

**TRABAJO FIN DE MÁSTER.**  
**INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE**  
**ENFERMEDADES TROPICALES.**

***Screening* de variantes genéticas de resistencia en  
*Aedes aegypti* de la Isla de Santiago (Cabo Verde).**

**Wilson Silvestre de Carvalho Correia**

**Tutorizado por: Dra. Cristina Pou Barreto y**

**Dr. Mariano Hernández Ferrer**

**Julio, 2018**

# Índice

Resumen (Abstract).....	2
1. Introducción.....	4
2. Objetivo .....	7
3. Materiales y Métodos .....	8
3.1. Área del estudio, colecta e identificación de mosquitos (adultos).....	8
3.2. Extracción y cuantificación del ADN genómico.....	9
3.3. Reacción en cadena de la polimerasa.....	9
3.3.1. Amplificación del extremo 5' del gen <i>COI</i> de <i>Ae. aegypti</i> .....	9
3.3.2. Amplificación del gen <i>VGSC</i> de <i>Ae. aegypti</i> .....	10
3.4. Análisis de las secuencias y red de haplotipos.....	10
4. Resultados .....	12
4.1. Diversidad genética en <i>Ae. aegypti</i> de la Isla de Santiago. ....	12
4.2. Estudios de los codones S989P, V1016G y F1534C del gen <i>VGSC</i> en <i>Ae. aegypti</i> de la Isla de Santiago. ....	13
5. Discusión .....	15
6. Conclusiones .....	17
7. Bibliografía .....	18
8. Anexo .....	24

## Resumen.

El mosquito *Aedes aegypti* es considerado uno de los vectores más importantes por transmitir virus como el Dengue, Zika y Chikungunya. En Cabo Verde esta especie está presente en todas las Islas, y actualmente es considerado el vector del Dengue y Zika en el país. Una parte del control de estas enfermedades se centra en el uso de insecticidas. La aparición de mutaciones de resistencia a piretroides en *Ae. aegypti* ha sido ampliamente documentada. Estudios previos sobre *Ae. aegypti* de Cabo Verde han mostrado fenotipo resistente a la deltametrina pero se desconoce el perfil de mutaciones de resistencia a este piretroide. Este trabajo tiene como objetivo realizar un estudio preliminar del perfil de sensibilidad genética del mosquito *Ae. aegypti* de la Isla de Santiago a este piretroide, primero evaluando la variabilidad genética de los mosquitos y luego buscando mutaciones *Kdr* involucradas en la resistencia al insecticida. Para ello se extrajo ADN de mosquitos adultos (N= 12), capturados en el norte, centro y sur de la Isla, a partir del cual se amplificó, la región 5' del gen mitocondrial citocromo c oxidasa (*COI*) y dos regiones del gen del canal de sodio en busca de las mutaciones de interés. El análisis del *COI* mostró una baja diversidad nucleotídica y divergencia entre individuos, así como la pertenencia de todos ellos al denominado haplogrupo II. Todo ello apuntando posiblemente a una colonización reciente y desde un solo lugar. Individuos de distintas zonas de la isla compartieron un mismo haplotipo lo que indica además una escasa diferenciación entre las muestras de diferentes localidades. En cuanto a la resistencia a deltametrina, no hemos detectado ninguna de las mutaciones en el gen *VGSC* normalmente relacionadas con esta resistencia (*S989P*, *V1016G* y *F1534C*). Sin embargo, esto no descarta la presencia en ellos de otras mutaciones en éste u otros genes que explicaran la resistencia encontrada en esta población de mosquitos.

**Palabras Claves:** *Ae. aegypti*, Cabo Verde, gen *COI*, mutaciones *Kdr*, piretroides, deltametrina.

## **Abstract.**

The *Aedes aegypti* mosquito is considered one of the most important vectors for transmitting the Dengue, Zika and Chikungunya virus. In Cape Verde this species is present in all the Islands and is currently considered the vector of dengue and zika in the country. A part of the control of these diseases focuses on the use of insecticides. The emergence of resistance mutations to pyrethroids in *Ae. aegypti* has been widely documented. Previous studies on Cape Verde *Ae. aegypti* have shown deltamethrin resistant phenotype but the profile of mutations resistant to this pyrethroid is unknown. The aim of this work is to carry out a preliminary study of the genetic sensitivity profile of the *Ae. aegypti* of the Santiago Island to this pyrethroid, first, evaluating the genetic variability of mosquitoes and then, looking for mutations *Kdr* involved in resistance to this insecticide. For this, DNA was extracted from adult mosquitoes (N = 12), captured in the north, center and south of the Island, from which the 5' region of mitochondrial cytochrome c oxidase (*COI*) gene and two regions of sodium channel gene were amplified to search the mutations of interest. The analysis of the *COI* gene showed a low nucleotide diversity and divergence among individuals, as well as all of them belonged to the haplogroup II. All this possibly pointing to a possible recent colonization and from one place. Individuals from different areas of the island shared the same haplotype, which also indicates a scarce differentiation between samples from different locations. Regarding deltamethrin resistance, we did not detect any of the *Kdr* mutations gene normally related to this resistance (*S989P*, *V1016G* and *F1534C*). However, this does not rule out the presence of the other mutations in this or other genes that would explain the resistance found in this population of mosquitoes.

**Keywords:** *Ae. aegypti*, Cape Verde, *COI* gene, *Kdr* mutations, pyrethroids, deltamethrin.

## 1. Introducción.

Las enfermedades transmitidas por vectores son de gran importancia en estos días para la salud pública a nivel mundial. De éstas son tres enfermedades las que destacan, el Dengue, Zika y Chikungunya, cuyo vector principal es el mosquito (Diptera: Culicidae) *Aedes aegypti* [1,2]. Entre ellas es el dengue la más importante, con un aumento vertiginoso de su incidencia y distribución en los últimos años, convirtiéndola en un grave problema de salud para 2.500 billones de personas en todo el mundo [3,4,5]. Hasta el momento no se dispone de una vacuna eficaz o tratamiento específico para el dengue. Por esta razón, una parte del control de la enfermedad se centra en la intervención sobre el vector mediante el uso de insecticidas de las familias de los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides [6,7]. Sin embargo, la resistencia a estos tipos de biocidas químicos está siendo un fenómeno cada vez más recurrente en los vectores, entre los que destaca *Ae. aegypti*. Esto es debido a la presencia de múltiples mutaciones puntuales en el gen del canal de sodio con tensión gaseosa (VGSC), comúnmente referido como mutación *Knockdown resistance* o *Kdr*, la insensibilidad en la enzima acetilcolinesterasa (iAChE) y la resistencia metabólica (alteración en la actividad de enzimas de desintoxicación) [8, 9, 10]. De entre los insecticidas, los organofosforados y piretroides son los más destacados en caso de resistencias [11,12,13], siendo las mutaciones *Kdr* importante mecanismo de resistencia a los piretroides y al Dicloro-difenil-tricloroetano [14].

Las mutaciones *Kdr* en los codones V1016G/I, I1011M, S989P y F1534C, presentes en el segmento S6, dominios II y III (IIS6 y IIS6), son las más comúnmente involucradas en la resistencia en *Ae. aegypti* a los piretroides: permetrina, cipermetrina y deltametrina [15,16,17,18,12]. La permetrina y la deltametrina son recomendados por la Organización Mundial de la Salud [19]. La mutación en el codón V1016G es la única que está involucrada en la reducción de sensibilidad a los tres piretroides, sin embargo, en combinación con la mutación S989P, reduce considerablemente la sensibilidad a la deltametrina [20,21,22,23]. Así, una alta frecuencia de los haplotipos 989P/1016G/F1534 y S989/V1016/1534C fueron correlacionadas con la reducción de la sensibilidad a la deltametrina en poblaciones de *Ae. aegypti* [24,25].

En Cabo Verde, país situado en la costa occidental africana, *Ae. aegypti* fue descrito por primera vez en São Vicente en 1931, y recientemente confirmada su

presencia en todas las islas [26,27]. Actualmente es considerado el único vector responsable de la transmisión del virus del Dengue y Zika en esta área [27, 28, 29,30].

El estudio de la estructura genética de *Ae. aegypti* de una región es esencial para el entendimiento de su dinámica poblacional, y para el análisis de los factores responsables de su adaptación [31]. Sin embargo, sobre la variabilidad genética de una población van a actuar diversos fenómenos biológicos, como la mutación, deriva genética, migración, y selección natural, todos responsables de la adaptación, especiación y evolución de las especies [32]. Para el estudio de estos fenómenos se utilizan distintos tipos de marcadores moleculares, cada uno con sus ventajas e inconvenientes. De entre los marcadores utilizados en el estudio de *Ae. aegypti*, se encuentran los marcadores mitocondriales y en particular el gen que codifica para el citocromo c oxidasa subunidad I (*COI*) que es considerado un marcador eficiente para el estudio de la diversidad genética y la expansión de *Ae. aegypti* [33]. Uno de los factores considerados importante en el proceso de diferenciación genética entre poblaciones de *Ae. aegypti* es el uso intensivo de insecticidas en el control de este vector [34].

Tras la primera epidemia de dengue en 2009 y hasta el momento, el uso de la deltametrina han sido considerado la principal medida de control de adultos de *Ae. aegypti* en Cabo Verde [35]. El conocimiento sobre la resistencia a insecticidas en la población de *Ae. aegypti* de este país es escaso [35,36]. Los resultados, a partir de mosquitos capturados en 2012 en la isla de Santiago mostraron resistencia a temefos y deltametrina. Estos autores probaron en individuos susceptibles y resistentes a cipermetrina (adulticida) la ausencia de mutaciones *Kdr* (Leu982Trp, Ile1011Met, Ile1011Val, Ile1014Phe, Val1016Gly, Val1016Ile y Phe1534Cys), que estaban relacionadas según el autor con la resistencia a este tipo de biocida químico [36]. Sin embargo, estos tipos de mutaciones no han sido específicamente relacionadas con la resistencia a la cipermetrina, aunque sí con la resistencia a piretroides en general [12,37, 38].

Determinar la sensibilidad genética de la población de *Ae. aegypti* de Cabo Verde, a través del estudio de mutaciones *Kdr* involucradas en la resistencia a la deltametrina, sería de gran interés ante el estado actual de resistencia que presenta la población de *Ae. aegypti* de este país a este insecticida. Este tipo de herramientas genéticas potenciaría

acciones de control efectivas, reduciendo la posibilidad de establecimiento de la resistencia en el campo.

## 2. Objetivos.

El trabajo que se presenta se trata de un estudio preliminar del perfil de sensibilidad genética presente en la población/es de *Ae. aegypti* de la isla de Santiago, Cabo Verde, a los piretroides utilizados en el programa de control vectorial en este Archipiélago. Y para ello:

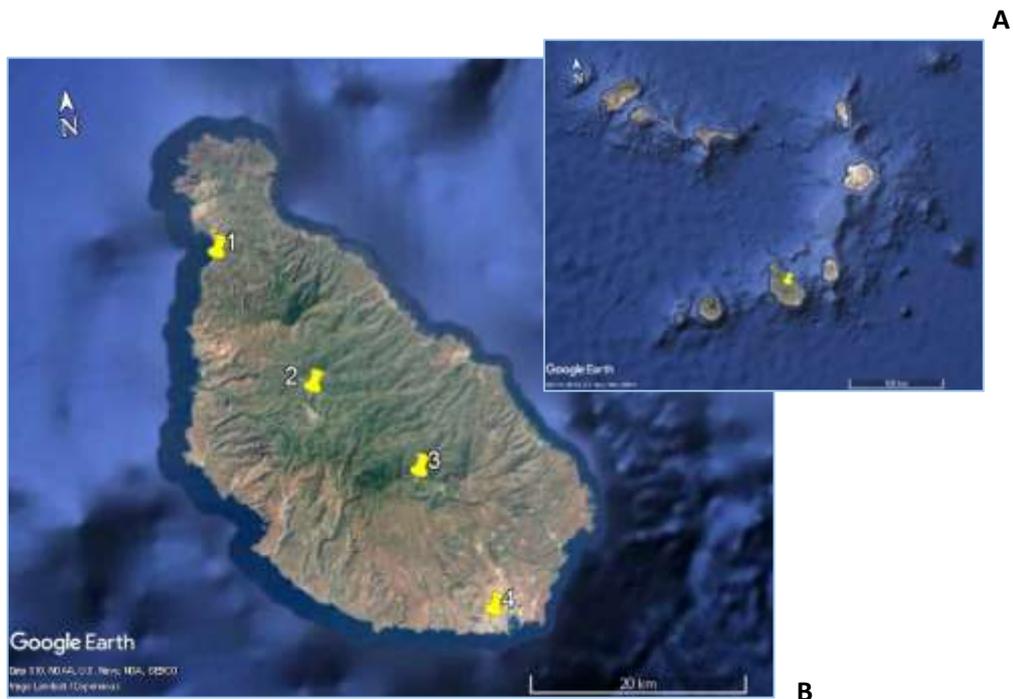
1. Se analizará la variabilidad genética de *Ae. aegypti* en distintas localidades de la Isla de Santiago (Cabo Verde) basada en el gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (*COI*).
2. Se llevará a cabo la búsqueda de mutaciones *Kdr* en los codones S989P, V1016G y F15434C, involucradas en la resistencia a deltametrina, en la población/es de *Ae. aegypti*.

### 3. Materiales y Métodos.

#### 3.1. Área del estudio, colecta e identificación de mosquitos (adultos).

El Archipiélago de Cabo Verde se encuentra situado en el Atlántico (Lat: 15.077948° Lon: -23.618570°), próximo a la costa de Senegal y constituido por 10 islas (Figura 1). Por su localización, su clima se caracteriza por presentar dos estaciones, una seca y otra lluviosa. Ésta última, transcurre entre los meses de julio y noviembre, con precipitaciones abundantes y con ellas la abundancia de mosquitos. Los individuos de la especie *Ae. aegypti* empleados para este estudio (12 hembras) fueron capturados durante esta estación y en ambientes antrópicos, tanto rurales como urbanos, de la Isla de Santiago. Estas capturas fueron realizadas por personal de la ULL (España) y de la UniCV (Cabo Verde) durante el mes de septiembre de 2012 como parte del proyecto titulado “Estudio medioambiental de vectores y reservorios de zoonosis en Cabo Verde” financiado por la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID).

La isla de Santiago es la mayor y más poblada de las islas del archipiélago de Cabo Verde ( $\approx$  54% de la población del país) y donde se localiza la capital, *Praia*, con una población de 106.348 habitantes, cerca de una cuarta parte de la población del país [39].



**Figura 1: A – Archipiélago de Cabo Verde**, se indica la situación de la Isla de Santiago (chincheta en amarillo).  
**B – Mapa de la Isla de Santiago**, con el número y chincheta que indica la situación de cada localidad donde fueron

capturados los adultos de *Ae. aegypti*: 1= *Ribeira das Pratas* (Tarfal), 2= *Boa Entrada* (Santa Catarina), 3= *Agua de Gato* (São Domingos) y 4= *Praia* (Praia). (Fuente: Google Earth 2018).

Los mosquitos fueron capturados en cuatro localidades, de norte a sur, *Ribeira das Pratas* (N= 1), *Boa Entrada* (N= 2), *Lagoa* (N= 2) y *Praia* (N= 7), y pertenecientes a los municipios de *Tarfal*, *Santa Catarina*, *São Domingos* y *Praia* (Figura 1, B). La geolocalización de cada uno de los puntos de captura es presentada en la tabla 1 del Anexo. Los adultos fueron capturados mediante trampas de luz blanca tipo CDC que funcionaban mediante una batería de 6V Li-Ne recargable. Éstas permanecieron en el punto de muestreo 24 h y al día siguiente los mosquitos eran colocados en una nevera con contenedores de frío para su transporte. Ya en el Laboratorio de Entomología Médica de la ULL, ubicado en Tenerife, los mosquitos fueron identificados morfológicamente empleando las claves taxonómicas adaptadas por Pou-Barreto, C y Melero-Alcibar, R, para el desarrollo del proyecto, a partir de las claves de H. Ribeiro *et al.*, 1980; G.H.E. Hopkins, 1952<sup>[40]</sup>; Evan, A. M. 1938<sup>[41]</sup> y Edwards, F. W. 1941<sup>[42]</sup>, y luego conservados a -20°C hasta la realización de estos trabajos.

### **3.2. Extracción y cuantificación del ADN genómico.**

La extracción de ADN de cada individuo (N=12) fue realizada a partir de dos de sus patas empleando el protocolo de extracción utilizado en el Laboratorio de Entomología Médica de la ULL (protocolo 1, Anexo), basado en el descrito por Beebe *et al.*, 2007<sup>[43]</sup> y Sarma *et al.*, 2014<sup>[44]</sup>, cuyo principio es el calentamiento de la muestra en un tampón. Todas las muestras de ADN fueron cuantificadas con la ayuda de un espectrofotómetro (DeNovix®– DS-11/DS-11+Spectrophotometer, USA).

### **3.3. Reacción en cadena de la polimerasa.**

#### **3.3.1. Amplificación del extremo 5' del gen *COI* de *Ae. aegypti*.**

Un total de 12 individuos fueron amplificados para el extremo 5' del gen *COI* del ADN mitocondrial, utilizando la pareja de cebadores HC02198 y LCO1490 diseñados por Folmer *et al.*, 1994<sup>[45]</sup>, y cuya secuencia se muestra en la tabla 2 del Anexo. Estos amplifican una región de 700 pares de base entre la posición 1490 a 2198 del genoma mitocondrial de *Ae. aegypti*. Las condiciones de amplificación del gen mitocondrial *COI* fueron establecidas de acuerdo con la enzima polimerasa empleada (protocolo 2, Anexo).

### **3.3.2. Amplificación del gen *VGSC* de *Ae. aegypti*.**

Para el análisis de variantes del gen *VGSC* se secuenciaron parcialmente los dominios II y III del gen *VGSC*. Para el análisis del dominio II llevamos a cabo amplificaciones con los oligonucleótidos denominados IIS5-6FW y IIS5-6REV (tabla 2, Anexo 3) descritos por Nazawi *et al.*, 2017 <sup>[24]</sup>, que amplifican los exones 20 y 21 y que incluye los codones 989 y 1.016 cuya variación ha sido asociada a resistencia de piretroides. Para el análisis del dominio III y concretamente la posición 1534 dentro del exón 31 utilizamos los *primers* AaNav31P y AaNav31Q diseñados por Harris *et al.*, 2010 <sup>[46]</sup> (tabla 2, Anexo). Las condiciones de amplificación de los exones 20, 21 y 31 fueran realizadas con el Kit Phire (Thermo Fischer) siguiendo las instrucciones del fabricante y perfil térmico utilizado por Nazawi *et al.*, 2017 <sup>[24]</sup> y Harris *et al.*, 2010 <sup>[46]</sup> salvo que la temperatura de desnaturalización fue de 98 °C durante 30 segundos en el primer paso y 98 °C 10 segundos en los pasos de desnaturalización de cada uno de los ciclos de amplificación (ver protocolo 3 en Anexo).

Todos los cebadores utilizados en este estudio fueron sintetizados por Macrogen Inc. (Corea) y las amplificaciones realizadas en un termociclador Eppendorf <sup>TM</sup> Mastercycler<sup>TM</sup> pro S. Una vez comprobadas las amplificaciones mediante electroforesis en geles del 1,7 % de agarosa, los productos amplificados fueron secuenciados por ambas cadenas en Macrogen Inc. (Corea).

### **3.4. Análisis de las secuencias y red de haplotipos.**

Las secuencias obtenidas fueron importadas y editadas mediante el programa MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets <sup>[47]</sup> y alineadas con el programa CLUSTAL W <sup>[48]</sup> tal como viene implementado en el propio programa MEGA7.0.

Con el fin de identificar el/los haplogrupo/s al que pertenecían las secuencias obtenidas en nuestro estudio, diversas secuencias depositadas en el GenBank fueron descargadas mediante el mismo programa MEGA7.0 y añadidas a nuestros alineamientos.

Las estimas de diversidad nucleotídica y diferencias entre haplotipos fueron obtenidas mediante el programa DnaSP v. 6.10.03 <sup>[49]</sup>.

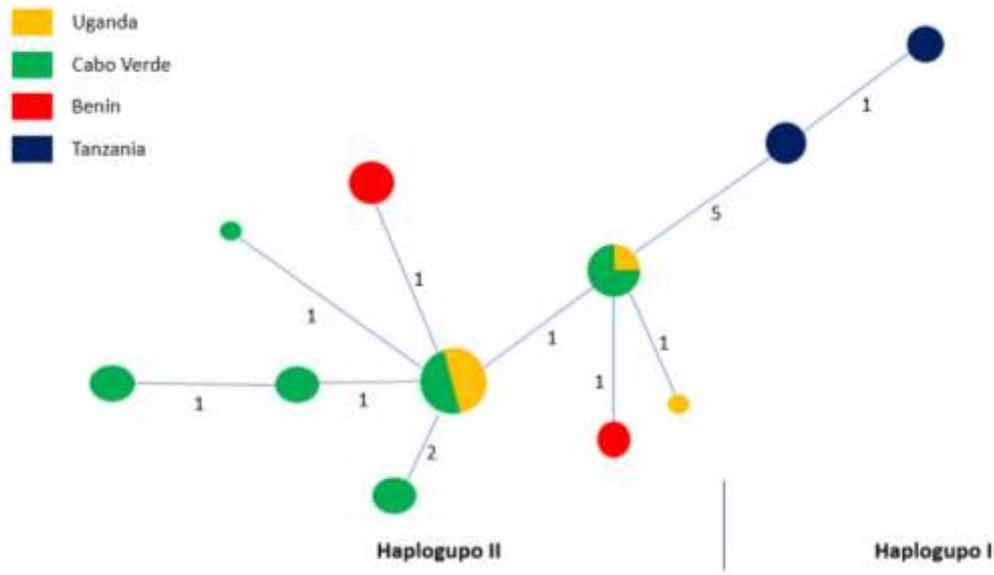
Para la reconstrucción de la red de haplotipos empleamos el programa Network v.5.0.0.3 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) utilizando el método “median joining” [50].

## 4. Resultados

### 4.1. Diversidad genética en *Ae. aegypti* de la Isla de Santiago.

Todos los individuos amplificaron un fragmento de 700 pb, pero sólo fueron 11 los incluidos en los análisis por presentar secuencias con la calidad y longitud adecuadas. Todas las secuencias mostraron una identidad > 98% con secuencias de *Ae. aegypti* obtenidas del GenBank (KX446414, KX446415). El alineamiento de las secuencias de estos individuos reveló la existencia de 8 haplotipos, con un número promedio de diferencias entre haplotipos de 2-3 y una diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,00372, ambos bajos.

En cuanto a la distribución de los haplotipos entre las poblaciones muestreadas de la isla, es preciso mencionar que todas ellas compartieron el haplotipo más común. Con el fin de conocer el haplogrupo al que pertenecerían las muestras capturadas en Cabo Verde, diversas secuencias de *COI* de *Ae. aegypti* de los haplogrupo I y II (KX446414, KX446415, KX446412, KX446451, KX446456, KX446458, KX446416, KX446418, KX446419, KX446420, KX446421, KC250441) <sup>[58]</sup> fueron obtenidas a partir del GenBank. La red de haplotipos construida con el conjunto de secuencias de Cabo Verde y las descargadas se muestra en la Figura 2. En ella se observa que todas las muestras analizadas de Cabo Verde de nuestro estudio pertenecen al denominado haplogrupo II que se diferencian en aproximadamente 5-8 posiciones con respecto a los del haplogrupo I. En la Figura 2 también se observa la homogeneidad-cercanía entre los haplotipos de Cabo Verde.



**Figura 2. Red de haplotipos para el gen mitocondrial citocromo C oxidasa I.** Cada círculo representa un haplotipo y su tamaño el número de individuos que presentan el haplotipo. Los colores indican los países de procedencia de los mosquitos el número sobre las líneas el nº de posiciones mutadas que separan los haplotipos.

#### **4.2. Estudio de los codones S989P, V1016G y F1534C del gen VGSC en *Ae. aegypti* de la Isla de Santiago.**

En el presente estudio se consiguió amplificar y secuenciar los fragmentos de interés (527 pb, de los exones 20 y 21 del segmento S6 del dominio II, y 350 pb, del exón 31 del segmento S6 del dominio III del VGSC) de los 12 mosquitos de la especie *Ae. aegypti* de la población de Isla de Santiago. Ninguna de las mutaciones no sinónimas asociadas con la resistencia a piretroides (S989P, V1016G y F1534C) fue detectada en este estudio (tabla 1, figura 3).



## 5. Discusión

El gen mitocondrial *COI* (citocromo c oxidasa I) ha sido ampliamente utilizado para caracterizar la diversidad genética y la filogeografía de poblaciones de *Ae. aegypti* [8,12,52]. Por este motivo fue seleccionado en este trabajo para determinar la variabilidad genética de *Ae. aegypti* de la Isla de Santiago. En este tipo de estudios es normal el uso de muestras pequeñas (entre 10 y 15 individuos) lo que prueba que la baja diversidad, cuando se encuentra, no está relacionada con el tamaño muestral [53]. Nuestros resultados (la diferencia promedio entre haplotipos e índice de diversidad nucleotídica) revelan una baja diversidad entre los individuos de Cabo Verde lo que indica que la población es reciente y/o procedente de una sola población fuente.

La presencia de un mismo haplotipo (el más común) en las tres zonas muestreadas de la Isla y la existencia de haplotipos que derivan de éste en tan solo 1 posición, señalan a la población de *Ae. aegypti* como una población muy homogénea. Ello implicaría un cierto flujo génico entre las distintas zonas a partir de una misma población inicial en la Isla. Este supuesto coincide con los resultados obtenidos por Salguero *et al.*, 2013 [53], quienes proponían que la población de *Ae. aegypti* de Cabo Verde estaría relacionada con población del África Occidental. En este sentido cabe mencionar que Bennett *et al.*, 2016 [58] tras realizar un estudio-revisión de la distribución de los haplogrupos I y II llegan a la conclusión de que mientras África Central, Asia y América presentan mosquitos con ambos haplogrupos I y II en determinadas frecuencias, la región de África Occidental tan solo presenta el haplogrupo II [58]. Nuestros resultados también podrían apoyar este origen para la población de Cabo Verde analizada en nuestro estudio. Este origen de la población de *Ae. aegypti* de Cabo Verde no es sorprendente dada la proximidad del archipiélago a África Occidental y la presencia de especies características del oeste africano. Sin embargo, no podemos olvidar la historia de las relaciones de este archipiélago con otros continentes como el americano (Brasil). Dado que en América los estudios indican la presencia de haplogrupo I y II no podemos descartar también un origen a partir de América. Un mayor tamaño muestral de la población de la isla de Santiago y del resto del archipiélago y la presencia de haplotipos propios de América o del Oeste Africano en la población de Cabo Verde aclararían definitivamente su origen.

El mecanismo que normalmente confiere la resistencia a la deltametrina son mutaciones en el gen *VGSC* o mutaciones *Kdr*, en particular las que afectan a los codones

S989P, V1016G y F1534C <sup>[14,24]</sup>. La detección precoz de mutaciones *Kdr* es una herramienta esencial para la monitorización de resistencia en una población de mosquitos. Estudios *in vitro* han probado que la combinación de estas tres mutaciones *Kdr* en el gen *VGSC* confiere una fuerte insensibilidad a la deltametrina <sup>[54]</sup>. Sin embargo, la resistencia a la deltametrina por este tipo de mutación en población de *Ae. aegypti* procedente del campo está siendo recientemente documentado en algunos países <sup>[20,24,55]</sup>. En Arabia Saudí las combinaciones de estas tres mutaciones *Kdr* que confieren resistencia fueran encontradas con una alta frecuencia en *Ae. aegypti* resistentes a deltametrina, pero no se han registrado en poblaciones de regiones del Medio Oriente susceptibles al insecticida <sup>[48,24]</sup>. Sobre las poblaciones de *Ae. aegypti* de Tailandia, Plernsub *et al.*, 2016 <sup>[54]</sup> probó que mejoraban significativamente su supervivencia a la deltametrina cuando presentan mutaciones en estos codones. En nuestro caso, no detectamos ninguna de estas mutaciones en la población de la isla de Santiago, pero ésta es considerada fenotípicamente resistente a deltametrina, como muestran los resultados de Dia *et al.*, 2012 <sup>[59]</sup>, y recientemente los de Rocha *et al.*, 2015 <sup>[36]</sup>. Otros autores sugieren que la resistencia a este insecticida puede ser mediada por otros tipos de mutaciones *Kdr* como, las de los codones S996P, V1023G y F1565C. Sus ensayos mostraron que la combinación de estas mutaciones puede reducir la sensibilidad a deltametrina en la población de *Ae. aegypti* de Sudeste Asiático <sup>[23,19]</sup>. Otros trabajos han probado que la población de *Ae. aegypti* de Indonesia resistentes a deltametrina presentaban un alto nivel de actividad enzimas desintoxicantes <sup>[57]</sup>. La ausencia de mutación del tipo *Kdr* en la población de *Ae. aegypti* de la isla de Santiago sugiere que la resistencia a ese compuesto podría estar siendo mediada por otros tipos de mutaciones y/o por otros mecanismos de resistencias, vía enzimas ligadas a la detoxificación de xenobióticos.

Por último señalar que el hecho de que todos los individuos hayan presentado la misma combinación de nucleótidos en los codones S989P, V1016G y F1534C y regiones próximas apoya el hecho de una baja diversidad entre los individuos de la Isla de Santiago.

## 6. Conclusiones

1. El escaso número de haplotipos encontrados para el fragmento del gen citocromo oxidasa I (*COI*) analizado en este estudio señala una colonización reciente y/o a partir de una sola población fuente.
2. La variación molecular detectada en los genes *COI* y *VGSC* entre muestras de distintas localidades de la Isla de Santiago (Cabo Verde), indican una gran homogeneidad y por tanto un flujo génico entre ellas.
3. Al menos en los mosquitos analizados en este estudio no hemos detectado las variantes genéticas asociadas a resistencia a deltametrina (*S989P*, *V1016G* y *F1534C*). Aun así, no podemos descartar la presencia en ellos de otras variantes en éste u otros genes que expliquen la resistencia encontrada en estudios pasados en esta población.

## 7. Bibliografía

1. Organización Mundial de Saúde. 2012. Report on global surveillance of epidemic-prone Infectious diseases - dengue and dengue haemorrhagic fever. Geneve, 2011. Disponible:[http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/CSR\\_ISR\\_2000\\_1/en/index2.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/CSR_ISR_2000_1/en/index2.html). Acesso em: 6 fev.
2. Barreto CF. 2005. *Aedes aegypti* – Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos, Goiás, ISSN 1808-8597, v.1, n.2, p. 62-73, nov.
3. Ferreira GLC. 2013. Global dengue epidemiology trends. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 54, Supl. 18, p.S5-6, 2012. Disponible en:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23011450>. Acesso em: 18 Oct.
4. Organización Mundial de Saúde. 2013. Dengue and severe dengue. *WHO Media centre*. Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>>. Acesso em: 6 fev. 2013.
5. Service M. 2014. *Medical Entomology for Students*. Liverpool School of Tropical Medicine: Cambridge University Press.
6. Bisset JA. 2002. Correct use of insecticides: management of resistance. Revista Cubana Medicina Tropical, Habana, v. 54, n. 3, p. 202-219.
7. Ranson et al. 2010. Insecticide resistance in dengue vectors. Tropical Diseases Research to Foster Innovation & Knowledge Application, Geneve, v. 1, n.1.
8. Beckel H. et al. 2002. Detecção da resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae), praga de grãos de cevada armazenada, a inseticida químicas.
9. Ferrari JA. 1996. Population genetics in vector biology. Em: Marquardt W.C. & Beaty B. J. The Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado, Niwot, p. 512-525.
10. Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V. 2011. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: ¿what are the implication for malaria control? *Trends Parasitology*, 27(2):91-98.

11. French-Constant R. et al. 1995. Cloning, sequencing and functional expression of acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Feder. Europ. Bioch. Societ.*, v. 368, p. 461-465.
12. Brengues C. et al. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and veterinary entomology, Oxford*, v. 17, n. 1, p. 87-94.
13. Montella IR. et al. 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore*, v. 77, n. 3, p. 467-477.
14. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*, 34:653–65.
15. Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, Torre A, Ranson H. 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pestic Biochem Physiol. Elsevier Inc.* 6±11.
16. Kushwah RB, Dykes CL, Kapoor N, Adak T, Singh OP. 2015. Pyrethroid-Resistance and Presence of Two Knockdown Resistance (*kdr*) Mutations, F1534C and a Novel Mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(1), e3332.
17. Smith LB, Kasai S, Scott JG. 2016. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pestic Biochem Physiol. Elsevier B.V*
18. Campos J, Andrade CFS. 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública*, v. 35, n. 3, p. 232-236.
19. WHO (World Health Organization). 2016. Recommended insecticides for space spraying against mosquitoes.
20. Srisawat et al. 2010. Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Appl. Entomol. Zool.* 45 (2): 275–282.
21. Kawada H, Oo SZM, Thaug S, Kawashima E, Maung, YNM., et al. 2014. Co-occurrence of Point Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel of Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* Populations in Myanmar. *PLoS Negl Trop Dis* 8(7): e3032. doi:10.1371.

22. Kasai S, Komagata O, Itokawa K, Shono T, Ng LC, Kobayashi M, et al. 2014. Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism. *PLoS Negl Trop Dis*.8:e2948.
23. Hirata K, Komagata O, Itokawa K, Yamamoto A, Tomita T, et al. 2014. A Single Crossing-Over Event in Voltage-Sensitive Na<sup>+</sup> Channel Genes May Cause Critical Failure of Dengue Mosquito Control by Insecticides. *PLoS Negl Trop Dis* 8(8): e3085.
24. Nazawi et al. 2017. Combined target site (*kdr*) mutations play a primary role in highly pyrethroid resistant phenotypes of *Aedes aegypti* from Saudi Arabia. *Parasit Vectors*, doi 10.1186/s13071-017-2096-6, 10:161.
25. Hamid PH, Prastowo J, Widyasari A, Taubert A, Hermosilla C. 2017. Knockdown resistance (*kdr*) of the voltagegated sodium channel gene of *Aedes aegypti* population in Denpasar, Bali, Indonesia. *Parasites & Vectors*, p. 5 of 9,10:283.
26. Ribeiro H, Ramos HC, Pires CA, Capela RA. 1980. Os mosquitos de Cabo Verde (Diptera: Culicidae). Sistemática, distribuição, bioecologia e importância médica. *Junta de investigações científicas do Ultramar*.
27. Alves, J. et al. 2010. Mosquito fauna on the Cape Verde Islands (West Africa): an update on species distribution and a new finding. *Journal of vector ecology*, Santa Ana, v. 35, n. 2, p. 307-312.
28. Monteiro ML. 2010. Vigilância epidemiológica. Paper presented at the Simposium internacional de relexão sobre a epidemia de Dengue em Cabo Verde, Praia.
29. Ministerio de Saúde e Segurança Social de Republica de Cabo Verde. 2016. Relatório estadístico.
30. Lourenço J. et al. 2017. Epidemiology of tche Zika virus outbreak in the Cabo Verde Islands, West Africa. bioRxiv preprint first posted online oct. 6.
31. Hiragi C, Simões K, Martins E, Queiroz P, Lima L, Monnerat R. 2009. Variabilidade Genética em populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) utilizando marcadores de RAPD. *Neotropical Entomology*, 38(4), pp.542-547.
32. Hartl DL. 2000. A primer of population genetics. 3rd Edition. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc.
33. Beebe NW, Whelan PL, Van den Hurk A, Ritchie S. 2005. Genetic diversity of the dengue vector *Aedes aegypti* in Australia and implications for future surveillance and

- mainland incursion monitoring. *Communicable Diseases Intelligence*, 29(3), pp.299-304.
34. Tien TK, Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Huong TH, Rodhain F, Huong NT, Failloux A. 1999. *Aedes aegypti* in Ho Chi Minh City (Viet Nam): susceptibility to dengue 2 virus and genetic differentiation. *TRoy Soc Trop Med H* 93:581–586.
  35. Ministerio de Saúde de Cabo Verde. 2015. Manual da luta integrada de vectores.
  36. Rocha et al. 2015. Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cabo Verde, to insecticides. *Acta Tropica* 152 66–73.
  37. Saavedra-Rodriguez et al. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 16(6), 785-798.
  38. Martins et al. 2009. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Tropical Medicine and International Health*. Volume 14 no 11 pp 1351–1355, doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02378.
  39. Ministerio de Saúde de Cabo Verde. 2014. Plano Multisectorial de Prevenção e Controlo de Doenças Não Transmissíveis de Cabo Verde.
  40. Hopkins GH. 1952. *Mosquitos of the Ethiopian Region. I - Larval bionomics of mosquitoes and taxonomy of culicine larvae* (2<sup>a</sup> ed.). London: British Museum.
  41. Evans AM. 1938. *Mosquitoes of the Ethiopian Region. II. - Anophelini. Adults and Early Stages*. The British Museum.
  42. Edwards FW. 1941. *Mosquitoes of the Ethiopian Region. III. - Culicine Adults and Pupae*. Printed by Order of the Trustees of the British Museum.
  43. Beebe NW, Whelan PI, Van Den Hruk AF, Ritchie SA, Corcoran S, Cooper RP. 2007. A Polymerase Chain Reaction-Based Diagnostic to Identify
  44. Sarma DK, Singh S, Bhattacharyya DR, Mhohapatra PK, Ahmed GU, Mahanta J, Anil Prakas. 2014. Suitability of the boiling method of DNA extraction in mosquitoes for routine molecular analyses. *International Journal of Mosquito Research*, 1 (3): 15-17.
  45. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R. 1994. Dna primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*: 3 (5), 294-299.
  46. Harris AF, Rajateleka S, Ranson H. 2010. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Gand Cayman. *Am J Trop Med Hyg*: 83(2):277-84.

47. Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7):1870-1874.
48. Larki M.A, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, and Higgins DG *Bioinformatics* 2007 23(21): 2947-2948.
49. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **34**: 3299-3302.
50. Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. 1999. Median Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), pp.37-48.
51. Pereira LPLA, Brito MCA, Araruna FB. 2017. Molecular studies with *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Linnaeus, 1762), mosquito transmitting the dengue virus. *Parasitol Res* 116: 2057. doi.org/10.1007/s00436-017-5484-0.
52. Kamgang B, Brengues C, Fontenille D, Nijokou F, Simard F, Paupy C. 2011. Genetic Structure of the Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Cameroon (Central Africa). *PLoS One*, 6(5): e20257.
53. Salqueiro et al. 2013. *Aedes aegypti* em Cabo Verde: análise do gene mitocondrial *COI*. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa. Paper apresentado no 2º Congresso Nacional de Medicina Tropical, de 20 a 23 de Abril de 2013.
54. Plernsub et al. 2016. Additive effect of knockdown resistance mutations, S989P, V1016G and F1534C, in a heterozygous genotype conferring pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *Parasit Vectors*:9:417; doi 10.1186/s13071-016-1713-0.
55. Hamid PH, Prastowo J, Widyasari A, Taubert A, Hermosilla C. 2017. Knockdown resistance (*ldr*) of the voltagegated sodium channel gene of *Aedes aegypti* population in Denpasar, Bali, Indonesia. *Parasit Vectors*, p. 5 of 9,10:283.
56. Sayono et al. 2016. Distribution of Volta-Gated Sodium Channel (*Nav*) Alleles among the *Aedes aegypti* populations In Central Java Province and Its Association With Resistance to Pyrethroid Insecticides. *PLoS One*.| doi:10.1371.
57. Ahmad I, Astari S, Tan, M. 2007. Resistance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in 2006 to pyrethroid insecticides in Indonesia and its association with oxidase and esterase levels. *Pak. J. Biol. Sci.*;10:3688–3692.

58. Bennett et al. 2016. Historical environmental change in Africa drives divergence and admixture of *Aedes aegypti* mosquitoes: a precursor to successful worldwide colonization? *Molecular Ecology*: 25, 4337–4354.
59. Dia I, Diagne C, Ba Y, Diallo D, Konate L, Diallo M. 2012. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* populations from Senegal and Cape Verde Archipelago. *Parasit Vectors* 5, 238.

## 8. Anexo

**TABLA 1: Trampas colocadas en las distintas zonas de la Isla de Santiago donde fueron capturados los mosquitos *Ae. aegypti* empleados en este estudio.** Se indica la geolocalización de cada una de las trampas de luz tipo CDC en grados decimales.

<b>Zona</b>	<b>Municipio</b>	<b>Localidad – Trampas</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>
<b>Norte</b>	<b>Tarrafal</b>	Ribeira das Pratas – Trampa 1	15,2283667	23,7437167
<b>Centro</b>	<b>Santa Catarina</b>	Boa Entrada – Trampa 1	15,1099500	23,6687833
		Boa Entrada – Trampa 2	15,1099500	23,6687667
	<b>São Domingos</b>	Agua de Gato – Trampa 1	15,0327167	23,5822167
		Agua de Gato – Trampa 2	15,0343667	23,5778667
<b>Sur</b>	<b>Praia</b>	Praia – Trampa 1	14,9153667	23,5149667
		Praia – Trampa 2	14,9117333	23,4983833
		Praia – Trampa 3	14,9120833	23,5206333
		Praia – Trampa 4	14,9116667	23,5265333
		Praia – Trampa 5	14,9173500	23,5301167

**PROTOCOLO 1: Protocolo de extracción de ADN para la identificación de especies de mosquitos a partir de adultos y huevos (utilizando de 1 a 2 patas del adulto o un huevo).**

Consideraciones previas:

- Preparar tampón TE, Tris-EDTA para homogenizar (Ver indicaciones al final del protocolo).
- Precalentar el baño María a 95°C.
- Todos los pasos de centrifugado serán realizados a temperatura ambiente.
- 

Extracción de ADN de mosquito mediante hervido.

1 – Añadir 40 µl de tampón TE (10:E0,1- Tris:EDTA) al tubo que contiene la muestra (patas delanteras o huevo) a homogenizar y mezclar con cuidado con ayuda de un palillo.

2 – El homogenizado se sometió a agitaciones breves con un *vortex* seguido un de centrifugado corto (*spinning*) en una microcentrifuga de sobremesa, se incubó en un baño de agua mantenido a 95°C durante 8 min y finalmente se centrifugó en una microcentrifuga de mesa a 8000rpm durante 2 min.

3 – El sobrenadante (aprox. 30µl) se pipeteó y almacenó en un tubo de microcentrifuga nuevo y estéril de 1,5 ml. La mitad del sobrenadante se usó para su aplicación inmediata y el resto se almacenó en un congelador a -20°C.

**Tampón Tris-EDTA**

<b>Concentración final</b>	<b>Volumen requerido del Stock</b>
10 mM Tris-HCl	4 ml de Tris HCl 1M (pH 8.0)
0,1 mM EDTA	80 µl de EDTA 0,5 M (pH 8.0)
Agua auto-clavada	396 ml

Ajustar todas las soluciones a pH 8.

**Nota:** Al EDTA hay que añadir una solución 10M de NaOH para su solubilización.

**TABLA 2.** Oligonucleótidos usados para las reacciones de amplificación llevadas a cabo durante este trabajo, la amplificación parcial del gen *VGSC* y del gene mitocondrial *COI* de *Ae. aegypti*.

Regiones de amplificación	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Tamaño de amplificación (pb)
<b>Exón 20 y 21</b>	IIS5-6FW	ATCGCTTCCCGGACAAAGAC	527
	IIS5-6REV	GTTGGCGATGTTCTCGACTTGA	
<b>Exón 31</b>	AaEx31P	TCGCGGGAGGTAAGTTATTG	350
	AaEx31Q	GTTGATGTGCGATGGAAATG	
<b>1490 y 2198</b>	HC02198	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	700
	LCO1490	CTCCGCTTTGAACTCAGATC	

**PROTOCOLO 2: Condiciones de PCR para la amplificación de un fragmento del gen mitocondrial *COI*.** Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 20 µl que contenía 0,2 µl de Taq ADN Polymerasa (Termo Scientific™ Phire™ Hot Start II DNA Polymerase, ref.: F-122S 200rxns), 0,15 mM de dNTPs (1,5 mM/dNTPs), 2,5 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub> – 25 mM), 0,5 µM de *Primers forward y reverse* (10 pmol/µl), 11 µl de Agua libre de Dnasas y Rnasas (SIGMA Life Science – ref.: W4502-1L) y 1 µl de ADN obtenido a partir del protocolo de extracción descrito en este trabajo. Las condiciones de los ciclos de amplificación se encuentran en la Tabla 5.

Etapas	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98 °C	30 s
Desnaturalización	35 Ciclos 98 °C 55 °C 72 °C	10 s
Anillamiento		30 s
Elongación		30 s
Extensión final	72 °C	5 min

**Tabla 5:** Perfil térmico de la reacción de PCR para el gen mitocondrial *COI*.

**PROTOCOLO 3: Condiciones de PCR para la amplificación de exones 20, 21 y 31.**

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 25 µl que contenía 0,2 µl de Taq ADN Polymerase (Thermo Scientific™ Phire™ Hot Start II DNA Polymerase, ref.: F-122S 200rxns), 0,15 mM de dNTPs (1,5 mM/dNTPs), 2,5 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub> – 25 mM), 0,4 µM de *Primers forward* y *reverse* (10 pmol/µl), 14,1 µl de Agua libre de Dnasas y Rnasas (SIGMA Life Science – ref.: W4502-1L) y 1 µl de ADN obtenido según el protocolo de extracción ya descrito. Las condiciones de los ciclos de amplificación se encuentran en la Tabla 3. Para la amplificación de exón 31 del dominio III las condiciones fueran las mismas excepto para la temperatura de anillamiento que fue 62°C (Tabla 4).

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	98 °C	30 s
Desnaturalización } Anillamiento } Elongación } <b>35 Ciclos</b>	98 °C <b>65 °C</b> 72 °C	10 s 30 s 30 s
Extensión final	72 °C	10 min

**Tabla 3.** Perfil térmico de la reacción de PCR para la detección de mutaciones *Kdr*, V1016G y S989P.

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	98 °C	30 s
Desnaturalización } Anillamiento } Elongación } <b>35 Ciclos</b>	98 °C <b>62 °C</b> 72 °C	10 s 30 s 30 s
Extensión final	72 °C	10 min

**Tabla 4.** Perfil térmico de la reacción de PCR para detección de las mutaciones *Kdr*, F1534C.

**PROTOCOLO 4: Valoración de los resultados de la amplificación.** El éxito de la amplificación fue probado a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1.7% en Tampón Tris-Ácido acético-EDTA (TAE) 1X conteniendo 1,5 µl de REALSAFE (RBMSAFE 1 ml – 20.000x), usando 8 µl de un marcador de peso molecular de 100 pb con ref.: nº A3470 de AppliChem y 5 µl del resultado de la PCR, y posteriormente visualizada en un analizador de imágenes Chemi-Doc™ XRS+ System (Bio-Rad).

**TAE 50X** = Tris-base – 242 g, EDTA 0,5 M, pH 8,0 - 100 ml, Ácido acético – 57,1 ml, Agua miliQ autoclavada (H<sub>2</sub>O) – 100ml.

En caso de obtener el tamaño de banda esperado, los productos de la PCR fueran enviadas a Macrogen Inc. (España) para su purificación y secuenciación