

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Comparación de regeneración celular del epitelio intestinal de mosquitos hembra *Aedes aegypti* criados en laboratorio y recolectados en Chiquimula, Guatemala durante el mes de agosto del 2021, mediante análisis de microscopía de fluorescencia**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Alessandra Paola Girard Mejía  
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala  
2022



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Comparación de regeneración celular del epitelio intestinal de mosquitos hembra *Aedes aegypti* criados en laboratorio y recolectados en Chiquimula, Guatemala durante el mes de agosto del 2021, mediante análisis de microscopía de fluorescencia**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Alessandra Paola Girard Mejía  
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala  
2022

Vo.Bo.:



(f)

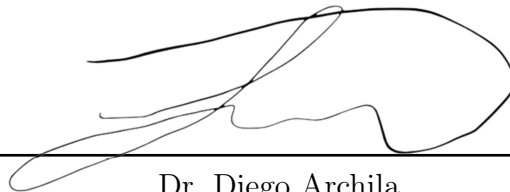
Dra. Norma Padilla

Tribunal Examinador:



(f)

Dra. Norma Padilla



(f)

Dr. Diego Archila



(f)

Dra. Mabel Taracena

Fecha de aprobación: Guatemala, 8 de diciembre de 2022.

---

## PREFACIO

---

Este trabajo de investigación surgió por un interés en la epidemiología de las enfermedades desatendidas que afectan a Guatemala y un creciente interés en aquellos vectores que las transmiten. Con el apoyo de diversas personas e instituciones, fue posible iniciar una línea de investigación que se enfoca en la importancia del sistema digestivo, específicamente el intestino del mosquito, en la transmisión y prevención de enfermedades infecciosas transmitidas por vectores.

Primero, debo dar gracias a Dios por haberme acompañado en cada fase de este proyecto y por haberme brindado la fortaleza necesaria para llevarlo a cabo.

A mi familia, por su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera universitaria. Por su amor, paciencia y motivación que me mantuvieron enfocada en lo que de verdad importa. Gracias por creer en mí.

A mi asesora, la Dra. Norma Padilla, por su apoyo, supervisión y por la confianza que me fue otorgada para poder desarrollar un proyecto de investigación prácticamente desde cero. A MSc. Juan Carlos Lol, por ser el soporte principal de la fase de colecta y por sus consejos y asesoría. Así como a Msc. David Castañeda, por su apoyo en mis prácticas profesionales y por su interés en el desarrollo de mi proyecto de graduación, tanto de manera presencial como virtual.

A Nicholas Buchon, por haber brindado los reactivos y equipo necesario para la realización de mi proyecto de graduación, así como la confianza de participar en una de las líneas de investigación que desarrollan en el *Buchon Laboratory*.

A la Dra. Mabel Taracena, por su constante apoyo y supervisión en la realización del proyecto. Por darme la oportunidad de participar en esta línea de investigación y por responder mis dudas sin importar la hora.

A la Dra. Pamela Pennington, por haber realizado el primer contacto con la Dra. Taracena y por realizar la convocatoria del proyecto que ahora se convirtió en mi trabajo de graduación.

Finalmente, agradezco a cada una de las personas involucradas directamente en la realización de este trabajo de graduación, así como aquellas que con un mensaje positivo, palabras de aliento o incluso silencios cómodos me dieron un espacio seguro para descansar, retomar fuerzas y seguir adelante.

<b>PREFACIO</b>	<b>III</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de cuadros</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>IX</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
A. Objetivo general . . . . .	3
B. Objetivos específicos . . . . .	3
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>4</b>
<b>IV. MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
A. Enfermedades transmitidas por vectores . . . . .	5
1. Arbovirus . . . . .	5
B. Biología de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> . . . . .	6
1. Estadios . . . . .	6
2. Distribución en Guatemala . . . . .	7
C. Sistema digestivo y epitelio intestinal de mosquitos . . . . .	7
1. Tipos celulares en dípteros . . . . .	7
2. Regeneración celular en homeostasis e infección . . . . .	8
D. Ciclo celular . . . . .	8
1. Mitosis . . . . .	8
2. Endoreduplicación . . . . .	8
E. Tinción inmunocitoquímica . . . . .	8
1. Fundamento e inmunofluorescencia . . . . .	8
2. Inmunodetección múltiple . . . . .	9
3. Tinción de histonas . . . . .	9
4. Tinción con DAPI . . . . .	9
5. Microscopía confocal . . . . .	9

<b>V. METODOLOGÍA</b>	<b>10</b>
A. Colecta de mosquitos silvestres	10
1. Mosquitos en estadio de pupa	10
2. Mosquitos adultos en reposo	10
3. Crianza	11
B. Disección de tejido intestinal	12
C. Fijación de tejido intestinal	12
D. Almacenamiento de tejido intestinal y cuerpo de mosquitos	12
E. Envío de muestras	12
F. Confirmación de especie por PCR convencional y electroforesis	13
1. Preparación de muestras y PCR convencional	13
2. Electroforesis de ADN	13
G. Tinción inmunocitoquímica de tejido intestinal	13
1. Preparación de soluciones	13
2. Fijación post-envío de tejido intestinal	14
3. Permeabilización	14
4. Preparación y aplicación de solución <i>Click-it</i>	14
5. Bloqueo	15
6. Tinciones	15
7. Montaje	15
H. Análisis de tejido intestinal por microscopía confocal	15
I. Conteo de células	16
J. Análisis estadístico	16
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>17</b>
A. Optimización de protocolo de procesamiento de tejido intestinal de mosquitos silvestres	17
B. Confirmación de especie de mosquitos silvestres	18
C. Identificación de tipos celulares, células en mitosis y replicación de ADN	19
D. Diferencias entre mosquitos silvestres y alimentados con solución de azúcar	20
<b>VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>23</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>26</b>
<b>IX. RECOMENDACIONES</b>	<b>27</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>28</b>
<b>XI. ANEXOS</b>	<b>31</b>
A. Anexo 1: Formulario de disección y fijación de intestino de mosquitos adulto silvestres emergidos de pupas en laboratorio	32
B. Anexo 2: Formulario de disección y fijación de intestino de mosquitos adulto silvestres en reposo	33
C. Anexo 3: Procedimiento de operación estándar (POE): Preservación y almacenamiento de mosquitos	34
D. Anexo 4: Procedimiento de operación estándar (POE): Preparación de una solución de agua azucarada al 10%	43
E. Anexo 5: Procedimiento de operación estándar (POE): Preparación de una solución de agua azucarada al 10% suplementada con EdU 20 mM	48
F. Anexo 6: Horario de alimentación según grupo de procesamiento	51
G. Anexo 7: Horario de disección según grupo de procesamiento	51
H. Anexo 8: Procedimiento de Operación Estándar: Disección y fijación del tejido intestinal de mosquitos adultos silvestres	52
I. Anexo 9: Referencia para confirmación de especies de mosquitos silvestres con electroforesis	57

J.	Anexo 10: Genotipificación de mosquitos silvestres por electroforesis en gel de agarosa	
	2%	57
K.	Anexo 11: Células EdU+PH3+ en mosquitos grávidos y sin sangre	61
L.	Anexo 12: Análisis complementario de datos obtenidos de los porcentajes de células EdU+ y PH3+ en los diferentes grupos de mosquitos	62



---

Lista de figuras

---

VI.1. Muestra de tejido epitelial antes (A) y después (B) de la optimización del protocolo.	17
VI.2. Dinámica celular del intestino medio de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> silvestres (A) grávida, (B) sin sangre, (C) semigrávida y (D) alimentadas con solución de azúcar. Aquí se observan: de color azul, células del epitelio, de verde, células EdU+ y de rojo, células PH3+.	19
VI.3. Distribución de datos obtenidos de los porcentajes de células EdU+, y su promedio, en mosquitos (A) semigrávidas, (B) sin sangre, (C) grávidas y (D) alimentadas con solución de azúcar. n = número de muestras en el grupo de estudio	20
VI.4. Porcentaje de células EdU+ en mosquitos silvestres criados en laboratorio. Clave de significancia: valor $P < 0.0001$ «***»; n = número de muestras en el grupo de estudio	21
VI.5. Distribución de datos obtenidos de los porcentajes de células PH3+, y su promedio, en mosquitos (A) semigrávidas, (B) sin sangre, (C) grávidas y (D) alimentadas con solución de azúcar. n = número de muestras en el grupo de estudio	21
VI.6. Porcentaje de células PH3 positivas en mosquitos silvestres criados en laboratorio. n = número de muestras en el grupo de estudio	22
XI.1. Formulario de disección y fijación de intestino de mosquitos adulto silvestres emergidos de pupas en laboratorio	32
XI.2. Formulario de disección y fijación de intestino de mosquitos adulto silvestres en reposo	33
XI.3. Horario de alimentación según grupo de procesamiento	51
XI.4. Horario de disección según grupo de procesamiento	51
XI.5. Referencia para confirmación de especies de mosquitos silvestres con electroforesis	57
XI.6. Genotipificación de ADN de muestras 1 a 24. Género <i>Aedes</i> .	57
XI.7. Genotipificación de ADN de muestras 25 a 48. Género <i>Aedes</i> .	58
XI.8. Genotipificación de ADN de muestras 49 a 71. Género <i>Aedes</i> .	58
XI.9. Genotipificación de ADN de muestras 72 a 94. Género <i>Aedes</i> .	58
XI.10. Genotipificación de ADN de muestras 95 a 122. Género <i>Aedes</i> .	58
XI.11. Genotipificación de ADN de muestras 123 a 150. Género <i>Aedes</i> .	59
XI.12. Genotipificación de ADN de muestras 151 a 179. Género <i>Aedes</i> .	59
XI.13. Genotipificación de ADN de muestras 180 a 207. Género <i>Aedes</i> .	59
XI.14. Genotipificación de ADN de muestras negativas entre 14 y 100. Género <i>Aedes</i> .	59
XI.15. Genotipificación de ADN de muestras negativas entre 102 y 155. Género <i>Aedes</i> .	60
XI.16. Genotipificación de ADN de muestras negativas entre 158 y 207. Género <i>Aedes</i> .	60
XI.17. Fotografías microscópicas de células EdU+PH3+ en epitelio intestinal de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> (A - B) grávidos y (C) sin sangre. Con una flecha color blanco se señala la célula de interés	61

---

Lista de cuadros

---

VI.1. Conteo de mosquitos y especies confirmadas . . . . .	18
VI.2. Estadística descriptiva de porcentaje de células EdU+ en mosquitos silvestres y criados en laboratorio . . . . .	20
VI.3. Estadística descriptiva de porcentaje de células PH3+ en mosquitos silvestres y criados en laboratorio . . . . .	22
XI.1. Análisis de Kruskal-Wallis de células EdU+ y PH3+ en mosquitos silvestres y criados en laboratorio . . . . .	62

Los mosquitos *Aedes aegypti* se caracterizan por ser el vector principal a nivel urbano de varias enfermedades humanas causadas por arbovirus. En Guatemala, se ha observado prevalencia de este vector en 21 de los 22 departamentos del país, siendo Chiquimula uno de los departamentos con mayor porcentaje de positividad de dengue. Por lo tanto, se seleccionaron dos barrios de esta área para realizar la colecta de mosquitos silvestres, tanto en estadio adulto como de pupa.

El presente estudio se enfocó en realizar una comparación entre el comportamiento celular observado en el epitelio intestinal de los mosquitos hembra *Ae. aegypti* de laboratorio con el de los mosquitos hembra *Ae. aegypti* silvestres. La metodología consistió en la optimización de un protocolo para la obtención y preparación de tejido del epitelio intestinal de mosquitos silvestres y, con base en ello, realizar un análisis de microscopía confocal para la identificación de los tipos celulares presentes en el epitelio intestinal; así como las células en procesos de mitosis y endorreduplicación. Se determinó, mediante una prueba de Kruskal-Wallis si existe diferencia significativa entre la cantidad de células en mitosis y replicación de ADN entre los mosquitos alimentados con sangre y los alimentados con solución de azúcar.

Es posible afirmar que el procedimiento desarrollado en este proyecto es eficaz para la obtención y preparación de tejido del epitelio intestinal de mosquitos silvestres. Además, mediante las tinciones inmunocitoquímicas se lograron identificar de manera certera las células madre intestinales (ISCs). Así mismo, fue posible identificar tanto células en procesos de mitosis y endorreduplicación/replicación de ADN en los cuatro grupos de estudio. Finalmente, al comparar el comportamiento de regeneración celular entre poblaciones alimentadas con sangre y solución de azúcar, se determinó una diferencia significativa entre los porcentajes de células EdU+ de ambos grupos. Sin embargo, no es posible indicar de manera certera la razón de esta variabilidad, por lo que se propone realizar un análisis de detección de ARN viral, específicamente de virus del Dengue (DENV), en el intestino medio de los mosquitos silvestres para evaluar una posible correlación entre la cantidad de células EdU+, PH3+ y la presencia o ausencia de un patógeno.

---

## INTRODUCCIÓN

---

Los mosquitos del género *Aedes* se caracterizan por ser vectores de una amplia gama de infecciones virales; específicamente *Ae. aegypti* es el vector principal a nivel urbano de varias enfermedades humanas causadas por arbovirus, como las causadas por el virus del Dengue (DENV), del Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV) y virus de la fiebre amarilla (Santos, Pereira, 2020). En Guatemala, se ha observado prevalencia de este vector en 21 de los 22 departamentos del país (López, 2019; Lepe, et al., 2017; Lepe, et al., 2016). En Guatemala, el Departamento de Chiquimula ha notificado un promedio de 863 casos positivos de dengue por cada 10,000 habitantes y presenta un porcentaje promedio de 21.85 % de positividad (OPS, 2020; Castillo, et al., 2020; SIGSA, 2019). Según el Departamento de Epidemiología del MSPAS, para la semana epidemiológica 13 del año 2021, Chiquimula ya sobrepasaba el índice de incidencia nacional (MSPAS, 2021). Sin embargo, la vigilancia pasiva del dengue en América Latina ha subestimado el número de casos por un factor de entre 3.5 y 19 (Sarti, et al., 2016; Castillo, et al., 2020) y, como resultado, es probable que se subestime la carga real de las arbovirosis en Guatemala.

La transmisibilidad de arbovirus como el DENV, CHIKV y ZIKV está determinada por su capacidad de infectar al vector, *Ae. aegypti*, y de poder multiplicarse en este y en mamíferos superiores, como los seres humanos. Las hembras *Aedes* adquieren el virus al tomar sangre de un hospedero vertebrado virémico; luego, se establece la infección en las células epiteliales del mosquito, principalmente las del intestino, para luego propagarse al hemocele y posteriormente a otros tejidos (glándulas salivales, ovarios, sistema nervioso, entre otros) para continuar con la transmisión del virus (Wu, et al., 2019). Además, se ha observado que en situaciones de estrés como la digestión de la sangre y la interacción con patógenos virales, el epitelio del intestino debe ajustar mecanismos celulares clave, incluida la proliferación y diferenciación celular para garantizar la integridad epitelial y el mantenimiento de la homeostasis.

En estudios realizados con mosquitos *Ae. aegypti* infectados con DENV, se indujo la proliferación celular de células madre intestinales (*Intestinal Stem Cells* o ISCs, por sus siglas en inglés) en cepas de mosquitos susceptibles y refractarias al arbovirus. Aquí se observó que, en cepas permisivas, la infección del intestino es favorecida por la ralentización de la renovación celular y que la refractariedad de una cepa estaría respaldada, al menos en parte, por la capacidad de activar el programa de división de ISCs en momentos clave. Por lo tanto, se demostró que la efectividad de la renovación celular del intestino medio durante la infección viral es un factor importante en la competencia del vector (Taracena, et al., 2018). En el caso de enfermedades tropicales desatendidas transmitidas por vectores, el estudio de la regeneración celular del intestino durante los diferentes estadios de vida del

vector y la comparación entre los especímenes silvestres y los criados en condiciones de laboratorio, podría impulsar el estudio de los mecanismos de infección de arbovirus en vectores, como *Ae. aegypti*. Esto, a su vez, permite desarrollar mecanismos potenciales para la prevención de la diseminación del virus en el mosquito.

### A. Objetivo general

Comparar el comportamiento celular observado en el epitelio intestinal de los mosquitos hembra *Ae. aegypti* cepas de laboratorio con el de los mosquitos hembra *Ae. aegypti* silvestres.

### B. Objetivos específicos

- Optimizar un protocolo para la obtención y preparación de tejido del epitelio intestinal de mosquitos silvestres
- Identificar tipos celulares del epitelio intestinal de los mosquitos hembra *Ae. aegypti* silvestres.
- Identificar células en procesos de mitosis y endoreduplicación del epitelio intestinal de los mosquitos hembra *Ae. aegypti* silvestres.
- Comparar el comportamiento de regeneración celular entre poblaciones alimentadas con sangre y solución de azúcar.

---

**JUSTIFICACIÓN**

---

En otros estudios se ha determinado que *Ae. aegypti* es una especie ectototérmica, pues la especie depende de condiciones cálidas y húmedas para reproducirse y transmitir enfermedades (Liu-Helmersson, et al., 2019). A nivel mundial, se ha observado que la distribución geográfica del mosquito *Ae. aegypti* es amplia, debido a que se puede encontrar en regiones tropicales y subtropicales (Kraemer, et al., 2015).

En Guatemala, el Departamento de Chiquimula ha notificado un promedio de 863 casos positivos de dengue por cada 10,000 habitantes y presenta un porcentaje promedio de 21.85% de positividad (OPS, 2020; Castillo, et al., 2020; SIGSA, 2019). Según el Departamento de Epidemiología del MSPAS, para la semana epidemiológica 13 del año 2021, Chiquimula ya sobrepasaba el índice de incidencia nacional (MSPAS, 2021). Sin embargo, la vigilancia pasiva del dengue en América Latina ha subestimado el número de casos por un factor de entre 3.5 y 19, en caso de dengue (Sarti, et al., 2016; Castillo, et al., 2020) y, como resultado, es probable que el número de casos subestime la carga real de las arbovirosis en Guatemala. En *Ae. aegypti*, se ha observado que la inducción de la proliferación de células del intestino medio hizo que una cepa susceptible fuera más resistente a la infección viral (Taracena, et al., 2018). Por lo tanto, se demostró que la efectividad de la renovación celular del intestino medio durante la infección viral es un factor importante en la competencia del vector. En el caso de enfermedades tropicales desatendidas transmitidas por vectores, el estudio de la regeneración celular del intestino durante los diferentes estadios de vida del vector y la comparación entre los especímenes silvestres y los criados en condiciones de laboratorio, podría impulsar el estudio de los mecanismos de infección de arbovirus en vectores, como *Ae. aegypti*. Esto, a su vez, permite desarrollar mecanismos potenciales para la prevención de la diseminación del virus en el mosquito.

## A. Enfermedades transmitidas por vectores

### 1. Arbovirus

La palabra arbovirus se refiere a los virus que son transmitidos por artrópodos (por la abreviación del inglés *arthropod-borne virus*), principalmente mosquitos y garrapatas. Este término no se utiliza para realizar clasificaciones taxonómicas, pero los virus que se encuentran dentro de este grupo comparten características como patrones de transmisión, por lo que la información obtenida para un virus puede ser potencialmente útil para la comprensión y, por lo tanto, la prevención y el control de otros (Jones, et al., 2020). Se ha observado que, en las últimas décadas, los virus del Dengue, Zika y Chikungunya han causado numerosos brotes a nivel mundial en humanos y animales, provocando enfermedades que varían en gravedad, síntomas y prevalencia, pero que representan una proporción importante de muertes (Salgado, et al., 2021).

#### Dengue

El virus del Dengue (DENV) es de ARN monocatenario de sentido positivo y pertenece a la familia Flaviviridae y género Flavivirus. Es uno de los virus transmitidos por mosquitos más frecuente en todo el mundo causando alrededor de 390 millones de infecciones cada año. Aproximadamente 500,000 son casos graves que requieren hospitalización y más de 20,000 casos conducen a la muerte principalmente en países tropicales (Wu, et al., 2019; Freund, et al., 2017). En Guatemala, el Departamento de Chiquimula ha notificado un promedio de 863 casos por cada 10,000 habitantes y presenta un porcentaje promedio de 21.85 % de positividad (OPS, 2020; Castillo, et al., 2020; SIGSA, 2019). Según el Departamento de Epidemiología del MSPAS, para la semana epidemiológica 13 del año 2021, Chiquimula ya sobrepasaba el índice de incidencia nacional (MSPAS, 2021). Sin embargo, la vigilancia pasiva del dengue en América Latina ha subestimado el número de casos por un factor de entre 3.5 y 19 (Sarti, et al., 2016; Castillo, et al., 2020) y, como resultado, es probable que el número de casos subestime la carga real del dengue en Guatemala.



## Zika

El virus Zika (ZIKV), al igual que DENV, pertenece a la familia Flaviviridae y género Flavivirus (+ssARN). Este fue identificado en Uganda en 1947 y su distribución geográfica se limitaba a África y Asia y no fue hasta 2015 que fue llegó al continente americano; lo que representó una emergencia de salud pública de preocupación a nivel internacional, por parte de la OMS. Para finales del 2017, se confirmaron más de 223,000 casos solamente en las Islas del Pacífico y las Américas; pero para el año 2020, al menos 86 países han notificaron pruebas de infección por el ZIKV (Jones, et al., 2020; Wu, et al., 2019; OPS, 2022). En Guatemala, las infecciones causadas por el ZIKV tienen una alta incidencia principalmente en la población pediátrica. Según datos publicados en la Plataforma de Información de Salud para las Américas (PLISA, OPS/OMS), hasta la semana epidemiológica 22 del 2021, de los 6,012 casos de Zika notificados en la región de las Américas, Guatemala presentó la segunda proporción más alta de casos sospechosos (522 casos) lo que representa un 9% del total. No obstante, a partir de 2020 se observa una disminución en el número de casos de Zika notificado lo cual coincide con el inicio de la pandemia causada por COVID-19; se propuso que esto se debe a que la saturación de los servicios de salud pudo haber afectado la capacidad de vigilancia de arbovirosis (Gallo, et al., 2021; OPS/OMS, 2021).

## Chikungunya

En el caso del virus del Chikungunya (CHIKV), este pertenece a la familia Togaviridae y al género Alphavirus, y también es de ARN monocatenario de sentido positivo. Su nombre se deriva de una frase makonde que significa “aquello que se dobla hacia arriba” o “contorsionarse”, haciendo referencia a la postura encorvada de los pacientes afectados (Frolov, Frolova, 2022; Vairo, et al., 2019; Ganesan, et al., 2017). En Guatemala, las infecciones causadas por el CHIKV se consideran enfermedades emergentes debido a que la incidencia de estas ha aumentado considerablemente en la última década. Junto al dengue y zika, este ha sido un punto focal en el proyecto de vigilancia de arbovirosis a nivel nacional.

## B. Biología de mosquitos *Aedes aegypti*

Los mosquitos del género *Aedes* se caracterizan por ser vectores de una amplia gama de infecciones virales; específicamente *Ae. aegypti* es el vector principal a nivel urbano de varias enfermedades humanas causadas por arbovirus, como las causadas por el DENV, ZIKV y CHIKV (Santos, Pereira, 2020).

### 1. Estadíos

El desarrollo del mosquito *Ae. aegypti* consta de cuatro estadíos distintos: huevo, larva, pupa y adulto. En el área urbana, las hembras adultas ponen sus huevos en las paredes internas de ciertos recipientes con agua, por encima de la línea de flotación. Los huevos son pequeños (alrededor de 0.5 mm), elípticos, de color claro en el momento de la oviposición y se oscurecen con el tiempo. Estos han presentado características de resistencia a diferentes condiciones ambientales ya que tienen la capacidad de adherirse firmemente a las paredes de recipientes de diferentes materiales (metal, plástico, cemento, cerámica, caucho, entre otros). Así mismo, se ha observado que tienen alta resistencia a la desecación y pueden permanecer viables hasta 8 meses después de la ovipostura. Sin embargo, en las condiciones adecuadas, la embriogénesis dura en promedio de 2 a 3 días (Carvalho, Moreira, 2017; Day, 2016).

La eclosión de huevos da lugar a larvas, que pasan por cuatro estadios de desarrollo: la L1 y

L2 son larvas inmaduras y jóvenes mientras que las L3 y L4 son adultas y con fase de transición a pupa y adulto. Estos son organismos acuáticos que se alimentan de materia orgánica adherida a las paredes o sedimentos en el fondo del recipiente en el que se encuentran. El tiempo de desarrollo varía según la disponibilidad de alimento y las condiciones ambientales como temperatura y densidad de larvas en el sitio de reproducción. En condiciones óptimas, las larvas pueden completar todos los estadios y entrar en la etapa de pupa en 4 a 5 días. La fase de pupa es una etapa donde el mosquito pasa por una serie de transformaciones internas que culminarán en la formación del adulto. Esta fase dura un promedio de 2 días a 27°C pero puede prolongarse a menores temperaturas (Carvalho, Moreira, 2017; Vasquez, 2009; Luz, et al., 2020).

Finalmente, los adultos emergen lentamente y permanecen en la superficie del agua por varios minutos para luego volar en busca de un refugio cercano (generalmente húmedos y protegidos del viento y la luz). Tanto machos como hembras se alimentan de sustancias azucaradas de origen vegetal, pero las hembras también requieren alimentación de sangre para la maduración de los ovarios y la consiguiente formación de óvulos (Pruszyński, et al., 2020; Carvalho, Moreira, 2017).

## 2. Distribución en Guatemala

En Guatemala, se ha observado prevalencia del vector *Ae. aegypti* en 21 de los 22 departamentos del país. Así mismo, se han reportado la presencia de este en sitios con temperaturas que llegan hasta los 34.8°C, lo que indica que la especie tiene tolerancia a altas temperaturas. Al igual que otros vectores, se ha observado un aumento de la población en los meses de la época lluviosa, donde hay una mayor precipitación; sin embargo, también fue reportado en sitios con baja precipitación anual. En términos de altitud, la especie puede sobrevivir en zonas altas, pero presenta una mayor densidad poblacional en zonas bajas del país (López, 2019; Lepe, et al., 2017; Lepe, et al., 2016).

## C. Sistema digestivo y epitelio intestinal de mosquitos

La transmisibilidad de arbovirus como el DENV, CHIKV y ZIKV se ve determinada por su capacidad de infectar al vector, *Ae. aegypti*, y de poder multiplicarse tanto en este como en mamíferos superiores, como los seres humanos. Las hembras *Aedes* adquieren el virus al tomar sangre de un hospedero vertebrado virémico; luego, se establece la infección en las células epiteliales del mosquito, principalmente las del intestino, para luego propagarse al hemocele y posteriormente a otros tejidos (glándulas salivales, ovarios, sistema nervioso, entre otros) para continuar con la transmisión del virus (Wu, et al., 2019).

### 1. Tipos celulares en dípteros

En dípteros, especialmente en el organismo modelo *Drosophila melanogaster*, el tracto digestivo ha sido ampliamente estudiado. Se determinó que el intestino se divide en tres secciones de origen diferente: intestino anterior, intestino medio e intestino posterior. El intestino medio está compuesto por una sola capa epitelial rodeado por dos capas de músculos viscerales; este consta de enterocitos poliploides (EC), células enteroendocrinas (EE) y células progenitoras no diferenciadas (células madre intestinales, ISC, y enteroblastos, EB) (Hixson, et al., 2021; Lemaitre, Miguel-Alaiga, 2013). A pesar que no se ha estudiado la composición del epitelio intestinal en vectores como *Ae. aegypti*, sí se encontraron grupos de células que expresan marcadores correspondientes a los principales tipos de células descritos en *Drosophila* (Cui, Franz, 2020).

## 2. Regeneración celular en homeostasis e infección

Para mantener un estado homeostático en los diferentes estadios de digestión de sangre, es importante para el mosquito que se mantenga la integridad general del intestino; en este caso las ISC, o células regenerativas, juegan un papel clave. Estas pueden sufrir una división asimétrica, donde se obtiene una ISC y una célula terminalmente diferenciada, para asegurar el mantenimiento de un número constante de ISC; o bien, una división simétrica donde se obtienen dos ISC o dos células diferenciadas (Caccia, et al., 2019; Zhang, et al., 2022).

No obstante, en situaciones de estrés como la digestión de la sangre y la interacción con patógenos virales, el epitelio del intestino medio debe ajustar mecanismos celulares clave, incluida la proliferación y diferenciación celular para garantizar la integridad epitelial y el mantenimiento de la homeostasis. En estudios realizados con mosquitos *Ae. aegypti* infectados con DENV, se observó una inducción de la división celular del intestino medio en cepas de mosquitos susceptibles y refractarias al arbovirus. Sin embargo, la cepa susceptible retrasa la activación del proceso de regeneración en comparación con la cepa refractaria (Taracena, et al., 2018); esto podría indicar una relación entre la resistencia viral y la inducción a la proliferación celular.

## D. Ciclo celular

### 1. Mitosis

El ciclo celular se refiere al proceso por el cual las células se replican y forman dos células nuevas, y este se divide en cuatro fases: G1, S, G2 y M. G1 es la etapa en la que la célula se prepara para dividirse. Luego pasa a la fase S donde la célula copia todo el ADN, (S por “síntesis de ADN”). Después de que se copia el ADN y hay un conjunto adicional completo de todo el material genético, la célula pasa a la etapa G2, donde organiza y condensa el material genético, o comienza a condensar el material genético y se prepara para dividirse. La siguiente etapa es M o mitosis. Aquí es donde la célula realmente divide las dos copias del material genético en las dos células hijas. Una vez completada la fase M, se produce la división celular y quedan dos células, y el ciclo celular puede comenzar de nuevo (Molnar, Gair, 2015).

### 2. Endorreduplicación

Existen casos donde una célula pasa por un proceso de replicación del genoma nuclear en ausencia de mitosis. Esto se conoce como endorreduplicación (*endocycling* en inglés). Esta es una variante común del ciclo celular que generan células poliploides. Existen diferentes variantes, pero todos coinciden en la total ausencia de la fase de citocinesis donde se da la ruptura de la envoltura nuclear (Edgar, et al., 2014).

## E. Tinción inmunocitoquímica

### 1. Fundamento e inmunofluorescencia

Para poder observar y caracterizar las diferentes células presentes en una muestra de tejido, se requiere del uso de la tinción inmunocitoquímica. Esta es una técnica donde se utilizan anticuerpos con etiquetas químicas o fluorescentes para visualizar la expresión y localización de antígenos. En casos de tinciones inmunofluorescentes, se puede realizar una inmunodetección múltiple; es decir, someter

la muestra a diversos anticuerpos con marcadores fluorescentes para que estos sean reconocidos por diferentes antígenos (Lee, Webb, 2022).

## **2. Inmunodetección múltiple**

### **EdU**

El EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) es un análogo de la timidina que se incorpora al ADN de las células en división. Se utiliza para detectar células que se encuentran en proceso de síntesis de ADN; o bien para determinar procesos de proliferación celular (Cavanagh, et al., 2011; Chehrehasa, et al., 2009).

## **3. Tinción de histonas**

El marcaje con anticuerpos de fosfohistona H3 (PH3) se utiliza para determinar la presencia de células en proceso de mitosis.

En este estudio se utiliza para caracterizar ISC debido a que estas tienen la capacidad distintiva de sufrir mitosis; por lo tanto este marcaje permite identificar y determinar el número de células que se dividen (Kim; et al., 2017; Taracena, et al., 2018).

## **4. Tinción con DAPI**

En el caso de las tinciones con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol), estas se realizan con la finalidad de teñir el área nuclear de células muertas. Este compuesto se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN y no puede pasar a través de la membrana celular (Atale, et al., 2014).

## **5. Microscopía confocal**

Para poder observar los diferentes marcajes fluorescentes, se debe utilizar un microscopio confocal. Este utiliza como fuente de iluminación uno o varios láseres, detectores de luz, fotomultiplicadores, y una barrera física, pinhole, que evita llegue al detector luz procedente de los planos diferentes al de foco. La imagen se forma por un barrido punto a punto de la muestra, consiguiendo de esta forma imágenes con mayor resolución (Bayguinov, et al., 2018).

## A. Colecta de mosquitos silvestres

La colecta de mosquitos adultos en reposo se realizó en el interior de las viviendas, y el de pupas y larvas L4, en recipientes tanto en el interior como en el peridomicilio de las viviendas. Se trabajó en dos barrios ubicados en el departamento de Chiquimula, Guatemala, siendo estos Shusho (Barrio A) y Jurgallón (Barrio B), en tres días consecutivos. Todas las muestras fueron transportadas a la Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, Guatemala.

### 1. Mosquitos en estadio de pupa

Utilizando un gotero, se removieron las pupas o larvas L4 presentes en el contenedor y se colocaron en un recipiente con agua destilada. Todos los individuos encontrados en un solo contenedor representan una muestra o un pool. Cada muestra fue registrada en el “FORMULARIO DE DISECCIÓN Y FIJACIÓN DE INTESTINO MEDIO EN LABORATORIO DE MOSQUITOS ADULTO EMERGIDOS DE PUPAS *Aedes aegypti*” [Figura XI.1 en Anexos]. Aquí se anotaron las características identificadas en campo del mosquito, tipo de contenedor de donde fueron recolectados, el sector y localidad de muestreo.

### 2. Mosquitos adultos en reposo

En periodos de 20 minutos, aproximadamente, se recolectaron todos los mosquitos adultos en reposo presentes en el interior de la vivienda. Para esto se utilizaron aspiradores de mochila Prokopack®. Se recolectaron los mosquitos de todas las habitaciones interiores y se colocaron en contenedores debidamente etiquetados con “Especie, características identificadas en campo, fecha y hora de colecta, Barrio, tipo de alimentación, conteo de hembras”. Cada individuo representa una muestra. Cada muestra fue registrada en el “FORMULARIO DE DISECCIÓN Y FIJACIÓN DE INTESTINO MEDIO EN LABORATORIO DE MOSQUITOS ADULTO EN REPOSO *Aedes aegypti*” [Figura

XI.2 en Anexos]. Aquí se anotaron las características identificadas en campo del mosquito, la fecha de colecta, el sector y localidad de muestreo y horario de captura.

### 3. Crianza

La crianza de todas las muestras fue realizada en instalaciones del insectario de la UVG en Guatemala, Guatemala. Tanto los mosquitos adultos colectados en campo como los emergidos a partir de pupas y larvas L4 se criaron en condiciones de laboratorio, hasta el momento de su disección utilizando una cámara de incubación. Las condiciones son las siguientes:

- Temperatura ambiente: 27°C
- Humedad relativa: 70±10 %
- Fotoperíodo: 12:12h (L:O)

#### Pupas y larvas L4

Las muestras se colocaron en bandejas con agua destilada tomando en consideración la temperatura, humedad relativa y tiempo de fotoperíodos ya mencionados. La alimentación de las larvas L4 se realizó el tiempo necesario para cada una, hasta su transición a pupa. El alimento de las larvas se depositó directamente en el contenedor, y en algunos casos fue necesario realizar cambios del agua destilada.

#### Mosquitos adultos

Se separaron los mosquitos *Ae. aegypti* hembra de los macho utilizando un aspirador bucal. Los mosquitos macho fueron almacenados en seco siguiendo el procedimiento del POE 4 “Preservación y almacenamiento de mosquitos” [Anexo 3].

Los mosquitos hembra permanecieron en los contenedores previamente rotulados para su crianza, tomando en consideración la temperatura, humedad relativa y tiempo de fotoperíodos ya mencionados.

Todos los mosquitos hembra fueron alimentados con una solución de agua azucarada 10 % (para su preparación, ver POE “Preparación de una solución de agua azucarada al 10 %” [Anexo 4]) y con la “solución de alimentación” (EdU 20 mM). Esta última se preparó, en condiciones estériles, siguiendo el POE "Preparación de una solución de agua azucarada al 10 % suplementada con EdU 20 mM"[Anexo 5]

La aplicación de la solución de alimentación y la solución azucarada 10 % se realizó una vez al día. Ambas se realizaron de la siguiente manera:

- Colocar 3mL, aproximadamente, de la solución en un recipiente de plástico.
- Hacer una esfera de algodón de 3cms de diámetro, aproximadamente para cada contenedor de plástico.
- Remojar la esfera en el recipiente y retirar el exceso, de manera que la esfera no gotee.
- Colocar la esfera en la parte superior del recipiente, sobre el sedaso.

El horario de alimentación detallado, según grupo de procesamiento, se encuentra en Anexos [Anexo 6].

## B. Disección de tejido intestinal

La disección de todas las muestras fue realizada en las instalaciones del insectario de la UVG en Guatemala, Guatemala. El horario de disección de cada grupo se encuentra en Anexos [Anexo 7].

Previo a cada disección, se debía preparar una solución PBS (tampón de fosfato salino) [1X]. Para la solución stock 10X, se siguieron los siguientes pasos:

- Colocar 800 mL de agua destilada en un recipiente estéril.
- Agregar 8.0 g de cloruro de sodio (NaCl).
- Agregar 0.2 g de cloruro de potasio (KCl).
- Agregar 1.44 g de fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).
- Agregar 0.245 g de fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).
- Ajustar el pH a 7.4.
- Aforar a 1L con agua destilada.

Luego, se siguió el procedimiento del POE “Disección del intestino de mosquitos adultos silvestres” [Anexo 8].

## C. Fijación de tejido intestinal

La fijación de todas las muestras fue realizada en las instalaciones del insectario de la UVG en Guatemala, Guatemala. Para la fijación del intestino de los mosquitos, se siguió el procedimiento del POE “Disección y fijación del tejido intestinal de mosquitos adultos silvestres” [Anexo 8]. Este se realizó indistintamente si la muestra fue procesada inmediatamente o no. La fijación del intestino permite preservar el intestino hasta 2 semanas.

## D. Almacenamiento de tejido intestinal y cuerpo de mosquitos

El almacenamiento de todas las muestras fue realizada en las instalaciones del insectario de la UVG en Guatemala, Guatemala. Los intestinos disectados y fijados se almacenaron en tubos eppendorf correctamente rotulados con PBS 1X a 4°C. Mientras que el cuerpo del mosquito fue almacenado en tubos eppendorf correctamente rotulados con 500  $\mu\text{L}$  de RNAlater a -20°C.

## E. Envío de muestras

Todas las muestras fueron enviadas por FedEx® al Laboratorio Buchon en la Universidad de Cornell para su análisis posterior.

## F. Confirmación de especie por PCR convencional y electroforesis

Todas las muestras fueron analizadas en las instalaciones del Laboratorio Buchon de la Universidad de Cornell, Ithaca, NY.

### 1. Preparación de muestras y PCR convencional

Cada una de las muestras se analizó de manera individual. En un tubo de PCR de 0.2 mL, se colocó una pata de mosquito. A este se agregaron 20  $\mu$ L del reactivo GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (M712) y 5  $\mu$ L de los primers CP-P1A/forward (5' - GTGGATCCTGTGAACTGCAGGACACATG - 3') y CP-P1B/reverse (5' - TACCCCTAAATTTAAGCATGTTCGACAC - 3'), y se siguió el siguiente programa de PCR.

- Desnaturalización a 95°C por 10 minutos.
- Alineamiento: 34 ciclos
  - 95°C por 1 minuto.
  - 55°C por 30 segundos.
  - 72°C por 1 minuto.
- Elongación a 72°C por 5 minutos.
- Finalización a 12°C (para análisis o almacenamiento).

### 2. Electroforesis de ADN

Se preparó un gel de agarosa 2% con buffer TBE 1X. En el primer y último pozo de cada gel se colocó la escalera de 1Kb Plus DNA Ladder (10787-018) de Invitrogen. Se aplicaron 100V por aproximadamente 40 minutos y finalmente se observó en transiluminador UV. Se esperaba que los mosquitos de la especie *Ae. aegypti* presenten una banda de 365 pb y los de *Ae. albopictus* en 600 bp.

## G. Tinción inmunocitoquímica de tejido intestinal

Todas las muestras fueron analizadas en las instalaciones del Laboratorio Buchon de la Universidad de Cornell, Ithaca, NY.

### 1. Preparación de soluciones

Previo a la inmunotinción de las muestras, se prepararon las siguientes soluciones:

- PBS 1X (pH 7.4)
- PFA 4% en PBS
- Tritón X-100 0.10% en PBS



- Solución de lavado
- Solución de bloqueo
- Solución de tinción de DAPI

#### **Preparación de solución de lavado**

Se colocaron 1000 mL de PBS 1X en un recipiente estéril, a esto se le agregó 1 mL de Tween-20, 2.5 g de BSA (albúmina de suero bovino) y se agitó hasta que la solución era homogénea.

#### **Preparación de solución de bloqueo**

Se colocaron 1000 mL de PBS 1X en un recipiente estéril, luego se agregó 1 mL de Tween-20, 25.0 g de BSA, 100 mL de NDS (suero de burro normal) y se agitó hasta que la solución era homogénea.

#### **Preparación de solución de tinción de DAPI**

Se colocaron 50 mL de PBS 1X en un recipiente estéril, a esto se le agregó 0.05 mL de Tween-20, 0.025 g de DAPI y se agitó hasta que la solución era homogénea.

## **2. Fijación post-envío de tejido intestinal**

Antes de ser procesadas, las muestras pasaron por un segundo paso de fijación. Se cubrió el tejido con PFA 4%, asegurando que el intestino se encontraba extendido de manera uniforme, y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego, se agregaron 250  $\mu$ L de PBS 1X a 4°C.

## **3. Permeabilización**

Tomando en cuenta que todo el procedimiento posterior es fotosensible, las muestras no se expusieron a la luz directa en ningún momento. Para esto, las muestras se cubrieron con papel aluminio.

Se agregaron 10  $\mu$ L de Tritón X-100 0.10% a cada muestra y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos en agitación constante. Luego se realizaron tres lavados con la solución de lavado, dejando reposar por 5 minutos en cada lavado. Se evitó que las muestras se desecaran.

## **4. Preparación y aplicación de solución *Click-it***

La solución *Click-it* se debía preparar inmediatamente antes de utilizarse y a un volumen exacto. Se calcularon 10  $\mu$ L de solución por muestra. Se siguió la siguiente receta agregando los reactivos en orden descendente:

- Click-it EdU rxn buffer 1X (85%)
- CuSO<sub>4</sub> (4%)
- Alexa Fluor Oxide (0.25%)

- Buffer additive 1X (10%).

Luego de preparar la solución, se retiró la solución de lavado de las muestra y se agregó 10  $\mu\text{L}$  de la solución *Click-it*. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos en agitación constante. Luego se realizaron tres lavados con la solución de lavado, dejando reposar por 5 minutos en cada lavado. Se evitó que las muestras se desecaran.

## 5. Bloqueo

Se retiró la solución de lavado de las muestras y se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de la solución de bloqueo. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 hora en agitación constante.

## 6. Tinciones

### Tinción con anticuerpo primario (conejo anti-PH3)

Se retiró la solución de lavado de las muestras y se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución [1:500] del anticuerpo primario. Se dejó incubando a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con la solución de lavado, dejando reposar por 5 minutos en cada lavado.

### Tinción con anticuerpo secundario (burro anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 555)

Se retiró la solución de lavado de las muestras y se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución [1:2000] del anticuerpo secundario. Se dejó incubando a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego, se realizaron tres lavados con la solución de lavado, dejando reposar por 5 minutos en cada lavado.

### Tinción con DAPI

Se retiró la solución de lavado de las muestras y se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución de tinción DAPI. Se dejó incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego, se realizó un lavados con la solución de lavado.

## 7. Montaje

En un portaobjetos limpio y debidamente rotulado, se ordenaron entre 8 y 10 muestras. Luego, se retiró la solución de lavado del portaobjetos. Se colocó una gota de medio de montaje sobre las muestras y sobre ellas un cubreobjetos de manera que no quedaran burbujas atrapadas. Finalmente se sellaron los bordes del cubreobjetos con esmalte transparente.

## H. Análisis de tejido intestinal por microscopía confocal

Todas las muestras fueron analizadas en las instalaciones del Laboratorio Buchon de la Universidad de Cornell, Ithaca, NY. Haciendo uso del microscopio invertido confocal fluorescente Zeiss LSM 700 del Laboratorio Buchon de la Universidad de Cornell, se tomaron fotografías del intestino anterior, medio y posterior de cada una de las muestras. Cada fotografía cuenta con tres canales (azul – DAPI; rojo – PH3; verde – EdU) y entre 5 a 10 fotos en el plano Z.

## I. Conteo de células

Utilizando el software ImageJ2/Fiji (v. 2.3.0/1.53f) se procesaron cada una de las imágenes para obtener una compilación de las imágenes del plano Z, con los tres canales ya mencionados. Posteriormente, se realizó el conteo de las células totales (canal azul), las células que se encuentran en mitosis (canal rojo) y las que se encuentran en síntesis de ADN/endorreduplicación (canal verde). Además, se obtuvo el área total del tejido intestinal.

A partir de los datos obtenidos previamente, se calculó el porcentaje de células en mitosis (PH3+) y las que se encuentran en síntesis de ADN/endorreduplicación (EdU+).

## J. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron comparados con una base de datos, provista por el Laboratorio Buchon de la Universidad de Cornell, de mosquitos hembra *Ae. aegypti* criados en condiciones de laboratorio y alimentados únicamente con solución de azúcar. Las muestras de estas bases de datos serán los «mosquitos de laboratorio» o «cepas de laboratorio». Con base a estos, se realizó un análisis de estadística descriptiva e inferencial, mediante pruebas no paramétricas, específicamente la prueba de Kruskal-Wallis.

### A. Optimización de protocolo de procesamiento de tejido intestinal de mosquitos silvestres

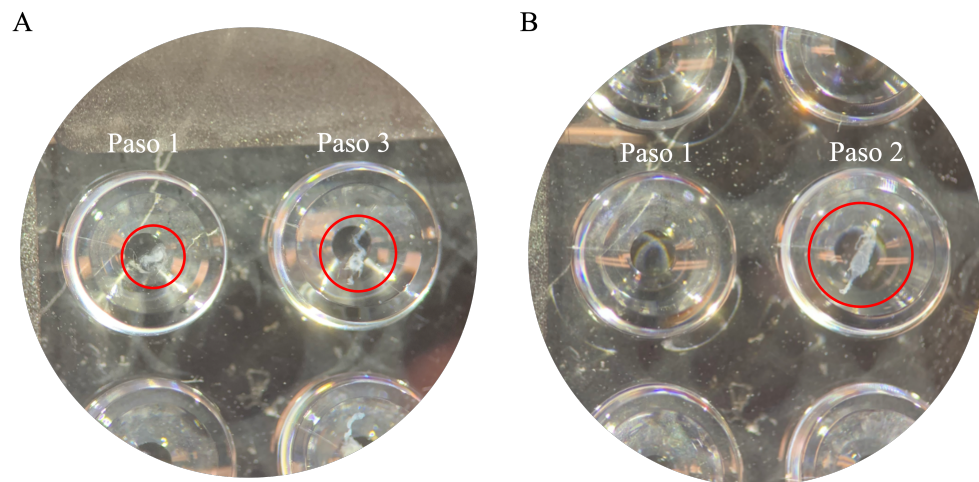


Figura VI.1: Muestra de tejido epitelial antes (A) y después (B) de la optimización del protocolo.

En la Figura VI.1, se pueden observar el «Paso 1», «Paso 2» y «Paso 3» de la metodología para el procesamiento del tejido intestinal. Estas se refieren a las secciones de «Fijación de tejido intestinal», «Fijación post-envío de tejido intestinal» y «Permeabilización» respectivamente en la sección de Metodología.

Previo a la optimización, el procedimiento a realizar constaba de la disección y «Fijación de los

intestinos» (Paso 1) en el insectario de la UVG, para su posterior envío al laboratorio Buchon. Luego, al iniciar las tinciones, se realiza la «Permeabilización» (Paso 3). Sin embargo, con este procedimiento se observó que la muestra era frágil, difícil de manipular y se separaba fácilmente [Figura VI.1.A]. Debido a esto, se realizó la incorporación de un paso de «Fijación post-envío» (Paso 2) antes de la «Permeabilización» (Paso 3). Esta modificación en el protocolo permitió que la manipulación de las muestras fuera más fácil. Como se puede observar en la Figura VI.1.B el tejido se encuentra íntegro, lo cual permitió su procesamiento posterior.

## B. Confirmación de especie de mosquitos silvestres

Cuadro VI.1: Conteo de mosquitos y especies confirmadas

<b>Especie</b>	<b>Cantidad de muestras</b>
<i>Ae. aegypti</i>	142
<i>Ae. albopictus</i>	2
<i>Culex quinquefasciatus</i>	63

A partir de 207 muestras viables se logró identificar 142 mosquitos pertenecientes a *Ae. aegypti*. Además de 2 que pertenecen a *Ae. albopictus* y 63 a *Culex quinquefasciatus*. En la Figura XI.5, en la sección de Anexos, se puede observar las muestras de referencia para la confirmación de especies utilizado en el Laboratorio Buchon. Además en el Anexo 10 se pueden observar los geles de agarosa 2% realizados para la genotipificación.

### C. Identificación de tipos celulares, células en mitosis y replicación de ADN

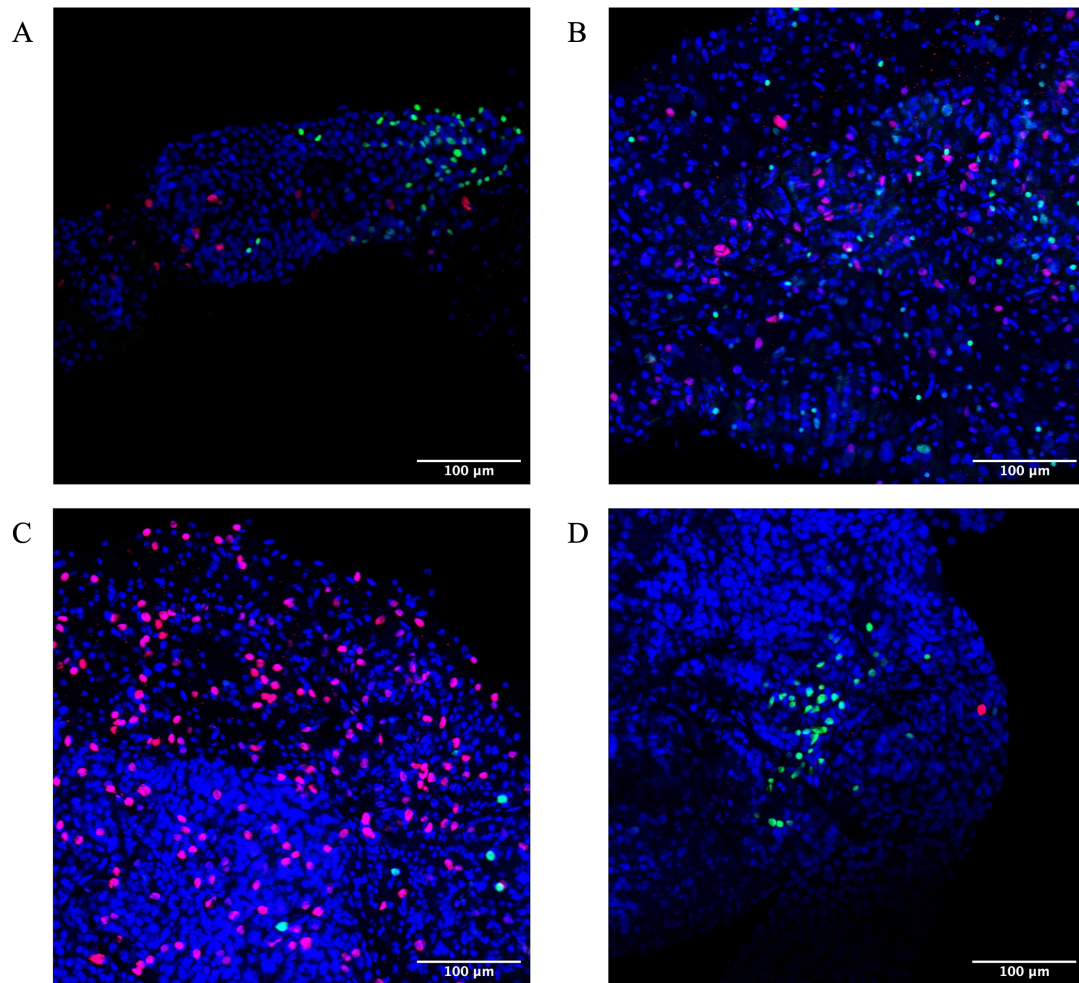


Figura VI.2: Dinámica celular del intestino medio de mosquitos *Ae. aegypti* silvestres (A) grávida, (B) sin sangre, (C) semigrávida y (D) alimentadas con solución de azúcar. Aquí se observan: de color azul, células del epitelio, de verde, células EdU+ y de rojo, células PH3+.

En la Figura VI.2 se encuentran las fotografías microscópicas del epitelio intestinal de los diferentes grupos de estudio. En todos fue posible observar tanto células en proceso de síntesis de ADN/endorreduplicación (EdU+), como en mitosis (PH3+). Sin embargo, la proporción de estas células varía de apreciable en cada uno de los grupos. Además fue posible observar, en tres muestras aisladas, células que eran EdU+ y PH3+; en todas se observó una sola célula EdU+PH3+ [Anexo 11]. No obstante, el porcentaje final de estas no es suficiente para hablar a nivel de población.

## D. Diferencias entre mosquitos silvestres y alimentados con solución de azúcar

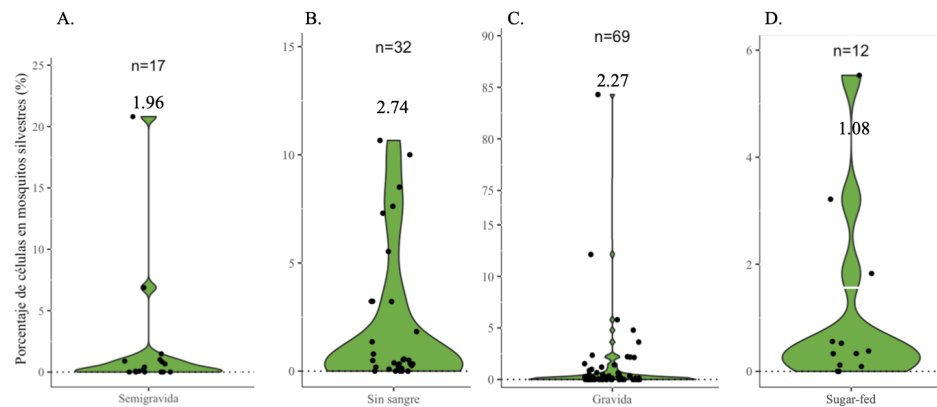


Figura VI.3: Distribución de datos obtenidos de los porcentajes de células EdU+, y su promedio, en mosquitos (A) semigrávidas, (B) sin sangre, (C) grávidas y (D) alimentadas con solución de azúcar. n = número de muestras en el grupo de estudio

En la Figura VI.3 se puede observar la distribución de los porcentajes de células EdU+ obtenidas en los diferentes grupos de estudio. El grupo de mosquitos «sin sangre» presentó la media más alta de todos los grupos, seguida del grupo «grávida», luego de «semigrávida» y finalmente el grupo «alimentadas con solución de azúcar» presentó la media más baja de todas. Aquí también se puede apreciar la distribución de los datos; en todos los grupos, la mayoría se agrupa en el rango de 0 – 2%.

Cuadro VI.2: Estadística descriptiva de porcentaje de células EdU+ en mosquitos silvestres y criados en laboratorio

Crianza	n	Media ( $\pm$ DE) [%]	Intervalo de confianza de 95.0 % (%)
Laboratorio	79	10.720 ( $\pm$ 19.132)	6.435 - 15.006
Silvestres	118	2.182 ( $\pm$ 8.446)	0.642 - 3.722

A partir de la información presente en el Cuadro VI.2, se puede decir que el grupo de mosquitos criados en el laboratorio presentaron un porcentaje de células EdU+ cinco veces mayor a la observada en los mosquitos silvestres. Esto quiere decir que los mosquitos criados en laboratorio pasan por un proceso de síntesis de ADN/endorreduplicación más constantemente que los mosquitos silvestres. Además, ambos grupos presentaron una alta variabilidad en los datos, pero los mosquitos criados en laboratorio presentaron una mayor variabilidad en cuanto a los porcentajes de células EdU+.

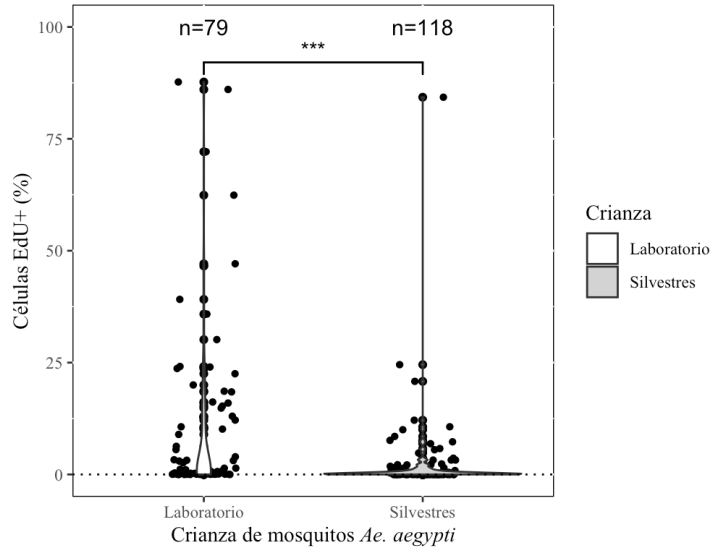


Figura VI.4: Porcentaje de células EdU+ en mosquitos silvestres criados en laboratorio. Clave de significancia: valor  $P < 0.0001$  «\*\*\*»; n = número de muestras en el grupo de estudio

En la Figura VI.4 se puede observar la distribución de los porcentajes de células EdU positivas en mosquitos silvestres y criados en laboratorio. Aquí se observó que el grupo de mosquitos de laboratorio (n=79), con una media de 10.720% células EdU+, presenta una alta variabilidad en cuanto a la distribución de los datos. Por otra parte los mosquitos silvestres (n=118), con una media de 2.182% células EdU+, presenta la mayoría de los datos agrupados entre el rango de 0 - 5%. Además, se observó una diferencia significativa entre los dos grupos, la cual es soportada por la prueba de Kruskal-Wallis [Anexo 12]; esto indica que la cantidad de células EdU+ observada en ambos grupos es significativamente diferente.

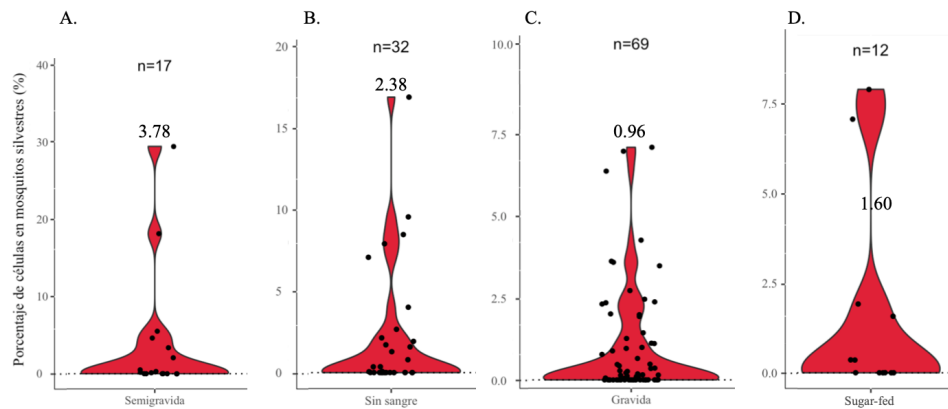


Figura VI.5: Distribución de datos obtenidos de los porcentajes de células PH3+, y su promedio, en mosquitos (A) semigrávidas, (B) sin sangre, (C) grávidas y (D) alimentadas con solución de azúcar. n = número de muestras en el grupo de estudio

En la Figura VI.5 se puede observar la distribución de los porcentajes de células PH3+ obtenidas en los diferentes grupos de estudio. El grupo de mosquitos «semigrávida» presentó la media más alta



de todos los grupos, seguida del grupo «sin sangre», luego de «alimentadas con solución de azúcar» y finalmente el grupo «grávida» presentó la media más baja de todas. Aquí también se puede apreciar la distribución de los datos; en todos los grupos, la mayoría se agrupa en el rango de 0 - 2%.

Cuadro VI.3: Estadística descriptiva de porcentaje de células PH3+ en mosquitos silvestres y criados en laboratorio

Crianza	n	Media ( $\pm$ DE)	Intervalo de confianza de 95.0%
Laboratorio	45	0.530 ( $\pm$ 1.204)	0.168 - 0.891
Silvestres	118	1.673 ( $\pm$ 3.903)	0.962 - 2.385

A partir de la información presente en el Cuadro VI.3, se puede decir que el grupo de mosquitos silvestres presentaron un porcentaje de células PH3+ tres veces mayor a la observada en los mosquitos de laboratorio. Esto quiere decir que los mosquitos silvestres pasan por un proceso de proliferación celular, o mitosis, más constantemente que los mosquitos de laboratorio. Además, ambos grupos presentaron una alta variabilidad en los datos, pero los mosquitos criados en laboratorio presentaron una mayor variabilidad en cuanto a los porcentajes de células PH3+.

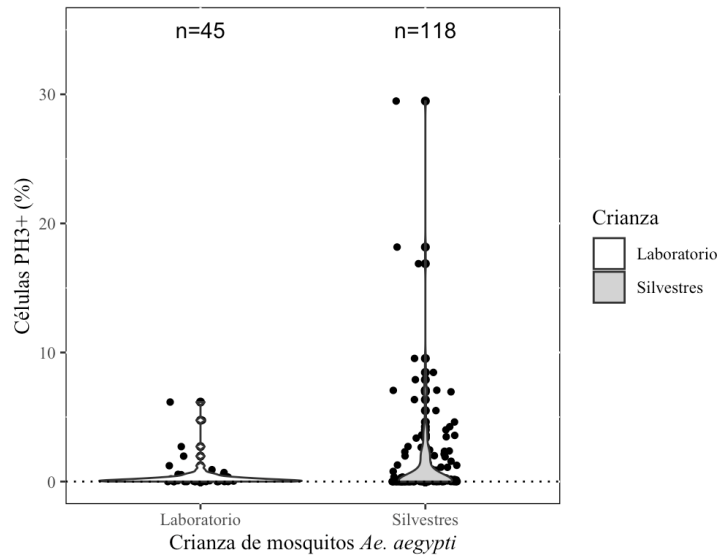


Figura VI.6: Porcentaje de células PH3 positivas en mosquitos silvestres criados en laboratorio. n = número de muestras en el grupo de estudio

En la Figura VI.6 se puede observar la distribución de los porcentajes de células PH3 positivas en mosquitos silvestres y criados en laboratorio. Aquí se observó que el grupo de mosquitos de laboratorio (n=45), con una media de 0.530% células PH3+, presenta la mayoría de los datos agrupados entre el rango de 0 - 3%. Por otra parte los mosquitos silvestres (n=118), con una media de 1.673% células PH3+, presenta una alta variabilidad en cuanto a la distribución de los datos. Además, aquí no se observó una diferencia significativa entre los dos grupos al realizar la prueba de Kruskal-Wallis [Anexo 12]; esto indica que no es posible afirmar que la cantidad de células PH3+ observada en ambos grupos es significativamente diferente.

---

## . DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

A partir de 207 muestras viables del cuerpo completo de mosquitos silvestres, se logró identificar que 142 mosquitos eran pertenecientes a la especie de interés, *Ae. aegypti*. Además de 2 que pertenecen a *Ae. albopictus* y 63 a *Culex quinquefasciatus*. Esto asegura que todas las muestras de tejido epitelial analizadas pertenecen a mosquitos silvestres de la especie *Ae. aegypti*.

Debido a que hasta el momento no se han realizado estudios de proliferación celular del epitelio intestinal en mosquitos silvestres, los protocolos existentes para el procesamiento de este tejido deben pasar por una optimización y validación. En este proyecto se optimizó la metodología descrita en el estudio realizado por Taracena, et al., (2018).

Previo a la optimización, el procedimiento a realizar constaba de la disección y «Fijación de los intestinos» (Paso 1) en el insectario de la UVG, para su posterior envío al laboratorio Buchon. Luego, al iniciar las tinciones, se realiza la «Permeabilización» (Paso 3). Sin embargo, con este procedimiento se observó que la muestra era frágil, difícil de manipular y se separaba fácilmente. Esto se puede observar en la Figura VI.1.A, pues en el «Paso 1» se encuentra el epitelio intestinal separado del tejido muscular, el cual se encuentra en el pozo del «Paso 3». Se infiere que las condiciones y el tiempo de envío influyó en la calidad del tejido; pues, después de la fijación de este, se requirió de al menos 15 días para que estas llegaran al Laboratorio Buchon. Esto aunado a los procesos de congelación y descongelación, se infiere que la integridad de la monocapa del epitelio intestinal se vio comprometida, provocando su desprendimiento de las células musculares. Sin embargo, no se ha observado un comportamiento similar en la literatura. De cualquier manera, surgió la necesidad de realizar la optimización de este procedimiento para el análisis de las muestras. Debido a esto, se realizó la incorporación de un paso de «Fijación post-envío» (Paso 2) antes de la «Permeabilización» (Paso 3). Esta modificación en el protocolo permitió que la manipulación de las muestras se viera facilitado. Es posible afirmar que el procedimiento descrito en este proyecto es eficaz para la obtención y preparación de tejido del epitelio intestinal de mosquitos silvestres ya que, luego de realizar la optimización, se observó un cambio en la naturaleza de las muestras. En la Figura VI.1.B se puede observar que el tejido intestinal se encuentra íntegro al inicio de la fase de permeabilización; por lo que las muestras se encontraban en condiciones óptimas para su posterior análisis.

Luego del análisis de microscopía confocal, se debió confirmar que en las muestras de tejido se encontraba la monocapa del epitelio intestinal. Mediante las tinciones inmunocitoquímicas se logró

identificar de manera certera las ISCs, debido a que son estas las que pasan por un proceso de proliferación celular (Cui, Franz, 2020). Así mismo, se logró determinar una dinámica diferenciada en cada grupo de estudio. Los mosquitos clasificados como «grávidas», «sin sangre», «semigrávidas» y «pupas» presentaron tanto células EdU+ como PH3+ [Figura VI.2]. Esto quiere decir que las ISCs del epitelio intestinal de estos mosquitos pasaron por un proceso de replicación de ADN o endorreduplicación (EdU+) y de mitosis (PH3+) (Taracena, et al., 2018; Kim, et al., 2017; Chehrehasa, et al., 2009).

No obstante la distribución de los resultados obtenidos varió según la clasificación del mosquito. En la Figura VI.3 se puede observar la distribución de los porcentajes de células EdU+ obtenidas en los diferentes grupos de estudio. El grupo de mosquitos «sin sangre» presentó la media más alta de todos los grupos, seguida del grupo «grávida», luego de «semigrávida» y finalmente el grupo «alimentadas con solución de azúcar» presentó la media más baja de todas. Además, en cuanto a las células en proceso de mitosis (PH3+), el grupo con la media más alta de todas fue el grupo de «semigrávidas», seguida del grupo «sin sangre», luego de «alimentadas con solución de azúcar» y finalmente el grupo «grávida» presentó la media más baja de todas. Estos resultados indican que los grupos «sin sangre» y «semigrávidas» presentan una tasa de síntesis de ADN/endorreduplicación y de mitosis, respectivamente, más alta que cualquier otro grupo de estudio. Asumiendo que todos los mosquitos silvestres analizados pasaron por al menos una alimentación con sangre antes de ser colectados, los mosquitos se encuentran en una fase tardía del proceso de digestión (8-36h después de la alimentación). La alimentación con sangre en los mosquitos induce la producción y secreción de enzimas digestivas en el intestino medio, lo que provoca la descomposición de las proteínas de la sangre en péptidos y aminoácidos esenciales para el desarrollo del huevo (Li, et al., 2019). Además de esto, las células del epitelio intestinal pasan por estrés oxidativo causado por el precursor de las especies reactivas de oxígeno (ROS), el anión radical superóxido ( $O^{2\bullet-}$ ), que es el producto de la reducción de un electrón del oxígeno molecular presente en la hemoglobina (Gwozdinski, et al., 2021). La exposición a agentes causantes de estrés celular pueden provocar daños en el ADN de las células del tejido; por lo tanto, para mantener la homeostasis, las células con ADN posiblemente dañado pasan por un proceso de proliferación celular. Por lo tanto, se puede afirmar que los mosquitos «sin sangre» y «semigrávidas» pasaron por un proceso de síntesis de ADN/endorreduplicación y mitosis, respectivamente, debido a la exposición a agentes causantes de estrés celular y deben ser reemplazadas.

Así mismo, la exposición a partículas de agentes virales también representan una amenaza a la integridad de las moléculas del ADN del tejido epitelial. Debido a la posición geográfica y la temporada de la colecta de los mosquitos, es probable que estos sean vectores activos de arbovirus, como el DENV. Las altas tasas de replicación de ADN/endorreduplicación y mitosis observadas, aunado a lo observado en otros estudios, podría indicar que estos mosquitos son susceptibles a virus (Behura, et al., 2011; Taracena, et al.). Sin embargo, no es posible afirmar que este es el caso para las muestras procesadas en este proyecto; por lo que se recomienda realizar la detección de patógenos virales, específicamente el DENV.

Finalmente se realizó la comparación entre los resultados de las muestras silvestres y las criadas en condiciones de laboratorio. En cuanto a los porcentajes de células EdU+, se puede decir que ambos grupos presentan una alta variabilidad. A pesar de ello, al realizar un análisis de Kruskal-Wallis se determinó un valor-P de  $2.913 \times 10^{-06}$ , lo que indica una diferencia significativa entre ambos grupos. Así mismo, al observar los porcentajes de células PH3+, también se puede decir que ambos grupos presentan una alta variabilidad, pues las desviaciones estándar son mayores a los datos de la media aritmética [Cuadro VI.3]. No obstante, la prueba de Kruskal-Wallis indicó un valor-P de 0.609, por lo que no existe una diferencia significativa entre ambos grupos.

Debido a que se observó una diferencia significativa entre las células EdU+ de los mosquitos silvestres y los de laboratorio, pero no se observó una diferencia significativa entre las células PH3+, es posible afirmar que el comportamiento observado en células EdU+ es causado por un proceso de endorreduplicación. Las células que pasan por un proceso de mitosis y replicación de ADN presentan

tanto coloración verde como coloración roja [ejemplo en Anexo 11], por lo tanto, las células que sólo presentan la coloración verde (EdU+) se encuentran en endoreduplicación.

## CAPÍTULO VIII

---

### . CONCLUSIONES

---

- Se optimizó un protocolo para la obtención y preparación de tejido del epitelio intestinal de mosquitos silvestres
- Se identificaron células madre intestinales (ISCs) en el epitelio intestinal de los mosquitos hembra *Ae. aegypti* silvestres.
- Se identificaron células en procesos de mitosis y endorreduplicación del epitelio intestinal de los mosquitos hembra *Ae. aegypti* silvestres.
- Al comparar el comportamiento de regeneración celular entre poblaciones alimentadas con sangre y solución de azúcar, se determinó una diferencia significativa entre los porcentajes de células EdU+ de ambos grupos.

## CAPÍTULO IX

---

### RECOMENDACIONES

---

Se propone realizar la detección de ARN viral, específicamente de DENV, en el intestino medio de los mosquitos silvestres para evaluar una posible correlación entre la cantidad de células EdU+, PH3+ y la presencia o ausencia de un patógeno.

- Atale, N., Gupta, S., Yadav, U. C. S., Rani, V. (2014) Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *Journal of microscopy*, 255(1), 7–19. <https://doi.org/10.1111/jmi.12133>
- Bayguinov, P. O., Oakley, D. M., Shih, C. C., Geanon, D. J., Joens, M. S., Fitzpatrick, J. (2018). Modern Laser Scanning Confocal Microscopy. *Current protocols in cytometry*, 85(1), e39. <https://doi.org/10.1002/cpcy.39>
- Behura, S. K., Gomez-Machorro, C., Harker, B. W., Debruyne, B., Lovin, D. D., Hemme, R. R., ... Severson, D. W. (2011). Global cross-talk of genes of the mosquito *Aedes aegypti* in response to dengue virus infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(11), e1385. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001385>
- Benelli G. (2015). Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medical and veterinary importance: a systematic review. *Parasitology research*, 114(9), 3201–3212. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4656-z>
- Caccia, S., Casartelli, M., Tettamanti, G. (2019). The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell and Tissue research*, 377(3), 505–525. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03076-w>
- Carvalho, F. D., Moreira, L. A. (2017). Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species?. *Neotropical entomology*, 46(3), 243–255. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0520-4>
- Castillo Signor, L. D. C., Edwards, T., Escobar, L. E., Mencos, Y., Matope, A., Castaneda-Guzman, M., Adams, E., Cuevas, L. E. (2020). Epidemiology of dengue fever in Guatemala. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(8), e0008535. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008535>
- Cavanagh, B. L., Walker, T., Norazit, A., Meedeniya, A. C. (2011). Thymidine analogues for tracking DNA synthesis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(9), 7980–7993. <https://doi.org/10.3390/molecules16097980>
- Chehrehasa, F., Meedeniya, A. C., Dwyer, P., Abrahamsen, G., Mackay-Sim, A. (2009). EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *Journal of neuroscience methods*, 177(1), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.10.006>
- Cui, Y., Franz, A. (2020). Heterogeneity of midgut cells and their differential responses to blood meal ingestion by the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 127, 103496. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103496>
- Day J. F. (2016). Mosquito Oviposition Behavior and Vector Control. *Insects*, 7(4), 65. <https://doi.org/10.3390/insects7040065>
- Edgar, B. A., Zielke, N., Gutierrez, C. (2014). Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(3), 197–210.

- <https://doi.org/10.1038/nrm3756>
- Freund, K. B., Sarraf, D., Mieler, W. F., Yannuzzi, L. A. (2017). Infection In: K. Bailey Freund (Ed.) *The Retinal Atlas E-Book* (2 ed., pp. 399-492). Elsevier Health Sciences.  
<https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323287920000053>
- Frolov, I., Frolova, E. I. (2022). Molecular Virology of Chikungunya Virus. *Current topics in microbiology and immunology*, 435, 1–31. [https://doi.org/10.1007/82\\_2018\\_146](https://doi.org/10.1007/82_2018_146)
- Gallo, D., Chúa, C., Alvizures, L., De-León, A., Díaz, J., Escobar, C., Guillén, M., Guerra, M., Mux, L., Sierra, M. (2021) Enfermedades transmitidas por vectores en niños: Dengue, Zika, Chikungunya, Malaria y Chagas en Guatemala. *Revista Médica, Colegio de Médicos y Cirujanos de Guatemala*, 2(13), 101-107. <https://doi.org/10.36109/rmg.v160i2.333>
- Ganesan, V. K., Duan, B., Reid, S. P. (2017). Chikungunya Virus: Pathophysiology, Mechanism, and Modeling. *Viruses*, 9(12), 368. <https://doi.org/10.3390/v9120368>
- Gwozdziński, K., Pieniazek, A., & Gwozdziński, L. (2021). Reactive Oxygen Species and Their Involvement in Red Blood Cell Damage in Chronic Kidney Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 6639199. <https://doi.org/10.1155/2021/6639199>
- Hixson, B., Taracena, M. L., Buchon, N. (2021). Midgut Epithelial Dynamics Are Central to Mosquitoes' Physiology and Fitness, and to the Transmission of Vector-Borne Disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 653156. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.653156>
- Jones, R., Kulkarni, M. A., Davidson, T., RADAM-LAC Research Team, Talbot, B. (2020). Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: A scoping review of entomological studies on Zika, dengue and chikungunya virus vectors. *PloS one*, 15(2), e0220753. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220753>
- Kim, J. Y., Jeong, H. S., Chung, T., Kim, M., Lee, J. H., Jung, W. H., Koo, J. S. (2017). The value of phosphohistone H3 as a proliferation marker for evaluating invasive breast cancers: A comparative study with Ki67. *Oncotarget*, 8(39), 65064–65076. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17775>
- Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., Moore, C. G., Carvalho, R. G., Coelho, G. E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I. R., Teng, H. J., Brady, O. J., Messina, J. P., Pigott, D. M., Scott, T. W., Smith, D. L., Wint, G. R., Golding, N., Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife*, 4, e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Lee, M. S., Webb, T. J., (2022) *Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica: Imágenes de tejidos a través de microscopía óptica*. JoVE, Cambridge. Recuperado de: <https://www.jove.com/es/v/10498>
- Lemaitre, B., Miguel-Aliaga, I. (2013). The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of genetics*, 47, 377–404. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133343>
- Lepe, M., Canet, M., Dávila, A., Villeda, L. (2016) *Cambio climático y vectores de dengue en Guatemala: modelación de escenarios presentes y futuros para toma de decisión epidemiológica*. Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud [PUIIS], Universidad San Carlos. Recuperado de: <https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puiis/INF-2016-03.pdf>
- Lepe, M., Dávila, M., Canet, M., López, Y., Flores, E., Dávila, A., Escobar, L. E. (2017). Distribución de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en Guatemala 2016. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 4(1), 21-31. <http://posgrado.fmvz.usac.edu.gt/wp-content/uploads/2019/02/Distribución-de-Aedes-aegypti-y-Aedes-albopictus-en-Guatemala-2016-.pdf>
- Li, X., Yang, J., Pu, Q., Peng, X., Xu, L., & Liu, S. (2019). Serine hydroxymethyltransferase controls blood-meal digestion in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & vectors*, 12(1), 460. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3714-2>
- López, J. D. S. (2019). Relación espacial entre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) y la enfermedad de dengue en Guatemala. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 28(2), 8-25. <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/07/1005764/relacion-espacial.pdf>
- Liu-Helmersson, J., Brännström, Å., Sewe, M. O., Semenza, J. C., & Rocklöv, J. (2019). Estimating Past, Present, and Future Trends in the Global Distribution and Abundance of the Arbovirus Vector *Aedes aegypti* Under Climate Change Scenarios. *Frontiers in public health*, 7, 148. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00148>




- Luz, T., de Mesquita, L., Amaral, F., Coutinho, D. F. (2020). Essential oils and their chemical constituents against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae. *Acta tropica*, 212, 105705. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105705>
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social [MSPAS] (31 de mayo de 2021) *Situación Epidemiológica de las Arbovirosis en Guatemala*. Recuperado de: <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/2021/salas-situacionales/arbovirosis/ARB-SE-13-2021.pdf>
- Molnar, C., Gair, J. (2015) Introduction to Reproduction at the Cellular Level In: *Concepts of Biology – 1st Canadian Edition*. (1 ed.) BCcampus. Recuperado de: <https://opentextbc.ca/biology/chapter/6-2-the-cell-cycle/>
- Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud [OPS/OMS] (2 de julio de 2021) *Actualización Epidemiológica: Arbovirosis en el contexto de COVID-19, 2 de julio de 2021, Washington, D.C.* OPS/OMS.
- Organización Panamericana de la Salud [OPS] (26 de marzo de 2022) *Zika: Reporte de Casos Acumulados*. Recuperado de: [https://www3.paho.org/data/index.php/es/?option=com\\_content&view=article&id=528:zika-weekly-es&Itemid=353](https://www3.paho.org/data/index.php/es/?option=com_content&view=article&id=528:zika-weekly-es&Itemid=353)
- Pruszyński, C. A., Stenn, T., Acevedo, C., Leal, A. L., Burkett-Cadena, N. D. (2020). Human Blood Feeding by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Florida Keys and a Review of the Literature. *Journal of medical entomology*, 57(5), 1640–1647. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa083>
- Salgado, B. B., de Jesus Maués, F. C., Pereira, R. L., Chiang, J. O., de Oliveira Freitas, M. N., Ferreira, M. S., Martins, L. C., da Costa Vasconcelos, P. F., Ganoza, C., Lalwani, P. (2021). Prevalence of arbovirus antibodies in young healthy adult population in Brazil. *Parasites & vectors*, 14(1), 403. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04901-4>
- Santos, V. S. V., Pereira, B. B. (2020). Low toxicity and high efficacy in use of novel approaches to control *Aedes aegypti*. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, 23(6), 243–254. <https://doi.org/10.1080/10937404.2020.1776655>
- Sarti, E., L’Azou, M., Mercado, M., Kuri, P., Siqueira Jr, J. B., Solis, E., Noriega, F., Ochiai, R. L. (2016). A comparative study on active and passive epidemiological surveillance for dengue in five countries of Latin America. *International Journal of Infectious Diseases*, 44, 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.01.015>
- Sistema de Información Gerencial de Salud [SIGSA] (2019) *Vector Borne Diseases, years 2012 to 2019*. Recuperado de: <https://sigsa.mspas.gob.gt/datos-de-salud/morbilidad/enfermedades-transmitidas-por-vectores>
- Sither, C. B., Hopkins, V. E., Harrison, B. A., Bintz, B. J., Hickman, E. Y., Brown, J. S., Wilson, M. R., Byrd, B. D. (2013). Differentiation of *Aedes atlanticus* and *Aedes tormentor* by restriction fragment length polymorphisms of the second internal transcribed spacer. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 29(4), 376–379. <https://doi.org/10.2987/13-6335.1>
- Taracena, M. L., Bottino-Rojas, V., Talyuli, O. A., Walter-Nuno, A. B., Oliveira, J. H. M., Angleró-Rodríguez, Y. I., Wells, M. B., Dimopoulos, G., Oliveira, P. L., Paiva-Silva, G. O. (2018). Regulation of midgut cell proliferation impacts *Aedes aegypti* susceptibility to dengue virus. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(5), e0006498. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006498>
- Vairo, F., Haider, N., Kock, R., Ntoumi, F., Ippolito, G., Zumla, A. (2019). Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. *Infectious disease clinics of North America*, 33(4), 1003–1025. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.08.006>
- Vasquez, A. (2009) Hidrobombas de infusión para el control larvario de *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti* en contenedores de agua. Universidad de El Salvador. Recuperado de: [https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/675/1/hidrobombas\\_de\\_infusion\\_control\\_larv.pdf](https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/675/1/hidrobombas_de_infusion_control_larv.pdf)
- Wu, P., Yu, X., Wang, P., Cheng, G. (2019). Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. *Expert reviews in molecular medicine*, 21, e1. <https://doi.org/10.1017/erm.2018.6>
- Zhang, W., Lou, Y. R., Zhou, J., He, Z. (2022). Editorial: Stem Cells in Tissue Homeostasis and Disease. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 876060. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.876060>







## C. Anexo 3: Procedimiento de operación estándar (POE): Preservación y almacenamiento de mosquitos

	<b>Procedimiento de Operación Estándar</b> <b>Red de Vigilancia de Resistencia a Insecticidas de</b> <b>Centro América y República Dominicana.</b>	<b>Revisión:</b> <b>Nº 1</b>	<b>POE:</b> <b>BIO4</b>
	<b>Preservación y almacenamiento de mosquitos</b>	<b>Pág.</b> <b>1 de 9</b>	

Preparado por: Carlos Lol Fecha: 3 de febrero, 2020

Revisado por: Norma Padilla Fecha: 16 de noviembre, 2020

Revisado por: David Castañeda Fecha: 25 de noviembre, 2020

Modificado por: Carlos Lol Fecha: 25 de noviembre, 2020

Aprobado por: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

### Introducción


El almacenamiento del material biológico, como individuos adultos para mosquitos del género *Anopheles* y *Aedes*, para el análisis molecular posterior es un paso de vital importancia. El almacenaje adecuado o inadecuado puede hacer toda la diferencia para obtener resultados óptimos y ácidos nucleicos (ADN y ARN) de integridad. Estos ácidos nucleicos permiten determinar si existen mutaciones en sitios blancos de insecticidas, o genes detoxificantes de insecticidas en el mosquito. Esto consecuentemente nos ayuda a dilucidar mejor que está confiriendo la resistencia a insecticidas. El ADN, por su estructura química, es más estable y el almacenamiento puede ser más simple. El ARN necesita condiciones distintas para poder mantener la integridad de este. Mosquitos que se utilizan para extraer ARN normalmente se almacenan con nitrógeno líquido, hielo seco o inmediatamente a -80°C. El RNAlater® es una solución química, no tóxica, que permeabiliza rápidamente el tejido y estabiliza y protege el ARN en individuos no congelados. Este habitualmente se utiliza en condiciones poco ideales o de campo, en donde el acceso a nitrógeno líquido es más restringido. El RNAlater® nos permite preservar y almacenar los individuos y mantener su integridad durante más tiempo con las condiciones que se tiene en el laboratorio para su posterior análisis molecular. La silicagel es un material que tiene propiedades higroscopias, en otras palabras, absorbe la humedad. El material preservado y almacenado para el análisis de ADN es necesario que se conserve lo más seco posible, por esta razón, el uso del silicagel es adecuado para mantener un ambiente libre de humedad y de esta manera preservar a los mosquitos por un largo periodo de tiempo (Torres et al., 2019).

### Objetivo

Preservar y almacenar de manera íntegra mosquitos del género *Anopheles* y *Aedes* para obtener resultados óptimos en su posterior procesamiento molecular.

### Definiciones y acrónimos

- POE: Procedimiento de Operación Estándar.
- RNAlater: Compuesto químico para estabilizar el ARN en tejidos biológicos.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ARN: Ácido ribonucleico

	<b>Procedimiento de Operación Estándar</b> <b>Red de Vigilancia de Resistencia a Insecticidas de</b> <b>Centro América y República Dominicana.</b>	<b>Revisión:</b> <b>Nº 1</b>	<b>POE:</b> <b>BIO4</b>
	<b>Preservación y almacenamiento de mosquitos</b>	<b>Pág.</b> <b>2 de 9</b>	

### Responsabilidades

Es responsabilidad del personal que va a preservar y almacenar los mosquitos para pruebas moleculares entender este POE antes de realizar las operaciones descritas. Si tiene alguna pregunta debe contactar al autor del documento o al encargado del área. Es responsabilidad del encargado del área asegurarse que los miembros firmen que han leído y entendido el POE estándar y aclarar cualquier duda al respecto.

### Procedimiento de operación estándar asociados

- POE “BIO1-Bioensayo de la botella CDC con dosis diagnóstica”
- POE “BIO7-Bioensayo CDC de intensidad”

### Equipo, materiales y reactivos

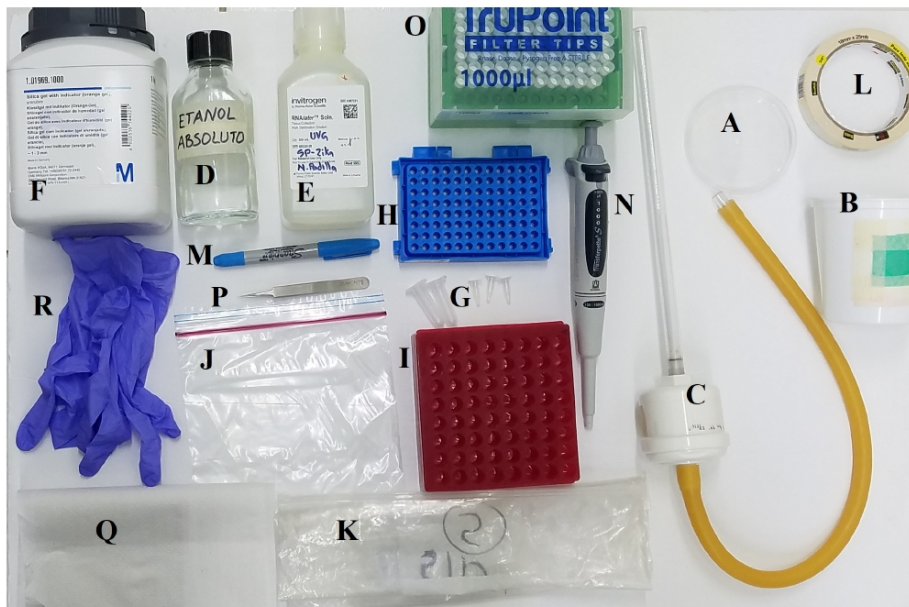




Figura 1. Materiales del A al R necesarios para realizar este procedimiento.

	<b>Procedimiento de Operación Estándar</b> <b>Red de Vigilancia de Resistencia a Insecticidas de</b> <b>Centro América y República Dominicana.</b>	<b>Revisión:</b> <b>Nº 1</b>	<b>POE:</b> <b>BIO4</b>
	<b>Preservación y almacenamiento de mosquitos</b>	<b>Pág.</b> <b>3 de 9</b>	

- A. Caja Petri
- B. Recipiente de contención
- C. Aspirador bucal.
- D. Etanol absoluto
- E. RNAlater
- F. Sílice gel
- G. Tubos de 0.2 y 1.5 mL estériles
- H. Gradillas para tubos de 0.2
- I. Gradillas para tubos de 1.5mL
- J. Bolsas con cierre hermético de (16.5 cm x 14.9 cm)
- K. Bolsas con cierre hermético de 2 galones XL (33cm x 38.1cm).
- L. Masking tape
- M. Marcador permanente de punta ultra fina.
- N. Micropipeta de 1000  $\mu$ L
- O. Puntas bloqueadas y estériles de 1000  $\mu$ L
- P. Pinzas entomológicas
- Q. Papel absorbente
- R. Guantes
- S. Alfiler
- T. Refrigeradora a 4°C
- U. Congelador a -20°C

	<b>Procedimiento de Operación Estándar</b> <b>Red de Vigilancia de Resistencia a Insecticidas de</b> <b>Centro América y República Dominicana.</b>	<b>Revisión:</b> <b>Nº 1</b>	<b>POE:</b> <b>BIO4</b>
	<b>Preservación y almacenamiento de mosquitos</b>	<b>Pág.</b> <b>4 de 9</b>	

## Precauciones y seguridad

- Limpiar la superficie de trabajo con papel absorbente humedecido con etanol al 70% antes y después de preservar los mosquitos.
- Utilizar guantes de nitrilo y bata de laboratorio durante todo el proceso.
- Descartar los desechos biológicos, los guantes y el papel para limpiar el área en una bolsa especial para desechos biopeligrosos y los desechos químicos según indique la ficha de seguridad.

## Procedimiento

### 1. Mosquitos utilizados en bioensayos para extraer ADN

- 1.1. Rotular el material con un marcador permanente con punta ultra fina (tubos de 2mL, recipientes de contención, bolsas con cierre hermético) que se utilizara con la información del bioensayo. Es importante colocar el estatus de los mosquitos almacenados: sobrevivientes, control o susceptible.

**NOTA:** Para rotular los recipientes de contención se recomienda cortar una tira de *masking tape* y escribir en este la información relevante del bioensayo, esta colocarla en la pinta para poder retirarla después, ya que estas son reutilizables.


- 1.2. Perforar con algún objeto punzante pequeño (un alfiler o tachuela) los viales de 2mL previamente rotulados (**Figura 2**). Se realiza una perforación de cada lado del tubo, esto se realiza para que se puedan secar adecuadamente al adicionar la silicagel.



**Figura 2. Vial de 2 mL perforado de cada lado para el almacenamiento de mosquitos.**

- 1.3. Al terminar el bioensayo al tiempo diagnóstico (POE BIO1, POE BIO7), inmediatamente retirar los mosquitos sobrevivientes con el aspirador bucal y colocarlos en un recipiente de contención limpia previamente rotulada con la información del bioensayo.

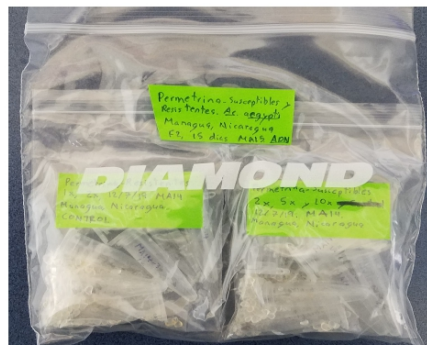


	<b>Procedimiento de Operación Estándar</b> <b>Red de Vigilancia de Resistencia a Insecticidas de</b> <b>Centro América y República Dominicana.</b>	<b>Revisión:</b> <b>Nº 1</b>	<b>POE:</b> <b>BIO4</b>
	<b>Preservación y almacenamiento de mosquitos</b>	<b>Pág.</b> <b>5 de 9</b>	

- 1.4. Colocar el recipiente de contención con los mosquitos sobrevivientes por 10 min a -20°C.
- 1.5. Colocar los mosquitos sobrevivientes en grupos de 5 en un vial estéril de 2mL previamente rotulado.
- 1.6. Realizar el mismo procedimiento con los mosquitos susceptibles y control del bioensayo.

**NOTA:** *Después de almacenar los resistentes se deben almacenar los susceptibles y por último los controles.*

- 1.7. Colocar todos los tubos dentro de una bolsa con cierre hermético de 16.5 cm x 14.9 cm. y agregar aproximadamente 10 mL de sílica gel a la bolsa (**Figura 3**).




**Figura 3.** Bolsa con cierre hermético de 33cm x 38.1 cm con bolsas de cierre hermético de 16.5 x 14.9 cm en el interior. Las bolsas más pequeñas contienen silicagel y los viales de 2 mL con mosquitos.

- 1.8. Sellar la bolsa con cierre hermético y revisar que la información de la bolsa coincida con el material que está siendo almacenado en esta.
- 1.9. Colocar esta bolsa dentro de otra bolsa con cierre hermético de 33cm x 38.1cm y rotular con el código del bioensayo.
- 1.10. Estos mosquitos pueden estar preservados de esta manera por varios años.

**NOTA:** *Si este material se mantendrá almacenado por un largo tiempo, revisar cada tres meses si el sílica gel necesita ser cambiando para evitar la humedad ya que esto puede degradar el material y hacer imposible obtener resultados aceptables.*

## 2. Mosquitos utilizados en bioensayos para extraer ARN

- 2.1. Rotular el material con un marcador permanente con punta ultra fina (tubos de 0.2mL, recipientes de contención, bolsas con cierre hermético) que se utilizara con la información del bioensayo. Es importante colocar el estatus de los mosquitos almacenados: sobrevivientes, control o susceptible.

	<b>Procedimiento de Operación Estándar</b> <b>Red de Vigilancia de Resistencia a Insecticidas de</b> <b>Centro América y República Dominicana.</b>	<b>Revisión:</b> <b>Nº 1</b>	<b>POE:</b> <b>BIO4</b>
	<b>Preservación y almacenamiento de mosquitos</b>	<b>Pág.</b> <b>6 de 9</b>	

**NOTA:** Para rotular los recipientes de contención se recomienda cortar una tira de masking tape y escribir en este la información relevante del bioensayo, esta colocarla en la pinta para poder retirarla después, ya que estas son reutilizables.


- 2.2. Agregar 280 µL de RNAlater al vial de 0.2 mL (**Figura 4**).

**NOTA:** Se recomienda tener viales con RNAlater disponibles y que estos sean utilizados y rotulados conforme se necesiten.



**Figura 4. Viales de 0.2mL con RNAlater®.**

- 2.3. Colocar 20mL etanol absoluto en una caja Petri. Esta será utilizada para sumergir los mosquitos en el etanol, asegúrese de mantener un nivel adecuado de etanol absoluto para este propósito.
- 2.4. Al terminar el bioensayo al tiempo diagnóstico (POE BIO1, POE BIO7), inmediatamente sacar los mosquitos sobrevivientes y colocarlos en un recipiente de contención previamente rotulado.
- 2.5. Aspirar el mosquito con el aspirador bucal y soplelo sobre la caja Petri con etanol absoluto del paso anterior, tratando de que el mosquito quede totalmente sumergido (**Figura 5**).

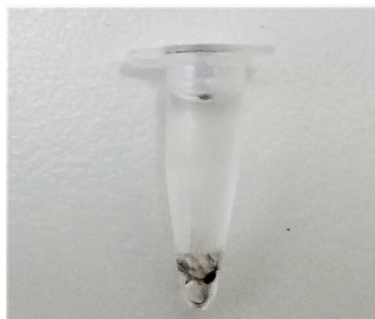
	<b>Procedimiento de Operación Estándar</b> <b>Red de Vigilancia de Resistencia a Insecticidas de</b> <b>Centro América y República Dominicana.</b>	<b>Revisión:</b> <b>Nº 1</b>	<b>POE:</b> <b>BIO4</b>
	<b>Preservación y almacenamiento de mosquitos</b>	<b>Pág.</b> <b>7 de 9</b>	



**Figura 5. Mosquito sumergido en Etanol absoluto colocado en una caja Petri.**


- 2.6. Utilizar una pinza entomológica para remover el mosquito de la caja Petri y seque el exceso de etanol presionando suavemente sin comprometer la integridad del mosquito sobre papel absorbente.
- 2.7. Colocar el individuo en el vial de 0.2 mL con RNAlater, asegurando que el mosquito quede totalmente sumergido en la solución (**Figura 6**).

**NOTA:** *Se almacena solamente un mosquito por tubo.*



**Figura 6. Mosquito individual almacenado en RNAlater® en un vial de 0.2mL.**

- 2.8. Coloque el vial en una gradilla adecuada para viales de 0.2mL. Rotule esta gradilla con la información del bioensayo y si los mosquitos son sobrevivientes, control o susceptibles.
- 2.9. Limpie la pinza con papel absorbente entre cada individuo y repita el procedimiento para todos los individuos.
- 2.10. Al terminar, colocar la gradilla con los tubos en una refrigeradora (4°C) por una noche.

	<b>Procedimiento de Operación Estándar</b> <b>Red de Vigilancia de Resistencia a Insecticidas de</b> <b>Centro América y República Dominicana.</b>	<b>Revisión:</b> <b>Nº 1</b>	<b>POE:</b> <b>BIO4</b>
	<b>Preservación y almacenamiento de mosquitos</b>	<b>Pág.</b> <b>8 de 9</b>	

- 2.11. Al día siguiente, colocar los mosquitos en una bolsa de cierre hermético de 16.9 cm x 14.9 cm, rotulada con el código del bioensayo (**Figura 7**). De igual manera colocar un rotulo con la información del bioensayo escrito con papel y lápiz y colocarlo dentro de la bolsa. Colocar esta bolsa en un congelador a -20°C. En el caso de los mosquitos de la botella control, preservarlos de la misma forma como se indica en este procedimiento.




**Figura 7. Bolsa de 16.9 x 14.9 cm con los viales de mosquitos listos para ser almacenados a -20°C.**

- 2.12. Estos mosquitos pueden almacenarse en estas condiciones hasta por un año sin mostrar degradación del ARN.
- 3. Mosquitos no utilizados en bioensayos para pruebas bioquímicas**
- 3.1. Colocar 30 mosquitos entre 2-5 días de edad adulta en un recipiente limpio y anestésarlos por 5 min a -20°C.
  - 3.2. Colocar los mosquitos individualmente en un vial de 1.5mL.
  - 3.3. Rotular los viales con un código único que haga referencia a la población.
  - 3.4. Almacenar los viales a -20°C hasta no más de 3 meses.


## Referencias

- Pinto J, Palomino M, Mendoza-Uribe L, Sinti C, Liebman KA, Lenhart A. 2019. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in three populations of *Aedes aegypti* from Peru. *Parasites Vectors* 12, 494.
- Silva WF, Wilding CS, Isaacs AT, Rippon EJ, Megy K, Donnelly MJ. 2019. Transcriptomic analysis of insecticide resistance in the lymphatic filariasis vector *Culex quinquefasciatus*. *Scientific Reports*, 9:11406.
- Thermo Fisher Scientific Inc. 2014. RNAlater® Tissue Collection: RNA Stabilization Solution User Guide.

	<b>Procedimiento de Operación Estándar</b> <b>Red de Vigilancia de Resistencia a Insecticidas de</b> <b>Centro América y República Dominicana.</b>	<b>Revisión:</b> <b>Nº 1</b>	<b>POE:</b> <b>BIO4</b>
	<b>Preservación y almacenamiento de mosquitos</b>	<b>Pág.</b> <b>9 de 9</b>	

Torres, M. G., Weakley, A. M., Hibbert, J. D., Kirstein, O. D., Lanzaro, G. C., & Lee, Y. (2019). Ethanol as a potential mosquito sample storage medium for RNA preservation. *F1000Research*, 8, 1431.

## D. Anexo 4: Procedimiento de operación estándar (POE): Preparación de una solución de agua azucarada al 10 %

	<b>Procedimiento de Operación Estándar</b> <b>Red de Vigilancia de Resistencia a Insecticidas de</b> <b>Centroamérica y República Dominicana</b>	<b>Revisión:</b> <b>Nº 1</b>	<b>POE:</b> <b>BIO3</b>
	<b>Preparación de una solución de agua azucarada al</b> <b>10%</b>	<b>Pág.</b> <b>1 de 5</b>	

Preparado por: Carlos Lol Fecha: 17 de noviembre, 2019

Revisado por: David Castañeda Fecha: 19 de noviembre, 2020

Modificado por: Carlos Lol Fecha: 21 de noviembre, 2020

Aprobado por: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

### Introducción

El mantenimiento y crianza de mosquitos depende mucho de una alimentación adecuada. Aunque la hembra adulta necesita alimentación sanguínea para permitir el desarrollo del ovulo, tanto machos y hembras, necesitan una fuente de carbohidratos. Esta fuente de carbohidratos normalmente se provee por medio de una solución azucarada. Distintas concentraciones se han experimentado de agua azucarada, el agua azucarada al 10% parece dar los mejores resultados para mosquitos del género *Anopheles* y *Aedes* (Imam *et al.*, 2014; MR4, 2015; Upshur; 2019; Nepomichene, 2017). Por esto la alimentación de los mosquitos por medio de agua azucarada al 10% es de gran importancia para obtener adultos saludables. Esto nos permite realizar las diferentes pruebas diagnósticas en las cepas y mantener estas cepas por más generaciones en el insectario.

### Objetivo

Proveer la fuente de energía a base de agua azucarada para mosquitos hembras y machos durante su mantenimiento en condiciones de insectario o campo.

### Definiciones y acrónimos


- Solución azucarada: Solución de agua con azúcar de mesa al 10%, la cual es utilizada para proporcionar una fuente de energía a los mosquitos adultos.
- Esterilizar: Proceso por el cual se elimina la presencia de cualquier microorganismo presente en una solución o material de trabajo.

### Responsabilidades

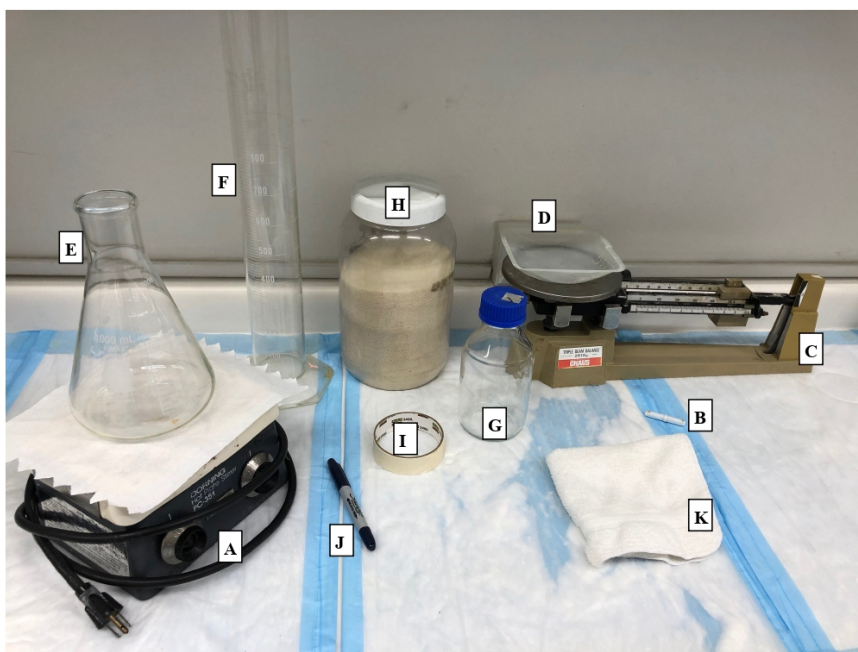
Es responsabilidad del personal que va a preparar la solución azucarada al 10% entender este POE antes de realizar las operaciones descritas. Si tiene alguna pregunta debe contactar al autor del documento o al encargado del área. Es responsabilidad del encargado del área asegurarse que los miembros firmen que han leído y entendido el POE estándar y aclarar cualquier duda al respecto.

### Equipo, materiales y reactivos

- 1 refrigeradora a 4°C
- 1 estufa con agitador magnético
- 1 barra de agitación magnética
- 1 balanza mecánica de triple brazo
- 1 recipiente para pesaje
- 1 Erlenmeyer de vidrio 1000 mL
- 1 probeta de vidrio o plástico de 1000 mL
- 4 botellas de vidrio de 500 mL

	<b>Procedimiento de Operación Estándar</b> <b>Red de Vigilancia de Resistencia a Insecticidas de</b> <b>Centroamérica y República Dominicana</b>	<b>Revisión:</b> <b>Nº 1</b>	<b>POE:</b> <b>BIO3</b>
	<b>Preparación de una solución de agua azucarada al</b> <b>10%</b>	<b>Pág.</b> <b>2 de 5</b>	


- 100 g de azúcar blanca
- 1000 mL de agua embotellada
- 1 rollo de masking tape
- 1 marcador permanente punta ultrafina marca Sharpie
- 1 bata de laboratorio
- 1 guantes para manipular recipientes caliente o una toalla de mano



**Figura 1. Equipo, materiales y reactivos para la preparación de la solución de agua azucarada al 10%.** (A) Estufa con agitador magnético; (B) Barra de agitación magnética; (C) Balanza mecánica de triple brazo; (D) Recipiente para pesar ; (E) Erlenmeyer de 1000 mL; (F) Probeta de 1000 mL; (G) Botella de 500 mL; (H) Azúcar; (I) Rollo de masking tape; (J) Marcador permanente de punta ultrafina; (K) Toalla de mano.

### Precauciones y seguridad

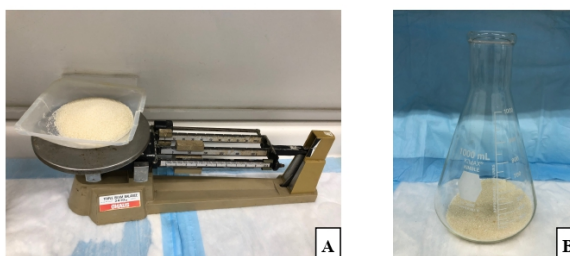
- Utilizar bata durante todo el procedimiento.
- Tener cuidado al manipular el Erlenmeyer después de hervir el agua azucarada.

	<b>Procedimiento de Operación Estándar</b> <b>Red de Vigilancia de Resistencia a Insecticidas de</b> <b>Centroamérica y República Dominicana</b>	<b>Revisión:</b> <b>Nº 1</b>	<b>POE:</b> <b>BIO3</b>
	<b>Preparación de una solución de agua azucarada al</b> <b>10%</b>	<b>Pág.</b> <b>3 de 5</b>	

## Procedimiento

### 1. Preparación de 1000 mL (equivalente a 1 L) de una solución de agua azucarada al 10%

- 1.1. Pesar 100 gramos de azúcar blanca en un recipiente de pesaje utilizando una balanza mecánica de triple brazo (**Figura 2A**), y luego colocarlos en un Erlenmeyer de 1000 mL (**Figura 2B**). En caso quisiera preparar 250 o 500 mL de la solución de agua azucarada al 10%, ver **Cuadro 1**.

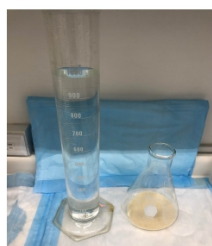


**Figura 2.** (A) Pesaje del azúcar para preparar la solución de agua azucarada al 10%; (B) Colocación del azúcar en el Erlenmeyer.

**Cuadro 1.** Volumen de agua del chorro y gramos de azúcar para preparar 250 o 500 mL de una solución azucarada al 10%.

Concentración (peso/volumen)	Volumen de agua del chorro (mL)	Cantidad de azúcar (gramos)
10%	250	25
	500	50

- 1.2. Seguidamente, medir 1000 mL de agua embotellada con una probeta de plástico o vidrio, y agregarla al Erlenmeyer que contiene el azúcar para disolverla (**Figura 3**).

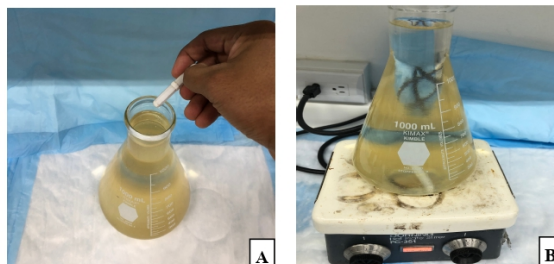


**Figura 3.** Medición de agua para disolver el azúcar.

- 1.3. Colocar dentro del Erlenmeyer una barra de agitación (**Figura 4A**) y colocarlo sobre la estufa con agitador (**Figura 4B**). Agitar al mínimo y calentar la mezcla hasta hervir, esto ayudará a esterilizar la solución azucarada y así evitar posibles contaminaciones de hongos o bacterias.



	<b>Procedimiento de Operación Estándar</b> <b>Red de Vigilancia de Resistencia a Insecticidas de</b> <b>Centroamérica y República Dominicana</b>	<b>Revisión:</b> <b>Nº 1</b>	<b>POE:</b> <b>BIO3</b>
	<b>Preparación de una solución de agua azucarada al</b> <b>10%</b>	<b>Pág.</b> <b>4 de 5</b>	




**Figura 4. (A) Colocación del agitador magnético a la solución de agua azucarada al 10%; (B) Calentamiento y agitación de la solución.**

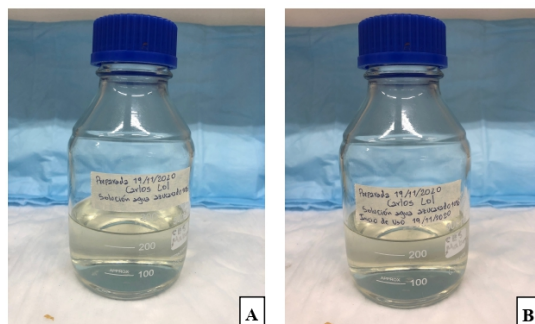
- 1.4. Retirar el Erlenmeyer de la estufa con un guante para material caliente (**Figura 5**) y dejar enfriar a temperatura ambiente por 30 minutos.



**Figura 5. Manipulación de la solución de agua azucarada al 10% después de hervir con una toalla de mano.**

- 1.5. Dividir la solución de agua azucarada al 10% en 4 botellas de vidrio de 250 mL, cada una rotulada con una tira de masking tape con la fecha de preparación y nombre de quién la preparó utilizando un marcador permanente de punta fina (**Figura 6A**).
- 1.6. Posteriormente, almacenar las botellas con la solución azucarada al 10% en una refrigeradora a 4°C.
- 1.7. Al comenzar a usar la primera botella de solución azucarada coloque la fecha en que se inicia para llevar el control del uso de cada una de las botellas (**Figura 6B**).
- 1.8. Una vez abierta una botella, su tiempo de vida es de una semana.

	<b>Procedimiento de Operación Estándar</b> <b>Red de Vigilancia de Resistencia a Insecticidas de</b> <b>Centroamérica y República Dominicana</b>	<b>Revisión:</b> <b>Nº 1</b>	<b>POE:</b> <b>BIO3</b>
	<b>Preparación de una solución de agua azucarada al</b> <b>10%</b>	<b>Pág.</b> <b>5 de 5</b>	



**Figura 6. (A) Botella con la solución de agua azucarada con la fecha en que se preparó; (B) Botella con la solución de agua azucarada al 10% rotulada con la fecha en que se empezó a utilizar.**

## 2. Limpieza material

- 2.1. Todo el material utilizado para la preparación de la solución azucarada al 10% debe ser lavado con una esponja y agua del chorro.
- 2.2. Seguidamente, enjuagar con agua hervida para esterilizar el material y así evitar posibles contaminaciones de hongos o bacterias.
- 2.3. El material se deja secar a temperatura ambiente por una noche o hasta que esté totalmente seco.
- 2.4. Colocar el material en una caja o gabinete para evitar que se ensucie o acumule polvo.

## Control de calidad

No aplica

## Documentación

No aplica

## Referencias


Imam, H., Zarnigar, Sofi, G., & Seikh, A. (2014). The basic rules and methods of mosquito rearing (*Aedes aegypti*). *Tropical parasitology*, 4(1), 53–55. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.129167>

MR4 Methods in Anopheline Research. 2015. Second edition. Center for Disease Control (CDC), Atlanta, GA, USA. 343 pp.

Upshur IF, Bose EA, Hart C, Lahondere C. 2019. Temperature and sugar feeding effect on the activity of a laboratory strain of *Aedes aegypti*. *Insects*, 10(10), 347.

Nepomichene TN, Andrianaivolambo L, Boyer S, Bourguoin C. 2017. Efficient method for establishing F1 progeny from wild populations of *Anopheles* mosquitoes. *Malar J*, 16:21.

## E. Anexo 5: Procedimiento de operación estándar (POE): Preparación de una solución de agua azucarada al 10 % suplementada con EdU 20 mM

	Procedimiento de Operación Estándar	Página <b>1 de 3</b>
	Preparación de una solución de agua azucarada al 10% suplementada con EdU 20 mM	Revisión: N° 1

Preparado por: Alessandra Girard Fecha: 15 de agosto, 2021

### Introducción:

El mantenimiento y crianza de mosquitos depende mucho de una alimentación adecuada. Aunque la hembra adulta necesita alimentación sanguínea para permitir el desarrollo del ovulo, tanto machos y hembras, necesitan una fuente de carbohidratos. Esta fuente de carbohidratos normalmente se provee por medio de una solución azucarada. Distintas concentraciones se han experimentado de agua azucarada, el agua azucarada al 10% parece dar los mejores resultados para mosquitos del género *Anopheles* y *Aedes* (Imam *et al.*, 2014; MR4, 2015; Upshur; 2019; Nepomichene, 2017). Por esto la alimentación de los mosquitos por medio de agua azucarada al 10% es de gran importancia para obtener adultos saludables. Esto nos permite realizar las diferentes pruebas diagnósticas en las cepas y mantener estas cepas por más generaciones en el insectario.

En insectos, la digestión y absorción de nutrientes se lleva a cabo principalmente en el tracto digestivo. El intestino es una de las superficies principales donde tienen lugar los intercambios con el medio exterior, por lo que es un tema estratégico de investigación para el control de insectos (Souza, *et al.*, 2019). En dípteros, el tracto digestivo ha sido ampliamente estudiado. Se ha determinado que el intestino se divide en tres secciones diferentes: intestino anterior, intestino medio e intestino posterior (Lemaitre, Miguel-Alaiga, 2013).

### Objetivos:


- Proveer la fuente de energía base de agua azucarada para mosquitos hembras durante su mantenimiento en condiciones de insectario o campo.
- Realizar el marcaje de células en proceso de mitosis y síntesis de ADN en el intestino medio de mosquitos hembra en estadio adulto.

### Definiciones y acrónimos:

- Solución azucarada: Solución de agua con azúcar de mesa al 10%, la cual es utilizada para proporcionar una fuente de energía a los mosquitos adultos.
- Solución de alimentación: Solución de agua con azúcar de mesa al 10% suplementada con EdU.
- Esterilizar: Proceso por el cual se elimina la presencia de cualquier microorganismo presente en una solución o material de trabajo.
- EdU: 5-etinil-2'-desoxiuridina

### Procedimientos de Operación Estándar Asociados:

- POE "BIO3-Preparación de una solución de agua azucarada al 10%"

	Procedimiento de Operación Estándar	Página <b>2 de 3</b>
	Preparación de una solución de agua azucarada al 10% suplementada con EdU 20 mM	Revisión: Nº 1

### Equipo, materiales y reactivos:


- Refrigeradora a 4°C
- Estufa con agitador magnético
- Barra de agitación magnética
- Balanza electrónica
- Recipiente para pesaje
- Erlenmeyer de vidrio 1000 mL
- Probeta de vidrio o plástico de 1000 mL
- 4 botellas de vidrio de 500 mL
- 100 g de azúcar blanca
- 1000 mL de agua embotellada
- 1 rollo de masking tape
- 1 marcador permanente punta ultrafina marca Sharpie
- 1 bata de laboratorio
- 1 guantes para manipular recipientes caliente o una toalla de mano
- 5 mg EdU marca Invitrogen

### Precauciones y seguridad:

- Utilizar bata durante todo el procedimiento.
- Tener cuidado al manipular el Erlenmeyer después de hervir el agua azucarada.

### Procedimiento:

1. **Preparación de 1000 mL de una solución de agua azucarada al 10%**
  - 1.1. Pesar 100 gramos de azúcar blanca en un recipiente de pesaje utilizando una balanza electrónica y luego colocarlos en un Erlenmeyer de 1000 mL.
  - 1.2. Seguidamente, medir 1000 mL de agua embotellada con una probeta de plástico o vidrio, y agregarla al Erlenmeyer que contiene el azúcar para disolverla.
  - 1.3. Colocar dentro del Erlenmeyer una barra de agitación y colocarlo sobre la estufa con agitador. Agitar al mínimo y calentar la mezcla hasta hervir, esto ayudará a esterilizar la solución azucarada y así evitar posibles contaminaciones de hongos o bacterias.
  - 1.4. Retirar el Erlenmeyer de la estufa con un guante para material caliente y dejar enfriar a temperatura ambiente por 30 minutos.
  - 1.5. Cuando la solución se encuentre a temperatura ambiente, agregar 5 mg EdU y agitar durante 10 minutos, o hasta que se disuelva el soluto.
  - 1.6. Dividir la solución de alimentación en 4 botellas de vidrio de 250 mL, cada una rotulada con una tira de masking tape con la fecha de preparación y nombre de quién la preparó utilizando un marcador permanente de punta fina .
  - 1.7. Posteriormente, almacenar las botellas con la solución de alimentación en una refrigeradora a 4°C.
  - 1.8. Al comenzar a usar la primera botella de solución azucarada coloque la fecha en que se inicia para llevar el control del uso de cada una de las botellas.
  - 1.9. Una vez abierta una botella, su tiempo de vida es de una semana.

	Procedimiento de Operación Estándar	Página <b>3 de 3</b>
	Preparación de una solución de agua azucarada al 10% suplementada con EdU 20 mM	Revisión: N° 1

## 2. Limpieza del material

- 2.1. Todo el material utilizado debe ser lavado con una esponja, jabón y agua corriente.
- 2.2. Seguidamente, enjuagar con agua hervida para esterilizar el material y evitar posibles contaminaciones de hongos o bacterias.
- 2.3. Colocar el material en una caja o gabinete para evitar acumulación de polvo y suciedad.

## Referencias:

- Imam, H., Zamigar, Sofi, G., & Seikh, A. (2014). The basic rules and methods of mosquito rearing (*Aedes aegypti*). *Tropical parasitology*, 4(1), 53–55. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.129167>
- Lemaitre, B., & Miguel-Aliaga, I. (2013). The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of genetics*, 47, 377–404.
- MR4 Methods in Anopheline Research. 2015. Second edition. Center for Disease Control (CDC), Atlanta, GA, USA. 343 pp.
- Nepomichene TN, Andrianaivolambo L, Boyer S, Bourgouin C. 2017. Efficient method for establishing F1 progeny from wild populations of *Anopheles* mosquitoes. *Malar J*, 16:21.
- Souza, R. S., Gama, M., Schama, R., Lima, J., Diaz-Albiter, H. M., & Genta, F. A. (2019). Biochemical and Functional Characterization of Glycoside Hydrolase Family 16 Genes in *Aedes aegypti* Larvae: Identification of the Major Digestive  $\beta$ -1,3-Glucanase. *Frontiers in physiology*, 10, 122.
- Upshur IF, Bose EA, Hart C, Lahondere C. 2019. Temperature and sugar feeding effect on the activity of a laboratory strain of *Aedes aegypti*. *Insects*, 10(10), 347.

**F. Anexo 6: Horario de alimentación según grupo de procesamiento**

Grupo de procesamiento	Día						
	0	1	2	3	4	5	6
Mosquitos adultos silvestres (Grupo A)							
Mosquitos adultos silvestres (Grupo B)							
Mosquitos adultos emergidos de pupas silvestres (Grupo C)							


Figura XI.3: Horario de alimentación según grupo de procesamiento

**G. Anexo 7: Horario de disección según grupo de procesamiento**

Grupo de procesamiento	Día						
	0	1	2	3	4	5	6
Mosquitos adultos silvestres (Grupo A)							
Mosquitos adultos silvestres (Grupo B)							
Mosquitos adultos emergidos de pupas silvestres (Grupo C)							

Figura XI.4: Horario de disección según grupo de procesamiento

## H. Anexo 8: Procedimiento de Operación Estándar: Disec- ción y fijación del tejido intestinal de mosquitos adultos silvestres

	Procedimiento de Operación Estándar	Página 1 de 5
	Diseción y fijación del tejido intestinal de mosquitos adultos silvestres	Revisión: N° 1

Preparado por: Alessandra Girard Fecha: 22 de julio, 2021

### Introducción:

En insectos, la digestión y absorción de nutrientes se lleva a cabo principalmente en el tracto digestivo. El intestino es una de las superficies principales donde tienen lugar los intercambios con el medio exterior, por lo que es un tema estratégico de investigación para el control de insectos (Souza, *et al.*, 2019). El estudio del sistema digestivo y el epitelio intestinal en vectores de enfermedades virales, como lo es *Aedes aegypti*, requieren el uso de técnicas básicas de histología. En dípteros, el tracto digestivo ha sido ampliamente estudiado. Se ha determinado que el intestino se divide en tres secciones diferentes: intestino anterior, intestino medio e intestino posterior (Lemaitre, Miguel-Alaiga, 2013). El intestino anterior está involucrado principalmente en la ingestión, conducción y almacenamiento de alimentos; el intestino medio es donde se realiza el proceso de digestión, y el intestino posterior se encarga de regular la absorción de agua y sales de los productos de desecho (Gusmão, *et al.*, 2007; Shao, *et al.*, 2012).

### Objetivo:

Obtener y preservar el tejido intestinal íntegro de los mosquitos silvestres para su uso posterior en pruebas histológicas.

### Definiciones y acrónimos:

POE: Procedimiento de Operación Estándar

PBS: Tampón de fosfato salino (Phosphate-buffered saline)

PFA: Paraformaldehído


### Procedimientos de Operación Estándar Asociados:

N/A

### Equipo, materiales y reactivos:

#### 1. Materiales:

- Pinza entomológica y estiletes
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Tubos de 1.5 mL estériles
- Gradillas para tubos de 1.5 o 2 mL
- Marcador negro (*Sharpie*) punta ultrafina
- Micropipetas de 20 – 200  $\mu$ L
- Puntas de bloqueadas de 20 – 200  $\mu$ L
- Beaker de 500 mL o recipiente para descarte.
- Bolsas adecuadas para desechos biopeligrosos
- 1 par de guantes de nitrilo
- 1 bata de laboratorio

 UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA	Procedimiento de Operación Estándar	Página 2 de 5
	Disección y fijación del tejido intestinal de mosquitos adultos silvestres	Revisión: N° 1

## 2. Reactivos:

### 2.1. Reactivos para limpieza del área de trabajo:

- Etanol al 70%
- Cloro al 10%

### 2.2. Reactivos para disección y fijación de intestino medio posterior

- PBS [1X] pH 7.4
- Solución de fijación (PFA al 4% en PBS)

## 3. Equipo de laboratorio:

- Estereoscopio
- Congelador a -20°C
- Refrigeradora a 4°C o bandeja fría

## Precauciones y seguridad:

- Limpiar la superficie de trabajo con papel absorbente humedecido con etanol al 70% antes y después de realizar las disecciones y fijaciones de intestinos.
- Utilizar guantes de nitrilo y bata de laboratorio durante todo el proceso.
- Descartar los desechos biológicos, los guantes y el papel para limpiar el área en una bolsa especial para desechos biopeligrosos y los desechos químicos según indique la ficha de seguridad.

## Procedimiento:


### 1. Preparación de material

- 1.1. Buscar las muestras a procesar (no más de 10) y colocar a -20°C por 15 minutos antes de empezar a trabajar. O bien, hasta que se inmovilicen.
- 1.2. Enfriar la solución de PBS 1X a 4°C.
- 1.3. Limpiar el área donde se va a trabajar con etanol 70%
- 1.4. Preparar un beaker de 500 mL con bolsa de desechos biopeligrosos.
- 1.5. Preparar bandeja fría o bandeja con hielo, para la caja petri
- 1.6. Rotular tubos de 2 mL con el ID del mosquito y fecha de disección, para el paso 3.3 y 4.3.

### 2. Disección de intestino medio posterior

- 2.1. Al sacar los mosquitos, rociar con etanol 70%. Y mantener en una caja Petri fría.
- 2.2. Colocar el mosquito, boca arriba, sobre un portaobjetos limpio con una pequeña gota de solución fría PBS 1X.
- 2.3. Con ayuda del estereoscopio y pinzas finas o estiletes, quitar alas y patas. Con un estilete hacer un pequeño corte en el tegumento del [séptimo/cuarto] segmento.
- 2.4. Sosteniendo el tórax con un estilete en la mano izquierda, sin apretar excesivamente, tirar lenta y gradualmente del extremo del abdomen con el estilete en la mano derecha. A continuación, se encuentra un diagrama de la anatomía de un mosquito.



 UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA	Procedimiento de Operación Estándar	Página 3 de 5
	Disección y fijación del tejido intestinal de mosquitos adultos silvestres	Revisión: N° 1

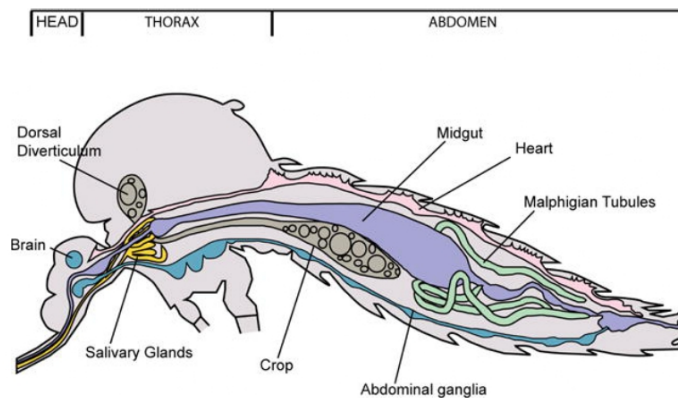



Figura 1. Diagrama de la anatomía de mosquito *Aedes* mostrando la posición de los órganos del sistema digestivo (Schmid, *et al.*, 2017)

- 2.5. Aislar el intestino retirando las demás estructuras (túbulos de Malpighi) y agregar más solución de PBS 1X si es necesario.
- 2.6. El intestino debería verse de la siguiente manera. A la izquierda, el intestino de un mosquito recién alimentado con solución aguamiel 10%. A la derecha el intestino de un mosquito que no ha sido alimentado recientemente.



Figura 2. Mosquito *Aedes aegypti* con el intestino expuesto.

	Procedimiento de Operación Estándar	Página 4 de 5
	Disección y fijación del tejido intestinal de mosquitos adultos silvestres	Revisión: N° 1

2.7. Retirar del portaobjetos todas las partes del cuerpo que no se utilizarán y retirar con cuidado todo el PBS 1X con una micropipeta.

### 3. Fijación del intestino

3.1. Cubrir el tejido con solución de fijación. Asegurarse que este se encuentre extendido de manera uniforme, sin giros o dobleces que dificulten la microscopía.

*NOTA: Una forma fácil de hacer esto es tirar del intestino desde el recto hasta la superficie del borde de la solución de fijación hasta que la conformación sea adecuada.*

3.2. Dejar la fijación a temperatura ambiente por 30 minutos. Asegurarse que haya suficiente líquido en todo momento

3.3. Retirar los intestinos de la solución de fijación con las pinzas y colocarlas en un tubo eppendorf que contenga 1 mL de PBS 1X frío para eliminar la solución de fijación.

3.4. Almacenar a 4°C hasta su análisis.

### 4. Almacenamiento de intestinos extraídos y fijados.

4.1. Rotular los tubos claramente con el tipo de muestra, ID del mosquito y la fecha de almacenamiento.

*NOTA: Preferiblemente, la fecha de almacenamiento es la misma a la fecha de disección.*

4.2. Llene cada eppendorf con 1.5 mL de PBS 1X

4.3. Colocar 5 intestinos por tubo.

4.4. Almacenar a 4°C.


## Referencias:

Benedict, M. (2015) *MR4 Methods in Anopheles Research*. Recuperado de: <https://www.beiresources.org/Portals/2/VectorResources/2016%20Methods%20in%20Anopheles%20Research%20full%20manual.pdf>

Buchon Laboratory. (2021, April 28) EdU and PH3 for Blood fed and viral infections in mosquitoes. Standard Operating Procedure (SOP). *In Dissecting and fixing mosquito guts for collaborators*. Cornell University.

Coleman, J., Juhn, J., & James, A. A. (2007). Dissection of midgut and salivary glands from *Ae. aegypti* mosquitoes. *JoVE*, (5), e228.4

Consoli, R. A., & Oliveira, R. L. D. (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Editora Fiocruz.

	Procedimiento de Operación Estándar	Página 5 de 5
	Disección y fijación del tejido intestinal de mosquitos adultos silvestres	Revisión: N° 1

- dos Santos Andrade, P., Urbinatti, P. R., da Rocha Coelho, R., de Sá Almeida, R. M. M., Ribeiro, S. S., & de Lima-Camara, T. N. (2019). Parity and gonotrophic discordance of females of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the city of São Paulo, SP, Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 44(2), 233-240.
- Gusmão, D. S., Santos, A. V., Marini, D. C., Russo, E., Peixoto, A. M., Bacci Júnior, M., Berbert-Molina, M. A., & Lemos, F. J. (2007). First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(8), 919–924.
- Intakhan, N., Jariyapan, N., Sor-Suwan, S., Phattanawiboon, B., Taai, K., Chanmol, W., ... & Bates, P. A. (2014). Exsheathment and midgut invasion of nocturnally subperiodic *Brugia malayi* microfilariae in a refractory vector, *Aedes aegypti* (Thailand strain). *Parasitology research*, 113(11), 4141-4149.
- Lemaitre, B., & Miguel-Aliaga, I. (2013). The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of genetics*, 47, 377–404.
- Schmid, M. A., Kauffman, E., Payne, A., Harris, E., & Kramer, L. D. (2017). Preparation of mosquito salivary gland extract and intradermal inoculation of mice. *Bio-protocol*, 7(14).
- Shao, Q., Yang, B., Xu, Q., Li, X., Lu, Z., Wang, C., Huang, Y., Söderhäll, K., & Ling, E. (2012). Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insects. *The Journal of biological chemistry*, 287(17), 14270–14279.
- Souza, R. S., Gama, M., Schama, R., Lima, J., Diaz-Albiter, H. M., & Genta, F. A. (2019). Biochemical and Functional Characterization of Glycoside Hydrolase Family 16 Genes in *Aedes aegypti* Larvae: Identification of the Major Digestive  $\beta$ -1,3-Glucanase. *Frontiers in physiology*, 10, 122.
- Taracena, M. L., Bottino-Rojas, V., Talyuli, O. A., Walter-Nuno, A. B., Oliveira, J. H. M., Angleró-Rodríguez, Y. I., ... & Paiva-Silva, G. O. (2018). Regulation of midgut cell proliferation impacts *Aedes aegypti* susceptibility to dengue virus. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(5), e0006498.

## I. Anexo 9: Referencia para confirmación de especies de mosquitos silvestres con electroforesis

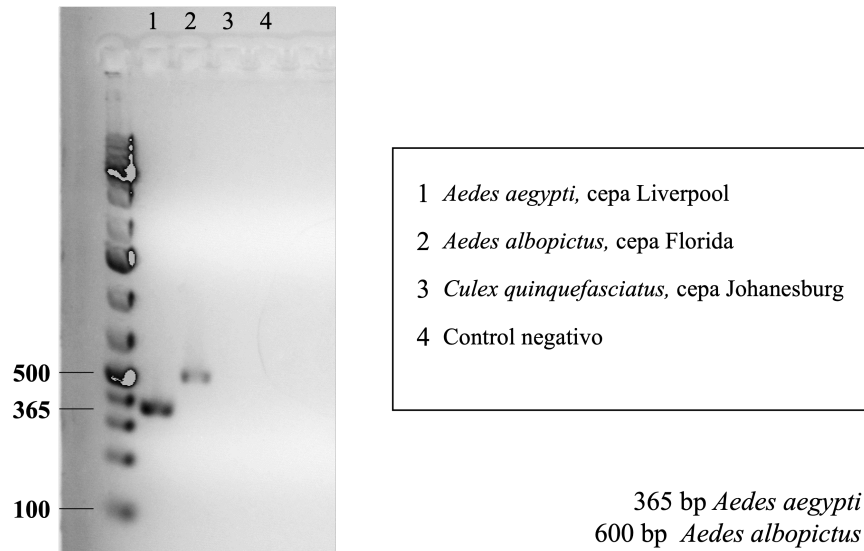


Figura XI.5: Referencia para confirmación de especies de mosquitos silvestres con electroforesis

## J. Anexo 10: Genotipificación de mosquitos silvestres por electroforesis en gel de agarosa 2%

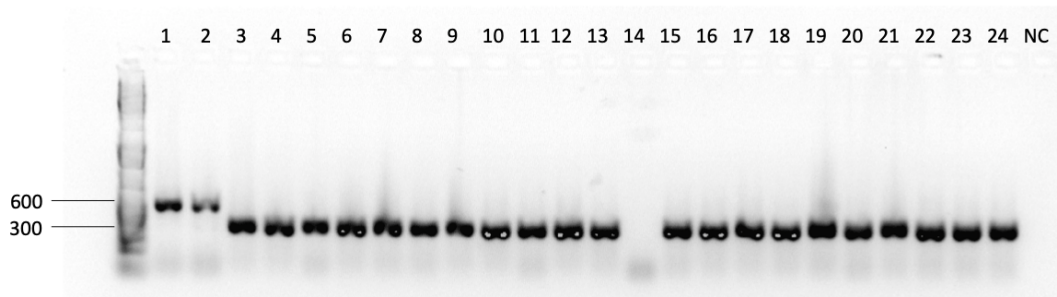


Figura XI.6: Genotipificación de ADN de muestras 1 a 24. Género *Aedes*.

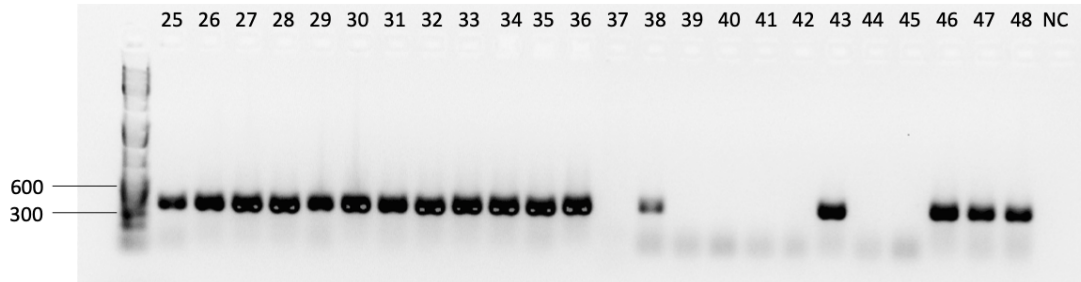


Figura XI.7: Genotipificación de ADN de muestras 25 a 48. Género *Aedes*.

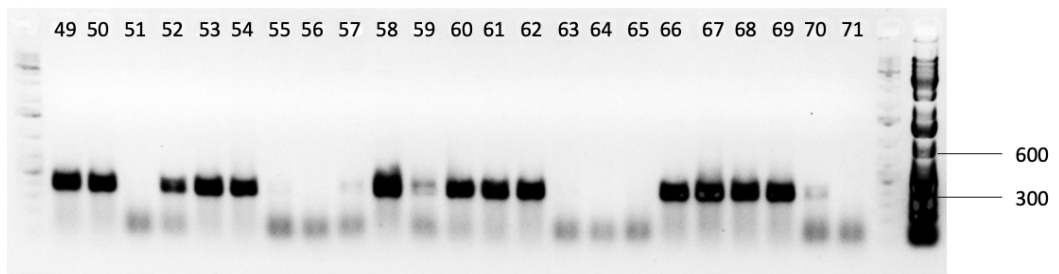


Figura XI.8: Genotipificación de ADN de muestras 49 a 71. Género *Aedes*.

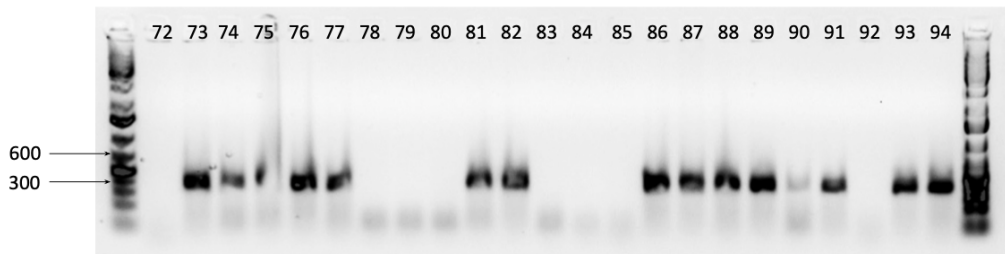


Figura XI.9: Genotipificación de ADN de muestras 72 a 94. Género *Aedes*.

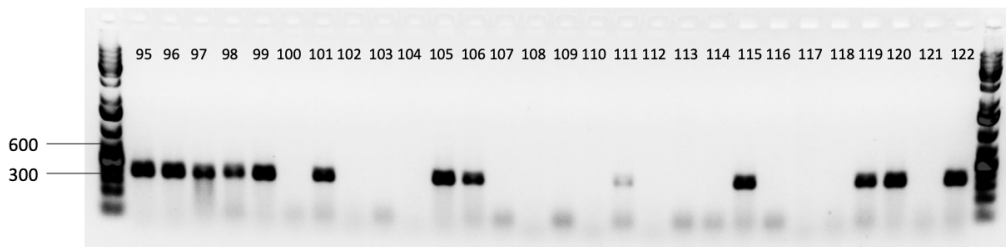


Figura XI.10: Genotipificación de ADN de muestras 95 a 122. Género *Aedes*.

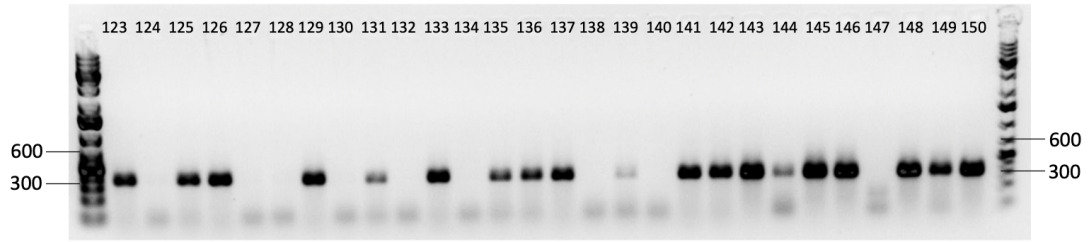


Figura XI.11: Genotipificación de ADN de muestras 123 a 150. Género *Aedes*.

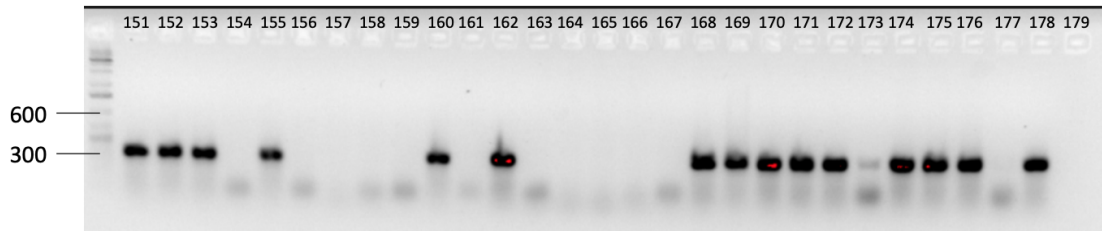


Figura XI.12: Genotipificación de ADN de muestras 151 a 179. Género *Aedes*.

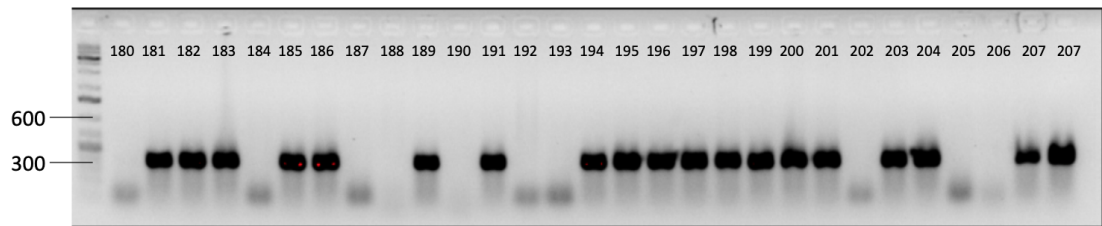


Figura XI.13: Genotipificación de ADN de muestras 180 a 207. Género *Aedes*.

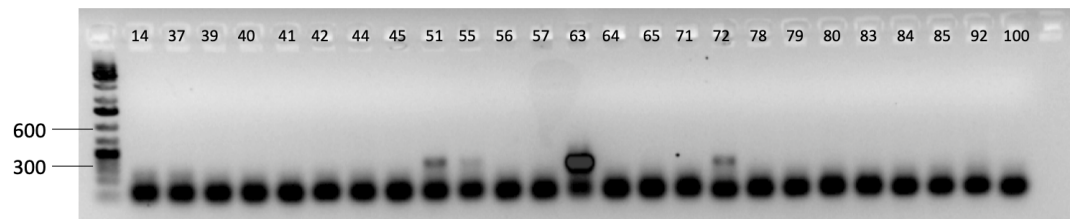


Figura XI.14: Genotipificación de ADN de muestras negativas entre 14 y 100. Género *Aedes*.

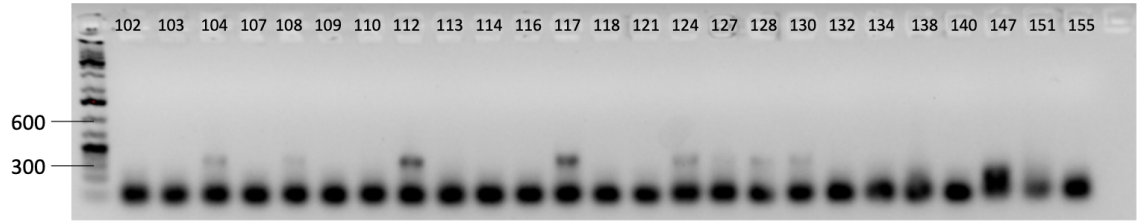


Figura XI.15: Genotipificación de ADN de muestras negativas entre 102 y 155. Género *Aedes*.

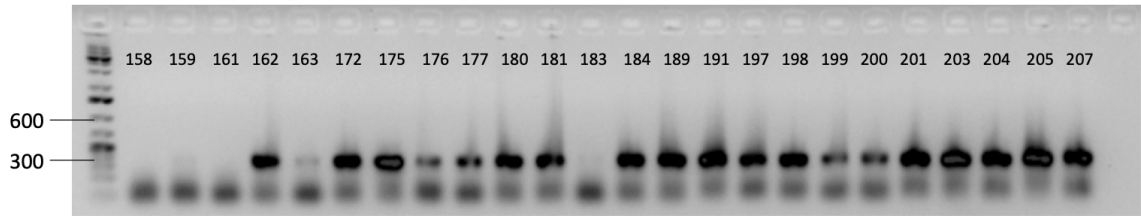


Figura XI.16: Genotipificación de ADN de muestras negativas entre 158 y 207. Género *Aedes*.

K. Anexo 11: Células EdU+PH3+ en mosquitos grávidos y sin sangre

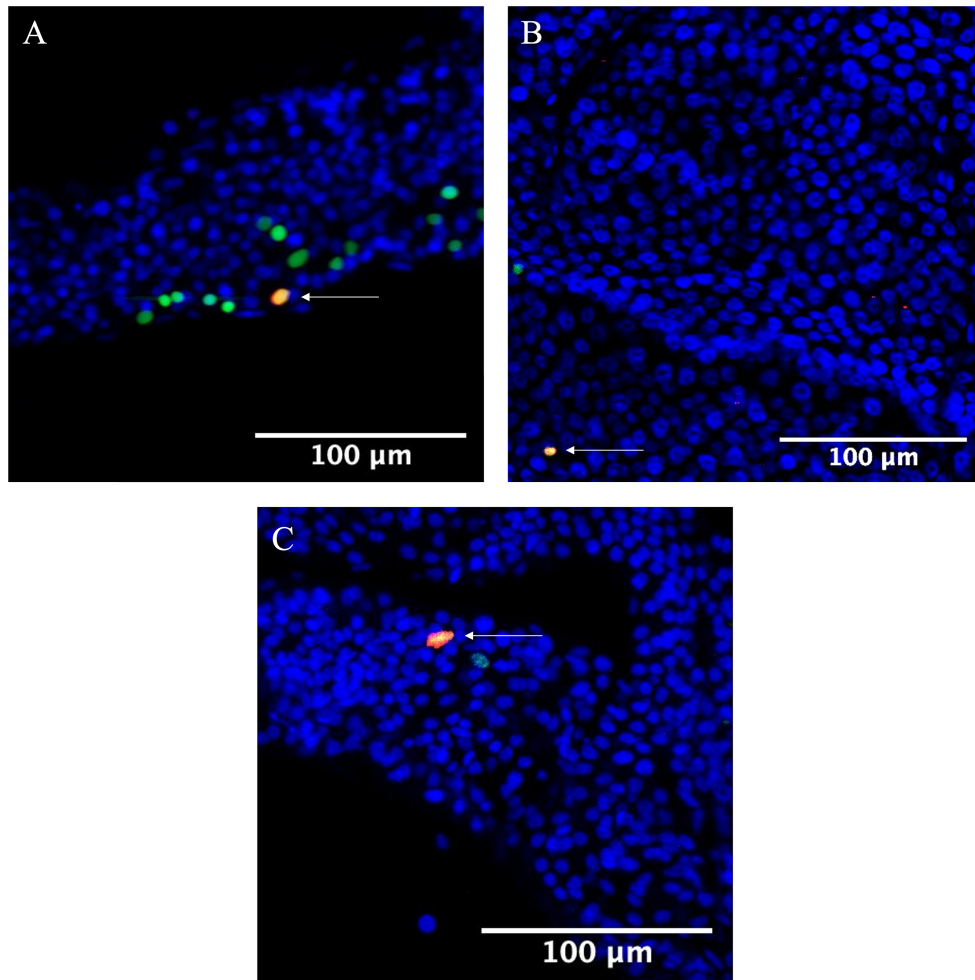


Figura XI.17: Fotografías microscópicas de células EdU+PH3+ en epitelio intestinal de mosquitos *Ae. aegypti* (A - B) grávidos y (C) sin sangre. Con una flecha color blanco se señala la célula de interés



**L. Anexo 12: Análisis complementario de datos obtenidos de los porcentajes de células EdU+ y PH3+ en los diferentes grupos de mosquitos**

Cuadro XI.1: Análisis de Kruskal-Wallis de células EdU+ y PH3+ en mosquitos silvestres y criados en laboratorio

<b>Células</b>	<b>Valor-P</b>	<b>Significancia</b>
EdU+	$2.913 \times 10^{-06}$	Sí
PH3+	0.609	No

