0, 10, 15 y 20 minutos.

Como se puede observar en la Figura 17, en los tiempos 0, 10, 15 y 20 minutos no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las señales de amoníaco en cada uno de los tiempos. Lo anterior, confirmó que la reducción en la señal de amoníaco obtenida en los experimentos previos fue causada por la aplicación de los compuestos repelentes y no por otros factores como el tiempo de conexión del mosquito o muerte del insecto durante el experimento. Las señales de electroantenografía correspondientes a estos resultados se encuentran en la Tabla 3.

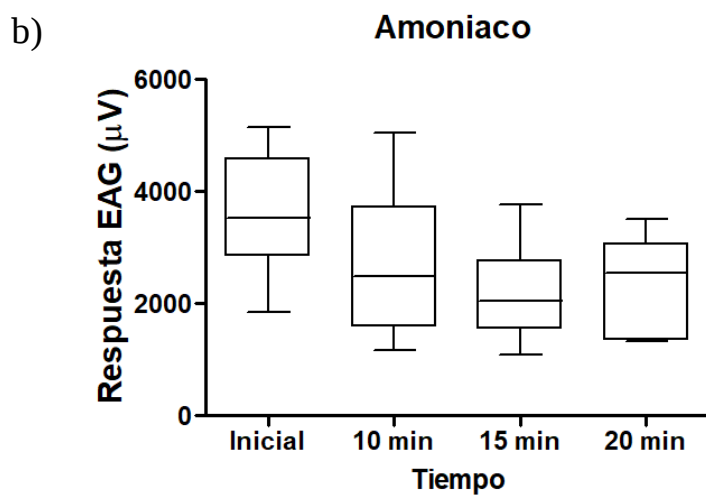
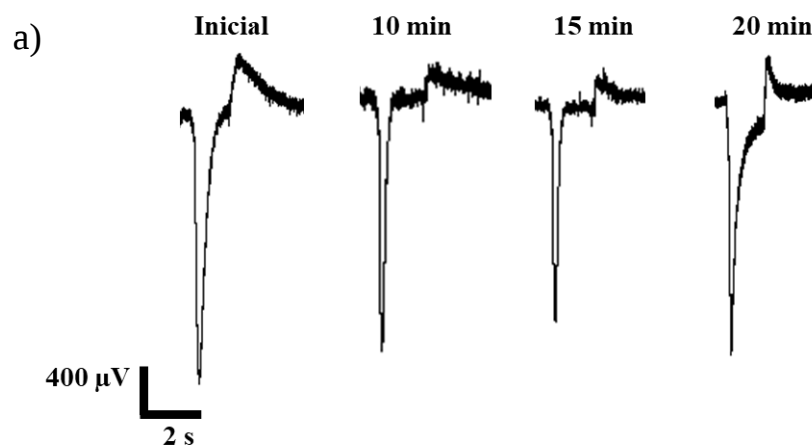
Tabla 3.

Señales de electroantenografía (microvoltios $\pm$ desviación estándar, $\mu V \pm SEM$) correspondientes al amoníaco en diferentes tiempos: inicial (0 minutos), 10, 15 y 20 minutos. La señal de amoníaco no cambia de forma significativa entre periodos de tiempo (0 a 20 minutos).

Sustancia/Tiempo	Señal de electroantenografía ($\mu V \pm SEM$)			
	Inicial (0 min)	10 min	15 min	20 min
NH₃	3563,0 $\pm$ 380,4	2655,0 $\pm$ 464,1	2195,0 $\pm$ 299,9	2315,0 $\pm$ 306,5

Figura 17. Registros de señales electroantenográficas correspondientes al amoníaco, una sustancia atrayente. a) Patrones de señales electroantenográficas relacionadas al amoníaco en diferentes tiempos 0,

10, 15 y 20 minutos. b) Registros de señales para el amoniacó en diferentes tiempos. No hay diferencias estadísticas significativas entre cada uno de los periodos de tiempo ($p > 0,05$, Prueba Tukey).



4.1.4 Registros de EAG con aplicación simultánea de amoniacó y repelente

Al comparar los ensayos de EAG y los experimentos de repelencia *in vivo* con humanos, estos últimos representan una situación más real ya que compuestos volátiles atrayentes (presentes en la piel) y repelentes se encuentran de forma simultánea en el entorno. Este factor no se tuvo en cuenta en la primera parte de EAG ya que se aplicaron los repelentes y el amoníaco por separado. Con el fin de aproximar los experimentos de EAG a un ensayo *in vivo*, se tomaron las señales de patrones de EAG exponiendo al mosquito a los repelentes y el amoníaco simultáneamente.

Respecto a estos resultados, se obtuvieron patrones de EAG similares a los experimentos anteriormente realizados (Figuras 18 a 22). Los valores de registro se presentan en la Tabla 4. En esta, se puede observar que la señal de amoníaco presentó el mismo comportamiento, disminuyendo el valor de amplitud para todas las concentraciones y cada una de las sustancias al aplicar el repelente.

Todas las sustancias y mezclas en concentración de 100 mg/mL, a excepción de la mezcla 2 (Apéndice H) y la mezcla 4 (Apéndice J) disminuyeron en mayor proporción porcentual la señal de amoníaco. Al realizar la respectiva prueba estadística de t-student para cada uno de los compuestos repelentes, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre las señales pre y post amoníaco para el acetato de geranilo a 50 mg/mL (Apéndice G), DEET 50 mg/mL (Figura 20), mezcla 1 a 50 mg/mL (Figura 21) y mezcla 2 a 50 mg/mL (Apéndice H). Lo anterior, infiere que la aplicación simultánea de amoníaco y repelente no cambia la capacidad olfativa o percepción del mosquito en estas concentraciones. Sin embargo, para algunas sustancias a 50 mg/mL y 100 mg/mL se presentaron diferencias estadísticamente significativas al aplicar el amoníaco en simultáneo con un repelente (Figura 22).

En los siguientes casos, la prueba estadística de t-student evidenció diferencias estadísticas significativas entre las señales pre y post de amoníaco de los compuestos tal como se presenta a

continuación: acetato de geranilo 100 mg/mL (t-test, $t(8)=3,189$; $p=0,0128$) (Apéndice G), α -bisabolol 50 mg/mL ($t(7)=2,648$ $p=0,0330$, t-test) y 100 mg/mL ($t(6)=4,231$; $p=0,0055$, t-test) (Figura 18), nerolidol 50 mg/mL ($t(6)=3,794$ $p=0,0090$, t-test) y 100 mg/mL ($t(7)=5,129$; $p=0,0014$, t-test) (Figura 19), DEET 100 mg/mL ($t(7)=2,883$; $p=0,0236$, t-test) (Figura 20), mezcla 1 100 mg/mL ($t(6)=5,824$; $p=0,0011$, t-test) (Figura 21), mezcla 2 100 mg/mL ($t(6)=3,935$; $p=0,0077$, t-test) (Apéndice H) y la mezcla 3 en ambas concentraciones 50 mg/mL ($t(6)=2,791$; $p=0,0315$, t-test), 100 mg/mL ($t(6)=3,912$; $p=0,0079$, t-test) (Apéndice I) y la mezcla 4 en ambas concentraciones 50 mg/mL ($t(6)=3,268$; $p=0,0171$, t-test) y 100 mg/mL ($t(6)=3,295$; $p=0,0195$, t-test) (Apéndice J).

De estos resultados se puede inferir que hay un cambio notorio en la percepción olfativa del mosquito frente a los compuestos repelentes, obteniéndose un cambio porcentual mayor a 30% para las sustancias acetato de geranilo (33,6%), bisabolol (52%), nerolidol (49%), mezcla 1 (56%), mezcla 3 (36%) en concentración de 100 mg/mL y la mezcla 4 (34%) a 50 mg/mL. De los resultados obtenidos a través de electroantenografía, se resalta que la mezcla 1, compuesta por los tres compuestos, fue evaluada en anteriores investigaciones realizadas en el laboratorio. De esto, se obtuvo que las mezclas en formulaciones sencillas muestran una capacidad repelente *in vivo* mejorada y comparable con el DEET en un periodo entre 1 a 3 horas. Con estos resultados, teniendo en cuenta la efectividad obtenida por las señales de EAG y las pruebas *in vivo* ya reportadas, se seleccionó la mezcla 1 para la evaluación de la expresión diferencial de proteínas y como sustancia control, el repelente sintético DEET.

Tabla 4.

Estímulo simultáneo atrayente (amoníaco) y repelentes. Señales de electroantenografía (microvoltios $\pm$ desviación estándar, $\mu V \pm SEM$) de las sustancias acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol, DEET y las mezclas 1, 2, 3, 4 en las concentraciones 50 y 100 mg/mL empleando un mosquito por réplica y concentración. Para cada experimento se aplicó un pulso inicial de amoníaco y luego un estímulo amoníaco-repelente. Para cada una de las sustancias y concentraciones se muestra la reducción porcentual de la señal de amoníaco luego de implementar el amoníaco y repelente de forma simultánea. Mezcla 1 (acetato de geranilo, α -bisabolol y nerolidol), mezcla 2 (acetato de geranilo y nerolidol), mezcla 3 (nerolidol y α -bisabolol), mezcla 4 (acetato de geranilo y α -bisabolol). () indica diferencias estadísticas significativas entre las señales EAG de amoníaco inicial y estímulo simultáneo amoníaco-repelente. ANOVA de una vía, t-student test.*

Señal de electroantenografía ($\mu V \pm SEM$)			
Sustancia	NH ₃ inicial	NH ₃ final (amoníaco + repelente)	Reducción (%)
Acetato de geranilo (50 mg/mL)	1498,0 $\pm$ 194,2	1345,0 $\pm$ 262,9	11,0 $\pm$ 9,2
Acetato de geranilo (100 mg/mL)	1733,0 $\pm$ 195,9	1151,0 $\pm$ 104,8	33,6 $\pm$ 6,0*
α -bisabolol (50 mg/mL)	2045,0 $\pm$ 283,6	1433,0 $\pm$ 163,3	30,0 $\pm$ 8,0*
α -bisabolol (100 mg/mL)	2463,0 $\pm$ 255,6	1183,0 $\pm$ 208,9	52,0 $\pm$ 8,5*
Nerolidol (50 mg/mL)	1446,0 $\pm$ 92,1	982,9 $\pm$ 130,0	32,0 $\pm$ 9,0*

Nerolidol (100 mg/mL)	1998,0 ± 157,9	1028,0 ± 152,6	49,0 ± 7,6*
DEET (50 mg/mL)	1823,0 ± 221,0	1240,0 ± 119,4	32,0 ± 6,5
DEET (100 mg/mL)	1993,0 ± 210,8	1278,0 ± 166,0	36,0 ± 8,3*
Mezcla 1 (50 mg/mL)	2720,0 ± 367,7	1718,0 ± 365,7	37,0 ± 13,4
Mezcla 1 (100 mg/mL)	1834,0 ± 195,2	802,9 ± 99,1	56,0 ± 5,4*
Mezcla 2 (50 mg/mL)	3147,0 ± 257,5	2260,0 ± 537,7	28,0 ± 17,0
Mezcla 2 (100 mg/mL)	1749,0 ± 34,3	1437,0 ± 87,4	18,0 ± 5,0*
Mezcla 3 (50 mg/mL)	1360,0 ± 61,72	1003,0 ± 107,4	26,0 ± 7,9*
Mezcla 3 (100 mg/mL)	2069,0 ± 314,5	1397,0 ± 184,8	36,0 ± 8,3*
Mezcla 4 (50 mg/mL)	1520,0 ± 115,7	1009,0 ± 84,6	34,0 ± 5,6*
Mezcla 4 (100 mg/mL)	1886,0 ± 173,0	1371,0 ± 217,2	28,0 ± 11,5*

Figura 18.

Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoníaco y el repelente de forma simultánea. a) señales de EAG α -bisabolol 50 mg/mL, c) señales de EAG α -bisabolol 100 mg/mL, c) Respuesta EAG α -bisabolol 50 mg/mL y d) respuesta EAG α -bisabolol 100 mg/mL. Los pulsos de amoníaco y repelente simultáneo se aplicaron luego de un pulso inicial de únicamente amoníaco para realizar la comparación estadística y porcentual. () indica diferencias*

estadísticas significativas entre las señales obtenidas de amoniaco vs amoniaco-repelente simultáneo, ANOVA de una vía, t-student test, α -bisabolol 50 mg/mL ($t(7)=2,648$ $p=0,0330$, t-test) y 100 mg/mL ($t(6)=4,231$; $p=0,0055$, t-test).

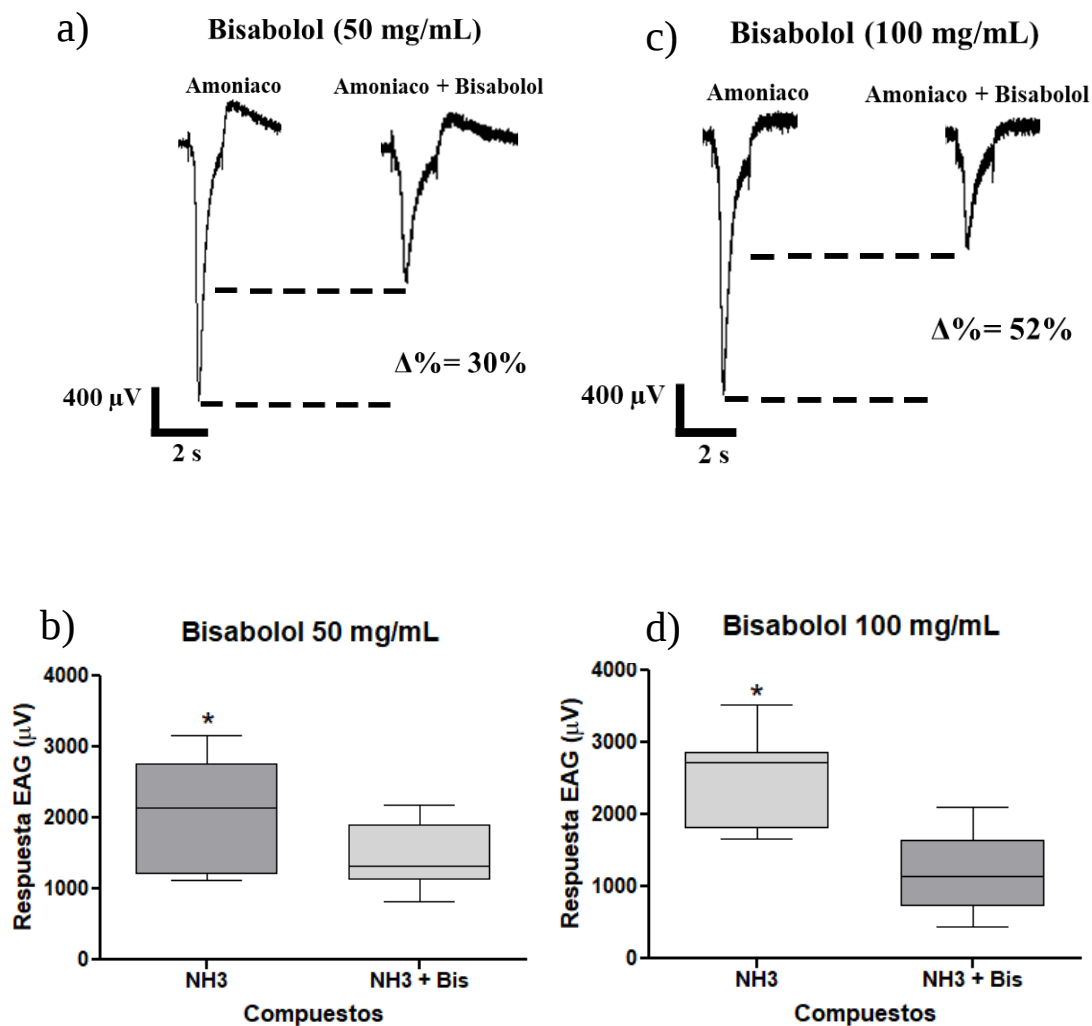


Figura 19.

Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoniaco y el repelente de forma simultánea. a) señales de EAG nerolidol 50 mg/mL, c) señales de EAG nerolidol 100 mg/mL, c) Respuesta EAG nerolidol 50 mg/mL y d) respuesta EAG nerolidol 100 mg/mL. Los pulsos de amoniaco y repelente simultáneo se aplicaron luego de un pulso inicial de únicamente amoniaco para realizar la comparación estadística y porcentual. (*) indica diferencias estadísticas significativas entre las señales obtenidas de amoniaco vs amoniaco-repelente simultáneo, ANOVA de una vía, t-student test, nerolidol 50 mg/mL ($t(6)=3,794$ $p=0,0090$, t-test) y 100 mg/mL ($t(7)=5,129$; $p=0,0014$, t-test).

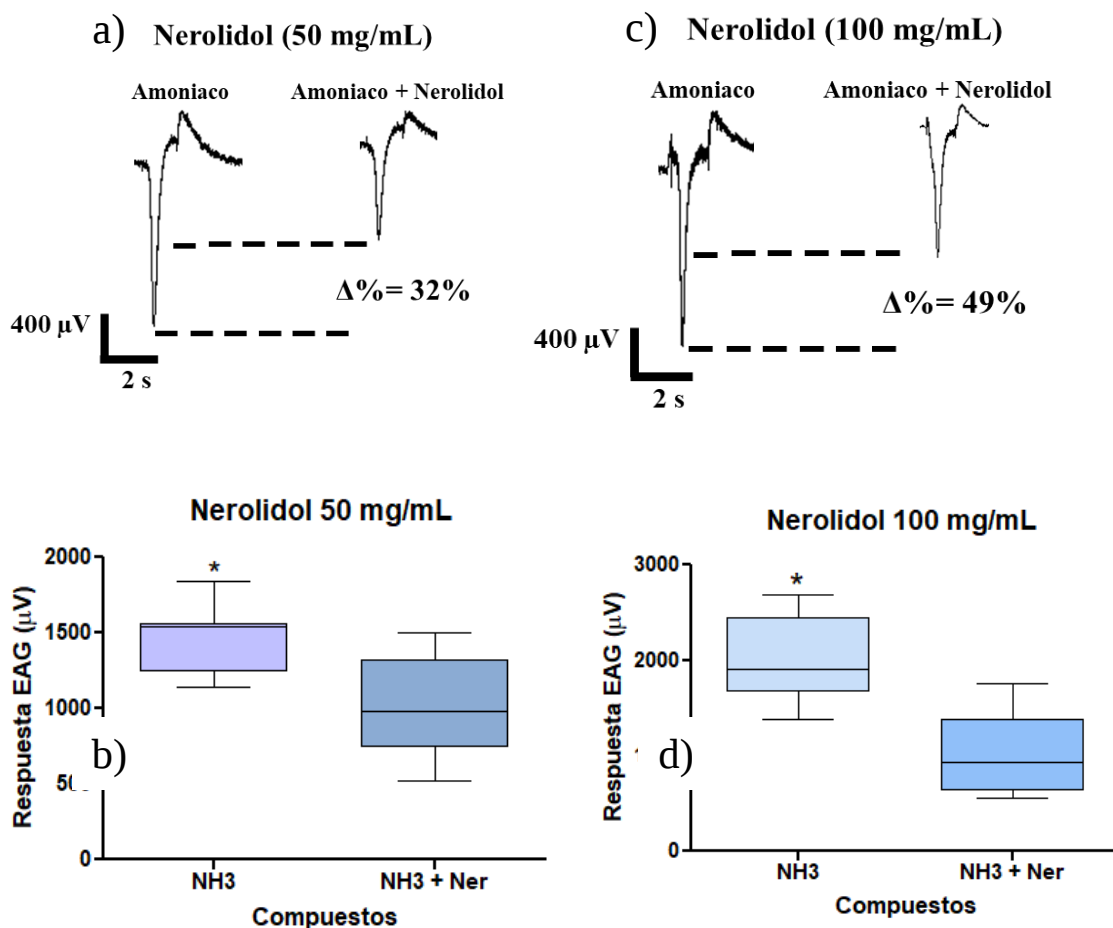


Figura 20.

Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoníaco y el repelente de forma simultánea. a) señales de EAG DEET 50 mg/mL, c) señales de EAG DEET 100 mg/mL, c) Respuesta EAG DEET 50 mg/mL y d) respuesta EAG DEET 100 mg/mL. Los pulsos de amoníaco y repelente simultáneo se aplicaron luego de un pulso inicial de únicamente amoníaco para realizar la comparación estadística y porcentual. (*) indica diferencias estadísticas significativas entre las señales obtenidas de amoníaco vs amoníaco-repelente simultáneo, ANOVA de una vía, t-student test, DEET 100 mg/mL ($t(7)=2,883$; $p=0,0236$, t-test).

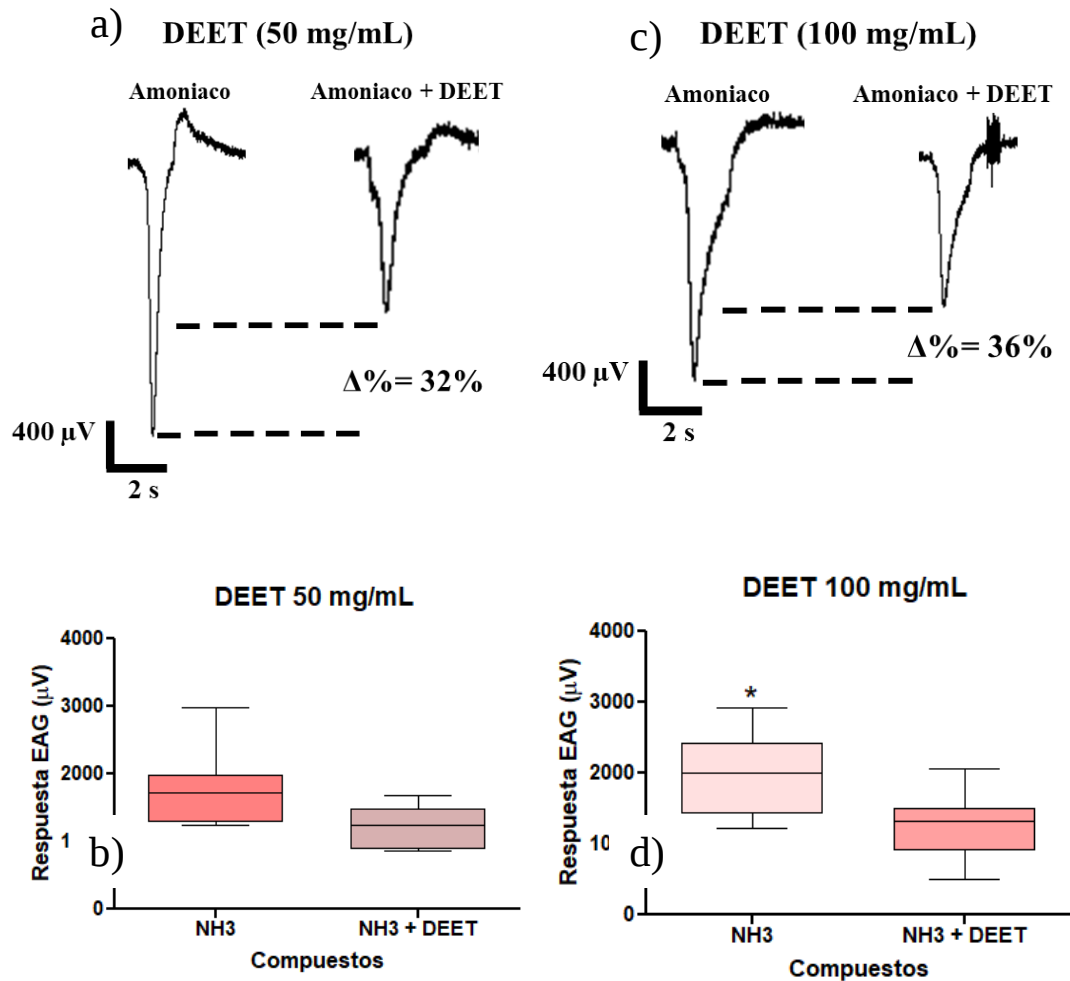


Figura 21.

Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoniaco y el repelente de forma simultánea. a) señales de EAG mezcla 1 (acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol) 50 mg/mL, c) señales de EAG mezcla 1 [100 mg/mL], c) Respuesta EAG mezcla 1 [50 mg/mL] y d) respuesta EAG mezcla 1 [100 mg/mL]. Los pulsos de amoniaco y repelente simultáneo se aplicaron luego de un pulso inicial de únicamente amoniaco para realizar la comparación estadística y porcentual. (*) indica diferencias estadísticas significativas entre las señales obtenidas de amoniaco vs amoniaco-repelente simultáneo, ANOVA de una vía, t-student test, mezcla 1 [100 mg/mL] ($t(6)=5,824$; $p=0,0011$, t-test).

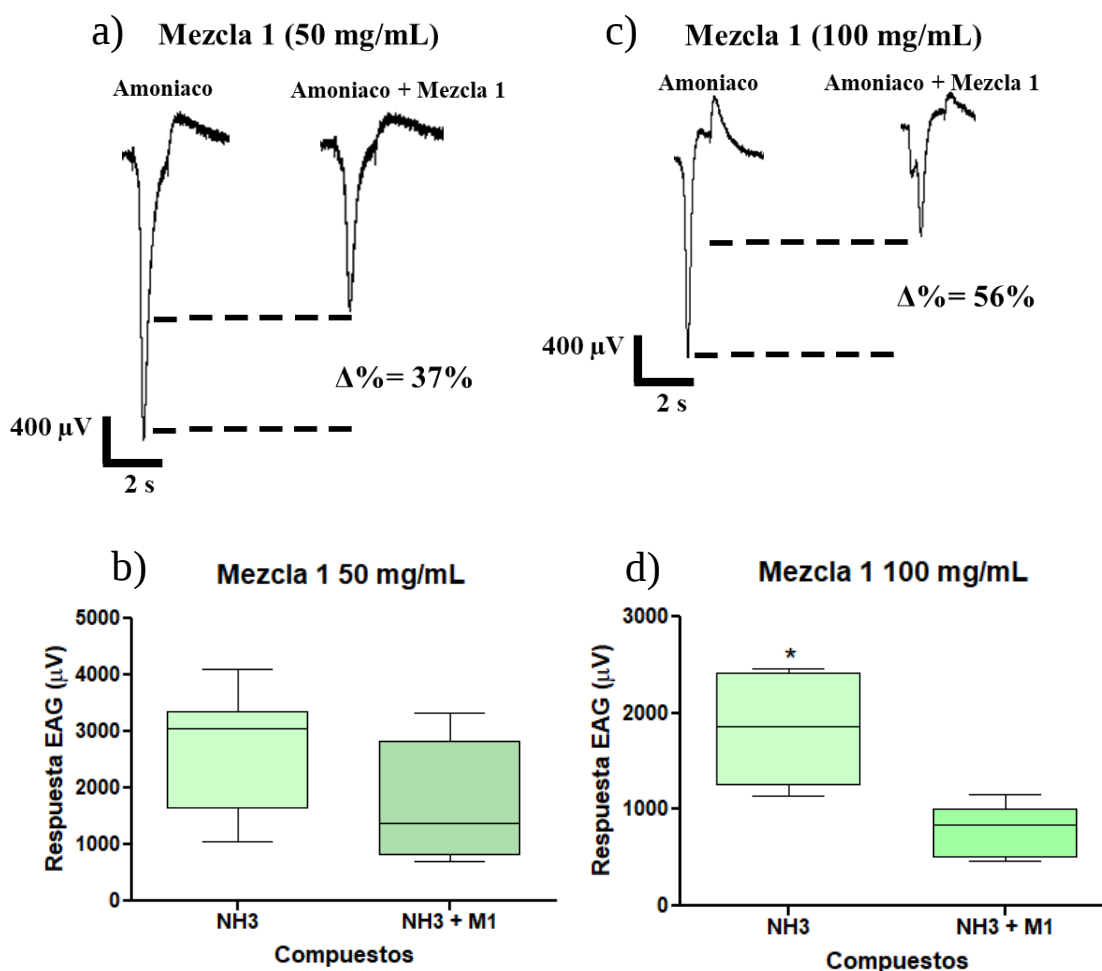
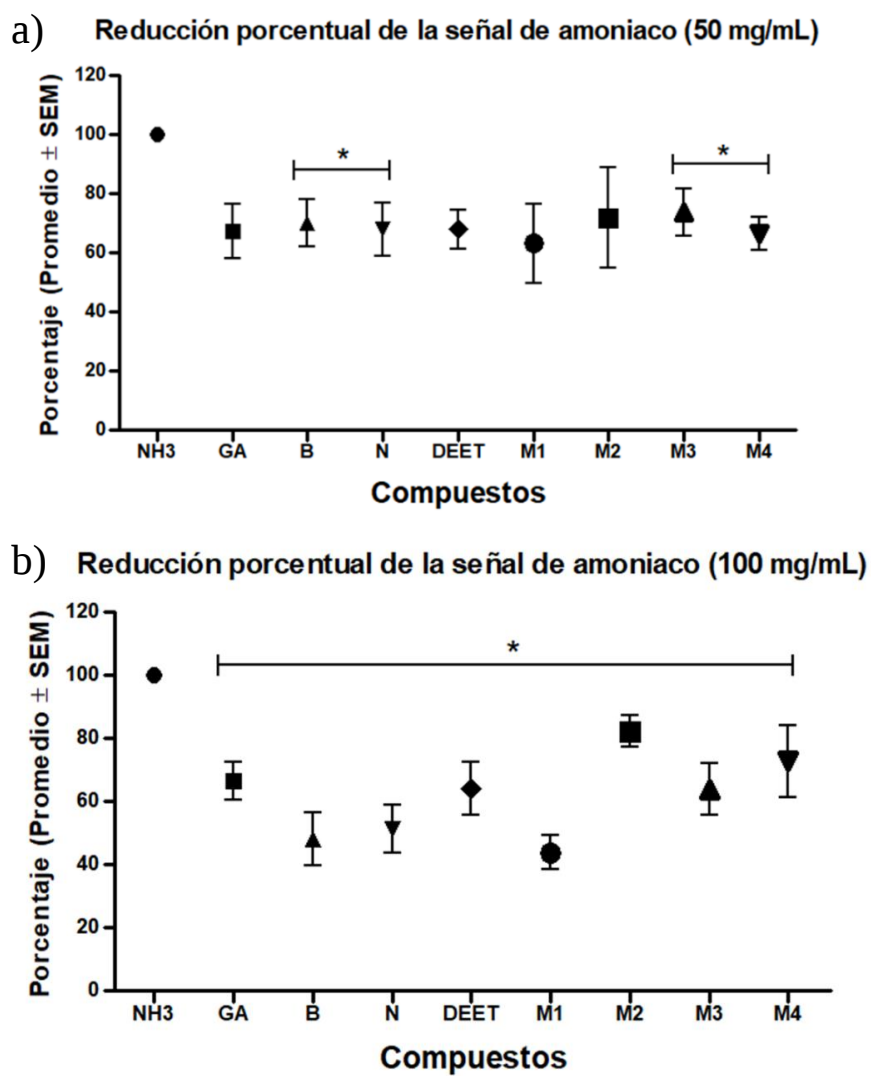


Figura 22.

Resumen de la reducción porcentual del estímulo de amoníaco en el sistema olfativo del mosquito al exponerse a todas las sustancias y mezclas de los repelentes en simultáneo con el amoníaco en las concentraciones a) 50 y b) 100 mg/mL, respectivamente. (NH₃: amoníaco, GA: acetato de geranilo, B: α -bisabolol, N: nerolidol, DEET, M1: mezcla 1, M2: mezcla 2, M3: mezcla 3, M4: mezcla 4). (*) indica diferencias estadísticas significativas entre las señales obtenidas de amoníaco vs amoníaco-repelente simultáneo, ANOVA de una vía, t-student test.



4.2 Identificación y comparación de proteínas con expresión diferencial después de tratamiento con la mezcla 1 y el DEET

Con el fin de observar si la metodología descrita en el ítem 3.7.4 era eficiente para la extracción de proteínas de la cabeza del mosquito hembra, se llevó a cabo una separación de proteínas a través de un gel unidimensional de SDS-page para verificar la presencia de bandas en diferentes rangos de peso molecular. En la Figura 23 se puede observar que el proceso de extracción descrito, utilizando una cantidad aproximada de 140 cabezas de hembras de *Aedes aegypti*, dio como resultado una gran cantidad de bandas en el rango de peso entre menos de 46 kDa a 203 kDa. En dicho experimento se obtuvo una concentración de proteína de aproximadamente 10 mg/mL. Con lo anterior, se verificó que el procedimiento fue apto para la extracción de proteínas. De este modo, se procedió a realizar los diferentes tratamientos del mosquito con las sustancias repelentes, con el DEET a 100 mg/mL y la mezcla 1 (acetato de geranilo, nerolidol y α -bisabolol) a 100 mg/mL y el control, sin tratamiento con alguna sustancia.

Figura 23.

Gel SDS page de una muestra de proteína de cabezas de hembras de Ae. aegypti. En este gel se pueden observar bandas en todos los rangos de peso molecular.

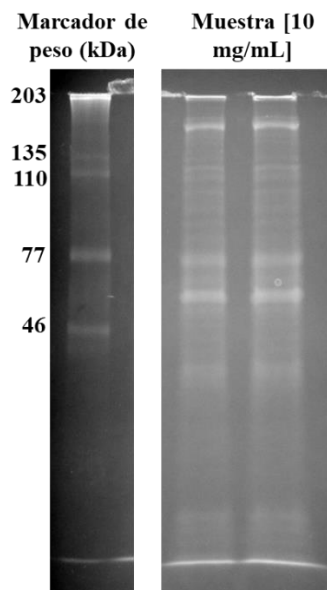
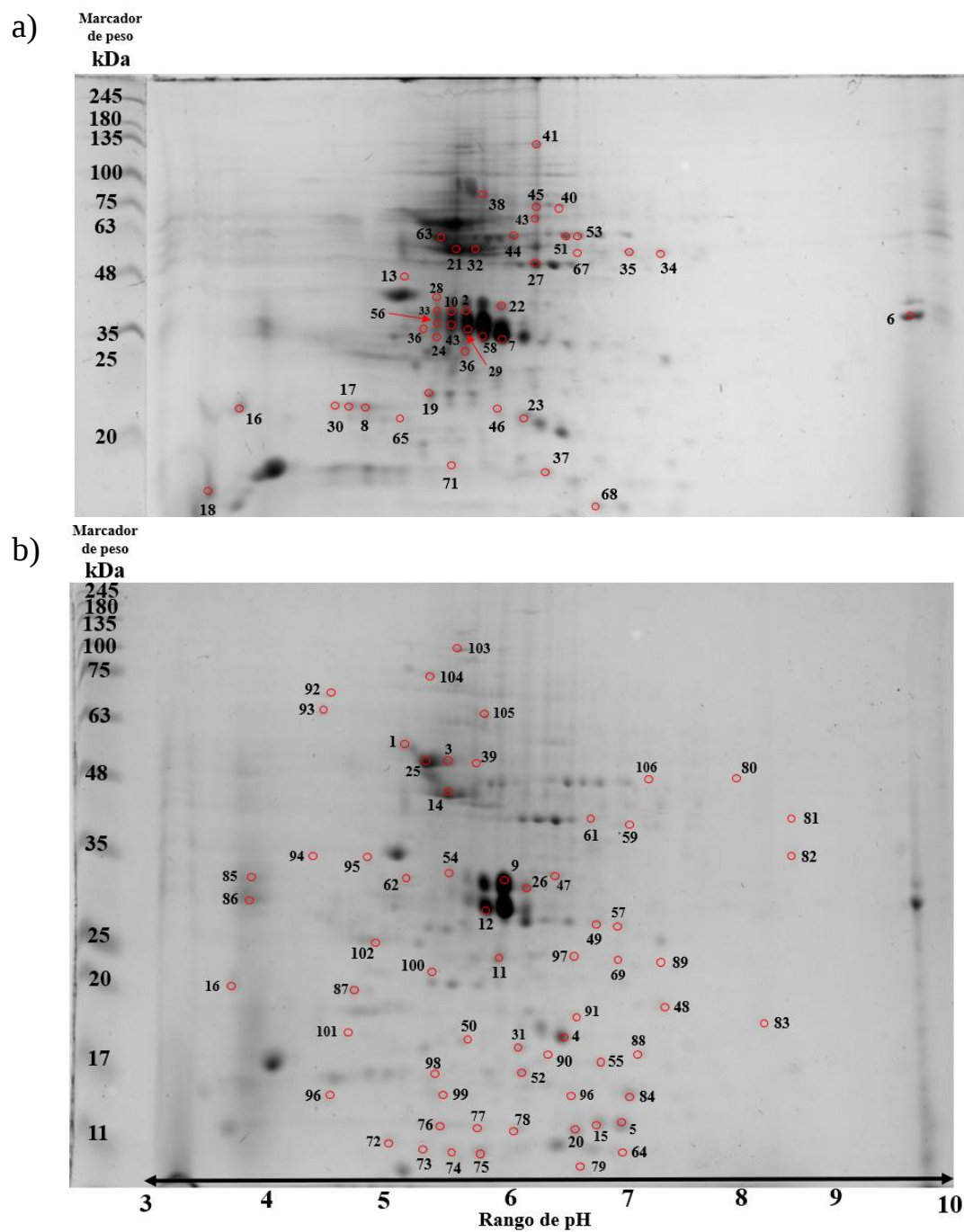
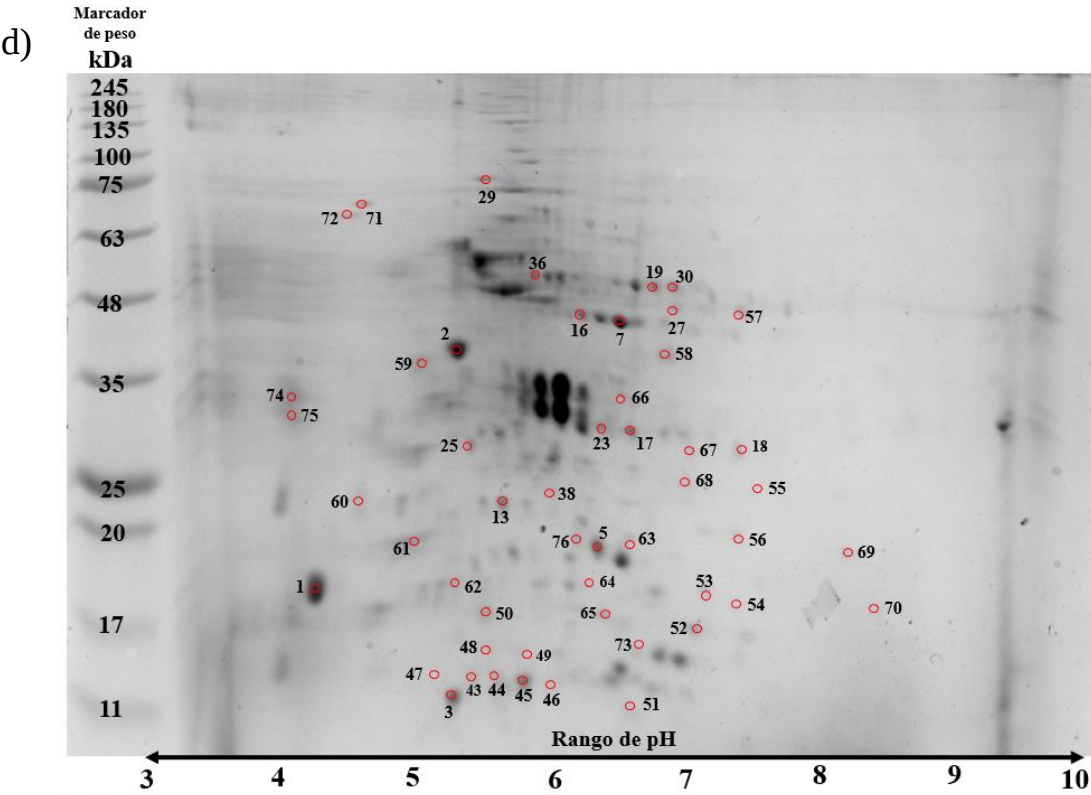
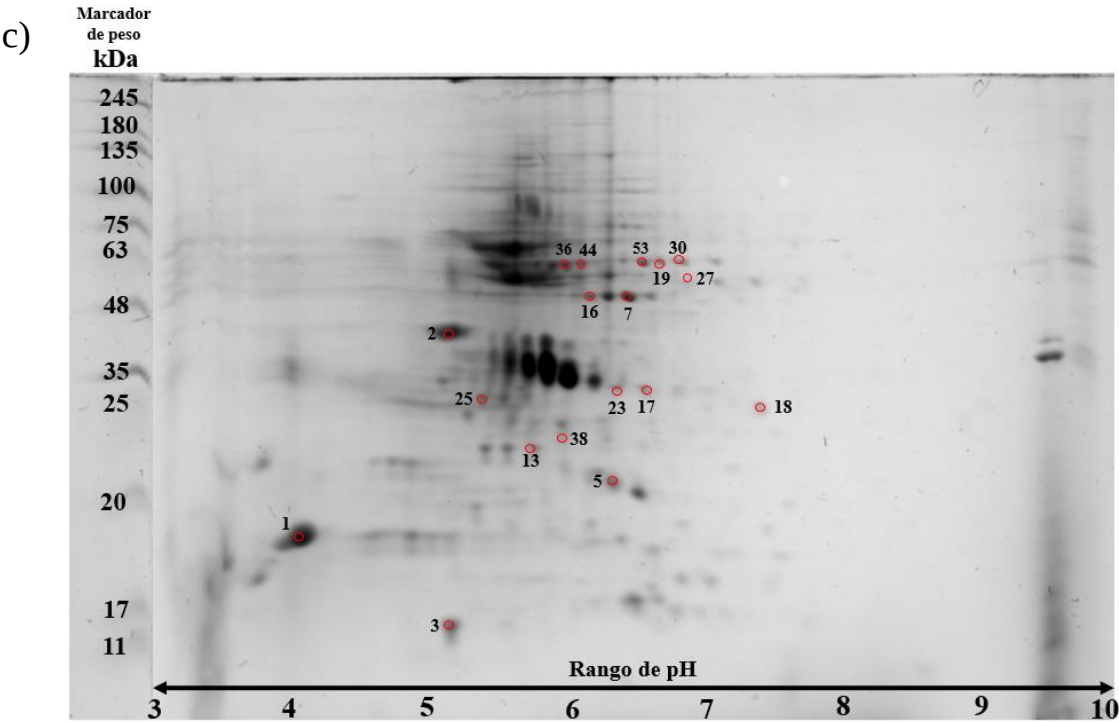


Figura 24.

Geles de electroforesis bidimensional en el rango de pH de 3 a 10 correspondientes a proteínas de la cabeza de hembras de Aedes aegypti obtenidos para: a) Control, mosquitos sin tratamiento con repelentes, los números corresponden a las proteínas con expresión diferencial que se identificaron para el tratamiento control vs mezcla 1 b) Mosquitos tratados con la mezcla 1 (acetato de geranilo, α -bisabolol y nerolidol) cada compuesto a 100 mg/mL, c) Control, mosquitos sin tratamiento con repelentes, los números corresponden a las proteínas con expresión diferencial que se identificaron para el tratamiento con el repelente DEET, d) Mosquitos tratados con la sustancia repelente DEET a 100 mg/mL. Estos geles corresponden a una de las réplicas obtenidas, los geles de cada una de las réplicas pueden ser visualizados en la sección de anexos.





De la extracción de proteínas para el control y los tratamientos con DEET y mezcla 1, se obtuvo una concentración de proteína entre 8 y 13 mg/mL, en todas las réplicas. En la Figura 24 se muestran las imágenes de algunos de los geles para una de las réplicas del control (sin tratamiento), mezcla 1 y DEET. Allí, se muestra únicamente un gel por triplicado, los 9 geles en total pueden ser visualizados en los anexos.

Al observar los 3 grupos de experimentos, se pueden observar spots de proteínas de la cabeza de hembras de *Ae. aegypti* en el rango de pH de 3 a 10 y peso molecular entre 11 y 245 kDa. Teniendo en cuenta el triplicado de tratamiento, se observó reproducibilidad en la extracción y separación de proteínas (Apéndices A, B, C) ya que en cada gel se obtuvo una cantidad aproximada de 150-170 spots y un R^2 entre 0,7-0,8 para cada triplicado de geles.

Del análisis a través de PDQuest de los geles bidimensionales se obtuvieron los geles *máster*, que representan los spots reproducibles en el triplicado de geles (Apéndice K). En estos, se muestra la cantidad total de spots de proteínas con expresión diferencial de cada experimento y un valor de *foldchange* para cada spot. El software PDQuest permitió realizar una lista según el *foldchange*, un valor relativo que indica el cambio en la expresión de una proteína teniendo como referencia el control del experimento. Los spots de proteínas se encontraron inhibidos si el *foldchange* fue menor a 0,5 y sobre expresado si el *foldchange* fue mayor a 2,0 el spot se encontró sobre-expresado para el tratamiento correspondiente. Este procedimiento se realizó para todas las proteínas obtenidas. En la comparación control vs mezcla 1, se obtuvo un total de 169 spots de proteínas de los cuales 106 proteínas se encontraban expresadas de forma diferenciada (sobre expresadas o inhibidas). De igual forma, para la comparación control vs DEET, se obtuvieron 149 spots de proteínas de los cuales 76 proteínas se encontraban expresadas de forma diferenciada (sobre expresadas o inhibidas).

Tabla 5.

Proteínas con expresión diferencial identificadas a través de espectrometría de masas MALDI-TOF MS correspondientes para el tratamiento con la mezcla 1 (Acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol). Para cada una de las proteínas identificadas se muestra el score, el foldchange ($\geq 2,0$ si la proteína se sobre expresó al exponer al mosquito a la mezcla 1 y $\leq 0,5$ si la expresión de la proteína se inhibió bajo las mismas condiciones experimentales). Además, se muestra la especie a la cual pertenece la proteína identificada a través del software MASCOT Science (Base de datos: Swissprot).

No.	Proteína	Score	Foldchange	Especie
1	Ribitol-5-phosphate cytidyltransferase	51	$\geq 2,0$	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
2	LIM domain-binding protein 2	48	$\leq 0,5$	<i>Xenopus laevis</i>
3	Aldo-keto reductase	46	$\geq 2,0$	<i>Alternaria alternat</i>
4	Apolipoprotein A-II	56	$\geq 2,0$	<i>Heterocephalus glaber</i>
5	Putative pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	48	$\geq 2,0$	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>
6	Dihydroxy acetone phosphate acyltransferase	56	$\geq 2,0$	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
7	6-phospho-5-dehydro-2-deoxy-D-gluconate aldolase	45	$\leq 0,5$	<i>Bacillus halodurans</i>

8	Ribonuclease HII	50	$\geq 2,0$	<i>Methanococcus maripaludis</i>
9	Flavin prenyltransferase	46	$\geq 2,0$	<i>Saccharolobus solfataricus</i>
10	Guanylate kinase	50	$\leq 0,5$	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>
11	Bifunctional protein Fold	51	$\geq 2,0$	<i>Escherichia coli</i>
12	Nucleoporin GLE1	52	$\leq 0,5$	<i>Rattus norvegicus</i>
13	60 kDa chaperonin	64	$\leq 0,5$	<i>Parascardovia denticolens</i>
14	Acetylglutamate kinase	48	$\geq 2,0$	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
15	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
16	Exocyst complex component EXO84	53	$\leq 0,5$	<i>Gibberella zeae</i>
17	Guanine nucleotide-binding protein alpha-3 subunit	66	$\leq 0,5$	<i>Ustilago maydis</i>
18	Malate dehydrogenase	40	$\leq 0,5$	<i>Haemophilus influenzae</i>
19	Ribosome maturation factor RimP	48	$\leq 0,5$	<i>Rippkaea orientalis</i>
20	Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog	44	$\geq 2,0$	<i>Homo sapiens</i>
21	Protein translocase subunit	55	$\leq 0,5$	<i>Escherichia coli</i>
22	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	39	$\leq 0,5$	<i>Arabidopsis thaliana</i>

23	Histidinol-phosphate aminotransferase	50	$\leq 0,5$	<i>Clostridium botulinum</i>
24	Squalene monooxygenase	63	$\leq 0,5$	<i>Panax ginseng</i>
25	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	51	$\geq 2,0$	<i>Treponema pallidum</i>
26	GMP reductase	66	$\geq 2,0$	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
27	Sclerostin domain-containing protein 1	40	$\leq 0,5$	<i>Homo sapiens</i>
28	NAD kinase	44	$\leq 0,5$	<i>Thermoplasma volcanium</i>
29	Polyketide synthase 2	46	$\leq 0,5$	<i>Metarhizium brunneum</i>
30	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1-B	54	$\leq 0,5$	<i>Homo sapiens</i>
31	GTP cyclohydrolase-2	54	$\geq 2,0$	<i>Actinobacillus succinogenes</i>
32	Superoxide dismutase [Fe]	46	$\leq 0,5$	<i>Methanothermobacter marburgensis</i>
33	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	66	$\leq 0,5$	<i>Pelagibacter ubique</i>
34	High-affinity nitrate transporter 3.1	52	$\leq 0,5$	<i>Arabidopsis thaliana</i>
35	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase	52	$\leq 0,5$	<i>Burkholderia ambifaria</i>
36	ATP synthase subunit beta	60	$\leq 0,5$	<i>Nautilia profundicola</i>
37	Probable alpha-L-glutamate ligase	48	$\leq 0,5$	<i>Marinomonas sp.</i>

38	Protein lin-7 homolog B	38	$\leq 0,5$	<i>Homo sapiens</i>
39	Putative glutaredoxin-C14	46	$\geq 2,0$	<i>Oryza sativa</i>
40	DNA ligase	51	$\geq 2,0$	<i>Pseudothermotoga lettingae</i>
41	Protein RecA	51	$\leq 0,5$	<i>Nitrosomonas europaea</i>
42	Protein vav	52	$\leq 0,5$	<i>Drosophila melanogaster</i>
43	Regulator of rDNA transcription 14	50	$\leq 0,5$	<i>Kluyveromyces lactis</i>
44	50S ribosomal protein L16	50	$\leq 0,5$	<i>Spinacia oleracea</i>
45	General odorant-binding protein 83a	46	$\leq 0,5$	<i>Drosophila melanogaster</i>
46	Cyclic GMP-AMP synthase	42	$\leq 0,5$	<i>Vibrio cholerae</i>
47	UPF0365 protein BMD_4543	50	$\geq 2,0$	<i>Bacillus megaterium</i>
48	Elongation factor Ts, mitochondrial	56	$\geq 2,0$	<i>Paramecium tetraurelia</i>
49	Chorismate synthase	54	$\geq 2,0$	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
50	50S ribosomal protein L6	66	$\geq 2,0$	<i>Corynebacterium urealyticum</i>
51	Transcriptional repressor NrdR	63	$\leq 0,5$	<i>Rhodopirellula baltic</i>
52	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
53	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	50	$\leq 0,5$	<i>Ralstonia solanacearum</i>

54	General odorant-binding protein 83a	47	$\leq 0,5$	<i>Drosophila melanogaster</i>
55	30S ribosomal protein S12	65	$\geq 2,0$	<i>Neorickettsia sennetsu</i>
56	No identificada	-	$\leq 0,5$	-
57	Ephrin-B1	57	$\geq 2,0$	<i>Xenopus laevis</i>
58	Myosin-8	52	$\geq 2,0$	<i>Canis lupus familiaris</i>
59	Phosphopantetheine adenylyltransferase	50	$\geq 2,0$	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
60	Protein lin-7 homolog B	65	$\leq 0,5$	<i>Bos taurus</i>
61	Nicotinate phosphoribosyltransferase	54	$\geq 2,0$	<i>Homo sapiens</i>
62	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	51	$\geq 2,0$	<i>Clostridioides difficile</i>
63	GTP pyrophosphokinase	46	$\leq 0,5$	<i>Bacillus subtilis</i>
64	Variable large protein 19 (Fragment)	43	$\geq 2,0$	<i>Borrelia crocidurae</i>
65	Cyclic pyranopterin monophosphate synthase	48	$\leq 0,5$	<i>Jannaschia sp.</i>
66	No identificada	-	$\leq 0,5$	-
67	Putative gustatory receptor 92a	46	$\leq 0,5$	<i>Drosophila melanogaster</i>
68	General odorant-binding protein 83a	46	$\leq 0,5$	<i>Drosophila melanogaster</i>
69	Glutathione S-transferase A	58	$\geq 2,0$	<i>Cavia porcellus</i>
70	No identificada	-	$\leq 0,5$	-
71	Nitric oxide synthase	47	$\leq 0,5$	<i>Anopheles stephensi</i>
72	N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase	56	$\leq 0,5$	<i>Exiguobacterium sp.</i>
73	Probable chemoreceptor glutamine deamidase	38	$\geq 2,0$	<i>Janthinobacterium sp.</i>

74	Peroxiredoxin-2B	53	$\geq 2,0$	<i>Arabidopsis thaliana</i>
75	AIG2-like protein C	50	$\geq 2,0$	<i>Arabidopsis thaliana</i>
76	General odorant-binding protein 83a	52	$\leq 0,5$	<i>Drosophila melanogaster</i>
77	Dynactin subunit 2	55	$\geq 2,0$	<i>Gallus gallus</i>
78	Muscle LIM protein Mlp84B	44	$\geq 2,0$	<i>Drosophila melanogaster</i>
79	Large-conductance mechanosensitive channel	46	$\geq 2,0$	<i>Escherichia coli</i>
80	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
81	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
82	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
83	Homologous-pairing protein 2 homolog	50	$\geq 2,0$	<i>Homo sapiens</i>
84	Probable GTP-binding protein EngB	54	$\geq 2,0$	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>
85	Periplasmic nitrate reductase	42	$\geq 2,0$	<i>Cupriavidus pinatubonensis</i>
86	Aspartate-tRNA ligase	42	$\geq 2,0$	<i>Bacillus halodurans</i>
87	Dihydroneopterin aldolase	51	$\geq 2,0$	<i>Picrophilus torridus</i>
88	Phosphoserine aminotransferase	55	$\geq 2,0$	<i>Pseudomonas putida</i>
89	50S ribosomal protein L27	63	$\geq 2,0$	<i>Roseobacter denitrificans</i>
90	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
91	Plastid 30S ribosomal protein S12	60	$\geq 2,0$	<i>Epifagus virginiana</i>
92	Peroxisomal membrane protein	53	$\geq 2,0$	<i>Arabidopsis thaliana</i>

93	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
94	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
95	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
96	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
97	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
98	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
99	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
100	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
101	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
102	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
103	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
104	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
105	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
106	No identificada	-	$\geq 2,0$	-

Tabla 6.

Proteínas con expresión diferenciada identificadas a través de espectrometría de masas MALDI-TOF MS correspondientes para el tratamiento con el repelente sintético DEET. Para cada una de las proteínas identificadas se muestra el score, el foldchange ($\geq 2,0$ si la proteína se sobre expresó al exponer al mosquito al repelente DEET y $\leq 0,5$ si la expresión de la proteína se inhibió bajo las mismas condiciones experimentales). Además, se muestra la especie a la cual pertenece la proteína identificada a través del software MASCOT Science (Base de datos: Swissprot).

No.	Proteína	Score	Foldchange	Especie
1	Acetyl-coenzyme A synthetase	50	$\leq 0,5$	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
2	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	48	$\leq 0,5$	<i>Escherichia coli</i>
3	SUN domain-containing protein 2	62	$\leq 0,5$	<i>Arabidopsis thaliana</i>
4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	51	$\leq 0,5$	<i>Treponema pallidum</i>
5	Bifunctional glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase/6-phosphogluconolactonase	50	$\leq 0,5$	<i>Plasmodium falciparum</i>
6	No identificada	-	$\leq 0,5$	-
7	Leucine-rich repeat-containing protein 9	53	$\leq 0,5$	<i>Mus musculus</i>
8	Protein lin-7 homolog B	38	$\leq 0,5$	<i>Homo sapiens</i>
9	Ribosome maturation factor RimP	48	$\leq 0,5$	<i>Rippkaea orientalis</i>
10	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	39	$\leq 0,5$	<i>Arabidopsis thaliana</i>
11	Dihydroxy acetone phosphate acyltransferase	48	$\leq 0,5$	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
12	Inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity	50	$\leq 0,5$	<i>Homo sapiens</i>
13	Cyclic GMP-AMP synthase	43	$\leq 0,5$	<i>Vibrio cholerae</i>
14	Squalene monooxygenase SE2	63	$\leq 0,5$	<i>Panax ginseng</i>
15	Sclerostin domain-containing protein 1	40	$\leq 0,5$	<i>Homo sapiens</i>

16	16 kDa calcium-binding protein	64	$\leq 0,5$	<i>Schistosoma mansonii</i>
17	Aspartate-tRNA(Asp/Asn) ligase	58	$\leq 0,5$	<i>Methanospaera stadtmanae</i>
18	Frequenin-1	42	$\leq 0,5$	<i>Drosophila melanogaster</i>
19	50S ribosomal protein L10	53	$\leq 0,5$	<i>Methylobacterium populi</i>
20	Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog, mitochondrial	50	$\leq 0,5$	<i>Homo sapiens</i>
21	LIM domain-binding protein 2	48	$\leq 0,5$	<i>Xenopus laevis</i>
22	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	66	$\leq 0,5$	<i>Escherichia coli</i>
23	Polyamine aminopropyltransferase	60	$\leq 0,5$	<i>Bacillus halodurans</i>
24	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	51	$\leq 0,5$	<i>Clostridioides difficile</i>
25	Histone H2A	46	$\leq 0,5$	<i>Podospira anserina</i>
26	Nucleoporin GLE1	52	$\leq 0,5$	<i>Rattus norvegicus</i>
27	SEC12-like protein 2	45	$\leq 0,5$	<i>Arabidopsis thaliana</i>
28	ATP synthase subunit beta	60	$\leq 0,5$	<i>Nautilia profundicola</i>
29	50S ribosomal protein L13e	53	$\leq 0,5$	<i>Aeropyrum pernix</i>

30	MYG1 exonuclease	45	$\leq 0,5$	<i>Homo sapiens</i>
31	Transcriptional repressor NrdR	63	$\leq 0,5$	<i>Rhodopirellula baltic</i>
32	GTP cyclohydrolase-2	54	$\leq 0,5$	<i>Actinobacillus succinogenes</i>
33	Putative gustatory receptor 92a	46	$\leq 0,5$	<i>Drosophila melanogaster</i>
34	Nucleoporin GLE1	49	$\leq 0,5$	<i>Homo sapiens</i>
35	Protein vav	52	$\leq 0,5$	<i>Drosophila melanogaster</i>
36	ATP synthase subunit alpha	50	$\leq 0,5$	<i>Phenylobacterium zucineum</i>
37	NAD kinase	44	$\leq 0,5$	<i>Thermoplasma volcanium</i>
38	Ribonuclease 3	51	$\leq 0,5$	<i>Campylobacter curvus</i>
39	Protein lin-7 homolog B	65	$\leq 0,5$	<i>Bos taurus</i>
40	Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog, mitochondrial	44	$\leq 0,5$	<i>Homo sapiens</i>
41	Glutathione S-transferase A	58	$\leq 0,5$	<i>Cavia porcellus</i>
42	Variable large protein 19 (Fragment)	43	$\leq 0,5$	<i>Borrelia hermsii</i>
43	Probable transcription factor KAN4	55	$\geq 2,0$	<i>Arabidopsis thalian</i>
44	Cytochrome c	54	$\geq 2,0$	<i>Cochliobolus lunatus</i>

45	Polyamine aminopropyltransferase	60	$\geq 2,0$	<i>Bacillus halodurans</i>
46	Threonine--tRNA ligase OS		$\geq 2,0$	<i>Thermotoga sp.</i>
47	Protein translocase subunit SecA	52	$\geq 2,0$	<i>Anaplasma marginale</i>
48	Lysozyme C	46	$\geq 2,0$	<i>Pongo pygmaeus</i>
49	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
50	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
51	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
52	Protein LST8 homolog	41	$\geq 2,0$	<i>Drosophila pseudoobscura</i>
53	50S ribosomal protein L5	45	$\geq 2,0$	<i>Leifsonia xyli</i>
54	Ribosome-recycling factor	47	$\geq 2,0$	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>
55	tRNA modification GTPase MnmE	46	$\geq 2,0$	<i>Thermotoga maritima</i>
56	Elongation factor Ts	50	$\geq 2,0$	<i>Alkaliphilus oremlandii</i>
57	Histone-lysine N-methyltransferase	51	$\geq 2,0$	<i>Oryza sativa</i>
58	Arginine biosynthesis bifunctional protein	48	$\geq 2,0$	<i>Methanococcus vanniellii</i>
59	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 2	47	$\geq 2,0$	<i>Homo sapiens</i>
60	Phosphatidylserine decarboxylase	44	$\geq 2,0$	<i>Homo sapiens</i>

61	CST complex subunit STN1	48	$\geq 2,0$	<i>Mus musculus</i>
62	Proline--tRNA ligase	47	$\geq 2,0$	<i>Dichelobacter nodosus</i>
63	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	46	$\geq 2,0$	<i>Chlorobium limicola</i>
64	Nuclear hormone receptor family member nhr-61	52	$\geq 2,0$	<i>Caenorhabditis elegans</i>
65	50S ribosomal protein L19	51	$\geq 2,0$	<i>Protochlamydia amoebophila</i>
66	GTPase Der	47	$\geq 2,0$	<i>Leptothrix cholodnii</i>
67	Nitric oxide synthase	47	$\geq 2,0$	<i>Anopheles stephensi</i>
68	UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase	49	$\geq 2,0$	<i>Thiobacillus denitrificans</i>
69	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1	51	$\geq 2,0$	<i>Paraburkholderia phymatum</i>
70	ATP-dependent lipid A-core flippase	58	$\geq 2,0$	<i>Vibrio vulnificus</i>
71	Histone H1E	58	$\geq 2,0$	<i>Chironomus tentans</i>
72	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
73	No identificada	-	$\geq 2,0$	-
74	Arginine biosynthesis bifunctional protein	46	$\geq 2,0$	<i>Methanococcus vanniellii</i>

75	Golgi apparatus membrane protein	41	$\geq 2,0$	<i>Chaetomium globosum</i>
76	ADP/ATP translocase 2	53	$\geq 2,0$	<i>Homo sapiens</i>

Tabla 7.

Función de cada una de las proteínas identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF MS correspondientes al tratamiento con la mezcla 1 (Acetato de geranilo, α -bisabolol y nerolidol) en concentración 100 mg/mL. Las funciones de cada una de las proteínas fueron consultadas en la base de datos de Uniprot <https://www.uniprot.org/>.

No.	Proteína	Función
1	Ribitol-5-phosphate cytidyltransferase	Transferasa. Involucrada en procesos de síntesis de pared celular. Es una de las proteínas encargadas de transformar entre pentosas y ácido glucurónico.
2	LIM domain-binding protein 2	Involucrada en el desarrollo del sistema nervioso y células somáticas. Regulada por quinasas.
3	Aldo-keto reductase	Tiene función detoxificante. Trabaja en conjunto con otras proteínas como p450 y glutatión S-transferasa.
4	Apolipoprotein A-II	Interactúa con lípidos para estabilizar estructuras. Puede involucrarse en

sistemas de señalización que relacionen hormonas, neurotransmisores o segundos mensajeros.

5	Putative pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	Pertenece a las proteínas que sintetizan el cofactor dihidrobiopterina y tetrahidrobiopterina. Estos cofactores se relacionan en la síntesis de neurotransmisores serotonina, melatonina, dopamina, norepinefrina, etc.
6	Dihydroxy acetone phosphate acyltransferase	Convierte un grupo fosfato en un grupo acetil fosfato con ayuda del acetil-CoA.
7	6-phospho-5-dehydro-2-deoxy-D-gluconate aldolase	Involucrada en la biosíntesis de acetil-CoA a partir de polialcoholes en plantas. Puede estar involucrada en la glucólisis ya que los productos de reacción son 3-oxopropanoato y dihidroxiacetona fosfato.
8	Ribonuclease HII	Ayuda a la degradación de RNA y derivados RNA-DNA.
9	Flavin prenyltransferase	Una de las proteínas de la ruta de biosíntesis de la ubiquinona (componente de la cadena transportadora de electrones).
10	Guanylate kinase	Transferasa y quinasa, fosforila una molécula de guanosina monofosfato GMP a guanosina difosfato GDP. El GDP actúa

como segundo mensajero en procesos de señalización.

11	Bifunctional protein FOLD	Proteína NADP-específica. Está relacionada en la síntesis de tetrahidrofolato, un cofactor necesario para la biosíntesis de aminoácidos. También está relacionado al proceso de transferencia de grupos de un solo carbono como metil, metileno, etc.
12	Nucleoporin GLE1	Involucrada en la exportación de mRNA del núcleo al citoplasma a través de poros nucleares.
13	60 kDa chaperonin	Evita el desdoblamiento e inadecuado plegamiento de proteínas en el citoplasma.
14	Acetylglutamate kinase	Fosfotransferasa. Pertenece a una de las proteínas del ciclo de la urea y síntesis de algunos aminoácidos.
16	Exocyst complex component EXO84	Involucrada en procesos de exocitosis de moléculas y formación de endosomas.
17	Guanine nucleotide-binding protein alpha-3 subunit	Proteína G. Involucrada en procesos de señalización. Subunidad alfa: ayuda en la conversión de GTP a GDP. Además, está relacionada a canales iónicos regulados por K ⁺ .

18	Malate dehydrogenase	Proteína perteneciente al ciclo de Krebs. Involucrada en la cadena transportadora de electrones de la mitocondria para producir energía.
19	Ribosome maturation factor RimP	Proteína importante para la maduración de las subunidades ribosomales 30S en la célula.
20	Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog	Esta proteína mitocondrial está involucrada en la síntesis de la ubiquinona un cofactor necesario en la cadena transportadora de electrones para la producción de energía.
21	Protein translocase subunit	Involucrada en la exportación de proteínas a través de membranas.
22	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	Proteína implicada en la biosíntesis de lípidos en la célula.
23	Histidinol-phosphate aminotransferase	Esta proteína hace parte de la ruta biosintética de la histidina y otros aminoácidos.
24	Squalene monooxygenase	Cataliza la oxidación estereoespecífica del esqualeno a epoxiesqualeno. Este paso es limitante para la síntesis de esteroides en la célula.

25	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Enzima de la glucólisis, cataliza la reacción que convierte el gliceraldehído 3-fosfato a glicerol 3-fosfato.
26	GMP reductase	Cataliza la reducción irreversible de GMP (guanosina monofosfato) a IMP (inosina monofosfato) una reacción importante que ayuda a mantener el balance intracelular de nucleótidos de adenina y guanina.
27	Sclerostin domain-containing protein 1	Esta proteína está involucrada en procesos de señalización del exterior de la célula al interior. Procesos de señalización relacionados: Wnt (paso de señales a través de receptores en la membrana celular) y TGF-beta (homeóstasis, crecimiento celular, apoptosis, etc).
28	NAD kinase	Proteína importante para el balance de NAD y NADP en la célula.
29	Polyketide synthase 2	Transferasa. Esta enzima ayuda a catalizar la transferencia de grupos acyl responsable de la biosíntesis de compuestos lipídicos en eucariotas.
30	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1-B	Hace parte de las proteínas del citoesqueleto principalmente en células nerviosas. Se une a microtúbulos por la acción de la calmodulina/ Ca^{2+} .

31	GTP cyclohydrolase-2	Está involucrada en el metabolismo de purinas y en la síntesis de riboflavina en eucariotas, bacterias y hongos, principalmente.
32	Superoxide dismutase [Fe]	Enzima detoxificante. Destruye aniones superóxido producidos por estrés en la célula.
33	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	Hace parte de la ruta para la biosíntesis de isopentenil difosfato, una molécula que hace parte del esqueleto de terpenos, terpenoides y otros lípidos.
34	High-affinity nitrate transporter 3.1	Proteína transmembranal que se encarga del transporte de iones nitrato a través de la membrana celular.
35	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase	Proteína de unión al RNA que transfiere grupos metil a algunas bases de citosina.
36	ATP synthase subunit beta	Hace parte de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria la cual produce energía en forma de ATP a partir del ADP en la mitocondria.
37	Probable alpha-L-glutamate ligase	Encargada de unir dos aminoácidos de glutamato (Glu-Glu). Está relacionada con los procesos de síntesis de glutatión.
38	Protein lin-7 homolog B	Mantiene un correcto orden y funcionamiento de canales iónicos en

		membranas polarizadas/polarizables. Está involucrada en la correcta localización y posicionamiento de proteínas sinápticas y postsinápticas para el transporte de vesículas.
39	Putative glutaredoxin-C14	Proteína detoxificante. En presencia de NADPH rompe el enlace que une dos moléculas de glutatión (rompimiento del enlace disulfuro).
40	DNA ligase	Forma enlaces covalentes en el extremo 5' de una cadena de polinucleótidos y el extremo 3' de otro.
41	Protein RecA	Es una proteína esencial para la reparación y mantenimiento del DNA. Además, protege fragmentos de ADN de la acción de nucleasas.
42	Protein vav	Pertenece a una familia de proteínas señalizadoras. Actúa como proteína G y ayuda al acoplamiento de GTP y liberación de GDP en diferentes procesos de señalización en la célula.
43	Regulator of rDNA transcription 14	La función de esta proteína es parcialmente conocida, se cree que puede estar involucrada en la formación y maduración de los ribosomas.

44	50S ribosomal protein L16	Indispensable para la estructura tridimensional de los ribosomas.
45	General odorant-binding protein 83a	Proteína de unión a odorantes. Proteína de transporte.
46	Cyclic GMP-AMP synthase	Cataliza la reacción que produce GMP y AMP cíclico, segundos mensajeros importantes en procesos de señalización celular.
47	UPF0365 protein BMD_4543	Componente integral de membrana
48	Elongation factor Ts, mitochondrial	Esta proteína se une a un complejo que induce el cambio de GDP a GTP en la mitocondria. La función principal es llevar los tRNAs al ribosoma durante el proceso de elongación de proteínas.
49	Chorismate synthase	Cataliza la reacción que produce ácido corísmico, una molécula importante para la síntesis de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano. Importante en bacterias, pero también presente en eucariotas.
50	50S ribosomal protein L6	Componente estructural de los ribosomas, importante para la efectiva formación de la estructura secundaria.

51	Transcriptional repressor NrdR	Relacionada con la regulación en la transcripción de proteínas ribonucleótido reductasas.
53	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	Proteína importante para formación de isoprenoides en la célula.
55	30S ribosomal protein S12	Proteína estructural de los ribosomas. Es una de las proteínas que mantiene íntegra la estructura secundaria durante el proceso de transcripción.
57	Ephrin-B1	Proteína transmembranal importante para la unión de otras proteínas a los receptores Eph (familia de receptores tirosina quinasas). Están involucrados en procesos de interacción proteína-proteína en las neuronas y en el desarrollo de células nerviosas.
58	Myosin-8	Proteína de unión a microfilamentos celulares. Principalmente presente en células musculares.
59	Phosphopantetheine adenylyltransferase	Una de las proteínas involucradas en la producción de acetil CoA a partir del ácido pantoténico. Existen análogos de esta proteína presentes en bacterias, mamíferos y otros organismos eucariotas.

61	Nicotinate phosphoribosyltransferase	Cataliza el primer paso para la síntesis de NAD a partir de ácido nicotínico. La producción de NAD previene el estrés celular producido por agentes oxidantes.
62	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	Proteína que hace parte de la ruta encargada de la biosíntesis de lisina en la célula.
63	GTP pyrophosphokinase	Produce AMP a partir del ATP y GTP. El AMP es un mensajero secundario involucrado en diferentes rutas de señalización.
64	Variable large protein 19 (Fragment)	Proteínas presentes en el exterior de la célula o en la membrana plasmática. Estas proteínas se expresan ante reacciones del sistema inmune del organismo.
65	Cyclic pyranopterin monophosphate synthase	Una de las proteínas encargadas de la biosíntesis de molibdopterina, un cofactor necesario para la función de algunas oxidasas.
67	Putative gustatory receptor 92a	Uno de los receptores gustativos responsable del comportamiento atrayente/repelente en el insecto.
69	Glutathione S-transferase A	Una de las proteínas más importantes para la detoxificación de la célula. Cataliza la

reacción de la forma reducida del glutatión con algún sustrato xenobiótico.

71	Nitric oxide synthase	Encargada de la producción de óxido nítrico (NO). Esta molécula puede actuar como neurotransmisor activando canales de K ⁺ logrando hiperpolarización de la membrana. También estimula la activación de algunas proteínas quinasas.
72	N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase	Hace parte de la ruta de degradación de N-acetil muramato en bacterias. También hace parte del metabolismo de azúcares y aminoácidos en bacterias y otros organismos.
73	Probable chemoreceptor glutamine deamidase	Quimiorreceptor que hace parte de un proceso de señalización llamado quimiotaxis. Este proceso ayuda a las células a moverse en dirección de menor a mayor concentración de cierta molécula.
74	Peroxiredoxin-2B	Reduce el peróxido de hidrogeno y alquil hidroperóxidos. Involucrada en procesos de detoxificación durante estrés celular.
75	AIG2-like protein C	Implicada en la formación de oxoprolina que juega un papel fundamental en la homeóstasis. Puede llegar a inducir la liberación del citocromo c en la

		mitocondria causando muerte celular programada.
77	Dynactin subunit 2	Modula la unión de la dineína en los microtúbulos con algunos organelos en la célula. Puede tener un rol en el desarrollo del cerebro en mamíferos.
78	Muscle LIM protein Mlp84B	Importante para la formación de microtúbulos y músculos. Promueve la organización del citoesqueleto durante el desarrollo de tejidos.
79	Large-conductance mechanosensitive channel	Canal iónico mecano-sensitivo. Participa en la regulación de la presión osmótica dentro de la célula.
83	Homologous-pairing protein 2 homolog	Esta proteína es importante durante el proceso de meiosis. Ayuda en el proceso de acoplamiento de cromosomas homólogos durante la división celular.
84	Probable GTP-binding protein EngB	Proteína que se une a GTP y GDP. Importante para que ocurra el proceso de división celular de forma correcta.
85	Periplasmic nitrate reductase	Transforma el anión nitrato a nitrito en la célula. Ayuda a formar compuestos como óxidos de nitrógeno y puede tomar parte en la producción de otras moléculas con

		nitrógeno como aminoácidos y nucleótidos.
86	Aspartate-tRNA ligase	Cataliza la unión del aspartato al tRNA. Durante el proceso se requiere ATP.
87	Dihydroneopterin aldolase	Participa en la biosíntesis de tetrahidrofolato, un precursor de la vitamina B9 o ácido fólico.
88	Phosphoserine aminotransferase	Cataliza la reacción que da lugar a la formación del aminoácido glutamato. Además, participa en la formación del aminoácido serina.
89	50S ribosomal protein L27	Componente estructural de los ribosomas.
91	Plastid 30S ribosomal protein S12	Proteína estructural importante para el proceso de transcripción. Se localiza entre las subunidades 30S y 50S.
92	Peroxisomal membrane protein	Proteína requerida para el ensamblaje de la membrana de los peroxisomas. Puede actuar como receptor para la importación de proteínas al peroxisoma.

Tabla 8.

Función de cada una de las proteínas identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF MS correspondientes al tratamiento con el repelente sintético DEET en concentración 100 mg/mL. Las funciones de cada una de las proteínas fueron consultadas en la base de datos de Uniprot <https://www.uniprot.org/>.

No.	Proteína	Función
1	Acetyl-coenzyme A synthetase	Cataliza la conversión de acetato y CoA en acetil-CoA, una molécula importante durante la generación de energía durante el ciclo de Krebs.
2	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	Ayuda a catalizar la polimerización de cadenas de RNA.
3	SUN domain-containing protein 2	Componente de un complejo de proteínas del citoesqueleto involucradas en la conexión e interacción entre el núcleo y el citoesqueleto.
4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Enzima de la glucólisis, cataliza la reacción que convierte el gliceraldehído 3-fosfato a glicerol 3-fosfato.
5	Bifunctional glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase/6-phosphogluconolactonase	Proteína que cataliza los primeros dos pasos de la ruta oxidativa de las pentosa-fosfato. Contribuye en el poder reductor

		para la síntesis de algunos ácidos grasos y nucleótidos.
7	Leucine-rich repeat-containing protein 9	Varias proteínas ricas en leucina están involucradas en procesos de adhesión de proteínas durante la sinapsis. Puede estar relacionada a la formación de vesículas de excreción durante la sinapsis.
8	Protein lin-7 homolog B	Mantiene un correcto orden y funcionamiento de canales iónicos en membranas polarizadas/polarizables. Está involucrada en la correcta localización y posicionamiento de proteínas sinápticas y postsinápticas para el transporte de vesículas.
9	Ribosome maturation factor RimP	Proteína importante para la maduración de las subunidades ribosomales 30S en la célula.
10	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	Proteína implicada en la biosíntesis de lípidos en la célula.
11	Dihydroxy acetone phosphate acyltransferase	Convierte un grupo fosfato en un grupo acetil fosfato con ayuda del acetil-CoA.
12	Inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity	Regula y coopera con las señales mediadas a través del calcio Ca^{2+} . Esta proteína está relacionada a proteínas G que desencadenan la señal para liberar iones de

		calcio al citoplasma. Esta respuesta lleva a la liberación de neurotransmisores o regulación transcripcional.
13	Cyclic GMP-AMP synthase	Cataliza la reacción que produce GMP y AMP cíclico, mensajeros secundarios importantes en procesos de señalización celular.
14	Squalene monooxygenase SE2	Cataliza la oxidación estereoespecífica del esqualeno a epoxiesqualeno. Este paso es limitante para la síntesis de esteroides en la célula.
15	Sclerostin domain-containing protein 1	Esta proteína está involucrada en procesos de señalización del exterior de la célula al interior. Procesos de señalización relacionados: Wnt y TGF-beta.
16	16 kDa calcium-binding protein	Proteína de bajo peso molecular que se une a iones de calcio Ca^{2+} .
17	Aspartate-tRNA(Asp/Asn) ligase	Une el aminoácido aspartato a su tRNA correspondiente.
18	Frequenin-1	Proteína dependiente de Ca^{2+} que coopera para la eficiencia de la transmisión de señales durante la sinapsis neuronal.
19	50S ribosomal protein L10	Proteína estructural de los ribosomas. Tiene un rol en la interacción de los ribosomas con proteínas de unión a GTP.

21	LIM domain-binding protein 2	Involucrada en el desarrollo del sistema nervioso y células somáticas. Regulada por quinasas.
22	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	Hace parte de la ruta para la biosíntesis de isopentenil difosfato, una molécula que hace parte del esqueleto de terpenos, terpenoides y otros lípidos.
23	Polyamine aminopropyltransferase	Involucrada en la síntesis y polimerización de poliaminas, principalmente en bacterias. En otras células ayuda a la producción de espermidina, una molécula que juega un rol en el mantenimiento del potencial de membrana, pH intracelular e inhibición de la producción de óxido nítrico NO.
24	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	Proteína que hace parte de la ruta encargada de la biosíntesis de lisina en la célula.
25	Histone H2A	Una de las histonas involucradas en la formación de cromatina en eucariotas.
26	Nucleoporin GLE1	Involucrada en la exportación de mRNA del núcleo al citoplasma a través de poros nucleares.

27	SEC12-like protein 2	Requerida para la formación o desarrollo de vesículas de transporte provenientes del retículo endoplasmático.
28	ATP synthase subunit beta	Hace parte de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria la cual produce energía en forma de ATP a partir del ADP.
29	50S ribosomal protein L13e	Componente estructural de los ribosomas
30	MYG1 exonuclease	Está involucrada en el rompimiento in situ de transcritos de RNA 3'-5' en el núcleo o mitocondria. Importante durante el proceso de transcripción y también de reparación/corrección de errores del DNA.
31	Transcriptional repressor NrdR	Relacionada con la regulación en la transcripción de proteínas ribonucleótido reductasas.
32	GTP cyclohydrolase-2	Está involucrada en el metabolismo de purinas en bacterias y hongos principalmente.
33	Putative gustatory receptor 92a	Uno de los receptores gustativos responsable del comportamiento atrayente/repelente en el insecto.
35	Protein vav	Pertenece a una familia de proteínas señalizadoras. Actúa como proteína G y ayuda al acoplamiento de GTP y

liberación de GDP en diferentes procesos de señalización en la célula.

36 ATP synthase subunit alpha	Hace parte de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria la cual produce energía en forma de ATP a partir del ADP. Las subunidades alfa y beta hacen parte de núcleo catalítico involucrado en la rotación de las otras subunidades de la ATP sintasa, lo que produce la hidrólisis de ATP.
37 NAD kinase	Proteína importante para el balance de NAD y NADP en la célula.
38 Ribonuclease 3	Ayuda a la degradación de RNA y derivados RNA-DNA
40 Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog, mitochondrial	Esta proteína mitocondrial está involucrada en la síntesis de la ubiquinona un cofactor necesario en la cadena transportadora de electrones para la producción de energía.
41 Glutathione S-transferase A	Una de las proteínas más importantes para la detoxificación de la célula. Cataliza la reacción de la forma reducida del glutatión con algún sustrato xenobiótico.

42	Variable large protein 19 (Fragment)	Proteínas presentes en el exterior de la célula o en la membrana que se expresan ante reacciones del sistema inmune.
43	Probable transcription factor KAN4	Posible factor de transcripción que regula la formación de una cubierta natural que rodea un organismo o tejido, piel, cáscara, corteza.
44	Cytochrome c	Proteína de transporte de electrones. Toma un rol importante durante la apoptosis, ante estrés celular se libera citocromo c desde la mitocondria provocando la activación de las caspasas y produciendo la muerte celular programada.
46	Threonine-tRNA ligase	Cataliza la reacción que une el aminoácido treonina con su respectivo tRNA.
47	Protein translocase subunit SecA	Proteína requerida para el transporte de proteínas fuera de la membrana celular.
48	Lysozyme C	Proteína que hace parte del sistema inmune innato con actividad enzimática antimicrobiana. Hidroliza la reacción del ácido N-acetilmurámico y N-acetil glucosamina presente en las paredes bacterianas.
52	Protein LST8 homolog	Es una subunidad de un complejo llamado TORC1/TORC2 que regula el crecimiento

celular y es un sensor biológico de señales que ayudan a controlar la síntesis de proteínas, la degradación de nutrientes y factores de crecimiento.

53	50S ribosomal protein L5	Proteína estructural de los ribosomas. Esta es una de las proteínas que se une y coopera la unión de unidades ribosomales más pequeñas a las de mayor tamaño.
54	Ribosome-recycling factor	En la mitocondria contribuye al reciclaje de los ribosomas justo después de realizar el proceso de transcripción.
55	tRNA modification GTPase MnmE	Induce la modificación de algunos tRNA con la introducción de un grupo carboxiaminometil, también tienen función hidrolasa transformando GTP en GDP al transferir el grupo mencionado al tRNA.
56	Elongation factor Ts	Ayuda al proceso de elongación de proteínas durante la transcripción. Cataliza la salida de GDP y entrada de GTP necesaria para la elongación proteica y la adición de otro amonoacil tRNA.
57	Histone-lysine N-methyltransferase	Esta proteína está involucrada en procesos de regulación de replicación y transcripción en plantas. Permite la

		adaptación y modulación necesaria para responder rápidamente ante estímulos/señales ambientales o de desarrollo a la planta.
58	Arginine biosynthesis bifunctional protein	Cataliza dos reacciones involucradas en la biosíntesis de arginina. Síntesis de acetilglutamato a partir de glutamato y acetil-CoA y la síntesis de ornitina a partir de acetilornitina y glutamato.
59	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 2	Importante en la organización de los microtúbulos y su dinámica (movimiento). Puede actuar en las neuronas como un regulador del desarrollo del centrosoma, axón y formación de las dendritas.
60	Phosphatidylserine decarboxylase	Tiene un rol central en el metabolismo de fosfolípidos, forma la fosfatidiletanolamina a partir de la fosfatidilserina. La función de estas moléculas es netamente estructural en la membrana lipídica.
61	CST complex subunit STN1	Componente del complejo CST que está relacionado al mantenimiento de los telómeros durante el proceso de replicación del DNA.

62	Proline--tRNA ligase	Cataliza la reacción que une el aminoácido prolina con su respectivo tRNA, en el proceso se consume una molécula de ATP.
63	Phenylalanine-tRNA ligase alpha subunit	Cataliza la reacción que une el tRNA con el aminoácido fenilalanina, durante el proceso se consume un ATP.
64	Nuclear hormone receptor family member nhr-61	Receptor nuclear, no se conoce con certeza qué tipos de ligandos pueden ser unidos a este.
65	50S ribosomal protein L19	Proteína estructural importante para el ensamblaje de unidades más grandes de los ribosomas.
66	GTPase Der	Juega un rol importante durante los últimos pasos del ensamblaje de ribosomas. Posee actividad de GTPasa.
67	Nitric oxide synthase	Encargada de la producción de óxido nítrico (NO). Esta molécula puede actuar como neurotransmisor activando canales de K ⁺ logrando hiperpolarización de la membrana. También estimula la activación de algunas proteínas quinasas.
68	UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase	Cataliza la hidrólisis de UDP-acil-N-acetilglucosamina formando UDP-miristoilglucosamina, una molécula

importante en la síntesis de lípidos de membrana en bacterias.

69	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1	Una enzima muy importante para la regulación de la gluconeogénesis. Cataliza la eliminación de un grupo fosfato de la fructosa 1,6-bisfosfato, formando fructosa 6-fosfato.
70	ATP-dependent lipid A-core flippase	Involucrada en la biosíntesis de lipopolisacáridos. Esta enzima ubicada en la membrana ayuda al movimiento de lípidos entre las dos capas que conforman la membrana celular.
71	Histone H1E	Proteína que ayuda a acomplejar el DNA formando las fibras de cromatina.
75	Golgi apparatus membrane protein	Proteína transmembranal que involucra la exportación de proteínas y vesículas desde el aparato de Golgi.
76	ADP/ATP translocase 2	Proteína presente en la membrana de la mitocondria que cataliza el intercambio de ADP a ATP. El ADP proviene del citoplasma y el ATP de la mitocondria.

Del anterior análisis, para el tratamiento de la mezcla 1, se obtuvieron en total 62 proteínas sobre expresadas y 44 inhibidas en comparación al control. Mientras que, para el tratamiento con el DEET, se obtuvieron en total 34 proteínas sobre expresadas y 42 inhibidas en relación con el control. Algunas de las proteínas sobre expresadas en ambos tratamientos no se encuentran en el control, es decir, son proteínas que únicamente se expresaron al exponer al mosquito con el repelente. Para el tratamiento con la mezcla 1, las proteínas enumeradas desde 73 hasta 106 son proteínas sobre-expresadas para este tratamiento que no se encontraron en el control. De igual forma, para el DEET las proteínas enumeradas desde 43 hasta 76 son proteínas que se sobre expresaron en el tratamiento y que no fueron halladas en el control. Estas proteínas están indicadas en la Tablas 5 y 6. En la Figura 25, el diagrama de Venn muestra las diferencias en los spots de geles obtenidos al realizar la comparación mezcla vs control y DEET vs control, así como el número de proteínas inhibidas y sobre expresadas analizadas a través del software PDQuest. De las 106 proteínas encontradas para la mezcla 1 y las 76 proteínas encontradas para el tratamiento con el DEET, 79 proteínas fueron identificadas en el caso de la mezcla y 65 en el caso del DEET. En ambos tratamientos, se encontraron en común 25 proteínas enumeradas en la Figura 25 y que pueden ser encontradas en la Tabla 1. Así, el resto de las proteínas identificadas para ambos tratamientos tienen una estructura y función diferente, lo que infiere que dicho mecanismo de acción y recepción también es diferente.

Durante el proceso de identificación a través de MALDI-TOF MS, fue posible obtener los espectros de masas de la mayoría de los spots analizados en PDQuest. De la comparación control vs mezcla 1 se logró identificar un total de 83 proteínas y para el control vs DEET un total de 70 proteínas. En las Tablas 5 y 6 se muestran las proteínas con expresión diferencial obtenidas para los tratamientos mezcla y DEET respectivamente junto con los valores de *foldchange* y el *score*

obtenido. De estas proteínas es necesario resaltar que con la mezcla 1, las proteínas No. 54, 60, 68 y 76; y para el DEET, las proteínas No. 20, 34, 39, 45 y 74, se encontraron de forma repetitiva, lo que posiblemente indica que los espectros obtenidos estén relacionados a estructuras proteicas o huellas peptídicas similares. En resumen, de las proteínas identificadas para el tratamiento con la mezcla 1, se logró identificar 42 proteínas sobre expresadas y 37 inhibidas. De igual forma, para el tratamiento con DEET se identificaron 27 proteínas sobre expresadas y 38 proteínas inhibidas (Tablas 5 a 8). Es posible que para las proteínas que no fueron identificadas, la concentración de proteína presente en el *spot* del gel no haya sido suficiente para detectar péptidos a través de espectrometría de masas.

Después de la identificación y la búsqueda de la función en la plataforma *Uniprot*, se realizó una clasificación de las proteínas según su función. La mayor parte de las proteínas encontradas estuvo relacionada a homólogos presentes en bacterias, *Drosophila melanogaster*, algunos mamíferos y el mosquito *Anopheles gambiae*. En ambos tratamientos se encontraron proteínas relacionadas a procesos de señalización, producción de energía, síntesis de compuestos, proteínas de transporte, proteínas involucradas en procesos de detoxificación, proteínas de procesos de regulación, metabolismo de lípidos, síntesis de proteínas y aminoácidos, proteínas de membrana, proteínas relacionadas al citoesqueleto celular, proteínas de los ribosomas y algunas relacionadas a procesos de reparación del DNA o metabolismo de nucleótidos. Para cada uno de los tratamientos, en la Figura 26 se presenta la clasificación de las proteínas descritas en las Tablas 5 y 6.

Figura 25.

Diagrama de Venn de proteínas con expresión diferencial para los tratamientos con mezcla 1 y DEET 100 mg/mL. a) Número total de spots de proteínas con expresión diferencial obtenidas inicialmente. b) Número total de proteínas identificadas a través de espectrometría de masas MALDI-TOF MS.

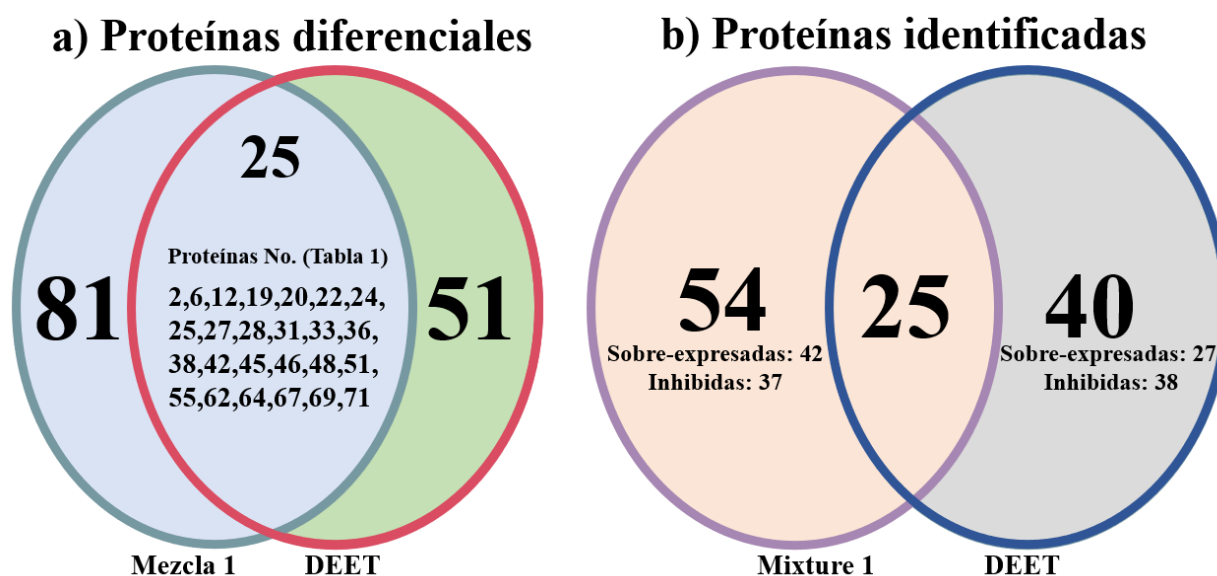
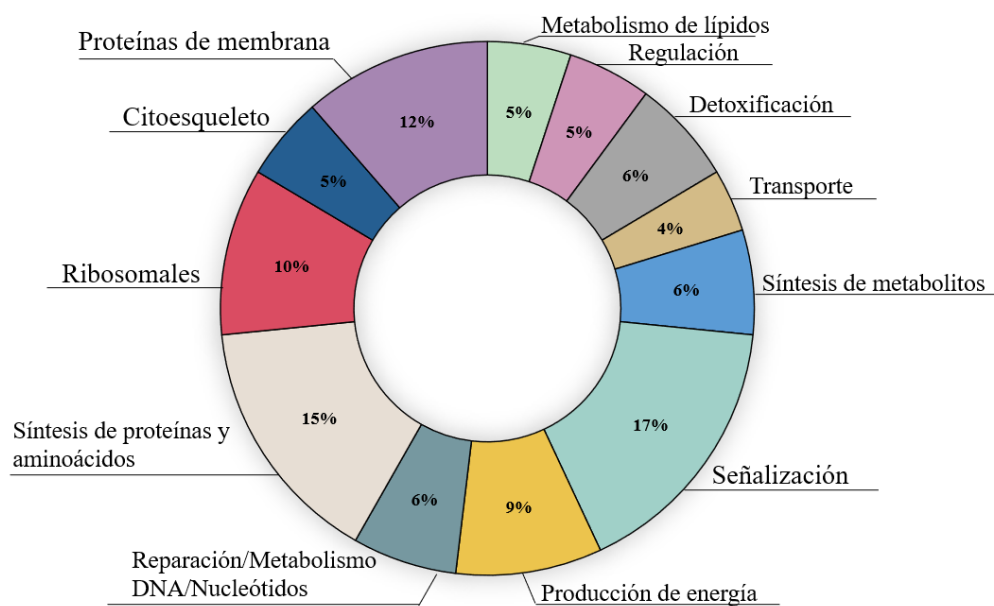


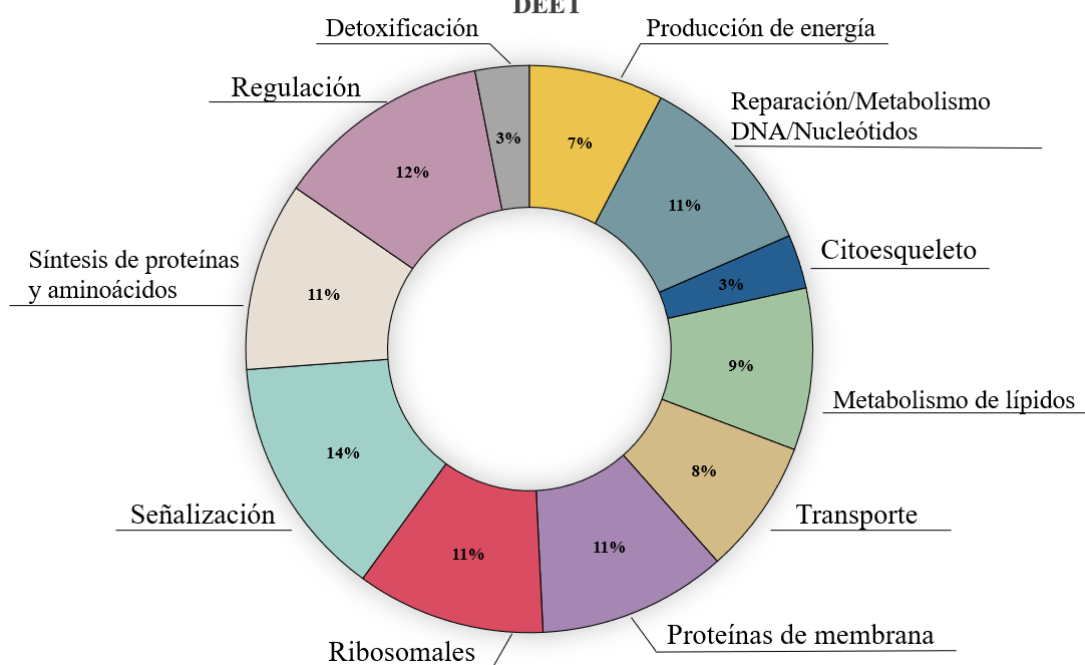
Figura 26.

Clasificación de las proteínas según su función en la célula. a) Clasificación correspondiente para la mezcla 1 (acetato de geranilo, α -bisabolol y nerolidol a 100 mg/mL). b) Clasificación de proteínas identificadas para el tratamiento con el repelente DEET a 100 mg/mL. La función y clasificación de cada una de las proteínas fue consultada en la base de datos de la Uniprot (<https://www.uniprot.org>).

a) Clasificación de proteínas con expresión diferencial en mosquitos tratados con la mezcla 1



b) Clasificación de proteínas con expresión diferencial en mosquitos tratados con DEET



4.2.1 Interacción proteína-proteína:

Con la herramienta online STRING se obtuvieron los diagramas de interacción proteína-proteína con *Drosophila melanogaster* como referencia. Esto se realizó ya que en este organismo se ha reportado casi por completo la estructura primaria, secundaria y función de todas sus proteínas, mientras que en *Aedes aegypti* no se ha reportado el proteoma en su totalidad. De este modo, es posible realizar una analogía con las proteínas identificadas y obtener una aproximación más acertada del posible mecanismo de recepción o acción. Con la mezcla 1, 28 proteínas presentaron interacciones entre sí y para el DEET, 30 proteínas (Figuras 27 y 28). Se adicionaron 10 interacciones adicionales o proteínas de “segunda capa o nivel”, proteínas no presentes en la identificación, pero que facilitan el análisis de interacciones proteicas relacionadas a las proteínas introducidas en el software. En las Figuras 27 y 28 se presentan los interactomas obtenidos de las proteínas identificadas para el tratamiento con la mezcla 1 y DEET, respectivamente. En las Tablas 9 y 10, se encuentran las proteínas correspondientes a cada clúster y su abreviación en los interactomas de las Figuras 27 y 28. En el diagrama de interacciones correspondiente a la mezcla 1 se evidenciaron interacciones entre proteínas de procesos de transporte, formación de vesículas, producción de energía (ATP), proteínas detoxificantes, proteínas de señalización y proteínas ribosomales. Mientras que el interactoma obtenido para el DEET mostró interacciones entre relacionadas a procesos de señalización, sinapsis, producción de energía (ATP), detoxificación, producción de óxido nítrico (NO), proteínas nucleares y ribosomales.

Tabla 9.

Lista de proteínas del diagrama de interacciones proteína-proteína realizado con el tratamiento de la mezcla 1 (acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol) en concentración de 100 mg/mL.

Clúster	Proteína	Abreviación
Transporte, formación de vesículas e importantes en procesos de sinapsis	Exocyst complex component1	Exocys1
	Exocyst complex component7	Exocys7
	Exocyst complex component5	Exocys5
	Exocyst complex component8	Exocys8
	Exocyst complex component15	Exocys15
	Dynactin subunit 2	Dynactin2
	Dynactin subunit 5	Dynactin5
	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1-B	SpectrinCa
	Probable GTP-binding protein	GTPbind
	Protein Vav	Vav
	Putative gustatory receptor 92a	GR92a
	General odorant-binding protein 83a	OBP83a
Proteínas para producción de energía, proteínas	Guanylate kinase	Gkinase
	Nitric oxide synthase	NOSynthase

detoxificantes y síntesis de neurotransmisores	Superoxide dismutase [Fe]	SOxiD
	Malate dehydrogenase	MalateDH
	ATP synthase subunit beta	ATPasaBeta
	Dihydroxy acetone phosphate acyltransferase	DhapAcT
	60 kDa chaperonin	Chaperonin
	Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog	UbiquinoneS
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PDH
	Fosfopiruvato hidratasa	Enolase
	Nucleoporin GLE1	Nucleoporin
Proteínas nucleares, proteínas para síntesis de proteínas y aminoácidos, proteínas detoxificantes	Nucleopore	Nucleopore
	Nuclearpore88	Nuclearpore88
	Muscle LIM protein Mlp84B	LIMprot
	DNA Ligase III	DNALigase
	Ribonuclease HII	RibonucleaseH
	DNA Binding Protein	DNABinding
	NAD Binding Protein	NADBinding
	Glutamate Proline tRNA ligase	GluProtRNAL
	Phosphoserine aminotransferase	PSerAmTrans
	Aspartate-tRNA ligase	AsptRNALigase

	Glutathione S-transferase A	GHSTransf
	Nicotinate phosphoribosyltransferase	NicoPRTransf
Proteínas ribosomales, proteínas de señalización y síntesis de lípidos	3-oxoacyl-[acyl-carrier- protein] synthase 3	3oxoAcprot
	NAD kinase	NADkinase
	Phosphopantetheine adenylyltransferase	PAdenylTransf
	Ribosome maturation factor RimP	RiboAssembly
	Ribosome Biogenesis factor	RiboBio
	Probable Ribosome Biogenesis factor 24	RiboBio24
	Ribosome production protein (Brix domain containing protein 1 homolog)	RiboProduct

Figura 27.

Interactomas obtenidos por el software STRING teniendo en cuenta las proteínas identificadas obtenidas. Organismo de referencia: Drosophila melanogaster. Interacciones proteína-proteína obtenidas para la mezcla 1 en concentración de 100/mL (acetato de geranilo, α -bisabolol y nerolidol). Las esferas grandes representan las proteínas sobre expresadas, las más pequeñas aquellas que se encontraron inhibidas, las esferas de color gris son proteínas no encontradas de forma diferencial adicionadas a través del software STRING como interactores secundarios.

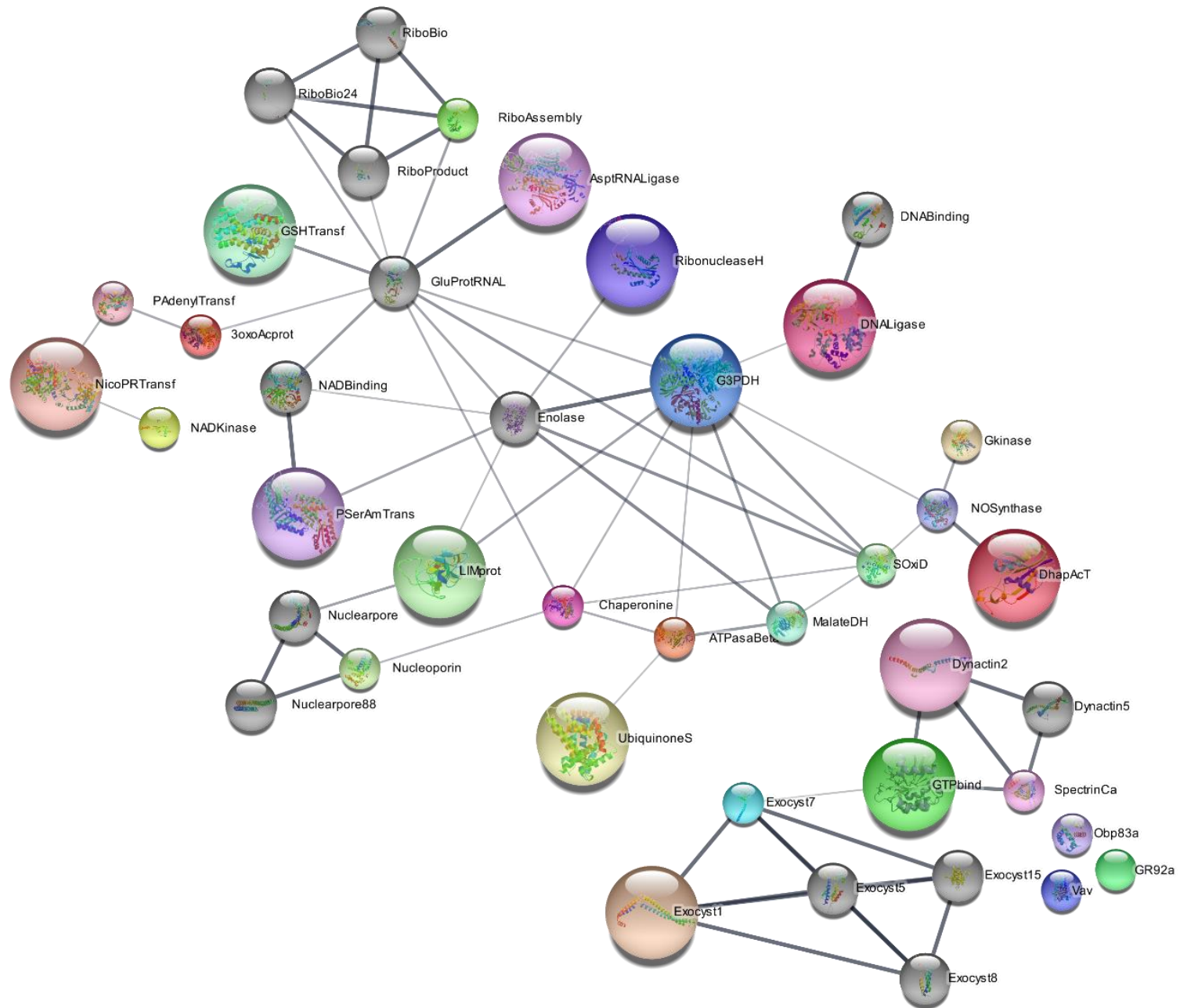


Tabla 10.

Lista de proteínas del diagrama de interacciones proteína-proteína realizado con el tratamiento del repelente sintético DEET en concentración de 100 mg/mL.

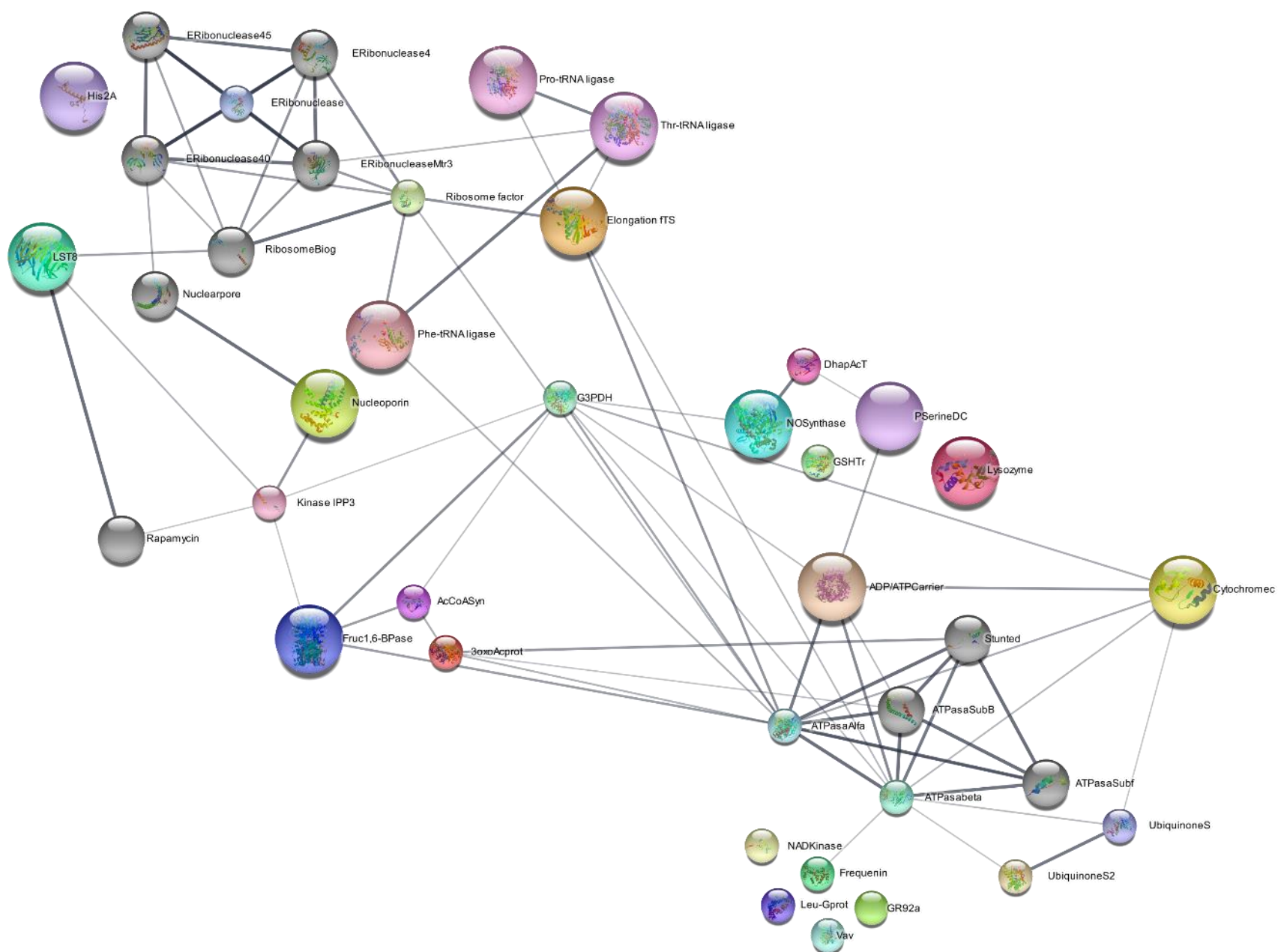
Clúster	Proteína	Abreviación
Proteínas de señalización y relacionados a procesos de sinapsis	Frequenin-1	Frequenin
	Putative gustatory receptor 92a	GR92a
	NAD kinase	NADkinase
	Protein vav	Vav
	Leucine-rich repeat-containing protein 9	Leu-Gprot
Proteínas importantes para la producción de ATP	ATP synthase subunit alfa	ATPasaAlfa
	ATP synthase subunit beta	ATPasabeta
	ATP synthase subunit b	ATPasaSubB
	ATP synthase subunit f	ATPasaSubf
	Protein Stunted	Stunted
	Ubiquinone biosynthesis protein COQ4	UbiquinoneS
	Ubiquinone biosynthesis protein	UbiquinoneS2
	Cytochrome c	Cytochromec
	ADP/ATP translocase 2	ADP/ATP Carrier

Detoxificación, producción de óxido nítrico	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PDH
	Nitric oxide synthase	NOSynthase
	Phosphatidylserine decarboxylase	PSerineDC
	Glutathione S-transferase A	GSHT _r
	Dihydroxy acetone phosphate acyltransferase	DhapAcT
Proteínas de la gluconeogénesis y síntesis de lípidos	Lysozyme C	Lysozyme
	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1	Fruc1,6-BPase
	Acetyl-coenzyme A synthetase OS	AcCoASyn
	3-oxoacyl-[acyl-carrier- protein] synthase 3	3oxoAcprot
	Inositol-1,4,5-trisphosphate 3- kinase activity	kinaseIPP ₃
Proteínas de señalización, proteínas nucleares, ribosomales y necesarias para síntesis de proteínas	Rapamycin companion complex of Tor	Rapamycin
	Nuclearpore complex 214	Nuclearpore
	Protein LST8 homolog	LST8
	Nucleoporin GLE1	Nucleoporin
	Histone H2A	His2A
	Ribosome biogenesis regulatory protein	RiboBio

Ribosomal RNA processing	Ribonuclease40
40	
Exoribonuclease Mtr3	ERibonucleaseMtr3
Exoribonuclease Rrp45	ERibonuclease45
Exoribonuclease Rrp4	ERibonuclease4
Ribonuclease 3	ERibonuclease
Ribosome Assembly factor	Ribosome factor
Mtr4	
Phenylalanine-tRNA ligase	Phe-tRNA ligase
alpha subunit	
Elongation factor Ts	Elongation fTS
Threonine-tRNA ligase	Thr-tRNA ligase
Proline-tRNA ligase	Pro-tRNA ligase

Figura 28.

Interactomas obtenidos por el software STRING teniendo en cuenta las proteínas identificadas obtenidas. Organismo de referencia: Drosophila melanogaster. Interacciones proteína-proteína obtenidas para el tratamiento con el repelente sintético DEET en concentración de 100/mL. Las esferas grandes representan las proteínas sobre expresadas, las más pequeñas aquellas que se encontraron inhibidas, las esferas de color gris son proteínas no encontradas de forma diferencial adicionadas a través del software STRING como interactores secundarios.



5. Discusión de resultados

5.1 Electroantenografía

En la presente investigación se emplearon los repelentes de origen natural acetato de geranilo, α -bisabolol y nerolidol, moléculas con actividad repelente *in vivo* y con capacidad de interacción con proteínas odorantes de *Ae. aegypti* (Portilla-Pulido *et al.*, 2020). Empleando la técnica electroantenografía, se evidenciaron patrones de señales eléctricas al conectar al mosquito y exponerlo a las sustancias repelentes mencionadas en diferentes concentraciones. Las neuronas olfativas que contienen los canales iónicos y demás proteínas del sistema olfativo respondieron de forma inmediata ante la sustancia atrayente, amoníaco NH_3 , una molécula clave para la localización de alimento para posteriormente alimentarse de sangre. Los patrones de señales de amoníaco alcanzaron valores desde 1 a 4 milivoltios (mV), lo que confirmó la respuesta efectiva del mosquito y conexión efectiva de los electrodos de registro en los lugares mencionados en la metodología.

Adicionalmente, este valor numérico en la escala de milivoltios (mV) indicó que los canales iónicos involucrados en el proceso de recepción estaban siendo estimulados, pues mayor voltaje significa mayor cantidad de iones pasando a través de la membrana de las neuronas causando la despolarización membranaral (Jacob, 2018). Por otro lado, las señales correspondientes a los repelentes mostraron bajos valores en la escala de voltaje. No obstante, no quiere decir que no exista percepción o respuesta del mosquito por estas sustancias, significa que una menor

cantidad de canales iónicos son activados por dichas sustancias o que la sensibilidad del equipo no es suficiente para detectar la señal. Como ejemplo de lo anterior, el caso de α -bisabolol, cuya señal siempre fue de 0 mV durante el primer conjunto de experimentos de EAG. Es posible que la percepción de esta sustancia esté relacionada a canales iónicos específicos o que la molécula tenga una ruta de transporte más larga, lo que evita una rápida activación de los receptores (Wicher, 2015).

5.1.1 Registros de EAG de compuestos repelentes y mezclas de repelentes

El primer conjunto de experimentos de EAG mostró una disminución significativa para casi todas las sustancias. Inicialmente, se atribuía tal decrecimiento en milivoltios (mV) al tiempo de conexión del mosquito mientras se tomaban los pulsos y señales de todas las sustancias repelentes. Sin embargo, al realizar una prueba con únicamente amoníaco en diferentes tiempos (Figura 17), se observó que la señal no cambiaba de forma significativa en un periodo de 20 minutos. Lo anterior, confirmó que la disminución de la señal de amoníaco era responsable únicamente por la exposición del mosquito a las sustancias repelentes. En cuanto a cada sustancia por individual, las moléculas α -bisabolol y nerolidol redujeron la señal de amoníaco en mayor proporción que el DEET. Sin embargo, es necesario resaltar que mayor reducción en la señal electroantenográfica obtenida por el atrayente amoníaco, no significa que se presente mejor efecto repelente *in vivo*, pues la actividad biológica de cada sustancia debe ser verificada con experimentos posteriores. Lo anterior permite deducir que, a pesar de esta disminución en la señal eléctrica, el efecto repelente *in vivo* es una variable diferente, ya que las sustancias de origen natural alcanzaron hasta 3 horas de efectividad y el DEET hasta 8 horas. Esto sugiere que los

receptores de odorantes y receptores ionotrópicos, son inhibidos aparentemente en mayor proporción por las sustancias de origen natural, pero con el paso del tiempo, es posible que exista un proceso en la célula que las elimine o degrade más fácilmente que la sustancia DEET (Bohbot & Pitts, 2015; Dickens & Bohbot, 2013).

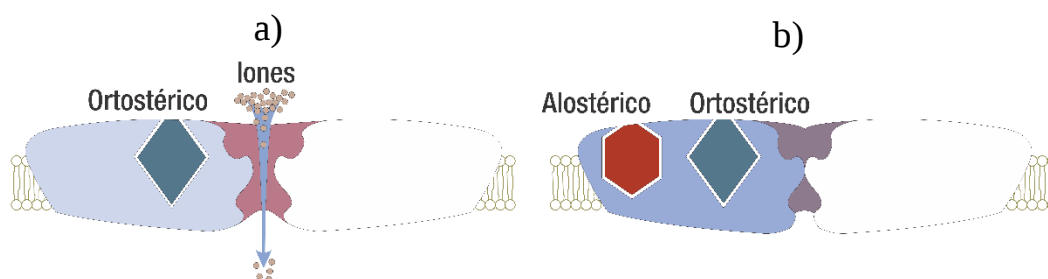
Existen diferentes hipótesis sobre lo que podría ocurrir cuando el mosquito percibe sustancias repelentes y su relación con la disminución en la señal de amoníaco. Las proteínas responsables de transformar la señal química en eléctrica son una familia de proteínas transmembranales conocidas como receptores iónotrópicos (IRs), receptores de odorantes (ORs) y receptores gustativos (GRs) (De Bruyne & Baker, 2008; Jason Pitts *et al.*, 2017; Matthews, *et al.*, 2016; Pask & Ray, 2016; Sparks *et al.*, 2018). Aunque su estructura es poco conocida, se conoce que contienen uno o varios sitios de unión de diferentes tipos. Algunos de tipo alostérico, donde se unen las moléculas y producen un efecto positivo o negativo en la actividad del canal y sitios ortostéricos, donde cada sustancia se une a su respectivo receptor (Dickens & Bohbot, 2013; Pellegrino, *et al.*, 2011; Sanford, *et al.*, 2013). De este modo, el amoníaco podría unirse a diferentes canales iónicos a través de sitios alostéricos produciendo un cambio en el potencial de membrana captado como señal de electroantenografía. Sin embargo, al emplear la sustancia repelente y observar una disminución, es posible que las moléculas repelentes compitan con las sustancias atrayentes por estos sitios alostéricos e impidan la funcionalidad del canal iónico durante un periodo determinado (Figura 30). Esto sugiere que la disminución en la señal percibida por EAG es debido a la interacción canal iónico-repelente. Sin embargo, este tipo de competencia no da lugar a un bloqueo definitivo del canal iónico, sino una modulación negativa que da lugar a la disminución de la cantidad de iones que pasan a través de la membrana. Así, menor cantidad de

iones atravesando la membrana neuronal producen menor corriente y menor señal de EAG, tal como se observó para todos los casos en la sección de resultados.

En la literatura se encuentran resultados que podrían confirmar lo obtenido en esta investigación. Se han realizado experimentos en los que se modifican los genes que producen los canales iónicos del sistema olfativo como los IRs, ORs o GRs. El objetivo de estas modificaciones fue estudiar la preferencia de los canales iónicos con sustancias sintéticas y de origen natural con efecto repelente o atrayente. Esto con el fin de detectar cambios en las señales eléctricas debido al cambio estructural de la proteína canal. Como ejemplo, Ditzen *et al.*, 2008 y Raji *et al* 2019, realizaron modificaciones sobre receptores de odorantes y receptores ionotrópicos que interactúan con sustancias atrayentes y algunas moléculas como el DEET. Con estos ensayos, se evidenció que, debido al cambio estructural de los receptores, se impedía la interacción efectiva de los compuestos mencionados, produciendo una señal de electrofisiológica reducida y significativamente diferente en comparación con aquellos mosquitos no modificados genéticamente. En algunos casos, estas modificaciones inhibieron por completo la detección de sustancias de tipo atrayente para detectar huéspedes mamíferos (Degennaro *et al.*, 2013).

Figura 29.

Posible interacción repelente-canal iónico A. La molécula atrayente se une a un sitio ortostérico el cual permite el paso de iones a través de la membrana, B. El mismo canal iónico posee diferentes sitios de unión, llamados sitios alostéricos, en los cuales otras moléculas pueden unirse. En el caso de los repelentes, es posible que este tipo de moléculas se una a sitios alostéricos e impida el funcionamiento adecuado del canal por un periodo de tiempo (Adaptado por Vidal M. CINTROP de: Dickens and Bohbot, 2013).



Además, algunos de los receptores modificados con posibles interacciones con DEET, mostraron que el efecto repelente disminuía y el mosquito tenía la capacidad de percibir sustancias atrayentes necesarias para la búsqueda de hospederos. De este modo, estos experimentos sugieren que tanto atrayentes como repelentes pueden tener uno o varios receptores con los que puedan interactuar y que el cambio estructural de los canales tiene como consecuencia la alteración en la sensibilidad del mismo (Stanczyk *et al.*, 2013; Syed & Leal, 2008). En similitud, los estudios realizados en la presente investigación con EAG demostraron que las señales eléctricas obtenidas se deben principalmente a la estimulación de varios receptores o canales iónicos y no un solo receptor. Sin embargo, se resalta que, para las sustancias repelentes, la señal eléctrica obtenida fue baja en la escala de mV, lo que infiere que sólo algunos receptores están involucrados en su percepción o que no producen la misma despolarización de la membrana como otras moléculas. Además, posiblemente la afinidad DEET-receptor sea mayor que aquellas moléculas de origen natural, lo que permite un efecto prolongado de repelencia (Afify, *et al.*, 2019; Leal & Leal, 2015; Lombardo *et al.*, 2017).

Otras investigaciones enfocadas en la estructura de estos canales iónicos, como las realizadas por Carraher *et al.*, 2015 y Pellegrino *et al.*, 2011, describen que los canales iónicos del sistema olfativo de insectos cuentan con sitios alostéricos. De este modo, diferentes moléculas

pueden interactuar con los canales iónicos produciendo efectos que estimulen el paso de iones a través de la membrana (agonistas) o que impidan su funcionamiento de forma temporal (inhibitorio). Esto da la posibilidad que algunos compuestos repelentes, tengan preferencia a la unión en sitios que produzcan un efecto inhibitorio o reduzcan la interacción y unión de otras moléculas en los canales iónicos de forma momentánea, provocando una reducción en la percepción. Posiblemente, las fuerzas intermoleculares compuesto-canal iónico generadas (puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals) tengan mayor afinidad, lo que causa que el compuesto permanezca por más tiempo en los receptores. Por lo tanto, podría explicar la efectividad de repelentes sintéticos como DEET, cuya efectividad alcanza hasta 8 horas, en comparación con las de origen natural cuyo intervalo varía entre 1 a 3 horas. Esto se pudo evidenciar en los ensayos de electroantenografía con la disminución en la señal de amoníaco. Posiblemente, las moléculas repelentes interaccionen con receptores que también se unen a compuestos atrayentes e impidan el correcto funcionamiento de los receptores y reduciendo la percepción de otras sustancias importantes para la localización de individuos (Afify *et al.*, 2019; Stanczyk *et al.*, 2010).

Después de realizar la evaluación de todas las concentraciones y sustancias, se observó que para casi todos los casos que mayor concentración empleada, mayor la disminución de la señal EAG de amoníaco. Esto sugiere que, a mayor cantidad de moléculas, mayor es el efecto sobre el sistema olfativo del mosquito. Esto se evidenció con las sustancias empleadas en mezcla, por ejemplo, el acetato de geranilo no disminuyó de forma significativa la señal de amoníaco, pero al implementarlo con los otros metabolitos en mezcla se obtuvo una disminución drástica de la percepción de amoníaco. Con lo anterior, se puede sugerir que al implementar mezclas sencillas con los 3 metabolitos se obtiene un efecto sinérgico, confirmado por experimentos de repelencia

in vivo (Portilla-Pulido, *et al.* 2020). En similitud, el DEET, empleado a 25% en repelentes comerciales podría tener efectos sinérgicos con los metabolitos en concentraciones muy bajas (0,5 a 2%). De este modo, se podría obtener un efecto mejorado de los compuestos de origen natural sobre la inhibición temporal de estos canales iónicos. A su vez, permitiría reducir en mayor proporción los daños en la salud del ser humano al implementar concentraciones bajas de metabolitos y DEET. Es necesario resaltar que con los experimentos de EAG, el tiempo de inhibición o bloqueo de la actividad de los canales iónicos no se podría conocer y más ensayos serían necesarios; no obstante, el tiempo de repelencia de estas sustancias puede dar una pista de la funcionalidad de estos canales a lo largo de un periodo.

5.1.2 Registros de EAG con aplicación simultánea de amoníaco y repelente

En lo que concierne a las moléculas empleadas en esta investigación, todas tienen un efecto repelente entre 1 a 3 horas, destacando las mezclas 1 y 2 en los experimentos *in vivo* (Castillo *et al.*, 2017; Portilla-Pulido *et al.*, 2020). Sin embargo, comparando los ensayos de EAG y los experimentos realizados con seres humanos, representan una situación mucho más real debido a que los compuestos volátiles presentes de forma simultánea se separan en dos grupos: los atrayentes expelidos a través de la piel y el repelente aplicado (Afify *et al.*, 2019). Este factor no se tuvo en cuenta en la primera parte de EAG ya que se aplicaron las sustancias repelentes y el amoníaco por separado.

Con la toma simultánea de patrones de EAG de repelente y amoníaco también se obtuvo una disminución en la señal de amoníaco en comparación con el pulso inicial aplicado, destacando

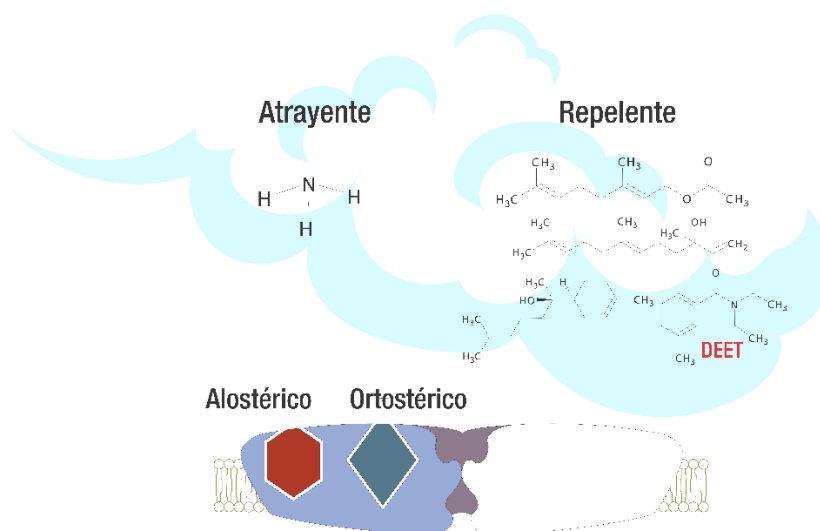
las mezclas que disminuyeron en mayor proporción la señal de EAG. Nuevamente, se sugiere que la reducción de la señal correspondiente a las mezclas está relacionada a un efecto sinérgico de interacciones molécula-proteína canal. Algunos estudios como los realizados por Syed and Leal, 2008 y Pellegrino *et al*, 2011, sugieren que el efecto repelente se presenta debido a cambios en propiedades fisicoquímicas como presión de vapor produciendo un efecto de enmascaramiento. Es decir, la interacción de estas sustancias en fase líquida disminuye la volatilidad de compuestos atrayentes presentes en la piel. Esto impide que este tipo de moléculas lleguen más rápido o en mayor cantidad al mosquito (Figura 31). Con esto, se podría inferir que además de la alteración de la actividad de canales iónicos, la interacción de las moléculas atrayentes-repelentes cambie volatilidad de los compuestos atrayentes presentes en la piel (Bohbot & Dickens, 2010). Así, dicha competencia podría explicar la reducción de la señal de amoníaco cuando se aplica de forma simultánea con el repelente, la cantidad de moléculas que llegan al sistema olfativo no es la misma y menos canales iónicos son activados. Experimentos posteriores relacionados a la estructura de diferentes canales iónicos podrían elucidar con mayor precisión los diferentes tipos de ligandos que se unen a cada uno de los receptores transmembranales del sistema olfativo.

A lo largo de las investigaciones realizadas enfocadas en el sistema olfativo, se han descrito vías de activación que involucran los canales iónicos metabotrópicos e ionotrópicos (ORs, IRs, GRs) (Choo *et al.*, 2018; De Bruyne & Baker, 2008; Dickens & Bohbot, 2013). La vía ionotrópica está relacionada a la activación directa de los receptores cuando los volátiles son transportados desde la linfa sensilar hasta la membrana de las neuronas (Liu *et al.*, 2018; Pask & Ray, 2016). Este efecto es rápido y la respuesta eléctrica es casi inmediata. Esto se evidenció al tomar las señales correspondientes del amoníaco, en la que se observó una señal de alto valor en milivoltios justo en el momento de la liberación del estímulo. En la presente investigación, las sustancias

repelentes presentaron señales eléctricas pequeñas (entre 100-400 μ V aproximadamente) o incluso nulas, en el caso del α -bisabolol. Sin embargo, al tomar nuevamente la señal de amoníaco se observó una disminución en los valores de la señal. En este punto, es posible que la vía metabotrópica esté tomando un rol importante. Este camino es más lento y dependiente de la concentración del volátil ya que varias proteínas de señalización toman participación al ser activadas. Algunas de estas proteínas relacionadas son proteínas G, que inducen la liberación de mensajeros secundarios como nucleótidos cíclicos (cAMP, cATP, cGMP, cGDP, cGTP, etc.), iones calcio Ca^{2+} , inositol trifosfato IP_3 , entre otros (Guo & Smith, 2017; Nakagawa & Vossell, 2009; Xia & Guang, 2005). De este modo, es posible que los repelentes interactúen primero con proteínas que desencadenen una cascada de señalización y al cabo de unos minutos produzca un efecto, en este caso, una inhibición o alteración en el funcionamiento de canales iónicos como los receptores de odorantes y los ionotrópicos. Una evidencia estaría relacionada a los primeros experimentos de electroantenografía; ya que la señal de amoníaco registrada se disminuyó de forma drástica al aplicar todas las concentraciones evaluadas. Esta señal fue tomada al cabo de 8-10 minutos, por lo tanto, existe la posibilidad de que algunas proteínas señalizadoras y de transporte participen en el proceso de recepción de estas sustancias repelentes. Lo anterior, podría explicar los bajos valores de mV registrados para los repelentes nerolidol, α -bisabolol y DEET, ya que estas moléculas además de interactuar con receptores transmembranales pueden llegar a desencadenar una cascada de señalización por la vía metabotrópica (Carraher *et al.*, 2015; Kaupp, 2010).

Figura 30.

Efecto de enmascaramiento. Uno de los posibles mecanismos de los repelentes es la interacción de las moléculas repelentes-atrayentes en fase líquida y fase de vapor que impiden la llegada de forma rápida al sistema olfativo del mosquito. Posteriormente, el efecto de la molécula sobre los canales iónicos produce el efecto de inhibición mencionado. (Adaptado por Vidal M. CINTROP de: Dickens and Bohbot, 2013).



De los resultados presentes en este trabajo, es posible observar que los repelentes presentaron el mismo patrón en la disminución de la señal de amoníaco. Con estos ensayos, sería posible implementar un *screening* de sustancias atrayentes y repelentes para futuras investigaciones. Sin embargo, experimentos *in vivo* serán siempre requeridos para verificar la efectividad repelente sobre el mosquito y analizar su perdurabilidad en la piel. Por otro lado, en la literatura se ha implementado técnicas electrofisiológicas para observar señales de EAG de repelentes; sin embargo, no hay estudios enfocados en la reducción de señales post tratamiento

con repelentes. Además, realizando un contraste con otros estudios de electroantenografía, la mayoría de las investigaciones emplean únicamente la cabeza del insecto o las antenas escindidas (cortadas). Contrario a lo implementado en el presente estudio, en el cual el mosquito siempre permaneció vivo durante los registros de EAG.

Respecto a la metodología realizada, en una investigación llevada a cabo por Afify *et al*, 2019, se describe un procedimiento similar al realizado en este trabajo para evaluar sustancias repelentes en el mosquito *Anopheles gambiae*. En dicho estudio, se evaluaron sustancias repelentes de origen sintético y natural de forma individual y simultánea con algunos odorantes que el mosquito utiliza para localizar a los mamíferos. De forma similar a la presente investigación, Afify y colaboradores observaron disminuciones en señales electrofisiológicas y sugirieron un posible efecto de enmascaramiento de los repelentes a sustancias de tipo atrayente como el octenol y un posible efecto inhibitorio sobre receptores involucrados en la percepción. Sin embargo, no se reportó evidencia de proteínas involucradas directamente en este proceso de recepción de odorantes. En los siguientes experimentos enfocados en proteómica, se logró identificar algunas proteínas importantes en el proceso de percepción de odorantes en el sistema olfativo de insectos. Lo que podría ser clave para entender el mecanismo de acción y recepción de moléculas odorantes, tanto atrayentes como repelentes.

5.2 Identificación y comparación de proteínas expresadas

Los geles obtenidos a través de electroforesis bidimensional fueron reproducibles y mostraron una gran cantidad de *spots* relacionadas a proteínas dentro del rango de pH de 3 a 10.

Con esto, se demostró que el rango de pH y peso molecular de las proteínas diferenciales es amplio pues se obtuvieron *spots* sobre todo el rango de pH (3-10) y peso molecular (11-245 kDa). Sin embargo, la mayor parte de las proteínas sobre expresadas en ambos tratamientos se encontraron en el rango de bajo peso molecular, 11 a 30 kDa aproximadamente. En la literatura, se han reportado diversas proteínas en este rango de peso que pertenecen a proteínas odorantes, proteínas de transporte, proteínas de señalización y regulación (Li *et al.*, 2008; Picón-Pagès *et al.*, 2019; Xia & Guang, 2005; Yuan *et al.*, 2015). Lo anterior, sugiere que este grupo de proteínas están implicadas en el proceso de recepción y transporte de sustancias como los repelentes (Eilerts, *et al.*, 2018; Fernandes, *et al.*, 2016; Rosilawati *et al.*, 2019).

Posteriormente, a través de MALDI TOF-MS y bases de datos como *Swissprot* y *Uniprot*, se identificaron las proteínas y su función en cada uno de los tratamientos. Con lo anterior, se encontró que los espectros están relacionados con proteínas de diversas especies de bacterias, de insectos como *Drosophila melanogaster*, de varios mamíferos y del mosquito *Anopheles gambiae* con valores de *score* de 39 a 71. Este rango podría indicar que no se conozca la huella peptídica de algunas proteínas o que la estructura primaria de dicha proteína no se haya reportado completamente hasta ahora para *Aedes aegypti*. No obstante, al realizar la clasificación y búsqueda de la función de las proteínas, se evidenció que están relacionadas a procesos de señalización en neuronas, procesos de regulación, producción de energía, detoxificación, entre otros. De este modo, esta metodología funcionó para identificar la mayor cantidad de proteínas obtenidas de forma diferencial. En general, la metodología mostrada para la extracción y separación de proteínas de cabeza de hembras de *Aedes aegypti* fue eficaz, ya que se obtuvieron más de 106 proteínas diferenciales por gel con abundancia relativamente alta. Aunque con otros métodos de separación de proteínas se obtiene una mayor cantidad de *spots* y péptidos, no siempre es posible

identificar todas las proteínas en su totalidad. Lo anterior indica que la metodología utilizada para la extracción y separación es adecuada para identificar proteínas diferenciales relacionadas al proceso de recepción de moléculas como los repelentes (Dhawan *et al.*, 2017; Mastrobuoni *et al.*, 2013; Rosilawati *et al.*, 2019).

5.2.1 Análisis de la expresión diferencial y mecanismo de recepción: DEET vs control

Con respecto a las funciones de señalización, regulación, transporte, producción de energía y detoxificación encontradas en las proteínas de este estudio, da a entender que durante la exposición a los repelentes (de origen natural y sintético) están involucradas diferentes vías metabólicas, de señalización y detoxificación celular. En primer lugar, se analizó el interactoma para el repelente sintético DEET. Con este tratamiento, proteínas involucradas en la producción de energía, como gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, acetil CoA sintetasa, ATP sintasa subunidades α y β y ubiquinona sintetasa inhibieron su expresión. Esto sugiere que la vía glucolítica y la fosforilación oxidativa que producen energía en forma de ATP, se encuentren alteradas en comparación con el control. Adicionalmente, la enzima fructosa 1,6-bifosfatasa se sobre expresó para este tratamiento; por lo tanto, confirma que el proceso de glucólisis se encuentra regulado de forma negativa (Baldelli *et al.*, 2019; Bernstein & Bamburg, 2003; Guo & Smith, 2017; Rund S *et al.*, 2013).

En la neurona, la demanda energética es alta debido a que se necesita mantener el funcionamiento de proteínas involucradas durante la sinapsis, síntesis y activación de mensajeros secundarios y transporte de neurotransmisores (Bernstein & Bamburg, 2003). En relación con

dicha disminución en la producción de energía, la proteína óxido nítrico sintasa, que sintetiza el óxido nítrico (NO), se encontró sobre expresada para este tratamiento. Esta molécula está catalogada como un neurotransmisor y mensajero secundario con diferentes funciones en la neurona. Una de estas está relacionada a la regulación negativa de la producción de ATP en la célula (Baldelli *et al.*, 2019; Picón-Pagès *et al.*, 2019). Esto se debe a que, durante la liberación de NO, varias proteínas y enzimas pierden o disminuyen su actividad porque reaccionan con el NO y se nitrosilan (Baldelli *et al.*, 2019).

Lo anterior, explicaría la inhibición de la expresión de proteínas de la vía glucolítica como el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, proteínas que regulan la homeóstasis como las chaperoninas y liberación de mensajeros secundarios, como el guanilato quinasas y guanilato ciclasas. En varias investigaciones realizadas (Mustafi, *et al.*, 2009; Omondi, *et al.*, 2015; Pongs *et al.*, 1993) se reportaron inhibiciones o alteraciones debido al óxido nítrico de algunas proteínas encontradas en esta investigación. De este modo, la expresión y actividad de varias proteínas se disminuye por la reacción del NO con la proteína (Baldelli *et al.*, 2019; Picón-Pagès *et al.*, 2019). Por otro lado, proteínas como los aminoaciles prolina, treonina y fenilalanina tRNA sintetasas, factores de ensamblaje ribosomal y de elongación y la proteína homóloga LST8, importantes en el proceso de elongación durante la síntesis de proteínas en el ribosoma se sobre expresaron (Baldelli *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2011). Lo anterior, sugiere que la célula sobre expresa proteínas necesarias para el proceso de síntesis de proteínas en respuesta al efecto negativo del óxido nítrico; así, producir nuevas proteínas para continuar con el funcionamiento adecuado de los procesos alterados por el NO.

Respecto a la producción de óxido nítrico, en investigaciones realizadas por Baldelli *et al.*, 2019, se reporta que el incremento de NO en la célula produce una respuesta metabólica de estrés

a nivel celular y mitocondrial. Esto estaría involucrado con la expresión de proteínas como citocromo c y la translocasa ADP/ATP en la mitocondria. Estas proteínas realizan el intercambio ADP/ATP entre la mitocondria y el citoplasma y se relacionan con la señalización que induce la muerte celular programada (apoptosis) (Rund *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2016). Además, se ha reportado que el estrés celular producido por el NO causa la alteración del ciclo celular y proteínas nucleares (Picón-Pagès *et al.*, 2019). Lo anterior, estaría relacionado a proteínas inhibidas para este tratamiento como exoribonucleasas y nucleoporinas, importantes en el proceso de transporte, degradación de RNA y reciclaje de nucleótidos, antes y después del proceso de síntesis de proteínas (Andrade *et al.*, 2009; Bhattacharjya *et al.*, 2015). De este modo, la exposición del mosquito con DEET podría producir apoptosis debido a la inhibición de estas proteínas y sobre expresión de factores de apoptosis como el citocromo c.

Otra de las funciones del óxido nítrico es actuar como neurotransmisor “retrógrado” (Esplugues, 2002; Picón-Pagès *et al.*, 2019). Se le atribuye el término retrógrado ya que se sintetiza en la neurona postsináptica y se transporta hacia neuronas presinápticas, produciendo un efecto cíclico en la transmisión de señales. Por lo tanto, se retrasa el flujo de información a neuronas postsinápticas. El retraso de la transmisión de señal neurona a neurona sugiere que la perdurabilidad de repelentes sintéticos como DEET sea más prolongado. Al interactuar el DEET con el sistema olfativo, las neuronas del insecto producen una elevada cantidad de NO. En consecuencia, provoca que otros procesos metabólicos como producción de energía, procesos de señalización y eliminación de moléculas xenobióticas, sean más lentos. Lo anterior se podría confirmar ya que también se encontraron proteínas inhibidas relacionadas a procesos de señalización y regulación.

Por ejemplo, la enzima inositol trifosfato quinasa, encargada de fosforilar moléculas de inositol produciendo inositol trifosfato (IP₃) y derivados fosforilados que funcionan como intermediarios para la liberación de iones calcio Ca²⁺ intracelular (Xia & Guang, 2005). La alteración en la actividad de esta enzima evita que la célula ralentice los procesos de homeóstasis, lo que ocasiona estrés celular por exceso o falta de iones Ca²⁺. De la misma forma, la proteína frequenina-1, es una de las proteínas que dependen de niveles de Ca²⁺ para su funcionamiento y se encuentra inhibida. Esta proteína tiene relevancia en la regulación de procesos durante la sinapsis (Dason, *et al.*, 2012; Pongs *et al.*, 1993). Una de las funciones de esta proteína, es actuar como un sensor de iones Ca²⁺ produciendo una cascada de señalización para el funcionamiento de proteínas quinasas necesarias para la síntesis de nucleótidos fosfato (cGMP, cGDP, cGTP, cAMP, GMP, GDP, GTP, AMP, etc.). Algunas de estas quinasas y proteínas de transporte involucradas con expresión inhibida son la enzima guanilato quinasa, la NAD quinasa, la proteína dominio LIM, lin-7 homólogo B y la AMP-GMP ciclo sintasa (Tabla 2). De este modo, la inhibición de proteínas como frequenina-1, guanilato quinasa y NAD quinasa, alteran la liberación y producción de mensajeros secundarios, involucrados durante la transducción de señales químicas a eléctricas por la vía metabotrópica (Dason *et al.*, 2012; Nakagawa & Vossell, 2009). Por lo tanto, la inhibición de estas proteínas que actúan como señalizadores en cadena causan un retraso o alteración de la captación y transmisión de señales neuronales transmitidas de célula a célula.

Por otro lado, en el interactoma también se encontraron proteínas que no presentaron interacción directa con otras en el diagrama. Varias de estas, como la proteína Vav, la proteína G rica en leucina, la proteína odorante 83a y el receptor gustativo 92, están involucradas en procesos de señalización (Bustelo, 2001; Kaupp, 2010; Matthews *et al.*, 2016; Pongs *et al.*, 1993). Por ejemplo, la proteína Vav juega un rol importante en el acoplamiento de proteínas tirosina quinasas

que desencadenan la actividad de GTPasas y cascadas de señalización para transducción de señales en la neurona (Bustelo, 2001). Seguido a esto, la proteína G rica en leucina, es necesaria para interacciones proteína-proteína relacionadas a procesos de activación de cascadas de señalización durante la recepción de moléculas en el sistema olfativo (Kobe & Kajava, 2001; Laurén *et al.*, 2003). Además, se encontró que el receptor gustativo GR92a inhibió su expresión, lo que podría indicar que se está reduciendo la percepción de volátiles por parte del mosquito. Según se ha reportado, la mayoría de los receptores gustativos están involucrados principalmente en la captación de CO₂, una molécula clave para la búsqueda de alimento en mosquitos (Sanford *et al.*, 2013; Schmidt & Benton, 2020). De este modo, en contraste con los resultados obtenidos en electroantenografía y experimentos *in vivo*, un posible mecanismo de recepción y acción del DEET es la alteración de la producción de ATP, de mensajeros secundarios y la inhibición de proteínas que transmiten información durante el proceso de sinapsis neuronal. En consecuencia, la transmisión de señales de neurona a neurona sucede más lentamente hasta que el DEET sea eliminado o degradado del organismo.

5.2.2 Análisis de la expresión diferencial y mecanismo de recepción: Mezcla 1 vs control

Pasando al análisis del diagrama de interacciones del tratamiento con la mezcla 1, se muestran diferencias en algunos *cluster* en comparación con DEET. Uno de estos, está relacionado con la producción y transporte de vesículas que transportan neurotransmisores en la neurona. Este grupo lo conforman proteínas como dinactinas, espectrinas, el factor de unión a GTP y los complejos de exocitosis Exo70 y Sec3. De estas, la dinactina, la proteína de unión a GTP (Tabla 1) y la Efrina-1 (Tabla 1), se sobre expresaron. Mientras que proteínas de unión membrana-

vesícula, como la espectrina, complejos de exocitosis (Exocyst), la proteína dominio LIM y lin-7 homólogo B (Tabla 2), se inhibieron. Las dinactinas se encuentran a lo largo del axón de la neurona, la sobre expresión de esta proteína sugiere que la neurona incrementa la actividad de transporte cuando el mosquito percibe los repelentes de la mezcla 1. De forma similar, este efecto estaría relacionado con otras proteínas sobre expresadas como LIM Mlp84b, que mantiene la integridad del citoesqueleto y regula la efectividad de la movilidad celular a través de las actinas (Bernstein & Bamberg, 2003). De este modo, aunque las proteínas como espectrinas, importantes en la unión vesícula-membrana, se encuentren inhibidas, la neurona incrementa la efectividad en el transporte para contrarrestar este efecto y continuar con el proceso de transporte y transducción de señales. En consecuencia, cuando el mosquito percibe los repelentes de la mezcla 1, se alteran procesos de transporte de vesículas y neurotransmisores; así, el proceso de sinapsis se ve afectado y se retrasa. Lo anterior, podría corroborarse ya que otras proteínas como las enzimas guanilato quinasa, NAD quinasa, la proteína Vav, la proteína de unión a guanina, la proteína homóloga lin-7, AMP-GMP cíclico sintasa, también se encuentran inhibidas. Todas estas proteínas están involucradas en la liberación de mensajeros secundarios que desencadenan la actividad de GTPasas y cascadas de señalización para transducción de señales. De este modo, el proceso de transporte y sinapsis se ve alterado, provocando que la transducción de señales químicas a señales eléctricas sea más lenta. Este efecto es similar al encontrado a través de EAG, ya que las sustancias de origen natural disminuyeron la señal eléctrica correspondiente al amoníaco, directamente relacionado a los canales iónicos y proceso de sinapsis.

En el caso de la mezcla 1, proteínas relacionadas al estrés oxidativo como las enzimas óxido nítrico sintasa, superóxido dismutasa y la proteína chaperonina 60 kDa, se encuentran inhibidas, contrario a lo sucedido para el DEET. En estudios realizados por Mustafi *et al*, 2009, se

encontró que la enzima superóxido dismutasa y las chaperoninas se co-expresan para evitar el daño de otras proteínas durante el estrés oxidativo celular. La inhibición de este tipo de proteínas sugiere que los repelentes de la mezcla 1 desencadenan reacciones que inhiben la expresión de estas proteínas. Por lo tanto, la recepción de los 3 metabolitos no produce una respuesta de estrés oxidativo. Sin embargo, se encontraron sobre expresadas varias proteínas detoxificantes como la aldo-ceto reductasa, la glutatión-S-transferasa, la glutarredoxina y la enzima nicotinato fosforibosiltransferasa (Baldelli *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2015; Misra *et al.*, 2011). Estas proteínas reaccionan fácilmente con compuestos que contengan grupos cetona, éster, aldehídos y carbonos electrofílicos, como aquellos presentes en los compuestos acetato de geranilo, α -bisabolol y nerolidol (Figura 32) (Hellestad *et al.*, 2011). De este modo, aunque no se presente respuesta de estrés oxidativo; la célula elimina estas moléculas por otros medios de detoxificación, los cuales son más efectivos debido a los enlaces presentes en los compuestos terpénicos utilizados en este proyecto. Esto sugiere que la baja efectividad repelente de sustancias de origen natural está directamente relacionada a la facilidad con la que la célula puede eliminarlas a través de estas proteínas detoxificantes, un suceso no encontrado para el repelente sintético DEET. No obstante, los experimentos realizados en esta investigación no confirman la ruta de degradación de compuestos de origen natural aquí utilizados, de este modo, investigaciones adicionales son necesarias para comprobar esta hipótesis.

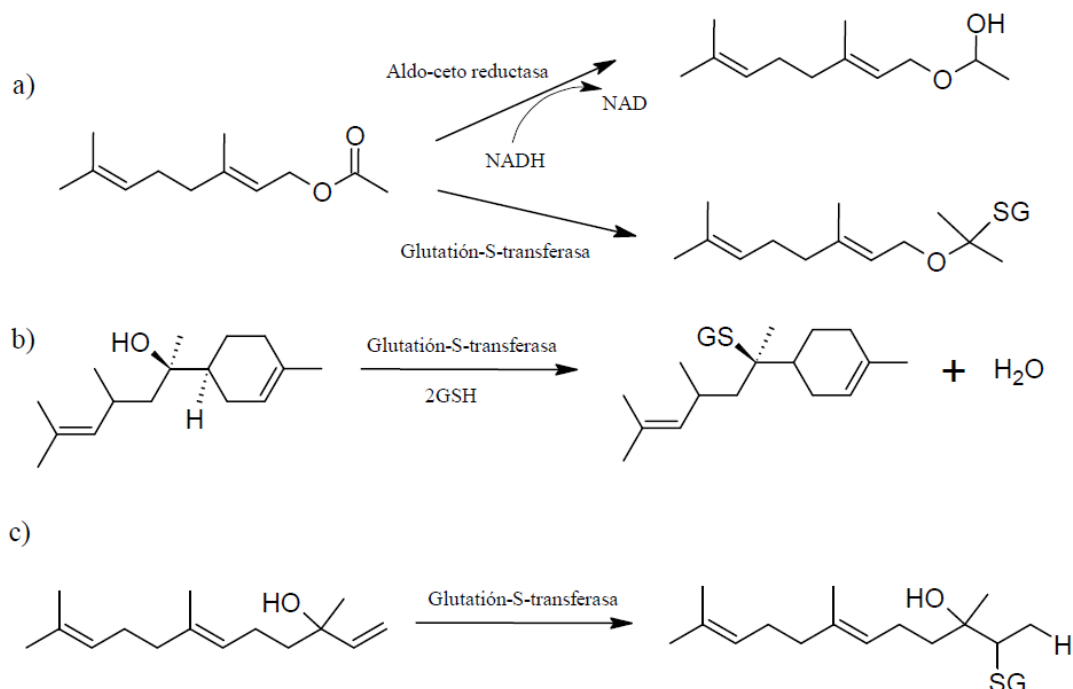
Con similitud al DEET, proteínas involucradas en la producción de energía como la ATP sintasa subunidad beta, la malato deshidrogenasa y la ubiquinona sintasa, se inhibieron. En este caso, la alteración en la producción de ATP disminuye la actividad de otros procesos dependientes de ATP. Esto estaría directamente relacionado con la inhibición de proteínas de transporte de neurotransmisores, pues requieren alta demanda de energía en forma de ATP para funcionar

(Bernstein & Bamberg, 2003; Rund *et al.*, 2013). De los resultados presentes en este proyecto, se resalta que en la literatura hasta el momento no se tenían reportes de investigaciones relacionadas al proteoma diferencial de *Aedes aegypti* cuando es expuesto a moléculas repelentes. Algunas investigaciones han realizado extracción de proteínas de cabezas *Aedes aegypti*; sin embargo, no se reportan las mismas proteínas encontradas en esta investigación ya que dichos estudios no están enfocados en el estudio diferencial con tratamientos de sustancias (Dhawan *et al.*, 2017; Hellestad *et al.*, 2011; Maringer *et al.*, 2017). Junto con los resultados de electroantenografía se puede confirmar que los repelentes sintéticos presentan un mecanismo diferente a las sustancias de origen natural. En lo que concierne a la recepción de estas moléculas volátiles, es posible que ambos tipos de moléculas sintéticas y de origen natural tengan el mismo mecanismo de recepción a través de proteínas odorantes. Sin embargo, la respuesta del mosquito frente a ambas moléculas es diferente; para el DEET, se encontró alteración en procesos relacionados a la eficacia sináptica y la generación de energía en forma de ATP en la neurona, lo que produce la reducción en la señal electroantenográfica por disminución en la actividad neuronal (Figura 33). Además, comparando los tratamientos de los repelentes de origen natural y DEET; el tratamiento con DEET no sobre expresó en igual proporción aquellas proteínas involucradas en procesos de detoxificación. De este modo, es posible que la interacción y efecto sobre canales y receptores iónicos se da de forma más eficaz y prolongada.

Figura 31.

Posibles mecanismos de detoxificación utilizados por el mosquito mediante las enzimas aldo-ceto reductasa y glutatión-S-transferasa, proteínas sobre expresadas para el tratamiento con la mezcla 1

(acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol). a) Acetato de geranilo, b) α -bisabolol, c) Nerolidol. (SG: Glutación)



En contraste, la mezcla de los 3 metabolitos alteró proteínas relacionadas a la generación de energía, señalización y transporte de vesículas y neurotransmisores, lo que influye de forma negativa en la sinapsis (Figura 34). Sin embargo, la célula en respuesta a compuestos de origen natural, sobre expresa proteínas detoxificantes, lo que ayuda a eliminar más fácilmente este tipo de moléculas (Baldelli *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2015; Strange *et al.*, 2001). En ambos tratamientos, se encontró alteraciones en la sinapsis neuronal, lo que estaría relacionado con la disminución de la señal de EAG reportada en esta investigación. Finalmente, el aporte de este trabajo representa una aproximación de posibles mecanismos de acción de repelentes de origen natural y sintético implementados contra el mosquito *Aedes aegypti*. Con futuras investigaciones, se podrán realizar diseño y búsqueda de moléculas repelentes cuyo efecto sea mucho más prolongado teniendo en

cuenta los efectos a nivel proteico y de señales de EAG encontrados en este trabajo. Así, repelentes sintéticos nocivos como el DEET e IR3535 podrán ser reemplazados de forma parcial o total con compuestos de origen natural e incrementar la efectividad repelente de este tipo de compuestos.

Figura 33.

Posible mecanismo de acción/recepción para el tratamiento con DEET. a) Los volátiles son transportados a los canales iónicos por las proteínas odorantes (OBP's) o se difunden a través de la membrana plasmática. b) La interacción DEET-canal iónico disminuye su actividad, lo que reduce la señal eléctrica. c) El DEET inhibe la expresión de la ATPasa, importante en la producción de ATP en la mitocondria. d) El ingreso del DEET al sistema olfativo afecta la expresión de proteínas importantes para la liberación de iones Ca^{2+} , lo que impide el correcto funcionamiento de otros procesos. e) Otras proteínas inhibidas y sobre expresadas provocan el retraso de cascadas de señalización y transmisión de señales.

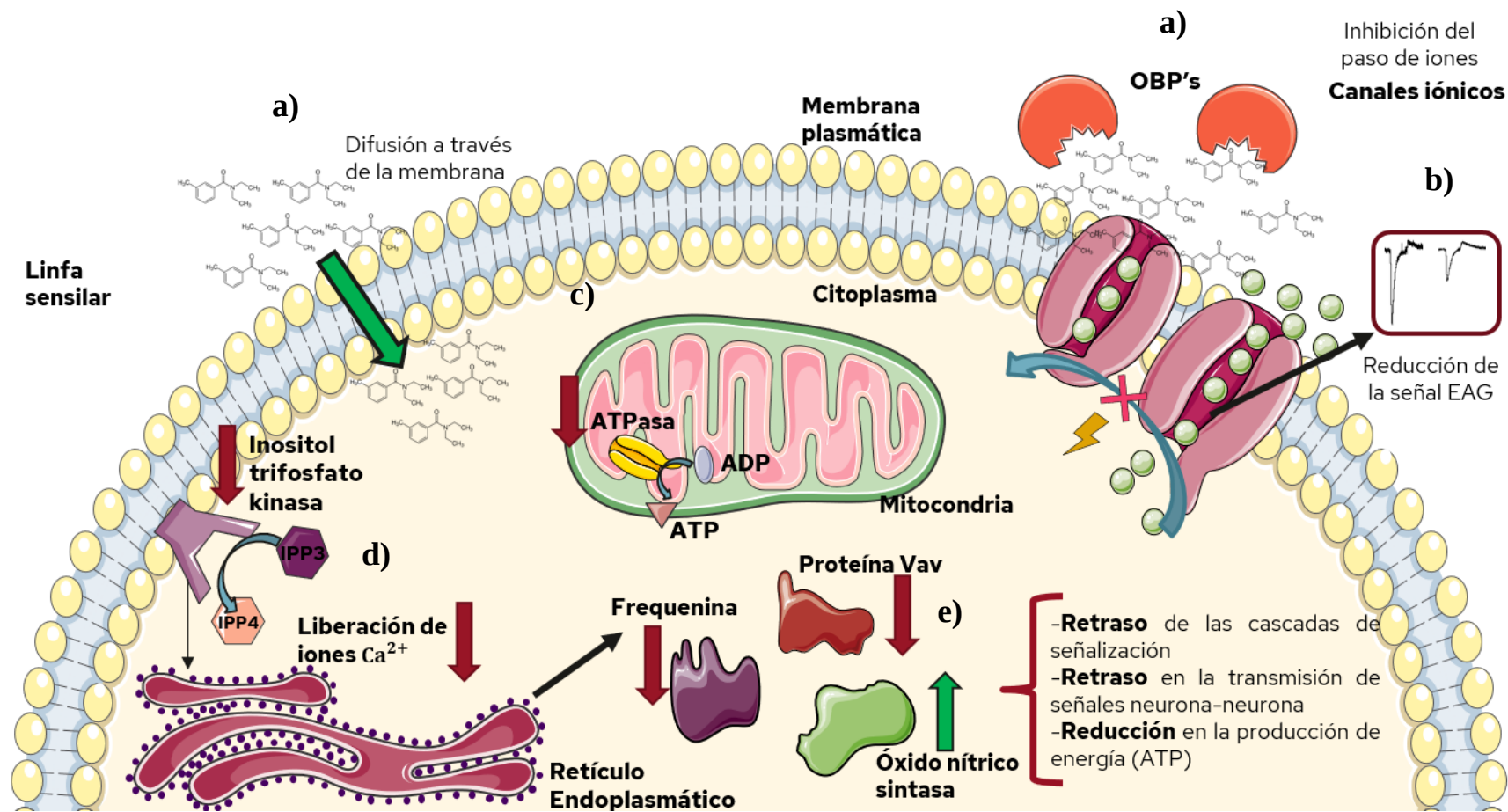
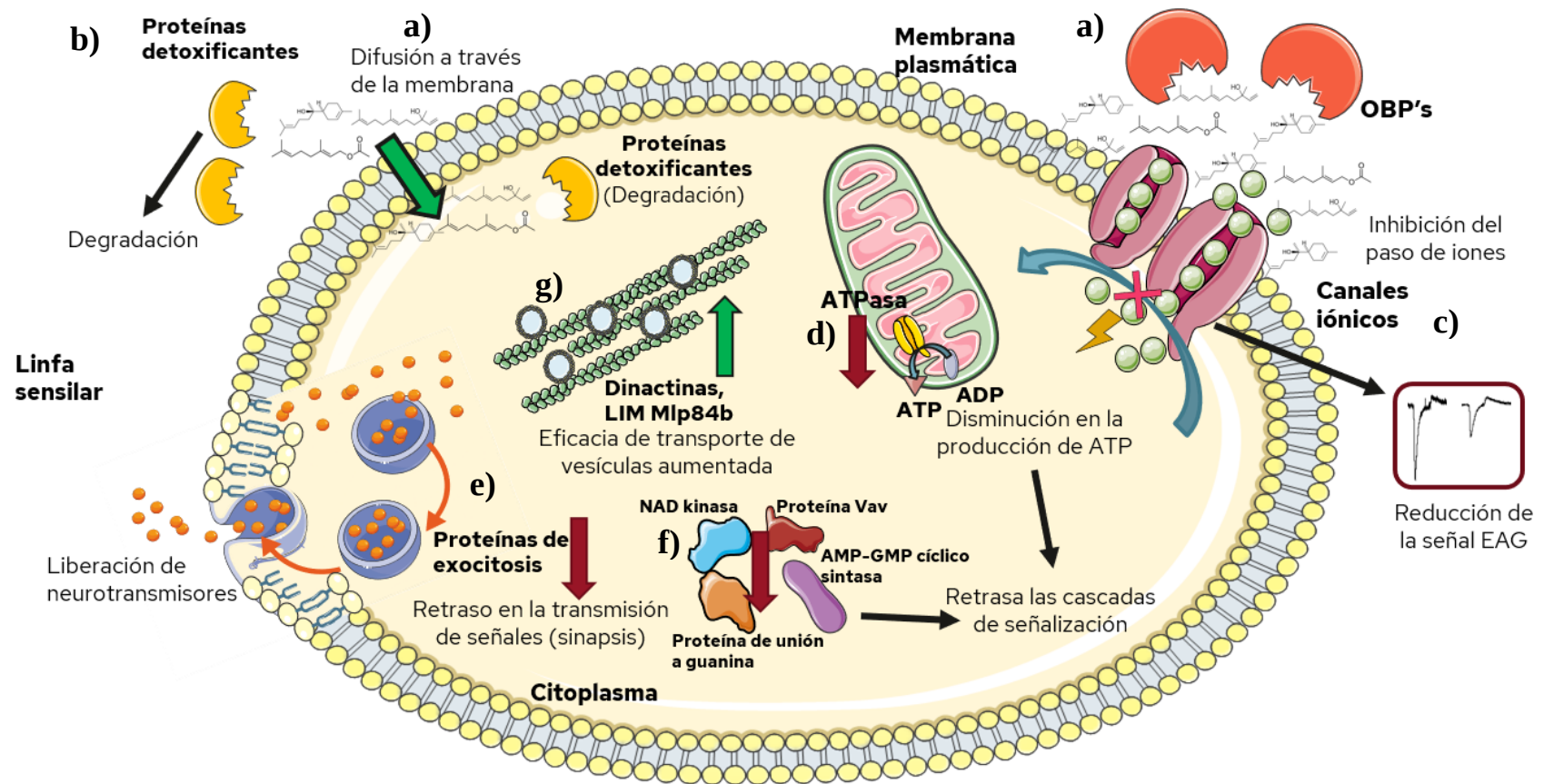


Figura 34.

Posible mecanismo de acción/recepción para el tratamiento con la mezcla 1. a) Los volátiles son transportados a los canales iónicos por las proteínas odorantes (OBP's) o se difunden a través de la membrana plasmática. b) Proteínas detoxificantes degradan los compuestos terpénicos. c) La interacción DEET-canal iónico disminuye su actividad, lo que reduce la señal eléctrica. d) El DEET inhibe la expresión de la ATPasa, importante en la producción de ATP en la mitocondria. e) Las proteínas relacionadas a procesos de exocitosis se inhiben, lo que retrasa el proceso de sinapsis. f) Otras proteínas inhibidas retrasan procesos de señalización en la célula. g) La sobre-expresión de dinactinas incrementa la eficacia en el transporte de vesículas importante para la transmisión de señales a través de neurotransmisores.



6. Conclusiones

Con el análisis del diagrama de interacciones proteína-proteína se demostró que los repelentes DEET y las sustancias de origen natural, tienen mecanismos de recepción diferentes. En el caso del DEET, se alteraron los procesos sinápticos, algunos relacionados a producción de energía en la neurona y síntesis de neurotransmisores como el óxido nítrico. Por otro lado, el mecanismo encontrado para la mezcla 1 se relaciona a la alteración de procesos de transporte de vesículas, señalización durante la sinapsis y producción de energía.

Las sustancias de origen natural, acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol y el repelente sintético DEET disminuyen la señal obtenida por electroantenografía correspondiente al amoníaco, una sustancia atrayente. Además, al implementar el repelente y amoníaco de forma simultánea, también se obtiene un patrón de disminución en la señal obtenida por el amoníaco. Los resultados correspondientes a electroantenografía muestran que los canales iónicos de *Aedes aegypti* se activan a través de vías ionotrópicas y metabotrópicas.

El patrón de disminución de señales eléctricas obtenidas por electroantenografía funciona como un proceso de *screening* para compuestos con actividad biológica repelente. Este patrón de la señal de amoníaco cambia al exponer al mosquito *Aedes aegypti* a los repelentes acetato de geranilo, nerolidol, α -bisabolol y DEET y este efecto está directamente relacionado con la actividad de canales iónicos del sistema olfativo. No obstante, se resalta que pruebas *in vivo* de repelencia siempre serán necesarias para corroborar la efectividad y perdurabilidad del repelente.

A través de electroantenografía se observó que las mezclas de metabolitos secundarios disminuyeron entre un 20-60% la proporción de la señal de amoníaco obtenida inicialmente. De estas, la mezcla 1, compuesta por acetato de geranilo, α -bisabolol y nerolidol, destaca sobre las demás debido a que presenta actividad repelente *in vivo* reportada previamente por el laboratorio.

La metodología implementada por la técnica de electroantenografía ratifica la necesidad experimental de emplear el mosquito vivo para este tipo de mediciones y no únicamente con la cabeza o antenas, como se reporta en la literatura. Lo anterior, disminuye el sesgo obtenido de las señales eléctricas y como se observó, representa una metodología reproducible para todas las sustancias.

La presencia de proteínas detoxificantes sobre expresadas en la mezcla 1, sugiere que las sustancias de origen natural sean menos efectivas como repelentes a largo plazo ya que son fácilmente degradadas por este tipo de enzimas.

Los resultados de ambas metodologías utilizadas, electroantenografía y proteómica, muestran que los canales iónicos son alterados por la interacción con compuestos repelentes. Además, la presencia de estas moléculas en el sistema olfativo del mosquito lleva a la reducción en la expresión de proteínas importantes para el proceso de sinapsis, síntesis de energía en forma de ATP y alteración de procesos de transporte intracelular a través de vesículas. En cuanto a la efectividad repelente a nivel molecular, los repelentes de origen natural sobre expresan proteínas que ayudan a la degradación facilitada en la célula y podrían permanecer por menos tiempo en la

célula. Por otro lado, el DEET no sobre expresa este tipo de proteínas y podría tener mayor afinidad con los canales iónicos, ya que experimentalmente se han obtenido hasta 8 horas de protección *in vivo*.

7. Recomendaciones

Para futuras investigaciones se recomienda emplear otros métodos de separación e identificación de proteínas para obtener un score mayor a través de espectrometría de masas e identificar proteínas que estén presentes en una concentración mucho menor. Esto se debe a que, durante la selección de spots de proteínas diferenciales, los spots con baja intensidad no logran ser identificados ya que la cantidad de proteína es muy baja, tal como se reportó para algunos casos ambos tratamientos.

Algunas técnicas como qPCR empleando *primers* de proteínas son necesarias para corroborar la identidad de las proteínas. Aunque algunas proteínas obtuvieron un *score* relativamente alto, este proceso confirma la identidad de la proteína obtenida por espectrometría de masas MALDI TOF MS.

En ambos tratamientos se inhibieron proteínas relacionadas a las subunidades de la ATP sintasa, una proteína necesaria para la producción de ATP en la célula. Se sugiere realizar ensayos

de actividad enzimática de ATPasa para confirmar cambios en la actividad de esta enzima en presencia de los repelentes acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol y DEET,

Los resultados aquí presentes confirman que existe una modificación de los procesos a nivel proteico cuando el mosquito se expone a sustancias repelentes. Estas moléculas pueden mejorar su actividad repelente realizando mezclas de estos compuestos en formulados que contengan liposomas, soluciones micelares, nano-emulsiones, entre otros. De este modo, lograr una efectividad repelente mayor para compuestos de origen natural, cuya perdurabilidad es menor al DEET.

En cuanto al diseño de futuros repelentes, se recomienda realizar diversas formulaciones y mezclas con los compuestos acetato de geranilo, α -bisabolol, nerolidol y DEET. Emplear las sustancias de origen natural y de origen sintético en formulados de concentraciones bajas podría mejorar la perdurabilidad de estas sustancias; así como su efectividad. Un estudio sobre mezclas de compuestos de origen natural y sintéticos en formulaciones podría incrementar la perdurabilidad de repelentes en la piel más de lo reportado actualmente en la literatura.

Referencias bibliográficas

- Achee, N. L., Grieco, J. P., Vatandoost, H., Seixas, G., Pinto, J., Ching-NG, L., Martins A. J., Juntarajumnog W., Corbel V., Gouagna C., David J., Logan J. G., Orsborne J., Marois E., Devine G. J. & Vontas, J. (2019). Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(1), 1-22.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006822>
- Afify, A., Betz, J. F., Riabinina, O., Lahondère, C., & Potter, C. J. (2019). Commonly Used Insect Repellents Hide Human Odors from *Anopheles* Mosquitoes. *Current Biology*, 29(21), 3669-3680. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.007>.
- Andrade-Ochoa, S., Correa-Basurto, J., Rodríguez-Valdez, L. M., Sánchez-Torres, L. E., Noguera-Torres, B., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2018). *In vitro* and *in silico* studies of terpenes, terpenoids and related compounds with larvicidal and pupaecidal activity against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1–21.
<https://doi.org/10.1186/s13065-018-0425-2>
- Andrade, J. M., Pobre, V., Silva, I. J., Domingues, S., & Arraiano, C. M. (2009). Chapter 5: The Role of 3'-5' Exoribonucleases in RNA Degradation. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 85(C), 187–229. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)00805-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)00805-2)
- Asbahani, A. E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A.

- E., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R. & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1–2), 220–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Balaji, A. P. B., Ashu, A., Manigandan, S., Sastry, T. P., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2017). Polymeric nanoencapsulation of insect repellent: Evaluation of its bioefficacy on *Culex quinquefasciatus* mosquito population and effective impregnation onto cotton fabrics for insect repellent clothing Polymeric nanoencapsulation of insect repellent. *Journal of King Saud University - Science*, 29(4), 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.12.005>
- Baldelli, S., Ciccarone, F., Limongi, D., Checconi, P., Palamara, A. T., & Ciriolo, M. R. (2019). Glutathione and nitric oxide: Key team players in use and disuse of skeletal muscle. *Nutrients*, 11(10), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu11102318>
- Bar, A., & Andrew, J. (2013). Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Larvae. *Annual Review & Research in Biology*, 3(1), 1–21.
- Benelli, G., & Pavela, R. (2018). Beyond mosquitoes: Essential oil toxicity and repellency against bloodsucking insects. *Industrial Crops and Products*, 117(November 2017), 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.072>
- Benton, R. (2006). On the Origin of smell: Odorant receptors in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(14), 1579–1585. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6130-7>
- Bernstein, B. W., & Bamberg, J. R. (2003). Actin-ATP hydrolysis is a major energy drain for neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(1), 1–6. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-01-00002.2003>

- Bhattacharjya, S., Roy, K. S., Ganguly, A., Sarkar, S., Panda, C. K., Bhattacharyya, D., Bhattacharyya, N.P. & Roychoudhury, S. (2015). Inhibition of nucleoporin member Nup214 expression by miR-133b perturbs mitotic timing and leads to cell death. *Molecular Cancer*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0299-z>
- Bohbot, J. D., Fu, L., Le, T. C., Chauhan, K. R., Cantrell, C. L., & Dickens, J. C. (2011). Multiple activities of insect repellents on odorant receptors in mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology*, 25(4), 436–444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.00949.x>
- Bohbot, Jonathan D., & Dickens, J. C. (2010). Insect repellents: Modulators of mosquito odorant receptor activity. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012138>
- Bohbot, Jonathan D., & Dickens, J. C. (2012). Odorant receptor modulation: Ternary paradigm for mode of action of insect repellents. *Neuropharmacology*, 62(5–6), 2086–2095. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.01.004>
- Bohbot, Jonathan D., & Pitts, R. J. (2015). The narrowing olfactory landscape of insect odorant receptors. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00039>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bustelo, X. R. (2001). Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene*, 20(44.ISS.5), 6372–6381. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204780>
- Carey, A. F., Wang, G., Su, C. Y., Zwiebel, L. J., & Carlson, J. R. (2010). Odorant reception in

the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Nature*, 464(7285), 66–71.

<https://doi.org/10.1038/nature08834>

Carraher, C., Dalziel, J., Jordan, M. D., Christie, D. L., Newcomb, R. D., & Kralicek, A. V. (2015). Towards an understanding of the structural basis for insect olfaction by odorant receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 66(2015), 31–41.

<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.09.010>

Castillo, R. M., Stashenko, E., & Duque, J. E. (2017). Insecticidal and Repellent Activity of Several Plant-Derived Essential Oils Against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 33(1), 25–35. <https://doi.org/10.2987/16-6585.1>

Centers for Disease Control and Prevention. (2012a). Surveillance and control of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the United States. 1, 1-24. Retrieved from <https://www.cdc.gov/dengue>

Centers for Disease Control and Prevention. (2012b). Mosquito Life Cycle *Aedes aegypti*. *National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Disease*, 1, 1–2. Retrieved from <https://www.cdc.gov/chikungunya>

Chen, R., Binder, B. M., Garrett, W. M., Tucker, M. L., Chang, C., & Cooper, B. (2011). Proteomic responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings treated with ethylene. *Molecular BioSystems*, 7(9), 2637–2650. <https://doi.org/10.1039/c1mb05159h>

Choo, Y. M., Xu, P., Hwang, J. K., Zeng, F., Tan, K., Bhagavathy, G., Chauhan, K.R. & Leal, W. S. (2018). Reverse chemical ecology approach for the identification of an oviposition attractant for *Culex quinquefasciatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(4), 714–719. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718284115>

- Colón-González, F. J., Peres, C. A., Steiner São Bernardo, C., Hunter, P. R., & Lake, I. R. (2017). After the epidemic: Zika virus projections for Latin America and the Caribbean. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(11), 1–19.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006007>
- ElSevier (2013). Book Chapter: *Herbal approaches to system dysfunctions. Principles and Practice of Phytotherapy*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-06992-5.00009-8>
- Costa, A. A., Naspi, C. V., Lucia, A., Masuh, H. M., & Barrera, R. (2017). Repellent and Larvicidal Activity of the Essential Oil From *Eucalyptus nitens* Against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 54(3), 670–676.
<https://doi.org/10.1093/jme/tjw222>
- Dason, J. S., Romero-Pozuelo, J., Atwood, H. L., & Ferrús, A. (2012). Multiple roles for frequenin/NCS-1 in synaptic function and development. *Molecular Neurobiology*, 45(2), 388–402. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8250-4>
- Davis, E. E., & Bowen, M. F. (1994). Sensory physiological basis for attraction in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10(2), 316–325.
- De Bruyne, M., & Baker, T. C. (2008). Odor detection in insects: Volatile codes. *Journal of Chemical Ecology*, 34(7), 882–897. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9485-4>
- Degennaro, M., McBride, C. S., Seeholzer, L., Nakagawa, T., Dennis, E. J., Goldman, C., Jasinskiene, N., James A.A. & Vosshall, L. B. (2013). Orco mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. *Nature*, 498(7455), 487–491.
<https://doi.org/10.1038/nature12206>

- Dekker, T., Ignell, R., Ghebru, M., Glinwood, R., & Hopkins, R. (2011). Identification of mosquito repellent odours from *Ocimum forskolei*. *Parasites and Vectors*, 4(1), 11–15.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-183>
- Del Marmol, J., Yedlin, M., & Ruta, V. (2021). The structural basis of odorant recognition in insect olfactory receptors. *BioRxiv*, 2021.01.24.427933. Retrieved from
<https://doi.org/10.1101/2021.01.24.427933>
- Deletre, E., Chandre, F., Williams, L., Duménil, C., Menut, C., & Martin, T. (2015). Electrophysiological and behavioral characterization of bioactive compounds of the *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon winterianus*, *Cuminum cyminum* and *Cinnamomum zeylanicum* essential oils against *Anopheles gambiae* and prospects for their use as bednet treatments. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0934-y>
- Dhawan, R., Kumar, M., Mohanty, A. K., Dey, G., Advani, J., Prasad, T. S. K., & Kumar, A. (2017). Mosquito-borne diseases and omics: Salivary gland proteome of the female *Aedes aegypti* mosquito. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 21(1), 45–54.
<https://doi.org/10.1089/omi.2016.0160>
- Diaz, J. H. (2016). Chemical and plant-based insect repellents: Efficacy, safety, and toxicity. *Wilderness and Environmental Medicine*, 27(1), 153–163.
<https://doi.org/10.1016/j.wem.2015.11.007>
- Dickens, J. C., & Bohbot, J. D. (2013). Mini review: Mode of action of mosquito repellents. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106(3), 149–155.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.02.006>
- Edwards, M. J., Severson, D. W., & Hagedorn, H. H. (1998). Vitelline envelope genes of the

yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, 28, 915–925.

Eilerts, D. F., Vandergiesen, M., Bose, E. A., Broxton, K., & Vinauger, C. (2018). Odor-specific daily rhythms in the olfactory sensitivity and behavior of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insects*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/insects9040147>

Esplugues, J. V. (2002). NO as a signalling molecule in the nervous system. *British Journal of Pharmacology*, 135(5), 1079–1095. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704569>

Farnesi, L. C., Menna-Barreto, R. F. S., Martins, A. J., Valle, D., & Rezende, G. L. (2015). Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *Journal of Insect Physiology*, 83, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.10.006>

Faulde, M. K., Uedelhoven, W. M., & Robbins, R. G. (2003). Contact toxicity and residual activity of different permethrin-based fabric impregnation methods for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), and *Lepisma saccharina* (Thysanura: Lepismatidae). *Journal of Medical Entomology*, 40(6), 935–941. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.6.935>

Fernandes, K. M., de Magalhães-Júnior, M. J., Baracat-Pereira, M. C., & Martins, G. F. (2016). Proteomic analysis of *Aedes aegypti* midgut during post-embryonic development and of the female mosquitoes fed different diets. *Parasitology International*, 65(6), 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.08.008>

Guha, L., Seenivasagan, T., Iqbal, S. T., Agrawal, O. P., & Parashar, B. D. (2014). Behavioral and electrophysiological responses of *Aedes albopictus* to certain acids and alcohols present

in human skin emanations. *Parasitology Research*, 113(10), 3781–3787.

<https://doi.org/10.1007/s00436-014-4044-0>

Gerber F.J., Barnard D.R., Ward R.A. (1994). Manual for mosquito rearing and experimental techniques. *Am Mosq Control Assoc*, 5, 1-98.

Guo, H., & Smith, D. P. (2017). Odorant receptor desensitization in insects. *Journal of Experimental Neuroscience*, 11, 1–5. <https://doi.org/10.1177/1179069517748600>

Hellestad, V. J., Witthuhn, B. A., & Fallon, A. M. (2011). The insect repellent DEET (*N,N*-diethyl-3-methylbenzamide) increases the synthesis of glutathione S-transferase in cultured mosquito cells. *Cell Biology and Toxicology*, 27(2), 149–157.
<https://doi.org/10.1007/s10565-010-9177-z>

Hsu, W. S., Yen, J. H., & Wang, Y. S. (2013). Formulas of components of citronella oil against mosquitoes (*Aedes aegypti*). *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 48(11), 1014–1019.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2013.816613>

Hughes, D. T., Pelletier, J., Luetje, C. W., & Leal, W. S. (2010). Odorant receptor from the Southern House mosquito narrowly tuned to the oviposition attractant skatole. *Journal of Chemical Ecology*, 36(8), 797–800. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9828-9>

Islam, J., Zaman, K., Tyagi, V., Duarah, S., Dhiman, S., & Chattopadhyay, P. (2017). Protection against mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* using a novel insect repellent, ethyl anthranilate. *Acta Tropica*, 174(February), 56–63.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.024>

- Jacob, V. E. J. M. (2018). Current Source Density Analysis of Electroantennogram Recordings: A Tool for Mapping the Olfactory Response in an Insect Antenna. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(September), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00287>
- Jason Pitts, R., Derryberry, S. L., Zhang, Z., & Zwiebel, L. J. (2017). Variant Ionotropic Receptors in the Malaria Vector Mosquito *Anopheles gambiae* Tuned to Amines and Carboxylic Acids. *Scientific Reports*, 7(January), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep40297>
- Jones, S., Bryant, J., & Harrison, S. (2013). Behavioral Responses of the Bed Bug to Permethrin-Impregnated ActiveGuard™ Fabric. *Insects*, 4(2), 230–240. <https://doi.org/10.3390/insects4020230>
- Jordan, R. A., Schulze, T. L., & Dolan, M. C. (2012). Efficacy of Plant-Derived and Synthetic Compounds on Clothing as Repellents Against *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 49(1), 101–106. <https://doi.org/10.1603/ME10241>
- Kaupp, U. B. (2010). Olfactory signalling in vertebrates and insects: Differences and commonalities. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(3), 188–200. <https://doi.org/10.1038/nrn2789>
- Kobe, B., & Kajava, A. V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6), 725–732. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(01\)00266-4](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(01)00266-4)
- Koenig, T., Menze, B. H., Kirchner, M., Monigatti, F., Parker, K. C., Patterson, T., ... Steen, H. (2008). Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics. *Journal of Proteome Research*, 7(9), 3708–3717.

<https://doi.org/10.1021/pr700859x>

- Laurén, J., Airaksinen, M. S., Saarma, M., & Timmusk, T. (2003). A novel gene family encoding leucine-rich repeat transmembrane proteins differentially expressed in the nervous system. *Genomics*, 81(4), 411–421. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(03\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(03)00030-2)
- Leal, G. M., & Leal, W. S. (2015). Binding of a fluorescence reporter and a ligand to an odorant-binding protein of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *F1000Research*, (0), 1–14. <https://doi.org/10.12688/f1000research.5879.2>
- Leal, W. S. (2013). Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 373–391. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153635>
- Leite, N. R., Krogh, R., Xu, W., Ishida, Y., Iulek, J., Leal, W. S., & Oliva, G. (2009). Structure of an Odorant-Binding Protein from the Mosquito *Aedes aegypti* Suggests a Binding Pocket Covered by a pH-Sensitive “Lid.” *PLoS ONE*, 4(11), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008006>
- Li, S., Picimbon, J. F., Ji, S., Kan, Y., Chuanling, Q., Zhou, J. J., & Pelosi, P. (2008). Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(3), 464–468. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.064>
- Liu, H., Liu, T., Xie, L., Wang, X., Deng, Y., Chen, C. H., James, A.A. & Chen, X. G. (2016). Functional analysis of Orco and odorant receptors in odor recognition in *Aedes albopictus*. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1644-9>

- Liu, N. Y., Li, Z. B., Zhao, N., Song, Q. S., Zhu, J. Y., & Yang, B. (2018). Identification and characterization of chemosensory gene families in the bark beetle, *Tomicus yunnanensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 25(August 2017), 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2017.11.003>
- Logan, I. S. (2016). ZIKA-How fast does this virus mutate?, 37(February), 110–115. <https://doi.org/10.13918/j.issn.2095-8137.2016.2.110>
- Lombardo, F., Salvemini, M., Fiorillo, C., Nolan, T., Zwiebel, L. J., Ribeiro, J. M., & Arcà, B. (2017). Deciphering the olfactory repertoire of the tiger mosquito *Aedes albopictus*. *BMC Genomics*, 18(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4144-1>
- Luo, X., Wang, Y. J., & Zheng, Y. G. (2015). Cloning and characterization of a NADH-dependent aldo-keto reductase from a newly isolated *Kluyveromyces lactis* XP1461. *Enzyme and Microbial Technology*, 77, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.004>
- Maia, M. F., & Moore, S. J. (2011). Plant-based insect repellents: A review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, 10(SUPPL. 1), S11. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S1-S11>
- Maringer, K., Yousuf, A., Heesom, K. J., Fan, J., Lee, D., Fernandez-sesma, A., Bessant, C., Matthews, D.A. & Davidson, A. D. (2017). Proteomics informed by transcriptomics for characterising active transposable elements and genome annotation in *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3432-5>
- Marinotti, O., Ngo, T., Kojin, B. B., Chou, S., Nguyen, B., Juhn, J., Lejarazú-Carballar, 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, 1–11.

Mastrobuoni, G., Qiao, H., Iovinella, I., Sagona, S., Niccolini, A., Boscaro, F., Caputo, B., Orejuela, M. R., Torre, D. A., Kempa, S., Felicioli, A., Pelosi, P., Moneti, G. & Dani, F. R. (2013). A proteomic investigation of soluble olfactory proteins in *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075162>

Matthews, B. J., McBride, C. S., DeGennaro, M., Despo, O., & Vosshall, L. B. (2016). The neurotranscriptome of the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC Genomics*, 17(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2239-0>

May-concha, I. J., Guerenstein, P. G., Malo, E. A., Catalá, S., & Rojas, J. C. (2018). Electroantennogram responses of the *Triatoma dimidiata* complex to volatiles produced by its exocrine glands. *Acta Tropica*, 185(April), 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.06.018>

McMeniman, C. J. (2015). *Disruption of Mosquito Olfaction. Genetic Control of Malaria and Dengue*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800246-9.00011-9>

Messina, J. P., Kraemer, M. U. G., Brady, O. J., Pigott, D. M., Shearer, F. M., Weiss, D. J., Golding, N., Ruktanonchai, C. W., Gething, P.W., Cohn, E., Brownstein, J.S., Khan, K., Tatem, A.J., Jaenish, T., Murray, C.J.L., Marinho, F., Scott, T.W. & Hay, S. I. (2016). Mapping global environmental suitability for Zika virus. *ELife*, 5(APRIL2016), 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.15272>

Misni, N., Nor, Z. M., & Ahmad, R. (2016). New Candidates for Plant-Based Repellents Against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 32(2), 117–123. <https://doi.org/10.2987/moco-32-02-117-123.1>

- Misra, J. R., Horner, M. A., Lam, G., & Thummel, C. S. (2011). Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. *Genes and Development*, 25(17), 1796–1806.
<https://doi.org/10.1101/gad.17280911>
- Morón Rodríguez, F., Furones Mourelle, J. A., & Pineda Gutiérrez, Z. (1996). *Cymbopogon citratus*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* (Vol. 1). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6/00018-2>
- Murray, N. E. A., Quam, M. B., & Wilder-Smith, A. (2013). Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. *Clinical Epidemiology*, 5(1), 299–309.
<https://doi.org/10.2147/CLEP.S34440>
- Mustafi, S. B., Chakraborty, P. K., Dey, R. S., & Raha, S. (2009). Heat stress upregulates chaperone heat shock protein 70 and antioxidant manganese superoxide dismutase through reactive oxygen species (ROS), p38MAPK, and Akt. *Cell Stress and Chaperones*, 14(6), 579–589. <https://doi.org/10.1007/s12192-009-0109-x>
- Myrick, A. J., & Baker, T. C. (2018). Increasing Signal-to-Noise Ratio in Gas Chromatography - Electroantennography Using a Deans Switch Effluent Chopper, (1969).
- Nakagawa, T., & Vosshall, L. B. (2009). Controversy and consensus: noncanonical signaling mechanisms in the insect olfactory system. *Current Opinion in Neurobiology*, 19(3), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.07.015>
- Nogueira Barradas, T., Perdiz Senna, J., Ricci Júnior, E., & Regina Elias Mansur, C. (2016). Polymer-based Drug Delivery Systems Applied to Insects Repellents Devices: A Review. *Current Drug Delivery*, 13(2), 221–235.
<https://doi.org/10.2174/1567201813666151207110515>

- Northey, T., Venthur, H., De Biasio, F., Chauviac, F. X., Cole, A., Ribeiro, K. A. L., Grossi, G., Falabella, P., Field, L.M., Keep, N.H. & Zhou, J. J. (2016). Crystal structures and binding dynamics of odorant-binding protein 3 from two aphid species *Megoura viciae* and *Nasonovia ribisnigri*. *Scientific Reports*, 6(December 2015), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/srep24739>
- Olsson, S. B., & Hansson, B. S. (2013). Pheromone Signaling. *Methods Mol Biol*, 1068(September). <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-619-1>
- Omondi, B. A., Latorre-Estivalis, J. M., Rocha Oliveira, I. H., Ignell, R., & Lorenzo, M. G. (2015). Evaluation of reference genes for insect olfaction studies. *Parasites and Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0862-x>
- Oyedele, A. O., Gbolade, A. A., Sosan, M. B., Adewoyin, F. B., Soyelu, O. L., & Orafidiya, O. O. (2002). Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from lemongrass oil. *Phytomedicine*, 9(3), 259–262. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00120>
- Palanisami, S., Natarajan, E., & Rajamma, R. (2014). Development of eco-friendly herbal mosquito repellent, 1(3), 132–136.
- Pando-robles, R. V., Dra, C., & Lanz-mendoza, H. (2009). La importancia de la proteómica en la salud pública, 51(1), 1-13.
- Pask, G. M., & Ray, A. (2016). Insect Olfactory Receptors: An Interface between Chemistry and Biology. *Chemosensory Transduction: The Detection of Odors, Tastes, and Other Chemostimuli*, 101–122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801694-7.00006-8>
- 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>

Pellegrino, M., Steinbach, N., Stensmyr, M. C., Hansson, B. S., & Vosshall, L. B. (2011). A natural polymorphism alters odour and DEET sensitivity in an insect odorant receptor.

Nature, 478(7370), 511–514. <https://doi.org/10.1038/nature10438>

Pelosi, P., Iovinella, I., Felicioli, A., & Dani, F. R. (2014). Soluble proteins of chemical communication: An overview across arthropods. *Frontiers in Physiology*, 5 AUG(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00320>

Pennetier, C., Chabi, J., Martin, T., Chandre, F., Rogier, C., Hougard, J. M., & Pages, F. (2010). New protective battle-dress impregnated against mosquito vector bites. *Parasites and Vectors*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-81>

Phasomkusolsil, S., & Soonwera, M. (2013). Efficacy of Thai herbal essential oils against three immature stages of *Aedes aegypti* (Linn), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Journal of Herbal Medicine*, 2(2), 25–35.

Picón-Pagès, P., Garcia-Buendia, J., & Muñoz, F. J. (2019). Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1865(8), 1949–1967. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.11.007>

Pongs, O., Lindemeier, J., Zhu, X. R., Theil, T., Engelkamp, D., Krah-Jentgens, I., Lambrecht, H.G., Koch, K.W., Schwemer, J., Rivosecchi, R., Mallart, A., Galceran, J., Canal, I., Barbas, J.A. & Ferrús, A. (1993). Frequentin-A novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the *Drosophila* nervous system. *Neuron*, 11(1), 15–28. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90267-U](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90267-U)

- Portilla-Pulido, J. S., Castillo-Morales, R. M., Barón-Rodríguez, M. A., Duque, J. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2020). Design of a Repellent Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Using *in silico* Simulations with AaegOBP1 Protein. *Journal of Medical Entomology*, 57(2), 463–476. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz171>
- Raji, J. I., Melo, N., Castillo, J. S., Gonzalez, S., Saldana, V., Stensmyr, M. C., & DeGennaro, M. (2019). *Aedes aegypti* Mosquitoes Detect Acidic Volatiles Found in Human Odor Using the IR8a Pathway. *Current Biology*, 29(8), 1253-1262.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.045>
- Ramos, I. B., Machado, E. A., Souza, G. H. M. F., Eberlin, M. N., Kaiser, C. R., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S. & Vasconcellos, H. (2007). A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37(2007), 1249-1261 <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.07.017>
- Rosilawati, R., Nabila, R., Siti Futri Farahinajua, F., Nazni, W. A., & Lee, H. L. (2019). A preliminary proteomic study of permethrin resistant and susceptible *Aedes aegypti* (L.). *Tropical Biomedicine*, 36(4), 855–865.
- Rund, S. S. C., Hou, T. Y., Ward, S. M., Collins, F. H., & Duffield, G. E. (2011). Genome-wide profiling of diel and circadian gene expression in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(32), E421–E430. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100584108>
- Rund, Samuel S.C., Bonar, N. A., Champion, M. M., Ghazi, J. P., Houk, C. M., Leming, M. T., Syed, Z., Duffield, G. E. (2013). Daily rhythms in antennal protein and olfactory sensitivity in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Scientific Reports*, 3, 1–9.

<https://doi.org/10.1038/srep02494>

Rund, S.S., Gentile, J.E. & Duffield, G.E. (2013). Extensive circadian and light regulation of the transcriptome in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*, 14(1).

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-218> LK.

Sanford, J. L., Shields, V. D. C., & Dickens, J. C. (2013). Gustatory receptor neuron responds to DEET and other insect repellents in the yellow-fever mosquito, *Aedes aegypti*.

Naturwissenschaften, 100(3), 269–273. <https://doi.org/10.1007/s00114-013-1021-x>

Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L. B., & Touhara, K. (2008).

Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*, 452(7190), 1002–1006. <https://doi.org/10.1038/nature06850>

Schmidt, H. R., & Benton, R. (2020). Molecular mechanisms of olfactory detection in insects:

Beyond receptors: Insect olfactory detection mechanisms. *Open Biology*, 10(10).

<https://doi.org/10.1098/rsob.200252>

Seenivasagan, T., Sharma, K. R., Sekhar, K., Ganesan, K., Prakash, S., & Vijayaraghavan, R.

(2009). Electroantennogram, flight orientation, and oviposition responses of *Aedes aegypti* to the oviposition pheromone n-heneicosane. *Parasitology Research*, 104(4), 827–833.

<https://doi.org/10.1007/s00436-008-1263-2>

Seenivasagan, Thangaraj, Guha, L., & Iqbal, S. T. (2013). Behavioral and electrophysiological

responses of *Culex quinquefasciatus* to certain fatty acid esters. *Acta Tropica*, 128(3), 606–612. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.09.009>

Seenivasagan, Thangaraj, Sharma, K. R., & Prakash, S. (2012). Electroantennogram, flight

orientation and oviposition responses of *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* to a fatty acid ester-propyl octadecanoate. *Acta Tropica*, 124(1), 54–61.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.06.009>

Sessions, O. M., Wilm, A., Kamaraj, U. S., & Choy, M. M. (2015). Analysis of Dengue Virus Genetic Diversity during Human and Mosquito Infection Reveals Genetic Constraints. *BMC Genomics*, 14(1), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004044>

Silvério, M. R. S., Espindola, L. S., Lopes, N. P., & Vieira, P. C. (2020). Plant Natural Products for the Control of *Aedes aegypti*: The Main Vector of Important Arboviruses. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(15). <https://doi.org/10.3390/molecules25153484>

Smith, L. B., Kasai, S., & Scott, J. G. (2016). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 133(February 2018), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.03.005>

Sparks, J. T., Botsko, G., Swale, D. R., Boland, L. M., Patel, S. S. & Dickens, J. C. (2018). Membrane Proteins Mediating Reception and Transduction in Chemosensory Neurons in Mosquitoes, 9(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01309>

Stanczyk, N. M., Brookfield, J. F. Y., Field, L. M., & Logan, J. G. (2013). *Aedes aegypti* Mosquitoes Exhibit Decreased Repellency by DEET following Previous Exposure. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054438>

Swale, D. R., Sun, B., Tong, F., & Bloomquist, J. R. (2014). Neurotoxicity and mode of action of *N,N*-diethyl-Meta-toluamide (DEET). *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103713>

- Syed, Z., & Leal, W. S. (2008). Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13598–13603. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805312105>
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Minguéz, P., Doerks, T., Stark, M., Müller, J., Bork, P., Jensen, L.J. & Von Mering, C. (2011). The STRING database in 2011: Functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 1), 561–568. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq973>
- Tavares, M., da Silva, M. R. M., de Oliveira de Siqueira, L. B., Rodrigues, R. A. S., Bodjolle-d'Almeira, L., dos Santos, E. P., & Ricci-Júnior, E. (2018). Trends in insect repellent formulations: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 539(1–2), 190–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.046>
- Thirión J. (2003). El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México. *Bayer Environmental Science*, 1, 151.
- Tisserand, R., & Young, R. (2014). *Essential oil profiles. Essential Oil Safety* (2nd ed.). © 2014, Elsevier Ltd. All rights reserved. <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-06241-4.00013-8>
- Venthur, H., & Zhou, J. (2018). Odorant Receptors and Odorant-Binding Proteins as Insect Pest Control Targets : A Comparative Analysis, 9(August), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01163>
- 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>

Wicher, D. (2013). *Olfactory Signaling in Insects. Molecular Basis of Olfaction* (1st Ed.).

Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2014.11.002>

World Health Organisation (2012). Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012–2020. *World Health Organisation*, 43.

<https://doi.org/entity/denguecontrol/9789241504034/en/index.html>

World Health Organization. (2017). Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas by Country. Retrieved from

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>

Xia, H. J., & Guang, Y. (2005). Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinases: Functions and regulations. *Cell Research*, 15(2), 83–91. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290270>

Xu, P., Atkinson, R., Jones, D. N. M., & Smith, D. P. (2005). *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. *Neuron*, 45(2), 193–200.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.031>

Xu, P., Choo, Y.-M., De La Rosa, A., & Leal, W. S. (2014). Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(46), 16592–16597. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417244111>

Yactayo, S., Staples, J. E., Millot, V., Cibrelus, L., & Ramon-Pardo, P. (2016). Epidemiology of chikungunya in the americas. *Journal of Infectious Diseases*, 214(February), S441–S445.

<https://doi.org/10.1093/infdis/jiw390>

Yang, G., Winberg, G., Ren, H., & Zhang, S. (2011). Expression, purification and functional

analysis of an odorant binding protein AaegOBP22 from *Aedes aegypti*. *Protein Expression and Purification*, 75(2), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.09.004>

Yuan, H. Bin, Ding, Y. X., Gu, S. H., Sun, L., Zhu, X. Q., Liu, H. W., Dhillon, K.H., Zhang, Y. & Guo, Y. Y. (2015). Molecular characterization and expression profiling of odorant-binding proteins in *Apolygus lucorum*. *PLoS ONE*, 10(10), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140562>

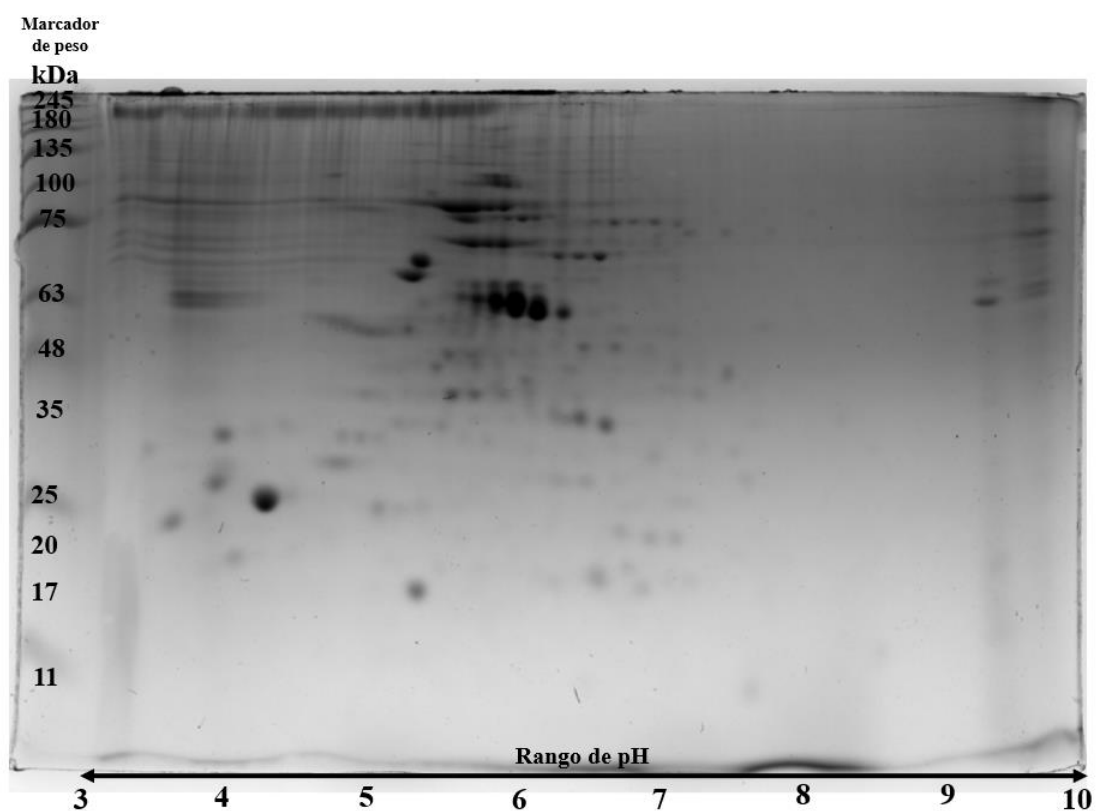
Zhou, J. J., He, X. L., Pickett, J. A., & Field, L. M. (2008). Identification of odorant-binding proteins of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: Genome annotation and comparative analyses. *Insect Molecular Biology*, 17(2), 147–163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00789.x>

Apéndices

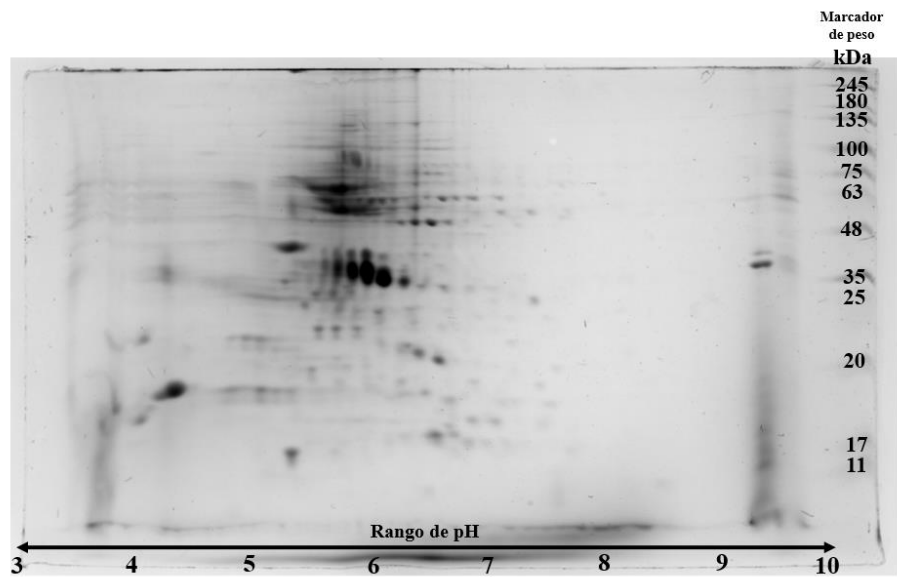
Apéndice A.

Triplicado de geles de electroforesis bidimensional en el pH de 3 a 10 correspondientes al control (mosquitos *Aedes aegypti* no tratados).

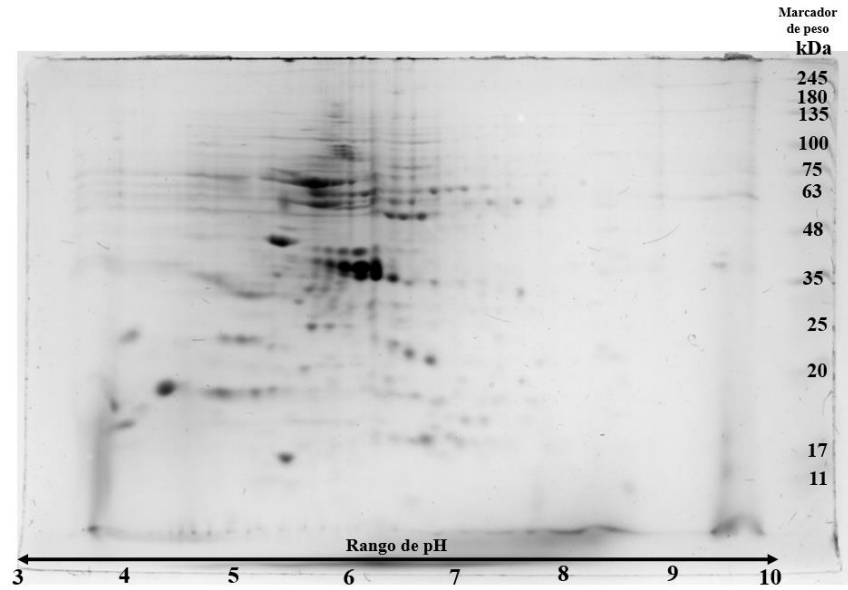
Réplica 1



Réplica 2

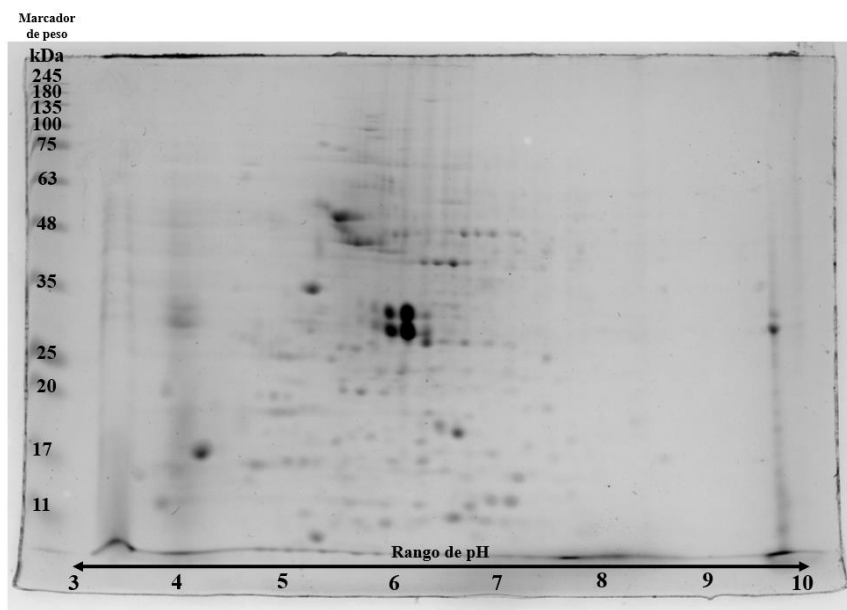


Réplica 3

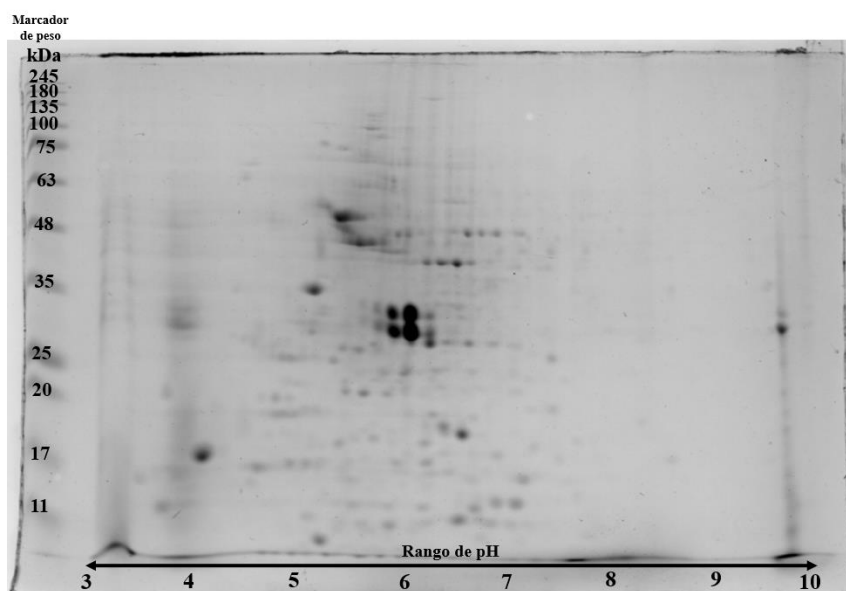


Apéndice B. Triplicado de geles de electroforesis bidimensional en el rango de pH de 3 a 10 correspondientes al tratamiento con la mezcla 1 (acetato de geranilo, α -bisabolol y nerolidol) cada compuesto en concentración de 100 mg/mL.

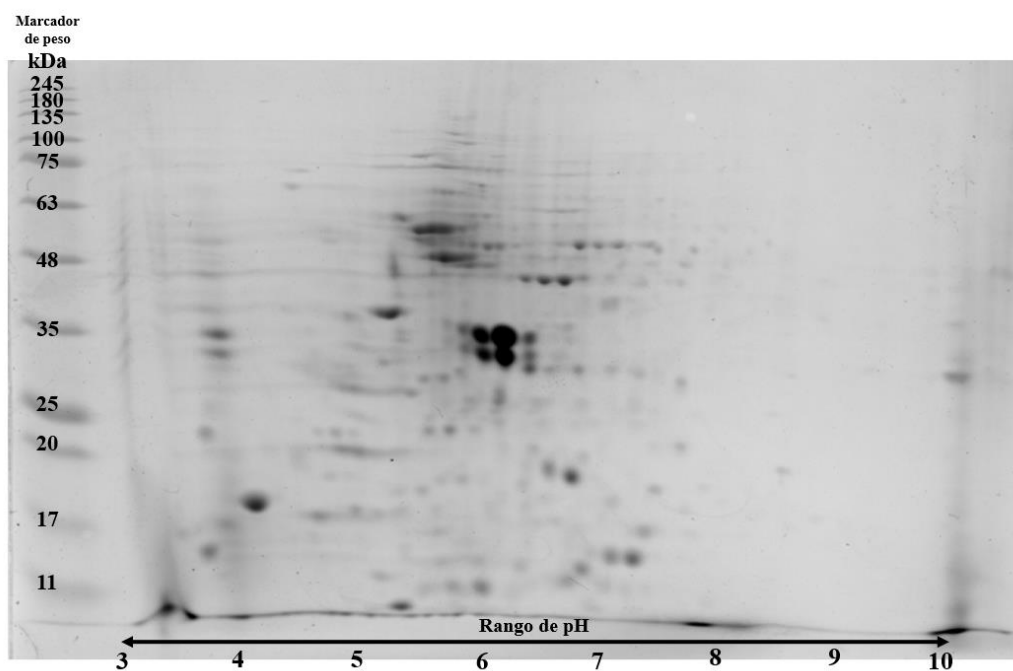
Réplica 1



Réplica 2

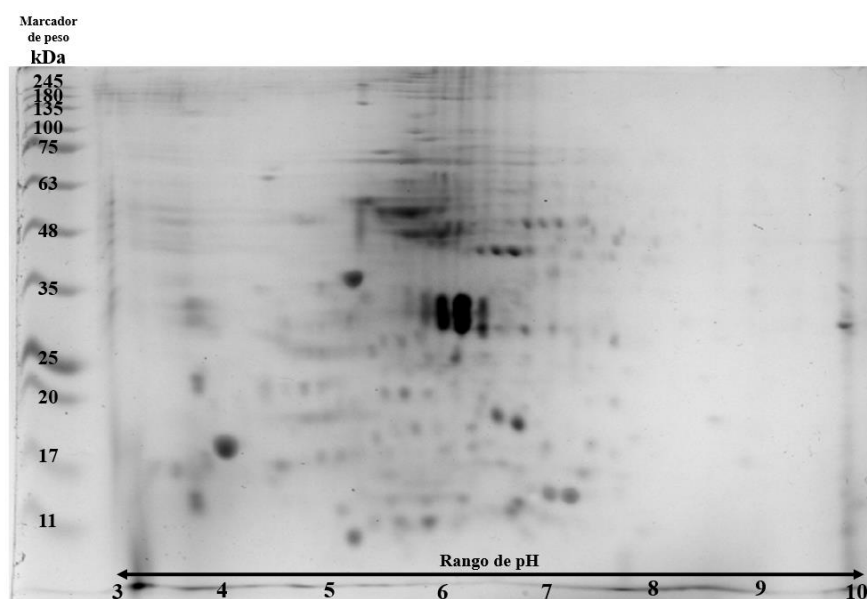


Réplica 3

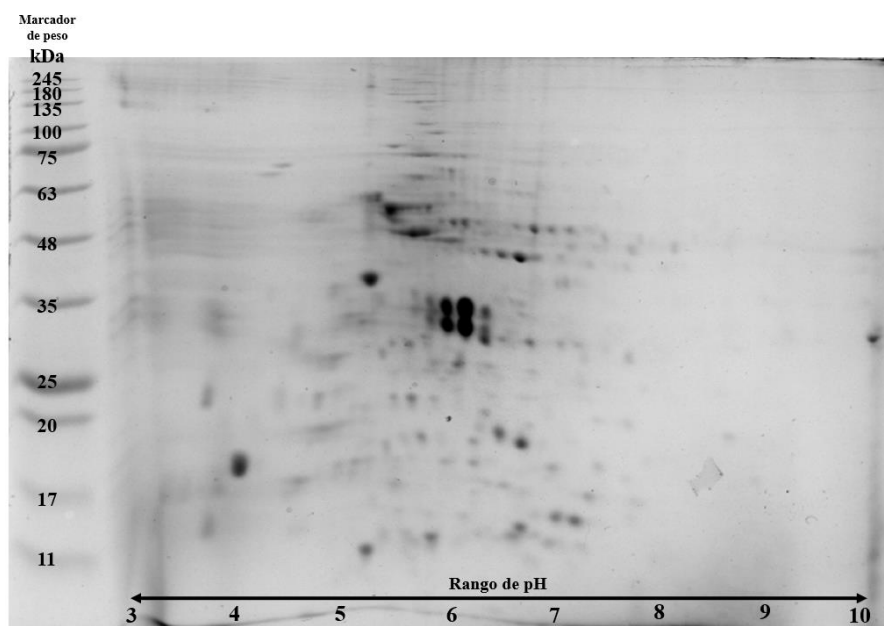


Apéndice C. Triplicado de geles de electroforesis bidimensional en el rango de pH de 3 a 10 correspondientes al tratamiento con el repelente sintético DEET en concentración de 100 mg/mL.

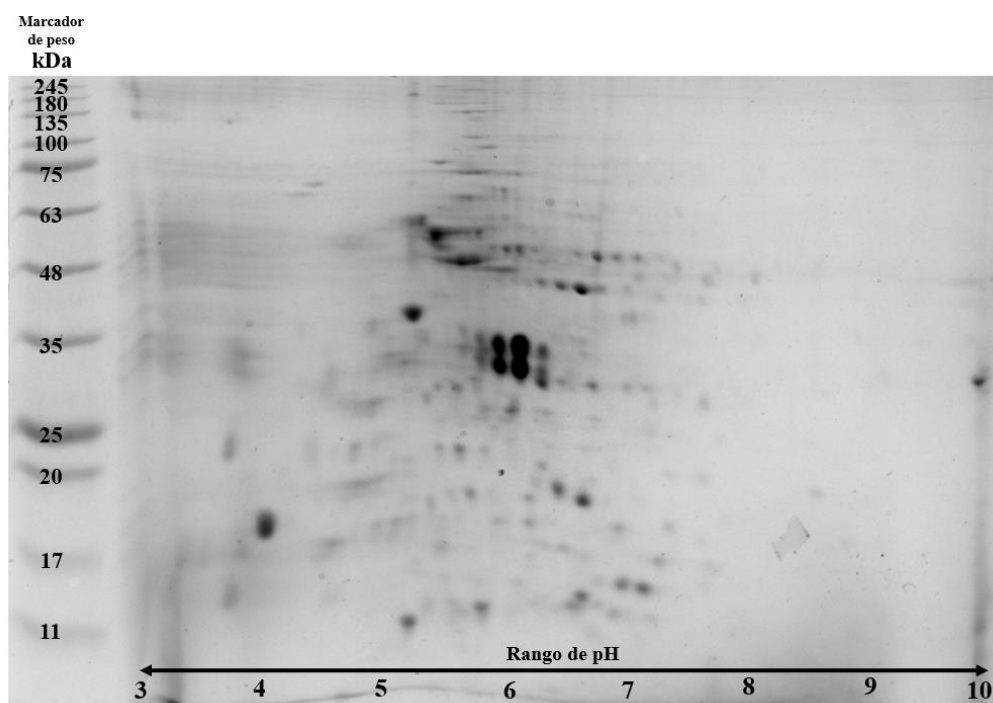
Réplica 1



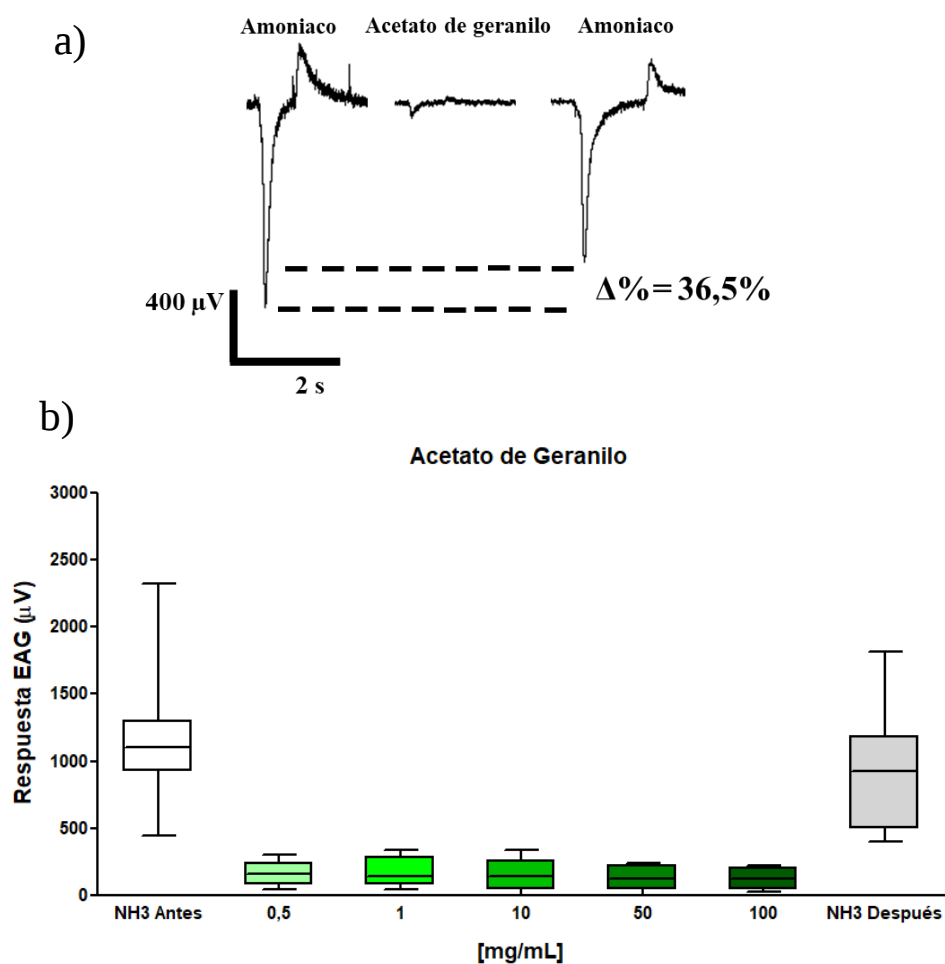
Réplica 2



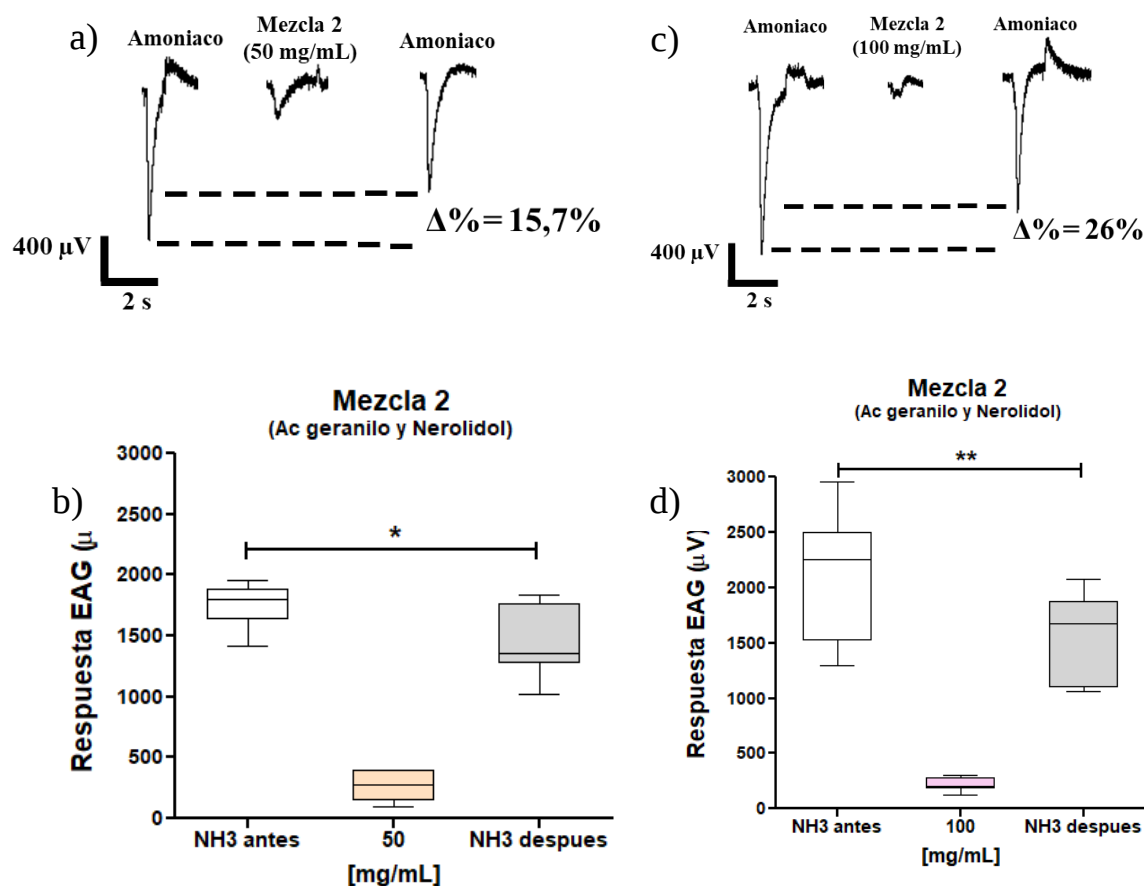
Réplica 3



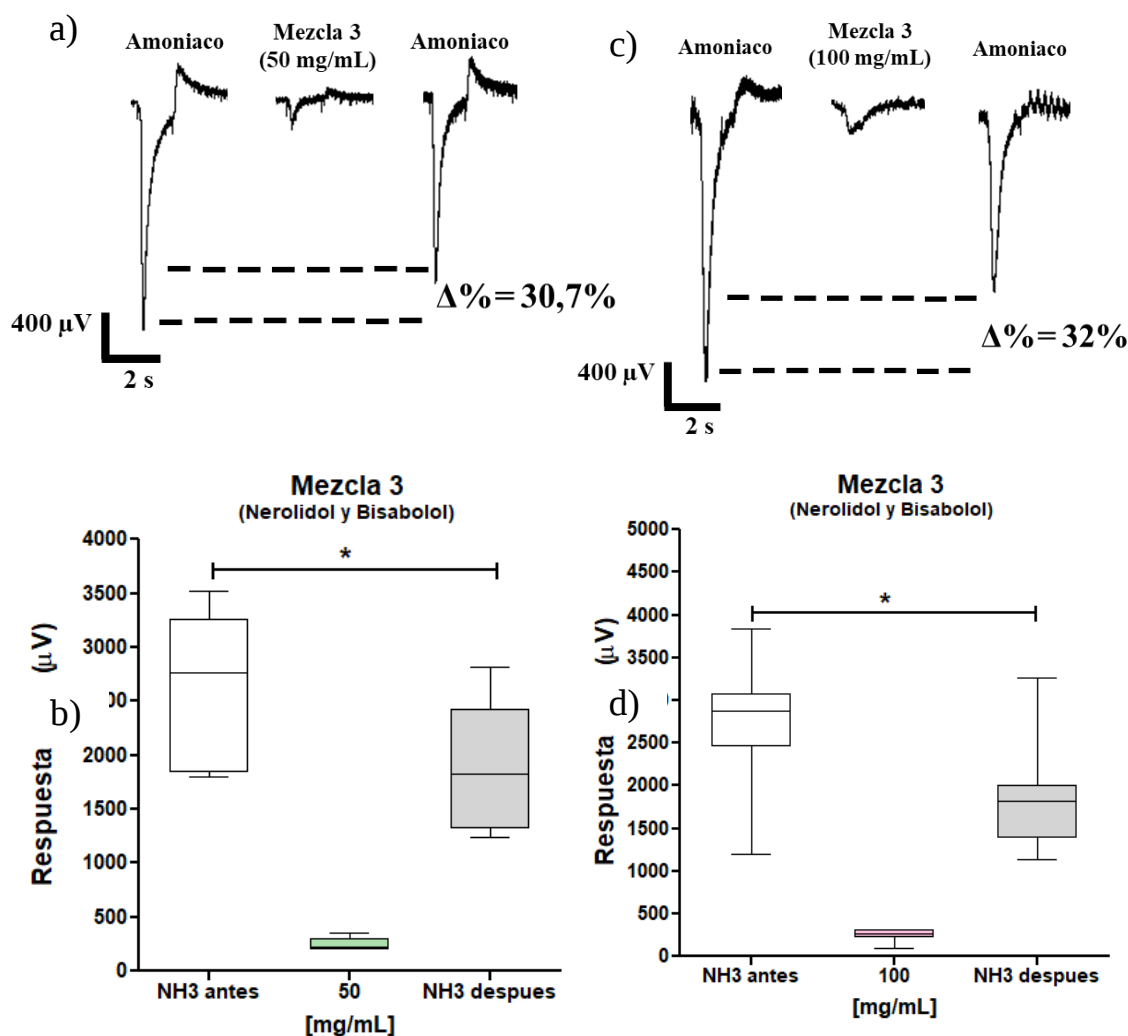
APENDICE D. a) Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en la señal de amoníaco al aplicar el compuesto acetato de geranilo, c) α -bisabolol, e) nerolidol y g) DEET en las concentraciones 0,5, 1, 10, 50 y 100 mg/mL, con un estímulo pre y post tratamiento de amoníaco. b) Registros de señales de electroantenografía para el repelente acetato de geranilo. Este compuesto no presentó diferencias estadísticas significativas entre las señales EAG de amoníaco antes y después de aplicar las sustancias repelentes mencionadas.



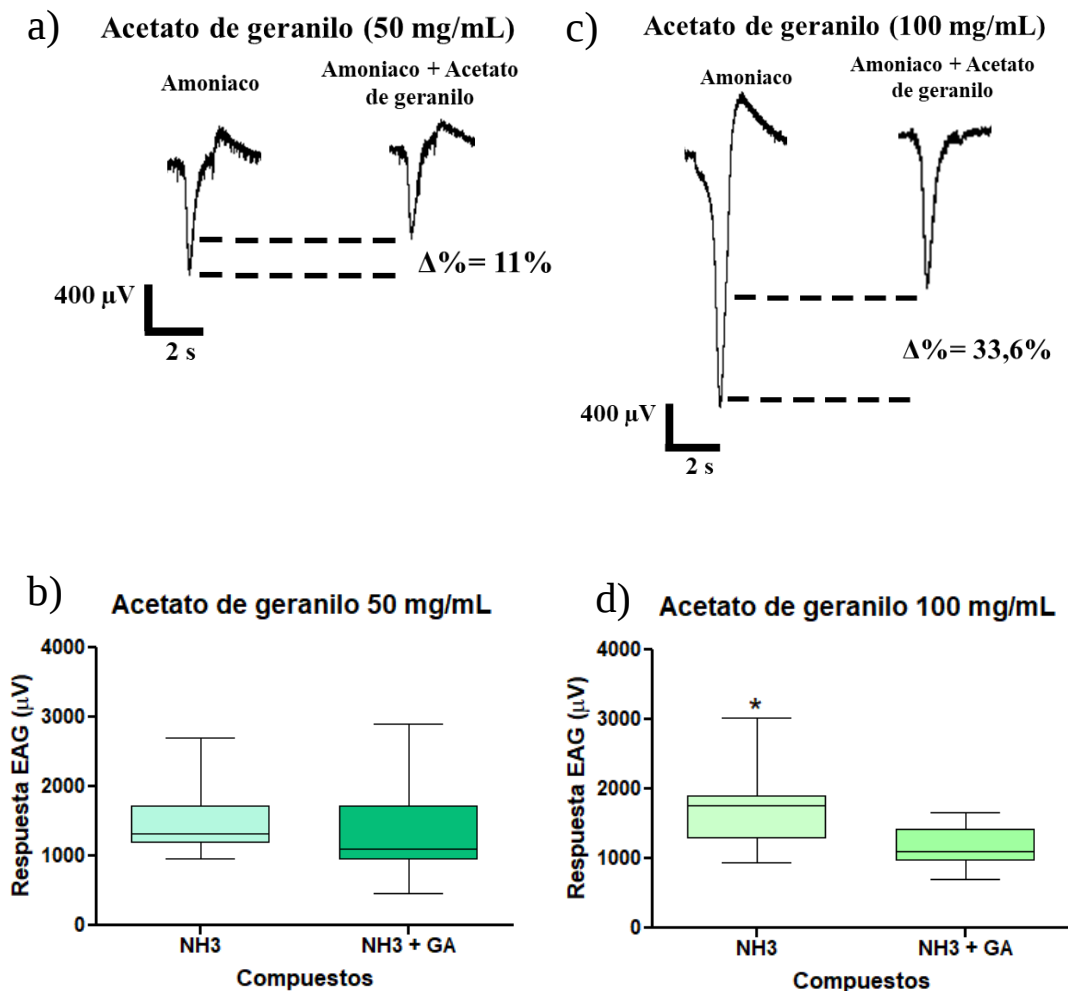
APÉNDICE E. Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en la señal de amoniacó al aplicar la mezcla 2 (acetato de geranilo y nerolidol). a) mezcla 2 50 mg/mL, c) mezcla 2 100 mg/mL con un estímulo pre y post tratamiento de amoniacó. Registros de señales de electroantenografía para la mezcla 2, b) mezcla 2 50 mg/mL, d) mezcla 2 100 mg/mL. (*) y (**) indica diferencias estadísticas significativas entre las señales EAG de amoniacó antes y después de aplicar las sustancias repelentes mencionadas. (*) $p < 0,05$ y (**) $p < 0,01$, Prueba Tukey. Junto con cada gráfica, se muestran los patrones de señales de EAG y su cambio porcentual antes y después de la aplicación del repelente. Estadístico, mezcla 2 en concentración 50 mg/mL (ANOVA de una vía, $F(2,24)=130,1$, $p < 0,0001$; Posthoc Prueba Tukey $p < 0,05$), mezcla 2 en concentración 100 mg/mL (ANOVA de una vía, $F(2,18)=43,22$, $p < 0,0001$; Posthoc Prueba Tukey $p < 0,01$).



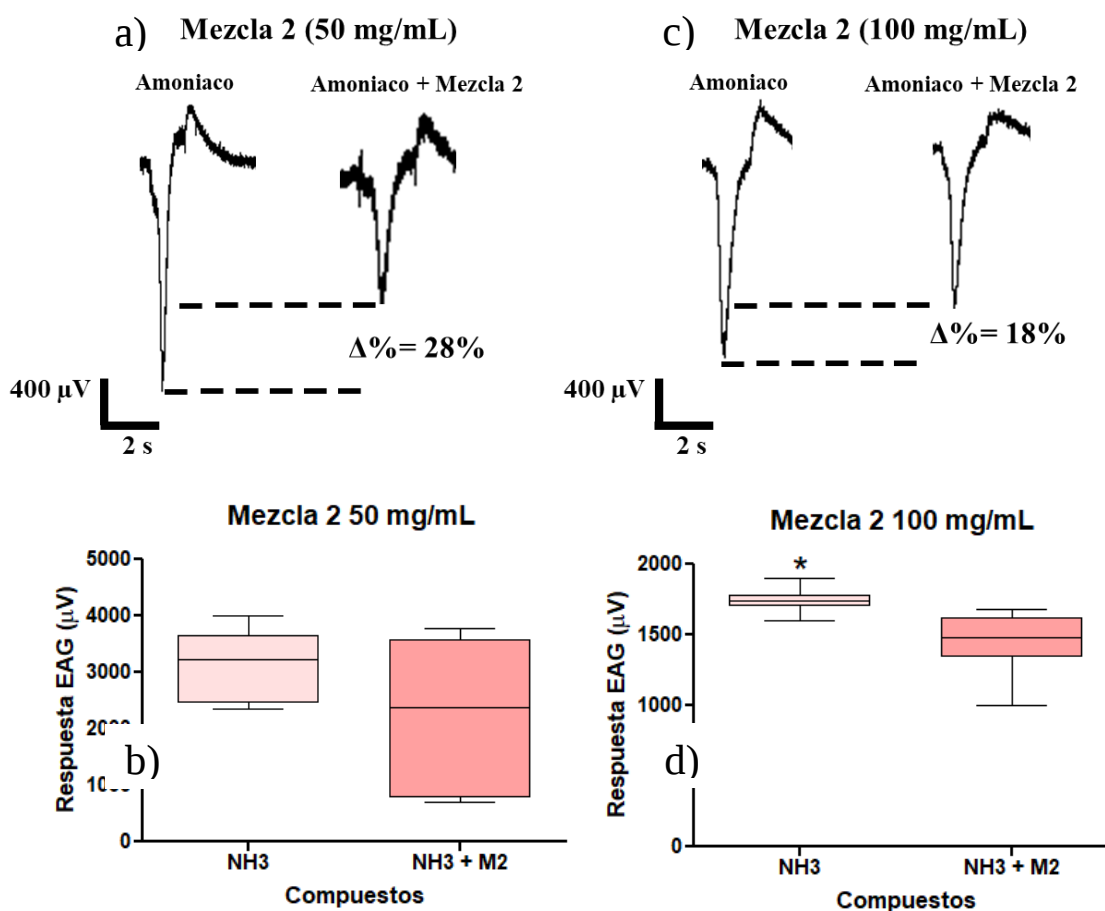
APÉNDICE F. Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en la señal de amoniacó al aplicar la mezcla 3 (Nerolidol y α -bisabolol). a) mezcla 3 50 mg/mL, c) mezcla 3 100 mg/mL con un estímulo pre y post tratamiento de amoniacó. Registros de señales de electroantenografía para la mezcla 3, b) mezcla 3 50 mg/mL, d) mezcla 3 100 mg/mL. (*) indica diferencias estadísticas significativas entre las señales EAG de amoniacó antes y después de aplicar las sustancias repelentes mencionadas. (*) $p < 0,05$, Prueba Tukey. Junto con cada gráfica, se muestran los patrones de señales de EAG y su cambio porcentual antes y después de la aplicación del repelente. Estadístico, mezcla 3 en concentración 50 mg/mL (ANOVA de una vía, $F(2,18)=39,18, p < 0,0001$; Posthoc Prueba Tukey $p < 0,05$), mezcla 3 en concentración 100 mg/mL (ANOVA de una vía, $F(2,18)=30,31, p < 0,0001$; Posthoc Prueba Tukey $p < 0,05$).



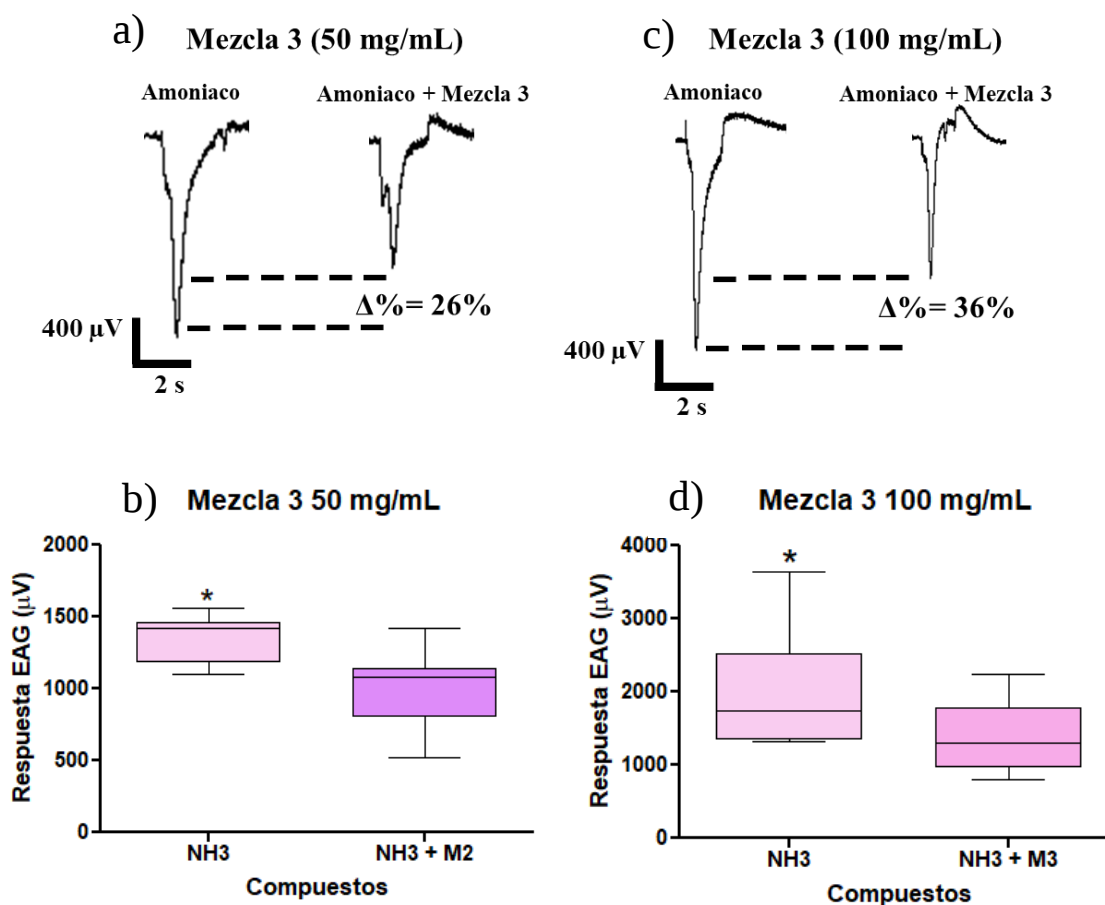
APÉNDICE G. Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoníaco y el repelente de forma simultánea. a) señales de EAG acetato de geranilo 50 mg/mL, c) señales de EAG acetato de geranilo 100 mg/mL, c) Respuesta EAG acetato de geranilo 50 mg/mL y d) respuesta EAG acetato de geranilo 100 mg/mL. Los pulsos de amoníaco y repelente simultáneo se aplicaron luego de un pulso inicial de únicamente amoníaco para realizar la comparación estadística y porcentual. (*) indica diferencias estadísticas significativas entre las señales obtenidas de amoníaco vs amoníaco-repelente simultáneo (t-student test). Estadístico, acetato de geranilo 100 mg/mL (t-test, $t(8)=3,189$; $p=0,0128$).



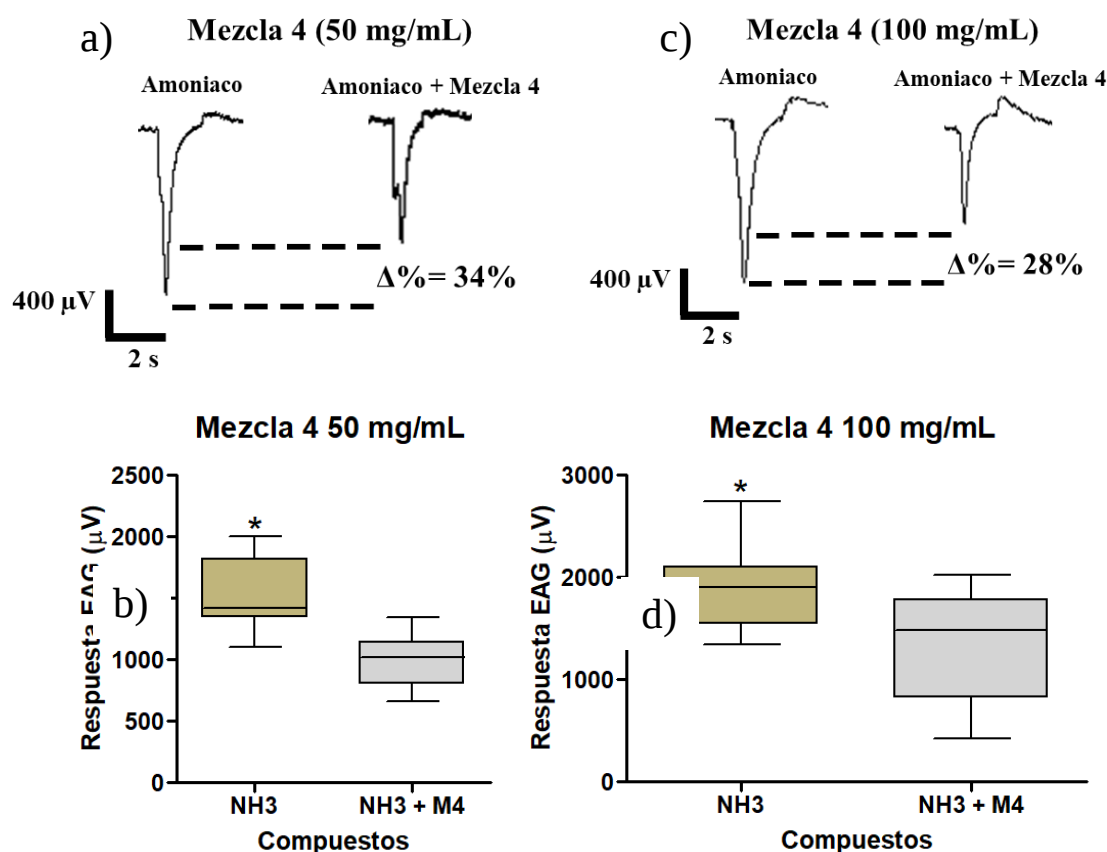
APÉNDICE H. Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoniaco y el repelente de forma simultánea. a) señales de EAG mezcla 2 (acetato de geranilo y nerolidol) 50 mg/mL, c) señales de EAG mezcla 2 [100 mg/mL], c) Respuesta EAG mezcla 2 [50 mg/mL] y d) respuesta EAG mezcla 2 [100 mg/mL]. Los pulsos de amoniaco y repelente simultáneo se aplicaron luego de un pulso inicial de únicamente amoniaco para realizar la comparación estadística y porcentual. (*) indica diferencias estadísticas significativas entre las señales obtenidas de amoniaco vs amoniaco-repelente simultáneo (t-student test). Estadístico, mezcla 2 [100 mg/mL] ($t(6)=3,935$; $p=0,0077$, t-test).



APÉNDICE I. Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoniaco y el repelente de forma simultánea. a) señales de EAG mezcla 3 (nerolidol y α -bisabolol 50 mg/mL, c) señales de EAG mezcla 3 [100 mg/mL], c) Respuesta EAG mezcla 3 [50 mg/mL] y d) respuesta EAG mezcla 3 [100 mg/mL]. Los pulsos de amoniaco y repelente simultáneo se aplicaron luego de un pulso inicial de únicamente amoniaco para realizar la comparación estadística y porcentual. (*) indica diferencias estadísticas significativas entre las señales obtenidas de amoniaco vs amoniaco-repelente simultáneo (t-student test). Estadístico, mezcla 3 en concentraciones 50 mg/mL ($t(6)=2,791$; $p=0,0315$, t-test), 100 mg/mL ($t(6)=3,912$; $p=0,0079$, t-test).



APÉNDICE J. Patrones de señales electroantenográficas y cambios porcentuales en las señales de EAG al aplicar el amoniaco y el repelente de forma simultánea. a) señales de EAG mezcla 4 (acetato de geranilo y α -bisabolol) 50 mg/mL, c) señales de EAG mezcla 4 [100 mg/mL], c) Respuesta EAG mezcla 4 [50 mg/mL] y d) respuesta EAG mezcla 4 [100 mg/mL]. Los pulsos de amoniaco y repelente simultáneo se aplicaron luego de un pulso inicial de únicamente amoniaco para realizar la comparación estadística y porcentual. (*) indica diferencias estadísticas significativas entre las señales obtenidas de amoniaco vs amoniaco-repelente simultáneo (t-student test). Mezcla 4 en concentraciones 50 mg/mL ($t(6)=3,268$; $p=0,0171$, t-test) y 100 mg/mL ($t(6)=3,295$; $p=0,0195$, t-test).



APÉNDICE K. Análisis de proteínas con expresión diferencial a través del software PDQuest. Los geles máster que indican la unión del triplicado de geles realizado se muestran en a) Mezcla 1 y b) DEET.

