

ARTÍCULO ORIGINAL

Recibido para publicación: noviembre 07 de 2013.
Aceptado en forma revisada: diciembre 13 de 2013.

Aproximación al estudio del daño oxidativo causado por larvicidas naturales y temefos sobre proteomas de larvas del mosquito *aedes aegypti*.

Approach to the study of oxidative stress caused by natural larvicides and temefos on proteome of *aedes aegypti* mosquito larvae

[Cárdenas Rivera Aury](#)¹, [Orozco Paez Jennifer](#)², [Rodríguez Cavallo Erika](#)³, [Moneriz Pretell Carlos](#)⁴, [Díaz Castillo Fredyc](#)⁵, [Méndez Cuadro Darío](#)⁶

RESUMEN

Introducción: El dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores artrópodos que más rápidamente se distribuye a nivel mundial. Actualmente, el control del vector *Aedes aegypti* se realiza con larvicidas sintéticos que han ido perdiendo eficacia por la aparición de cepas resistentes. De ahí, que la búsqueda de nuevos larvicidas de origen natural complementados con métodos modernos de la biología molecular se requieren para comprender nuevos mecanismos involucrados en la acción larvicida. **Objetivo:** Evaluar mediante métodos de proteómica redox el daño oxidativo causado por el larvicida sintético Temefos y dos extractos de plantas sobre proteomas de larvas de *Aedes aegypti*. **Métodos:** Larvas en estadios III y IV del mosquito fueron expuestas a la acción de Temefos, y extractos larvicidas de semillas de *T. cymosa* y *M. americana*. Luego, las proteínas carboniladas de los proteomas obtenidos de larvas expuestas y no expuestas a los larvicidas se marcaron con DNPH. Finalmente, los perfiles de proteínas carboniladas se determinaron por metodología western. **Resultados y Discusión:** El larvicida

¹ Químico Farmacéutico, Universidad de Cartagena. Candidata a Magister en Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena.

² Odontóloga, Universidad de Cartagena. Candidata a Magister en Bioquímica, Universidad de Cartagena.

³ Químico Farmacéutico, Universidad de Cartagena. Magister en Biología, Universidad Javeriana. Doctor en Química Analítica, Universidad Complutense de Madrid. Profesor Asociado, Universidad de Cartagena. Director Grupo de Química Analítica & Biomédicina.

⁴ Químico Farmacéutico, Universidad de Cartagena. Especialista en Bioquímica Clínica, Universidad Javeriana. Doctor en Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense de Madrid. Profesor Asociado, Universidad de Cartagena. Director Grupo de Bioquímica y Enfermedad.

⁵ Químico Farmacéutico, Universidad de Cartagena. Magister en Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Doctor en Farmacognosia, Universidad de Illinois. Profesor Titular, Universidad de Cartagena. Sub-director Científico, Hospital Universitario del Caribe. Director del Laboratorio de Investigaciones Fitoquímicas y Farmacológicas (LIFUC).

⁶ Químico Farmacéutico, Universidad de Cartagena. Magister en Biología, Universidad Javeriana. Doctor en Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense de Madrid. Profesor Asociado, Universidad de Cartagena. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Cartagena. Campus de Piedra de Bolívar. Cartagena de Indias, Colombia, Suramérica. Teléfono int+57+5+6698278. Fax int+57+5+669977. Correo electrónico: dmendezc@unicartagena.edu.co, dmendezc78@yahoo.com.

sintético Temefos produce intenso daño oxidativo sobre el proteoma de larvas *Aedes aegypti* a las concentraciones de ensayo. Los extractos de *T. cymosa* y *M. americana* resultaron activos a 200 ppm. Tanto Temefos como los extractos de *T. cymosa* y *M. americana* produjeron daño oxidativo en proteínas de bajo peso molecular, presentes en el proteoma de *Aedes aegypti*. **Conclusiones:** Temefos y los extractos larvicidas aumentan la carbonilación de proteínas de bajo peso molecular de larvas de *Aedes aegypti*.

Palabras Claves: Dengue, *Aedes aegypti*, larvicidas, proteómica redox, carbonilación

ABSTRACT

Background: Dengue fever is a viral disease transmitted by arthropod vectors that quickly spreads around the world. Currently, the control of the vector *Aedes aegypti* is made with synthetic larvicides which have been losing efficacy by the emergence of resistant strains. Hence, search for new natural larvicides complemented with modern methods of molecular biology are required to understand new mechanisms involved in the larvicidal action. **Objective:** To evaluate oxidative damage caused by synthetic larvicide Temephos and two plants extracts on *Aedes aegypti* larvae proteomes using methods of redox Proteomics. **Methods:** Larvae instars III and IV were exposed to Temephos and larvicidal seed extracts of *T. cymosa* and *M. americana*. Then, the protein carboniladas of the proteomes of larvae exposed and not exposed to larvicides were tagged with DNPH. Finally, the profiles of carboniladas proteins were determined by western methodology. **Results and discussion:** Synthetic larvicide Temephos produces intense oxidative damage on the proteome of *Aedes aegypti* larvae to concentration assayed. While *T. cymosa* and *M. americana* extracts were active at 200 ppm. Both, natural and synthetic larvicidas produced oxidative damage in low molecular weight proteins, present in the proteome of *Aedes aegypti*. **Conclusions:** Temephos and Larvicidas extracts increase the carbonylation of protein of low molecular weight of larvae of *Aedes aegypti*.

Key words: Dengue, *Aedes aegypti* Larvicidas, carbonylation, redox proteomics

INTRODUCCIÓN

El dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores artrópodos que más rápidamente se distribuye a nivel mundial. Se estima que cada año se producen cerca de 50 millones de casos y aproximadamente 2.5 billones de personas viven en regiones endémicas. Es por ello que desde el año de 1999 se considera un tema prioritario de salud para la humanidad (1). En la actualidad, el control de la hembra del mosquito *Aedes aegypti* es la principal estrategia de intervención ante la falta de fármacos o vacunas eficientes. Con el fin de reducir el riesgo de transmisión del virus del dengue, el control se realiza a través de programas educativos y de gestión ambiental que incluyen el uso de insecticidas químicos y biológicos (1).

Desafortunadamente, la mayoría de estos programas se enfrentan a retos operativos a causa de la aparición y desarrollo de resistencia en los mosquitos transmisores. Esta es una situación que se repite en distintas partes del mundo (2, 3). Específicamente en nuestro país, se demostró recientemente que los mosquitos *A. aegypti* de 10 poblaciones del sur del país presentan resistencia los insecticidas DDT, bendiocarb y Temefos (4).

Adicionalmente, el uso de agentes químicos para controlar el vector transmisor del dengue encierra importantes problemas como son, la falta de selectividad y la toxicidad ambiental que pone en riesgo la seguridad alimentaria de las poblaciones expuestas a los

insecticidas (5). Ante esta situación, el desarrollo y/o descubrimiento de nuevos compuestos insecticidas de origen natural resulta esencial para combatir la creciente resistencia, sustituir a muchos organofosforados, organoclorados y piretroides sintéticos altamente costosos y reducir significativamente los impactos ambientales derivados de su uso (6).

Una ventaja de los extractos crudos de plantas frente a los compuestos sintéticos, es que la acción insecticida es ejercida por una mezcla de varios metabolitos con diferentes modos de acción, lo cual reduce el riesgo de aparición de resistencia por parte de los mosquitos (7). Sin embargo, la caracterización de estos mecanismos de acción para la completa caracterización de la actividad biológica supone un verdadero reto científico.

En este sentido se hace necesario iniciar estudios tendientes a la caracterización de los posibles mecanismos de acción de los extractos más activos, relacionados por ejemplo, con el posible daño oxidativo que ellos causan al proteoma de larvas en estadios III y IV del ciclo vital del mosquito vector. Esto resulta de sumo interés debido a que ha sido descrito en la literatura que el vector trasmisor *A. aegypti*, puede emplear indistintamente dos mecanismos de resistencia, los cuales desde el punto de vista molecular se caracterizan por: 1) mutaciones que ocurren en los sitios de acción de los insecticidas y que inducen insensibilidad y 2) el incremento del metabolismo del insecticida, lo que se traduce en una detoxificación eficiente por parte del mosquito (8). Estos mecanismos se han desarrollado como consecuencia del uso de insecticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides por largos periodos de tiempo (9-11) y poseen en común un incremento de la expresión de las enzimas que hacen parte de sus defensas antioxidantes, como por ejemplo las glutatión-S-transferasas (GSTs) (12, 13).

Es por ello, que nos propusimos acoplar los bioensayos de actividad larvicida *in vitro* con métodos de proteómica redox para la identificación de los perfiles de carbonilación de proteínas de las fases larvianas de *Aedes aegypti*, a fin proporcionar una nueva visión del papel fisiológico del estrés oxidativo en la susceptibilidad y resistencia a los insecticidas químicos y derivados de productos naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y mantenimiento de la colonia de Aedes aegypti .

Las larvas de *Aedes aegypti* se colectaron en la zona residencial del barrio la Montañita del municipio de Turbaco (Bolívar), a partir de criaderos artificiales (tanques de reserva de agua potable). Se colocaron 300 larvas de mosquito en los estadios III y IV en bandejas plásticas con agua potable y se trasladaron al laboratorio de la Unidad de Entomología Departamental de Salud Pública de Bolívar, donde se realizó su identificación, descartando aquellas larvas no pertenecientes a la especie *Aedes aegypti*. A continuación se trasladaron al Laboratorio de Investigaciones Fitoquímicas y Farmacológicas de la Universidad de Cartagena (LIFFUC) para la formación y el mantenimiento de colonias de mosquitos *Aedes aegypti*, bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad relativa (28-30 °C y 75 %).

Recolección del material vegetal.

Frutos de *Tabernaemontana cymosa* y *Mammea americana* se recolectaron en el Jardín Botánico "Guillermo Piñeres" de Cartagena (Colombia), en el período comprendido del 14 de Junio de 2012. A un espécimen de cada planta se le realizó la identificación taxonómica en el herbario del Jardín Botánico "Guillermo Piñeres" de Cartagena (Colombia) y se herborizaron con los códigos JBGP6421 y JBGP4330, respectivamente.

Preparación de extractos

Las semillas obtenidas de los frutos colectados fueron secadas a temperatura ambiente (29-30 °C) por 15 días. Luego, se molieron mediante métodos mecánicos para ser maceradas con etanol por 5 días. Completado el tiempo de extracción, se filtraron y secaron a presión reducida con un roto-evaporador a 40 °C. Posteriormente estos extractos secos se pesaron y almacenaron en viales de vidrio refrigerados y protegidos de la luz.

Bioensayos de actividad larvicida

La evaluación de la actividad larvicida se realizó teniendo en cuenta el protocolo establecido por el LIFFUC, el cual a su vez está basado en protocolos internacionales establecidos por la Organización Mundial de la Salud (14, 15). En este, 40 larvas de *Aedes aegypti* en estadios III (tardío) y IV (temprano) fueron expuestas a la acción larvicida de los extractos etanólicos totales de *T. cymosa* y *M. americana* a 200 ppm, mientras que el larvicida sintético Temefos (fosforotionato de o,o,o,o'-tetrametil-o,o'-tio-di-p-fenileno) usado como control positivo se utilizó a 0,05 ppm (Abate®). Estas concentraciones fueron determinadas en estudios previos realizados por el LIFFUC (16). Todos los larvicidas fueron evaluados disueltos en DMSO, por triplicado, a una temperatura de 28 ± 2 °C y humedad relativa entre 75 y 80 %. Se incluyeron DMSO al 1% como control negativo y un blanco de larvas en agua para estudiar el perfil de carbonilación basal.

Las lecturas de mortalidad larvaria, se realizaron a las 1, 2 y 4h de exposición. Las larvas se declararon muertas cuando no reaccionaron al contacto físico en la región cervical y si se presentaban movimientos muy lentos o incapacidad para flotar. En este punto fueron retiradas del vaso de ensayo y mantenidas en congelación hasta la extracción de los proteomas.

Obtención de los proteomas y marcaje de proteínas carboniladas.

Larvas de cada replica fueron puestas en tubos eppendorff de 1.5 mL y homogenizadas manualmente en frío con el tampón RIPA (TRIS HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM y SDS 1%). El homogenizado fue centrifugado a 10.000 rpm a 4°C durante 30 minutos en equipo Thompson modelo TGL-16M. Para precipitar el ADN contenido en la muestra, los sobrenadantes fueron tratados con isopropanol en proporción (5:1), incubados en frío por una hora y centrifugado a 10.000 rpm a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante clarificado correspondió al extracto total de proteínas de larvas de *Aedes aegypti* que fue utilizado para la medición de proteínas carboniladas. La concentración de proteínas en el extracto se midió por el método de Bradford adaptado a microplacas, usando como estándar albumina de suero bovino (BSA) (17).

Con el fin de visualizar las proteínas oxidadas, los grupos carbonilos de cada muestra de proteínas fueron marcados con una etiqueta de DNPH siguiendo el protocolo de Levine

(18) . Para ello, 100 μ L de cada muestra, fue tratada con 33 μ L de SDS al 24% e incubada a 100°C por 3 minutos. Luego se agregó 33 μ L de DNPH 10 mM (en HCl 2M) hasta una concentración final de 2 mM, se mezcló y se incubó a 25°C por 10 minutos. A continuación, se detuvo la reacción de derivatización adicionando 33 μ L de solución stop compuesta de 85 % de TRIS 2M-glicerol 30% y 15% de 2-mercaptoetanol. Después las muestras fueron electroforadas y las proteínas carboniladas detectadas por metodología western.

Determinación de los perfiles de carbonilación.

Proteínas marcadas con DNPH de los grupos de larvas expuestos a larvicidas naturales y sintético, a DMSO y blanco fueron electroforadas en SDS –PAGE (5% de gel concentrador y 12% de resolución) de acuerdo con Laemmli (19). Los geles fueron equilibrados y transferidos a membranas de Poliviniliden-di-floruro (PVDF; Amersham Biosciences) por vía húmeda a 1mA/cm² de gel). Las membranas con las proteínas transferidas fueron bloqueadas por 1h a temperatura ambiente con leche descremada al 10% en tampón fosfato salino (PBS). Luego, fueron incubadas durante dos horas a temperatura ambiente con anticuerpos policlonales de conejo Anti-DNP (Sigma) en dilución 1:4000 empleando como vehículo PBS-tween 20 (0,05%)- leche 10%. A continuación, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios anti IgG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) y las señales quimioluminiscentes se desarrollaron empelando el sustrato de la peroxidasa contenido en el kit de quimioluminiscencia Western MaxTM. Imágenes de las señales se capturaron con el foto-documentador G:BOX y empleado el software Genesys. Finalmente, el análisis de los perfiles de carbonilación obtenidos se realizó con ayuda de software Quantity One 4.0 (Biorad). Un esquema resumen de la metodología general empleada se muestra en la figura 1.

RESULTADOS

Larvas de *Aedes aegypti* en estadios III y IV fueron expuestas a la acción larvicida de los extractos etanólicos de semillas de *M. americana*, *T. cymosa* y el larvicida sintético Temefos. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de Mortalidad larvaria de *M. americana*, *T. cymosa* y Temefos

Larvicida	Concentración	% de Mortalidad Larvaria			Actividad
		1 hora	2 horas	4 horas	
Extracto Etanólico de semillas de <i>M. americana</i>	200 ppm	46,7 \pm 16,4	93,3 \pm 12,37	100 \pm 0,00	Buena
Extracto Etanólico de semillas de <i>T. cymosa</i>	200 ppm	45,83 \pm 16,7	80,0 \pm 6,25	100 \pm 0,0	Buena
Temefos	0,05 ppm	0	73,3 \pm 7,87	100 \pm 0,0	Buena
DMSO*	1% v/v	0	0	0	0

* Control negativo de ensayo.

Luego, larvas moribundas de cada grupo fueron pasadas a tubos eppendorfs de 1,5 mL, homogenizadas en tampón RIPA y sus proteomas obtenidos se cuantificaron por el método de Bradford. Para ello se construyó una curva de calibración empleando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. A partir de la ecuación resultante del análisis de regresión lineal, se determinaron los rendimientos obtenidos para cada grupo ensayado como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Cantidad de proteína obtenida por grupos de larvas expuestas a los larvicidas ensayados

Larvicida	Cantidad de Proteína Obtenida (µg)*			
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Media ± RSD
Extracto Etanólico de semillas de <i>M. americana</i>	269,8	304,61	316,34	296,92 + 8,2
Extracto Etanólico de semillas de <i>T. cymosa</i>	313,69	341,69	326,93	327,44 ± 4,3
Temefos	289,48	323,15	297,8	303, 48 ± 5,8
DMSO	401,85	549,41	538,81	496,69 ± 16,6

* Cantidad de proteína obtenida de las 40 larvas que se utilizaron en cada réplica del ensayo larvicida.

En términos porcentuales, el rendimiento de proteínas obtenidas de larvas de estadios III y IV expuestas a *M. americana*, *T. cymosa* y Temefos corresponde al 59,78%, 65,92% y 61,10% del total obtenido para el grupo control, respectivamente.

Después de cuantificadas, los grupos carbonilos de las proteínas oxidadas fueron marcados con DNPH, luego electroforadas, transferidas a membrana de PVDF e inmunodetectadas con anticuerpos anti-DNPH. Finalmente, con ayuda de las funciones avanzadas del software Quantity One (Biorad) se realizó el análisis densitométrico de los patrones de carbonilación obtenidos.

DISCUSIÓN

Basados en los criterios establecidos por la OMS, donde se establece que el efecto de un agente larvicida se debe evaluar dentro una ventana de observación de 48h (15); se demuestra que los extractos etanólicos de semillas de *T. cymosa* y *M. americana* son potentes larvicidas porque alcanzan el 100 % de mortalidad dentro de las primeras 4 horas del ensayo, en una forma similar al producto comercial de referencia Abate®. Estos resultados obtenidos, son coincidentes con estudios previos preliminares realizados en el LIFFUC, destinados a la identificación de especies promisorias con actividad larvicida contra *Aedes aegypti* (16).

No obstante, se registraron diferencias durante la primera hora de observación del ensayo. A este tiempo, los extractos etanólicos de semillas de *T. cymosa* y *M. americana* comenzaron a manifestar su efecto larvicida mientras que el Temefos lo hizo a partir de la segunda hora. Esta diferencia indica, que a pesar de la naturaleza compleja de la mezcla de metabolitos secundarios que son los extractos etanólicos totales, sus principios activos larvicidas se estarían liberando más rápidamente que el Temefos atrapado en los excipientes del producto comercial Abate® (6, 20).

A continuación, para evitar el deterioro metabólico que sufren los organismos en periodos *post mortem* (21), las larvas en franco estado moribundo fueron retiradas del vaso de incubación y conservadas en congelación con el objeto de retardar el deterioro de los proteomas estudiados. Para considerar como moribunda una larva, se siguieron los criterios establecidos por la OMS (15). Una vez cuantificadas las muestras de proteínas totales de las larvas expuestas a los extractos larvicidas y el Temefos, se encontraron diferencias en los rendimientos obtenidos con respecto al grupo de larvas expuestas al control negativo. Estas diferencias indican, que la presencia de los principios activos larvicidas de los extractos y el Temefos estaría afectando el metabolismo general de larva y que la consecuencia es un deterioro en el aumento de biomasa larvaria, que en últimas causaría una disminución de la tasa de crecimiento de las larvas. Estas alteraciones en las tasas de crecimiento y desarrollo de los huevos y larvas de diferentes insectos, se ha descrito en estudios de entomología forense, donde se describen como la ingesta de diferentes tipos de drogas pueden retardar o alargar la duración de las diferentes etapas del desarrollo de los mismos (21, 22). De allí, que la cuantificación de los extractos de proteínas se podría utilizar como un marcador bioquímico del efecto del larvicida sobre el desarrollo de las larvas de *Aedes aegypti*.

Finalmente, el análisis de los perfiles de carbonilación de los proteomas de larvas expuestas a los larvicidas ensayados frente al control negativo, muestra que: (i) Existe un alto grado de carbonilación basal en el control negativo. (ii) Temefos y *T. cymosa* incrementan la intensidad de este fondo oxidativo con perfiles similares. (iii) Que los tres agentes larvicidas causan la carbonilación de proteínas de larvas con tamaño cercano a los 15 KDa. Estos resultados demuestran que el estudio de las modificaciones oxidativas causadas por los larvicidas ensayados, puede contribuir a la identificación de potenciales blancos moleculares de la acción larvicida o de respuesta al estrés metabólico que causan en la presencia de estos agentes en el hábitat de las larvas.

CONCLUSIONES.

De la discusión de los resultados obtenidos se puede concluir, que los extractos etanólicos totales de *Tabernaemontana cymosa* y *Mammea americana* se comportan como potentes larvicidas, que posiblemente actúan reduciendo la biomasa de larva, disminuyendo su tasa de crecimiento y causando daño oxidativo en proteínas con tamaño cercano a los 15 KDa. De igual manera, se propone que las diferencias entre los rendimientos de obtención de las proteínas expuestas a los larvicidas frente al grupo control, se podría utilizar como un marcador bioquímico del efecto del larvicida sobre el desarrollo de las larvas de *Aedes aegypti*.

REFERENCIAS

1. OMS. Report of the Scientific Working Group on dengue. In: Diseases TSPfRaTiT, editor. Geneva: World Health Organization; 2006.
2. Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. [J Am Mosq Control Assoc](#)2007 Dec;23(4):420-9.

3. Dusfour I, Thalmensy V, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Girod R. Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. [Mem Inst Oswaldo Cruz](#) 2011 May;106(3):346-52.
4. Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J, Brogdon W. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. [Acta Trop](#) 2011 Apr;118(1):37-44.
5. Gunasekaran K, Vijayakumar T, Kalyanasundaram M. Larvicidal & emergence inhibitory activities of NeemAzal T/S 1.2 per cent EC against vectors of malaria, filariasis & dengue. [Indian J Med Res](#) 2009 Aug;130(2):138-45.
6. Ribeiro KAdC, C. M; Molina, M. T; Lima, E. P; Lopez-Montero, E; Reys, J. R; de Oliveira, M. B; Pinto, A. V; Santana, A. E; Goulart, M. O. Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. [Acta Trop](#) 2009 Jul; 111(1):44-50.
7. Rattan RS. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection* [Review]. 2010;29:913 - 20.
8. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. [Insect Biochem Mol Biol](#) 2004 Jul;34(7):653-65.
9. Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David JP. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. [Insect Biochem Mol Biol](#) 2008 May;38(5):540-51.
10. Lima EP, Paiva MH, de Araujo AP, da Silva EV, da Silva UM, de Oliveira LN, et al. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara, Brazil. [Parasit Vectors](#) 2011;4:5.
11. Lumjuan N, Rajatileka S, Changsom D, Wicheer J, Leelapat P, Prapanthadara LA, et al. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. [Insect Biochem Mol Biol](#) 2011 Mar;41(3):203-9.
12. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. [Med Sci Monit](#) 2004 Jun;10(6):RA141-7.
13. Azael Che-Mendoza RPPaDAR. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. *African Journal of Biotechnology*. [Review]. 2009;8(8):1386-97.
14. WHO/OMS. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva: World Health Organization; 1981.
15. WHO/OMS. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva: WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2005. p. 41.
16. Fredyc Díaz Castillo SMMC, Moisés Carrascal Medina, Yina Pájaro González y Harold Gómez Estrada. Larvicidal activity of ethanol extracts of *Tabernaemontana cymosa* and *Trichilia hirta* against III and IV stage larvae of *Aedes aegypti*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2012 Julio-Septiembre 17(3).
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976 May 7;72:248-54.
18. Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 2000;99:15-24.
19. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. [Nature](#) 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
20. Antonio-Arreola GES, D. [Residual effectiveness of temephos observed in a Mexican southeast city affected by dengue]. *Rev Cubana Med Trop* 2012 May-Aug;64(2):176-86.
21. Kapil Verma RPM. Assessment of Post Mortem Interval PMI from Forensic Entomotoxicological Studies of Larvae. *Entomology, Ornithology & Herpetology* 2013.
22. De Carvalho LML, A. X; Badan Palhares, F. A. The effect of cocaine on the development rate of immatures and adults of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) and its importance to postmortem interval estimate. [Forensic Sci Int](#) 2012 Jul 10;220(1-3):27-32.

Agradecimientos:

Al Doctor Luis Cortés Alemán, Coordinador de la unidad de entomología médica en la Secretaria de Salud de Bolívar por su apoyo en la identificación de las larvas de *Aedes aegypti*. A la Universidad de Cartagena (resolución 4681 de 2011) y Colciencias (Código 1107-545-31632) por sus respectivos apoyos financieros.