

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Análisis de expresión génica de
Glutación-S-transferasas y su potencial rol en la
resistencia metabólica a piretroides en poblaciones
de *Aedes aegypti* (Lannaeus, 1962)**

Trabajo de gradución en modalidad de tesis presentado por
Sheryl Ariany Nahomy Ruíz Vásquez
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala
2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Análisis de expresión génica de
Glutación-S-transferasas y su potencial rol en la
resistencia metabólica a piretroides en poblaciones
de *Aedes aegypti* (Lannaeus, 1962)**

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Sheryl Ariany Nahomy Ruíz Vásquez
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala
2023

Vo.Bo.:



(f)

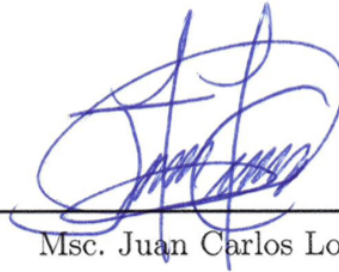
Dra. Norma Padilla

Tribunal Examinador:



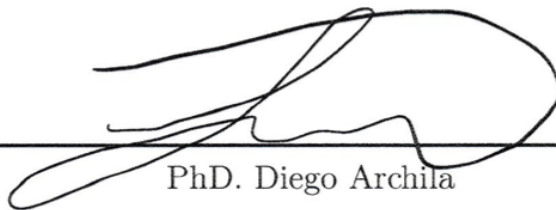
(f)

Dra. Norma Padilla



(f)

Msc. Juan Carlos Lol



(f)

PhD. Diego Archila

Fecha de aprobación: Guatemala, 12 de enero de 2023.

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a Dios por guiarme a lo largo de mi vida y por haberme dado fortaleza para seguir adelante en los momentos difíciles. A mis padres, por haberme dado la vida, por su amor incondicional, su paciencia, su comprensión, por la formación y educación que me brindaron, por ser mi principal apoyo en cada momento de mi vida y por haberme dado un hermano extraordinario y un angelito que desde el cielo me cuida.

A mi madre por ser mi mejor amiga, por escucharme y siempre brindarme consejos y tranquilidad en los momentos difíciles. A mi padre por ser un ejemplo de perseverancia, disciplina y responsabilidad. A mi hermano por brindarme su confianza y ser mi cómplice. A mis abuelitos por ser un pilar fundamental en mi familia, por estar apoyándome desde mi primer día de colegio hasta mi último día de universidad y por ser como mis segundos padres. A mis tios y mis primos por siempre estar pendientes de mi formación a lo largo de la carrera.

Quiero agradecer a la Universidad del Valle de Guatemala por brindar educación de calidad. A catedráticos y a todas las personas que directa o indirectamente me acompañaron en este proceso de formación profesional. Le agradezco al Centro de Estudios en Salud (CES) por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente. A la Unidad de Entomología Médica y Malaria del CES por permitirme realizar mis prácticas profesionales y mi trabajo de graduación en tan prestigioso laboratorio. A la Dra. Norma Padilla, lic. Juan Carlos Lol y licda. Ana Cristina Benedict por compartir sus conocimientos que fueron de vital importancia para el desarrollo del presente estudio y mi crecimiento profesional. A Pedro Peralta y Jorge Sincal, que con su experiencia me mostraron las técnicas adecuadas en el manejo del insectario y su apoyo incondicional.

Agradecimientos	III
Lista de figuras	VI
Lista de cuadros	VIII
Resumen	IX
1. Introducción	1
2. Objetivos	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. Justificación	3
4. Marco teórico	4
4.1. Arbovirosis	4
4.1.1. Dengue	5
4.1.2. Chinkungunya	6
4.1.3. Zika	6
4.2. Vectores de arbovirosis	7
4.2.1. <i>Aedes aegypti</i>	8
4.3. Insecticidas	11
4.3.1. Piretroides	12
4.4. Resistencia a insecticidas	13
4.4.1. Resistencia por alteraciones del sitio objetivo de los insecticidas	13
4.4.2. Resistencia por penetración cuticular reducida	14
4.4.3. Resistencia metabólica	14
5. Marco metodológico	17
5.1. Muestra	17
5.2. Extracción de ARN	18
5.3. Concentración de muestras y Geles de integridad	18
5.4. Síntesis de ADNc	19
5.5. Curva de eficiencia de cebadores	19
5.6. Cuantificación de expresión génica	19
5.7. Análisis de datos	20

6. Resultados	21
6.1. Extracción de ARN	21
6.2. Concentración de muestras y Geles de integridad	25
6.3. Curva de eficiencia de los cebadores	26
6.4. Cuantificación de expresión génica	28
7. Análisis de resultados	31
8. Conclusiones	34
9. Recomendaciones	35
10. Bibliografía	36
11. Anexos	43
11.1. Procedimiento Operacional Estandarizado de la Extracción de ARN utilizando el kit SV Total RNA Isolation System de Promega	43
11.2. Procedimiento Operacional Estandarizado de la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando el kit GoScript Reverse Transcription System de Promega	50
11.3. Información de los cebadores GSTe2R y GSTe2F, del gen GSTe2	55
11.4. Información de los cebadores GSTe5R y GSTe5F, del gen GSTe5	56
11.5. Información de los cebadores GSTe7R y GSTe7F, del gen GSTe7	57
11.6. Características de los cebadores GSTe7F y GSTe7R.	57
11.7. Optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.	58
11.8. Genes de referencia	68
11.9. Expresión génica de GSTe2 de la población Carmen.	70
11.10 Expresión génica de GSTe2 de la población Villa Consuelo.	75
11.11 Rediseño de cebadores para GSTe5 y GSTe7	79

Lista de figuras

4.1. Distribución global de los principales géneros de mosquitos vectores de arbovirosis. . .	8
4.2. Morfología del adulto hembra de <i>Ae. aegypti</i>	9
4.3. Ciclo de vida de <i>Ae. aegypti</i>	10
4.4. Estructura química de la deltametrina y permetrina.	12
4.5. Estructura del canal de sodio en <i>Ae. aegypti</i>	13
4.6. Estructura de Glutathion S-transferasas 2 en <i>Ae. aegypti</i>	15
5.1. Resultados de los bioensayos de deltametrina de dosis diagnóstica y sinergistas. . . .	17
5.2. Resultados de los bioensayos de permetrina de dosis diagnóstica y sinergistas. . . .	18
6.1. Gel de integridad al 1% de agarosa de la población El Carmen, Costa Rica y New Orleans.	25
6.2. Gel de integridad al 1% de agarosa de la población Villa Consuelo, República Dominicana	25
6.3. Curva estándar del gen GSTe2	27
6.4. Curva estándar del gen GSTe7.	28
6.5. Gráfica del análisis de expresión génica del gen GSTe2 de la población El Carmen, Costa Rica.	29
6.6. Gráfica del análisis de expresión génica del gen GSTe2 de la población Villa Consuelo, República Dominicana.	30
11.1. Secuencia del gen GSTe2 y región donde se unen los cebadores GSTe2F y GSTe2R. .	55
11.2. Secuencia del gen GSTe5 y región donde se unen los cebadores GSTe5F y GSTe5R. .	56
11.3. Secuencia del gen GSTe7 y región donde se unen los cebadores GSTe7F y GSTe7R. .	57
11.4. Curva estándar de la prueba 1 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R. .	59
11.5. Curva estándar de la prueba 2 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R. .	60
11.6. Curva estándar de la prueba 3 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R. .	61
11.7. Curva estándar de la prueba 4 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R. .	62
11.8. Curva estándar de la prueba 5 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R. .	62
11.9. Curva estándar de la prueba 6 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R. .	63
11.10 Curva estándar de la prueba 7 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R. .	64
11.11 Curva estándar de la prueba 8 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R. .	65
11.12 Curva estándar de la prueba 9 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R. .	65
11.13 Curva estándar de la prueba 10 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R. .	66
11.14 Curva estándar de la prueba 11 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R. .	67
11.15 Curva estándar de la prueba 12 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R. .	68
11.16 Curva estándar del gen RSP3.	69
11.17 Curva estándar del gen Ae60sL8.	70

Lista de cuadros

6.1. Información de las muestras de ARN extraídas	21
6.2. Cuantificación por medio del equipo NanoDrop de la concentración y purezas de las extracciones de ARN.	24
6.3. Cuantificación por medio de NanoDrop de la concentración y purezas de las extracciones de ARN luego de 25 minutos de concentración SpeedVac.	24
6.4. Condiciones de optimización del par de cebadores del gen GSTe2.	26
6.5. Eficiencia y coeficiente de correlación (R^2) de la optimización del par de primers del gen GSTe2.	26
6.6. Valores Ct de la optimización del gen GSTe2.	26
6.7. Condiciones de las pruebas de optimización del par de cebadores para los genes GSTe5 y GSTe7.	27
6.8. Resultados del qPCR de la prueba que presentó amplificación del gen GSTe7.	27
6.9. Eficiencia y coeficiente de correlación (R^2) de la optimización del par de cebadores del gen GSTe7.	28
6.10. Análisis de expresión génica del gen GSTe2 de la población El Carmen, Costa Rica.	28
6.11. Análisis de expresión génica del gen GSTe2 de la población Villa Consuelo, República Dominicana.	29
11.1. Secuencia 5'—3 de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.	55
11.2. Características de los cebadores GSTe2F y GSTe2R	55
11.3. Secuencia 5'—3 de los cebadores GSTe5F y GSTe5R.	56
11.4. Características de los cebadores GSTe5F y GSTe5R.	56
11.5. Secuencia 5'—3 de los cebadores GSTe7F y GSTe7R.	57
11.6. Condiciones de las pruebas de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.	58
11.7. Resultados del qPCR de la prueba 1 de optimización.	58
11.8. Resultados del qPCR de la prueba 2 de optimización.	59
11.9. Resultados del qPCR de la prueba 3 de optimización.	60
11.10. Resultados del qPCR de la prueba 4 de optimización.	61
11.11. Resultados del qPCR de la prueba 5 de optimización.	62
11.12. Resultados del qPCR de la prueba 6 de optimización.	63
11.13. Resultados del qPCR de la prueba 7 de optimización.	63
11.14. Resultados del qPCR de la prueba 8 de optimización.	64
11.15. Resultados del qPCR de la prueba 9 de optimización.	65
11.16. Resultados del qPCR de la prueba 10 de optimización.	66
11.17. Resultados del qPCR de la prueba 11 de optimización.	67
11.18. Resultados del qPCR de la prueba 12 de optimización.	68
11.19. Condiciones de qPCR para los genes RSP3 y Ae60sL8	68

11.20	Eficiencia y coeficiente de correlación (R^2) de los genes de referencia RSP3 y Ae60sL8.	69
11.21	Resultados del qPCR del gen de referencia RSP3.	69
11.22	Resultados del qPCR del gen de referencia Ae60sL8.	70
11.23	Valores de Ct obtenidos del equipo de qPCR.	70
11.24	Corrección de los valores Ct de acuerdo con las eficiencias de los PCRs.	72
11.25	Promedio de las réplicas técnicas.	73
11.26	Valores de delta Ct.	74
11.27	Promedio de los valores de delta Ct.	74
11.28	Valores de delta delta Ct.	74
11.29	Promedio de los valores de delta delta Ct por réplica biológica.	75
11.30	Valores de Ct obtenidos del equipo de qPCR.	75
11.31	Corrección de los valores Ct de acuerdo con las eficiencias de los PCRs.	76
11.32	Promedio de las réplicas técnicas.	77
11.33	Valores de delta Ct.	78
11.34	Promedio de los valores de delta Ct.	78
11.35	Valores de delta delta Ct.	78
11.36	Promedio de los valores de delta delta Ct por réplica biológica.	79
11.37	Secuencia 5'—3 de los cebadores GSTe5F y GSTe5R rediseñados.	79
11.38	Características de los cebadores GSTe5F y GSTe5R rediseñados.	79
11.39	Secuencia 5'—3 de los cebadores GSTe7F y GSTe7R rediseñados.	79
11.40	Características de los cebadores GSTe7F y GSTe7R rediseñados.	80

La principal estrategia para controlar brotes epidémicos de arbovirosis, tal como el dengue, se basa en el uso de insecticidas para disminuir la prevalencia del vector *Aedes aegypti*; sin embargo, en los últimos años los casos de dengue han aumentado considerablemente y se tiene la hipótesis de que este aumento se atribuye a la resistencia a los insecticidas que el vector desarrolla con el pasar del tiempo. El objetivo de esta investigación fue determinar la expresión génica de tres genes relacionados a Glutación-S-transferasas en la resistencia a piretroides observada en poblaciones de *Aedes aegypti* de América Central y República Dominicana. Para el presente estudio se seleccionaron las poblaciones de El Carmen, Costa Rica y Villa Consuelo, República Dominicana, con respecto a los resultados de los bioensayos con compuestos sinergistas realizados en el Laboratorio de Entomología Médica y Malaria, CES; los cuales dan indicios de un potencial rol de las Glutación-S transferasas en la resistencia a piretroides. Se realizaron extracciones de ARN, geles de integridad para evaluar la integridad de las muestras extraídas y síntesis de ADNc.

Para evaluar la expresión génica se buscó optimizar los cebadores de los genes GSTe2, GSTe5 y GSTe7. Únicamente se consiguió optimizar los cebadores del gen GSTe2, con una eficiencia de 105.90% y R^2 de 0.9987. Al realizar la cuantificación génica se observó significancia en la sobreexpresión el gen GSTe2 en la población de El Carmen, Costa Rica resistente a permetrina; mientras que para la población de El Carmen, Costa Rica resistente a deltametrina no se presentó una sobreexpresión significativa. Lo que nos permite concluir que bajo las condiciones de esta investigación, el gen GSTe2 tiene un potencial rol solamente en la población de El Carmen, Costa Rica resistente a permetrina. Respecto a la población Villa Consuelo, República Dominicana tanto resistente a deltametrina como a permetrina, no se determinó que la sobreexpresión del gen GSTe2 fuera significativa, por lo que no fue posible determinar el rol de las Glutación-S transferasas en la resistencia a piretroides.

Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente, se recomienda rediseñar los cebadores para los genes GSTe5 y GSTe7, para que posteriormente sea posible determinar si estos juegan un papel importante en la resistencia a piretroides en *Ae. aegypti*. Asimismo, se recomienda secuenciar el gen GSTe2 presente en la población de El Carmen, Costa Rica y determinar las posibles mutaciones del gen que podrían estar implicadas en la resistencia metabólica a piretroides, para luego poder validar el gen como un marcador molecular.

El vector *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) es un mosquito distribuido en regiones tropicales y subtropicales (CDC, 2016), su ciclo de vida consiste en cuatro estadíos, huevo, larva, pupa y adulto. Los huevos de este mosquito tienen la característica de ser altamente resistentes a condiciones hostiles, tales como temperaturas altas, contaminación, entre otros (Kweka, Baraka, Mathias, *et al.*, 2018). Además, es importante mencionar que (*Ae. aegypti*) es el principal vector de arbovirosis, tal como dengue (Jassen, 2010) y representa la fuente principal de transmisión de esta enfermedad; por lo que la principal estrategia para controlar los brotes epidémicos es utilizar insecticidas, tales como piretroides; con el fin de disminuir la prevalencia del vector y de esta forma disminuir la transmisión del virus (OPS, s.f.). A pesar de los intentos de disminuir el número de casos de dengue, este aumenta todos los años y causa cientos de muertes, representando un problema a nivel de salud pública (OPS, 2021).

Algunos autores le atribuyen este aumento en los casos de dengue a la creciente resistencia a insecticidas² en el vector (Paul, Harrington y Scott, 2006). Existen distintos mecanismos de resistencia y uno de los principales mecanismos es la resistencia metabólica, ya que es el mecanismo de resistencia más común y desafiante en comparación con otros mecanismos. Este mecanismo se asocia a la sobreexpresión en genes que codifican enzimas detoxificantes como las Glutación-S transferasas (Fagbohun, Idowu, Olakiigbe, *et al.*, 2020). Es por ello que el objetivo principal de esta investigación fue determinar la expresión génica de tres genes, que pertenecen a la familia de las Glutación-S-transferasas, en la resistencia metabólica a piretroides de *Aedes aegypti*.

2.1. Objetivo general

Determinar la expresión génica de Glutación-S-transferasas en la resistencia metabólica a piretroides de *Aedes aegypti*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar si los genes GSTe2, GSTe5 y GSTe7 se sobreexpresan en poblaciones silvestres de *Aedes aegypti* resistentes a permetrina.
- Determinar si los genes GSTe2, GSTe5 y GSTe7 se sobreexpresan en poblaciones silvestres de *Aedes aegypti* resistentes a deltametrina.

Aedes aegypti es el vector de dengue con mayor prevalencia a nivel mundial. En las últimas décadas, se ha observado un aumento global en la distribución del mosquito, así como en la incidencia de arbovirosis (Jassen y Beebe, 2010). Según Sánchez (2019), el número real de casos de dengue se encuentra mal clasificado, sin embargo, se estima que anualmente se producen 390 millones de infecciones por dengue mundialmente; de los cuales 96 millones se clasifican clínicamente.

Debido a que no existe un tratamiento específico o una vacuna aprobada contra el virus del dengue (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2021), la forma más sencilla y eficiente de controlar los brotes epidémicos de esta enfermedad se basa en el control del mosquito por medio del uso de insecticidas (Moyes, *et al.*, 2017). Con la introducción de insecticidas sintéticos, como los piretroides, se redujo considerablemente la prevalencia del dengue (OPS, s.f.). Sin embargo, en 2019, en América el dengue alcanzó el mayor número de casos registrados en la historia, con más de 2.7 millones de casos, incluyendo 22,127 casos graves y 1,206 muertes reportadas (OPS, 2019).

Múltiples estudios han buscado identificar los mecanismos de resistencia que han desarrollado los mosquitos con el pasar del tiempo; como Liu (2015), plantea que el aumento en la actividad de enzimas detoxificantes de los insecticidas y la disminución de la sensibilidad de las proteínas objetivo son los responsables de la resistencia a los insecticidas. Además, se ha evidenciado que la resistencia metabólica mediada por enzimas es uno de los principales mecanismos de resistencia a insecticidas en mosquitos (Schluep y Buckner, 2021); específicamente, en *Ae. aegypti* este tipo de resistencia se ha asociado con actividad elevada o sobreexpresión de los citocromos P450 (P450s, por sus siglas en inglés), carboxilesterasas (CCE, por sus siglas en inglés) y glutatión-S-transferasas (GSTs, por sus siglas en inglés) (Fagbohun, *et al.*, 2020).

El grupo de genes implicado en la resistencia metabólica más caracterizado a nivel molecular ha sido los citocromos P450 (French, *et al.*, 2013), mientras que para GSTe mayormente se han realizado investigaciones utilizando bioensayos con componentes sinergistas o a nivel enzimático, tal como el estudio de Lumjuan, *et al.* (2011) donde identificaron que altos niveles de GSTs están asociados con la resistencia a paratión, piretroides, tetraclorovinfos, malatión y DDT. Otro estudio en poblaciones de *Ae. aegypti* de Pakistán detectó un aumento en la actividad enzimática de las GSTs en poblaciones de campo resistentes a piretroides en comparación con una cepa de laboratorio no expuesta a los insecticidas; ya que los niveles elevados de GSTs introducen resistencia por secuestro o metabolismo directo de insecticidas (Nawaz, *et al.*, 2021). Es por ello que conocer la actividad de GSTs en poblaciones de *Ae. aegypti* de Costa Rica y República Dominicana es importante para guiar las intervenciones que utilizan insecticidas como el control de vectores.

4.1. Arbovirosis

Las arbovirosis son un grupo de enfermedades causadas por arbovirus o virus transmitidos por artrópodos, como mosquitos del género *Aedes*, moscas y pulgas (Ogunlade, *et al.*, 2021); Alarcón-Elbal, *et al.* (2017) mencionan que estas enfermedades, aunque tienen una distribución mundial, presentan una mayor incidencia en regiones tropicales y subtropicales; por lo que constituye uno de los principales problemas de salud pública en la Región de las Américas (Espinal, *et al.*, 2019).

Betancourt y Falcón (2020) mencionan que existen más de 70 arbovirus conocidos capaces de causar alguna enfermedad en humanos y algunos autores dividen a los arbovirus en 3 principales familias; *Bunyaviridae*, donde se encuentra el virus de la Encefalitis de La Crosse, Hantavirus y Fiebre Orepuche, *Flaviviridae*, donde se encuentra el Virus del Dengue (DENV), el virus de la Fiebre Amarilla y el Virus del Zika (ZIKV), por último, encontramos a la familia *Togaviridae*, donde pertenece el Virus Chikungunya (CHIKV) y el Virus de Mayaro (Arredondo-García, Méndez, Herrera y Medina-Cortina, 2016).

Las arbovirosis suelen presentarse de forma epidémica y son similares en sus cuadros clínicos; constituyen un síndrome que puede ser febril o exantemático (erupciones generalizadas (Fernández, *et al.*, 2017)); otros síntomas frecuentes son dolores de cabeza, dolor corporal y manifestaciones en las articulaciones. Además, es importante tomar en cuenta que cualquier infección por arbovirus puede ser asintomática u oligosintomática y pueden presentarse junto con otras infecciones, por lo que el diagnóstico diferencial es complejo y dificultoso (Pan American Health Organization [PAHO], 2017). Muchas arbovirosis se diagnostican mediante técnicas serológicas como ELISA, en donde se mide la presencia de anticuerpos contra el virus; sin embargo, esta técnica puede dar resultados erróneos y no es útil para diagnosticar la infección en fases agudas (Betancourt y Falcón, 2020). Con los avances tecnológicos y de la biología molecular, se han desarrollado nuevas técnicas de diagnóstico de múltiples enfermedades, incluidas las arbovirosis y se ha descrito la RT-PCR como la técnica más utilizada, por su alta especificidad (Pereira-Palacio, *et al.*, 2018).

Las arbovirosis más importantes desde el punto de vista de salud pública son Dengue, Chikungunya y Zika (Betancourt y Falcón, 2020); por lo que estas se describirán con más detalle a continuación.

4.1.1. Dengue

El dengue es una arbovirosis causada por el Virus del Dengue (DENV), el cual pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*; hasta el momento se han identificado cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) (Martina, Koraka y Osterhaus, 2009). Salles, *et al.* (2018) señalan que este patógeno es un virus envuelto con simetría icosaédrica, con un genoma constituido por una cadena de ARN positivo y 10.8 kb de longitud.

En los últimos años, las infecciones por dengue han aumentado a nivel mundial, representado una morbilidad y mortalidad significativa. Causan un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde un estado asintomático hasta cuadros severos con disfunción orgánica y muerte. Existen una forma leve del dengue, conocida como dengue clásico; el cual se caracteriza por un inicio agudo de fiebre asociado con dolor de cabeza, artralgia grave y mialgia, y también existen formas más graves como la fiebre hemorrágica del dengue y el Síndrome de shock por dengue (Jayarajah, Lahiru, De Zoysa y Seneviratne, 2021).

Según la Organización Panamericana de la Salud [OPS] (2015), la situación epidemiológica del dengue sigue siendo extremadamente compleja e inestable; en América, entre 2000 y 2014 se registraron 14.2 millones de casos y 7,000 muertes a causa del dengue. La Actualización Epidemiológica de 2021 (OPS, 2021), indicó que ese año se notificaron un total de 1,173,674 casos de dengue con 387 muertes en la Región Americana, con una tasa de incidencia de 118 casos por cada 100,000 habitantes. Además, la OPS (2015) menciona que los cuatro serotipos del DENV se encuentran circulando en las Américas, por lo que aumenta el riesgo de casos graves; ya que la infección por un serotipo produce inmunidad permanente contra la reinfección por ese serotipo, pero la infección sucesiva con dos serotipos diferentes es un factor de riesgo para desarrollar las formas graves de la enfermedad (OPS, s.f.). Es importante mencionar que la transmisión del dengue se da principalmente por la picadura del mosquito *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Higa, 2011).

En cuanto a la patogénesis del DENV, luego de que este ingresa al organismo, prolifera en el sistema monocito-fagocito e ingresa a la circulación, provocando la primera viremia; luego coloniza el sistema reticuloendotelial y el tejido linfoide. Este se replica en células mononucleares de sangre periférica, macrófagos en tejidos y células Kupffer en el hígado y vuelve a entrar a circulación, para causar la segunda viremia. El DENV se une a anticuerpos específicos producidos por el cuerpo para formar complejos inmunes que activan los sistemas de complemento y coagulación, dando paso a un aumento en la permeabilidad vascular, permeabilidad, vasodilatación, congestión, extravasación de proteínas plasmáticas y componentes sanguíneos tangibles; causando cambios patofisiológicos. Además, el virus también inhibe la producción de leucocitos y plaquetas en la médula ósea, provocando leucopenia y trombocitopenia. Sin embargo, la patogenia del dengue grave aún no se ha dilucidado por completo debido a la falta de modelos animales ideales, pero es bien sabido que los factores virales y del huésped, tormenta de citoquinas y la variación de la virulencia viral debido a la infección secundaria por DENV, juega un papel esencial en la patogenia del dengue grave (Fuchun, *et al.*, 2021).

Actualmente no se cuenta con un tratamiento antiviral contra el DENV, por lo que el tratamiento gira en torno a aliviar los síntomas que se presenten; recientemente la FDA aprobó la vacuna Dengvaxia para su uso en niños de 9-16 años que vivan en áreas donde el dengue es común y que tengan evidencia de una infección previa por virus del dengue confirmada por laboratorios clínicos, ya que en niños que no han tenido dengue, la vacuna aumenta el riesgo de enfermedad grave y hospitalización si contraen dengue después de recibir la vacuna (CDC, 2021). Esto representa un gran desafío ya los cuatro serotipos del virus del dengue están presentes en las Américas y la cocirculación de los cuatro fue reportada en Brasil, Guatemala y México en 2019. La circulación de dos o más serotipos aumenta la ocurrencia de casos graves de la enfermedad (OPS, 2019)

4.1.2. Chikungunya

Es una arbovirosis que fue descrita por primera vez durante un brote registrado en el sur de Tanzania en 1952 y su nombre proviene del idioma malonde que significa “postura retorcida”; es causada por virus de la familia *Togaviridae* (OMS, 2020). Vu, Jungkind y LaBeaud (2017) mencionan que el CHIKV cuenta con un genoma que consiste en ARN de sentido positivo y una longitud de 11.8 kb.

La OPS (s.f) indica que los síntomas de la infección por CHIKV comienzan entre 4-8 días después de la picadura del mosquito; el síntoma más común es la aparición de fiebre repentina, acompañada de dolor de articulaciones, dolor muscular, dolor de cabeza, náuseas, fatiga y erupciones cutáneas. Actualmente aún no existe una vacuna o tratamiento con medicamentos antivirales para esta infección, por lo que el tratamiento se centra en aliviar los síntomas que se mencionaron anteriormente (CDC, 2014). Además, menciona que los casos de muerte a causa de Chikungunya son muy raros y casi siempre se encuentran relacionados con otros problemas de salud existentes.

En cuanto a la transmisión de esta arbovirosis esta se da a través de la picadura de mosquito *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (OPS, s.f.). Pruss-Navarrete, Lucas-Mendoza y Mendoza-Rodríguez (2016) remarcan que por el momento no se han registrado casos donde la madre transmita el CHIKV al bebé durante el período de gestación o lactancia; sin embargo, se ha documentado transmisión materna al recién nacido cuando la madre presenta fiebre días antes o al momento del parto, por lo que la cesárea no evita la transmisión del virus. Es por ello que las mujeres gestantes con Chikungunya son un grupo de riesgo.

En 2013 se documentó el primer brote en las Américas (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2020) y desde entonces se ha monitoreado la prevalencia del virus, por ejemplo, en 2021 se registraron 131,630 casos de Chikungunya y 11 muertes en 14 países pertenecientes al continente americano; con una incidencia de 13 casos por 100,000 habitantes. Sin embargo, el 99 % de los casos registrados durante 2021 fueron notificados en 3 países: Brasil con 127,487 casos (97 %), Guatemala con 1951 casos (1.5 %) y Belice con 737 casos (0.6 %) (OPS, 2021).

En cuanto a la patogenia del CHIKV, después de ingresar al torrente sanguíneo a través de la picadura del mosquito, el CHIKV se replica en los sitios de inoculación en fibroblastos y macrófagos; el virus se propaga por medio de los vasos linfáticos hacia el torrente sanguíneo, lo que permite la diseminación a varios sitios de replicación (órganos linfoides, piel y tejidos como músculos, articulaciones periféricas y tendones), pero también en cerebro e hígado en casos más graves. La replicación del CHIKV en tejidos periféricos da como resultado cargas virales séricas notablemente altas y permitiendo que el CHIKV se pueda transmitir fácilmente a los mosquitos a través de la sangre de individuos contagiados (Silva y Dermody, 2017).

4.1.3. Zika

El Zika es una arbovirosis causada por el Virus del Zika (ZIKV) el cual pertenece a la familia *Flaviviridae*; es un virus de ARN monocatenario y es transmitido a humanos, principalmente por picaduras del mosquito *Ae. aegypti*; por contacto sexual con individuos contagiados, de la madre al feto durante el embarazo, trasplante de órganos e incluso transfusiones de sangre. Su nombre se deriva del Bosque Zika en Uganda, donde el virus se identificó por primera vez en 1947 en un mono y los primeros casos en humanos se describieron en 1952 en Uganda y Tanzania (Pergolizzi, *et al.*, 2021 y OMS, 2018).

Según el CDC (2019), muchas de las personas infectadas con el ZIKV no manifiestan síntomas o solo presentarán síntomas leves, los cuales abarcan fiebre, sarpullido, dolor de cabeza, dolor de articulaciones, conjuntivitis y dolor muscular; sin embargo, durante el embarazo, el ZIKV puede causar defectos congénitos graves en el neonato como microcefalia, articulaciones con limitaciones

de movimiento y tejido cerebral disminuido (CDC, 2016). Además, la OMS (2018) remarca que la infección por ZIKV también se ha asociado con complicaciones en el embarazo como el parto prematuro, aborto espontáneo y muerte intrauterina. Al igual que en las arbovirosis mencionadas con anterioridad, para el Zika no existe un tratamiento ni para las enfermedades a las que se asocia; por lo que los tratamientos se basan en medicamentos comunes para tratar el dolor y la fiebre.

A pesar de que el virus del Zika se reportó en Uganda desde 1947, fue hasta en 2014-2015 cuando se reportó el primer caso en Brasil, donde se estimaron 4.1 millones de casos (Cucunubá, *et al.*, 2016). Pergolizzi y colaboradores (2021) mencionan que desde esta fecha el ZIKV se expandió rápidamente, causando brotes epidémicos en 87 países; se estimó que para ese año se presentaron alrededor de 1.3 millones de casos. En 2021, se notificaron un total de 18,804 casos de Zika, incluidas dos muertes en toda la Región de las Américas. La más alta proporción de casos se registraron en Brasil con 15,903 casos, seguido de Guatemala con 1,902 casos y Paraguay con 474 casos (OPS, 2021).

En cuanto a la patogenia del virus aún se desconocen los mecanismos exactos, pero se cree que al ingresar a las células objetivo por medio de endocitosis el virus utiliza los receptores de tirosina quinasa para promover la unión del virus a las células T, macrófagos, NK inmaduras, células de Sertoli en testículos, células del epitelio pigmentario de la retina y endoteliales. Tras la liberación del genoma viral en el citoplasma, se establece la replicación del ARN viral por medio del módulo no estructural del genoma viral y estudios recientes han demostrado que de manera similar a otros flavivirus como DENV, la infección por ZIKV en fibroblastos de piel o células progenitoras neurales humanas inducen reordenamientos del retículo endoplasmático, dando paso a paquetes de vesículas y cisternas que contiene partículas de virus denominadas bolsas de virus (Chiramel y Best, 2018).

4.2. Vectores de arbovirosis

Según la OMS (2020), un vector es un organismo capaz de transmitir patógenos infecciosos entre personas o de animales a personas. Generalmente son insectos hematófagos que ingieren los patógenos junto con la sangre de un portador infectado y posteriormente transmiten el microorganismo a un nuevo portador, una vez replicado el patógeno; cuando el vector ya es infeccioso, puede transmitir el patógeno por el resto de su vida en cada picadura o ingestión de sangre posterior.

Padilla, *et al.* (2017) mencionan que los vectores de arbovirosis más conocidos son los mosquitos, por ejemplo el mosquito *Ae. aegypti*. Autores indican que tanto mosquitos como las garrapatas son considerados los principales vectores de arbovirosis de importancia médica y veterinaria; se sabe que las garrapatas transmiten una mayor cantidad de arbovirosis en comparación con los mosquitos, probablemente porque absorben una mayor cantidad de sangre y el tiempo que pasan unidos al hospedero (Viglietta, Bellone, Blisnick. Y Failloux, 2021). Jones, Kulkarni, Davidson y Talbot (2020), mencionan que los mosquitos del género *Aedes*, *Culex* y *Anopheles* se encuentran entre los vectores arbovirales más prevalentes alrededor de todo el mundo.

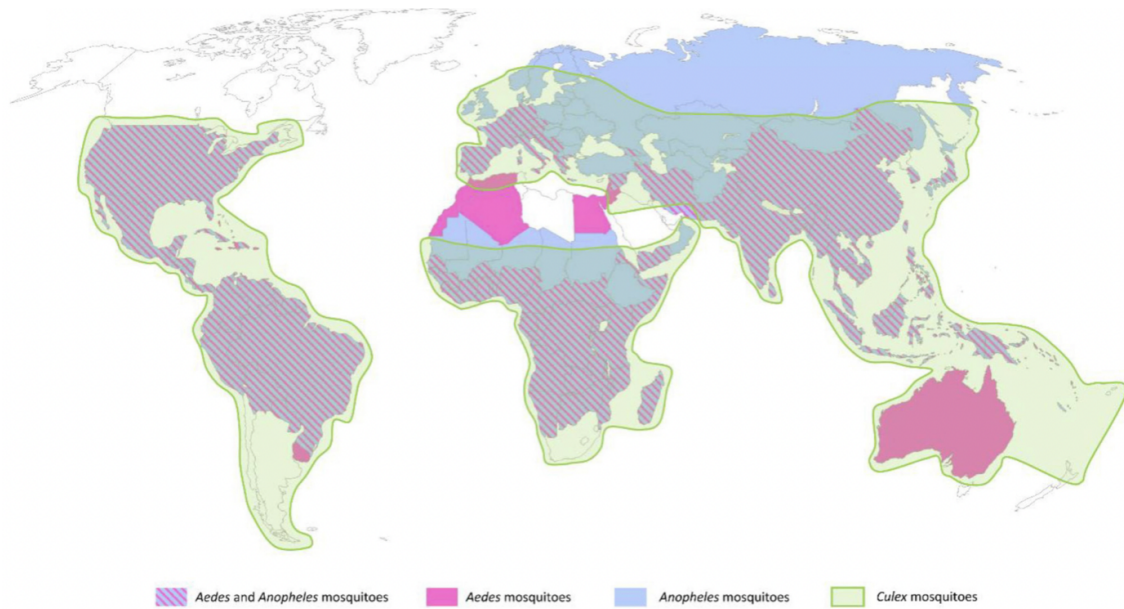


Figura 4.1: Distribución global de los principales géneros de mosquitos vectores de arbovirosis. (Viglietta, Bellone, Blisnick, y Failloux, 2021)

Tal como se observa en la Figura 4.1, en la Región de las Américas los mosquitos *Aedes* se encuentran ampliamente diseminados; como Robles, Ortega y Huerta (2020) mencionan que la especie *Ae. aegypti* transmite el DENV, ZIKV y CHIKV, principales arbovirosis en América (Betancourt y Falcón, 2020); por lo que a continuación se describirá con detalle a la especie *Ae. aegypti*.

4.2.1. *Aedes aegypti*

Aedes aegypti es un mosquito perteneciente al orden *Diptera*, familia *Culicidae*, del género *Aedes* y se encuentra distribuido globalmente en regiones tropicales y subtropicales (OECD, 2018). Es el principal vector de múltiples enfermedades en humanos, incluyendo chikungunya, dengue, fiebre amarilla y Zika (CDC, 2016). Arredondo-García y colaboradores (2016) mencionan que se cree que esta especie de mosquito arribó de África a América con la llegada de los primeros europeos al continente americano.

En cuanto a la descripción del organismo, este es un mosquito negruzco de tamaño mediano, de tres o cuatro milímetros de largo; es fácilmente reconocible por su patrón de escamas en forma de lira de color blanco plateado en su escudo. Los segmentos 1 a 4 de los tarsos poseen anillos blancos basales antes, el segmento 5 es completamente blanco; además, las hembras son más grandes que los machos y se distinguen por pequeños palpos con escamas plateadas o blancas en la punta (Public Health Vectors and Pests, s.f.), tal como se observa en la Figura 4.2. Robles, *et al.* (2020) señala que los machos de esta especie consumen néctar de plantas, mientras que las hembras se alimentan de sangre preferentemente humana; ya que estas requieren de los nutrientes de la sangre para la producción de huevos y ovoposición.

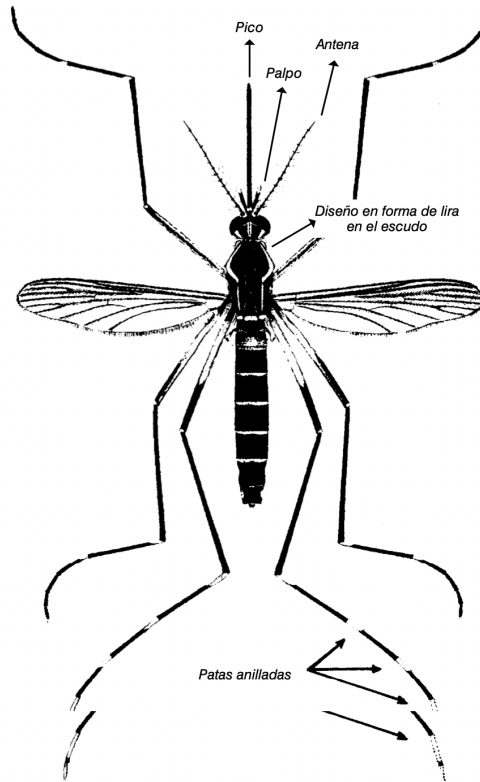


Figura 4.2: Morfología del adulto hembra de *Ae. aegypti*.
(Rossi y Almirón, s.f.)

Ciclo de vida

El ciclo de vida del mosquito *Ae. aegypti* inicia con la hembra adulto poniendo huevos en las paredes internas de recipientes con agua; los huevos se adhieren a las paredes de los recipientes como si tuvieran pegamento y pueden sobrevivir secándose por hasta 8 meses; todo el ciclo toma aproximadamente entre 7-10 días para que un huevo se convierta en mosquito adulto, Figura 4.3 (CDC, s.f.).

Según Rogers (2019), luego de que los huevos eclosionan, las larvas de *Aedes* viven en el agua, generalmente colgando boca abajo y utilizan un sifón respiratorio corto y grueso para tomar oxígeno del aire sobre el agua. Las larvas maduran a través de cuatro estadios, en la última se convierten en pupas o crisálidas y posteriormente se transforman en adultos que emergen en la superficie del agua. Los mosquitos hembra adultos pican a las personas para poder producir huevos, se aparean con los machos, luego se alimentan, y buscan fuentes de agua para poner los huevos (CDC, s.f.).

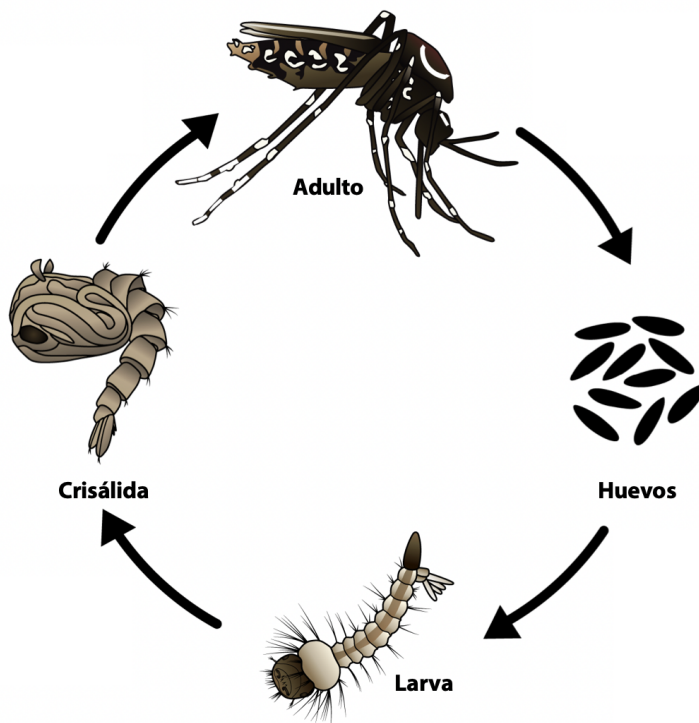


Figura 4.3: Ciclo de vida de *Ae. aegypti*.

(CDC, s.f.)

Distribución ecológica

Ae. aegypti se encuentra en regiones tropicales y subtropicales del planeta, entre las latitudes 35° Norte y 35° Sur, y por debajo de los 1,000 metros sobre el nivel del mar; sin embargo, se ha documentado la presencia de este vector en una altitud mayor en Colombia y México (Robles, *et al.*, 2020). Estudios demuestran que los adultos no logran sobrevivir al ser expuestos por períodos prolongados a temperaturas inferiores a 0 °C o superiores a 42 °C; tampoco se ha logrado criar colonias a temperaturas mayores a 36 °C ni por debajo de 18 °C (Carbajo, 2003).

Esta especie de mosquito se encuentra altamente adaptada a ambientes urbanos y se reproducen en aguas estancadas que se encuentran en contenedores, basureros y neumáticos. Debido a su adaptabilidad al medio ambiente cuentan con la capacidad de recuperarse rápidamente luego de perturbaciones resultantes de fenómenos naturales como sequías o intervenciones humanas; una de estas adaptaciones es la capacidad de los huevos para resistir a la desecación (Kweka, *et al.*, 2018).

Rocha, *et al.* (2021) señalan que la frecuencia en la que *Ae. aegypti* coloniza contenedores en áreas determinadas, está directamente influenciado por múltiples factores socioeconómicos y de comportamiento. Además, describen que la calidad de los hábitats de las larvas está determinada por varios factores que incluyen el aporte de recursos nutricionales, la densidad de las larvas (competencia de recursos), presencia de depredadores y las propiedades fisicoquímicas del agua. Otros factores abióticos, como la salinidad y el pH, también pueden afectar la sobrevivencia y la tasa de crecimiento de las larvas.

Asimismo, los mosquitos se reproducen mejor en la época de lluvia, por lo que durante el verano aumenta su densidad poblacional y, en consecuencia, también se incrementa la posibilidad de transmisión de arbovirus (Robles, *et al.*, 2020). Además, la OPS (2016) menciona que la hora de

mayor actividad del mosquito es temprano por la mañana y al atardecer, por lo tanto, es el período de mayor riesgo para las picaduras; es importante mencionar que el rango de vuelo del mosquito es corto, no vuela más de 25 metros, pero se han encontrado mosquitos que vuelan hasta 400 metros de distancia en busca de alimento (Juárez, *et al.*, 2022).

Control de vectores

A pesar de los esfuerzos de los expertos, aún no se cuenta con una vacuna o medicamento contra las arbovirosis mencionadas anteriormente, el método más efectivo para disminuir la incidencia de casos de arbovirosis y la prevalencia de *Ae. aegypti* es el control del vector (OPS, 2016). Wilson, *et al.* (2020) mencionan que el control de vectores tiene como objetivo limitar la transmisión de patógenos al reducir o eliminar el contacto humano con vector; existe una amplia gama de herramientas de control de vectores, que pueden clasificarse en herramientas químicas y no químicas.

En cuanto a las herramientas no químicas, la OMS (2009) menciona la gestión ambiental, la cual busca cambiar el medio ambiente para prevenir o disminuir la propagación del vector por medio de la eliminación o alteración de los contenedores que proporcionan hábitats para las larvas. Existen tres tipos de gestión ambiental; modificación ambiental, la cual consiste en transformaciones físicas duraderas para reducir los hábitats de larvas de vectores; manipulación ambiental, incluye cambios temporales en los hábitats de los vectores que involucran el manejo de contenedores, como el vaciado y la limpieza frecuente; y por último, se encuentran los cambios en el comportamiento humano, las cuales son acciones para reducir el contacto entre humanos y vectores, como la instalación de mosquiteros en ventanas y puertas.

Por otro lado, las herramientas químicas se utilizan cuando las herramientas no químicas no pueden aplicarse o cuando son muy costosas; estos métodos se basan en la utilización de químicos como larvicidas e insecticidas; sin embargo, este método cuenta con algunas desventajas, por ejemplo, en dosis altas, los insecticidas y larvicidas pueden ser tóxicos. Además, es necesario realizar anualmente varias fumigaciones con los químicos, especialmente en áreas donde hay alta prevalencia del vector (OMS, 2009).

4.3. Insecticidas

Según el National Pesticide Information Center [npic] (2019), los insecticidas son pesticidas formuladas para matar, dañar, repeler o mitigar uno o más especies de insectos. El primer uso registrado de insecticidas data hace más de 4.500 años, cuando los sumerios utilizaban compuestos de azufre para controlar insectos y ácaros, mientras que hace unos 3,200 años los chinos usaban mercurio y compuestos de arsénico para controlar los piojos del cuerpo. Hasta la década de 1940, las sustancias inorgánicas, como el clorato de sodio, ácido sulfúrico y otros productos químicos orgánicos derivados de fuentes naturales, todavía se usaban ampliamente en el control de plagas, sin embargo, esa misma década, se aceleró el crecimiento de los plaguicidas sintéticos, donde se puede mencionar DDT, BHC, aldrín y paratión (International Union of Pure and Applied Chemistry [IUPAC], 2010).

IUPAC (2010) menciona que, por muchos años, DDT fue el insecticida más popular debido a su actividad de amplio espectro, parecía tener baja toxicidad para los mamíferos y reducía las enfermedades transmitidas por insectos, como la malaria, la fiebre amarilla y el tifus. Sin embargo, en 1946, se reportó resistencia al DDT por parte de las moscas domésticas y debido a su uso generalizado. Por lo que la investigación sobre pesticidas e insecticidas continuó y entre 1970 y 1980, se introdujeron los insecticidas de tercera generación de piretroides, avermectinas y benzoilureas como tratamiento por aspersión; de igual forma que con el DDT, se presentaron problemas de resistencia, por lo que se introdujeron estrategias de manejo para combatir este efecto negativo. Desde 1990, las actividades de investigaciones se han concentrado en encontrar nuevos miembros de

las familias de insecticidas ya existentes para que tuvieran una mayor selectividad y mejores perfiles ambientales y toxicológicos.

Actualmente los insecticidas se clasifican basados en su estructura y mecanismo de acción (United States Environmental Protection Agency, 2022). El Insecticide Resistance Action Committee [IRAC] (2010), ordena los insecticidas sintéticos en 28 grupos por su mecanismo de acción, donde se pueden mencionar los antagonistas del canal de cloro activado por GABA como los fiproles, entre otros; con fines de la investigación nos enfocaremos en la clasificación de los insecticidas moduladores del canal de sodio, donde se encuentran las piretrinas y los piretroides.

4.3.1. Piretroides

Los piretroides son un grupo de compuestos de origen natural aislados de las flores de la planta *Tanacetum cinerarioaeifolium*. Los piretroides naturales son compuestos inestables que se descomponen rápidamente bajo la influencia de la luz, por lo que se ha desarrollado la síntesis de derivados más resistentes a la radiación, que, además, son más tóxicos para los insectos; actualmente la permetrina y la deltametrina (Figura 4.4) son los piretroides más utilizados (Holynska-Iwan y Szewczyk-Golec, 2020).

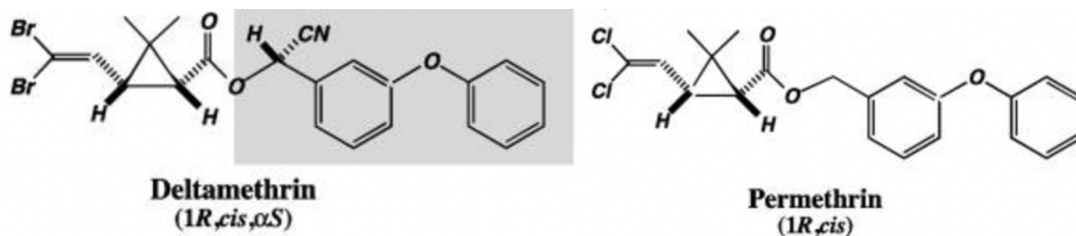


Figura 4.4: Estructura química de la deltametrina y permetrina. (Soderlund, 2013)

Múltiples estudios han demostrado que el principal mecanismo de acción de los piretroides, tanto en insectos como en mamíferos es la disrupción estereoespecífica de los canales de sodio voltaje dependientes de las células nerviosas; sin embargo, también se cuenta con evidencia de que esta clase de insecticidas actúan sobre otras dianas biológicas, tales como los canales de calcio voltaje dependiente, así como los canales de cloro voltaje dependiente (Paz, 2018).

Respecto a los canales de sodio voltaje dependientes, Yuzhe, *et al.* (2016) menciona que estos son fundamentales para la iniciación y propagación de los potenciales de acción en el sistema nervioso. El canal de sodio se encuentra compuesto por cuatro dominios repetidos, cada uno con seis segmentos transmembrana helicoidales. La posición de estos cuatro dominios determinan la selectividad iónica de los canales de sodio (Figura 4.5).

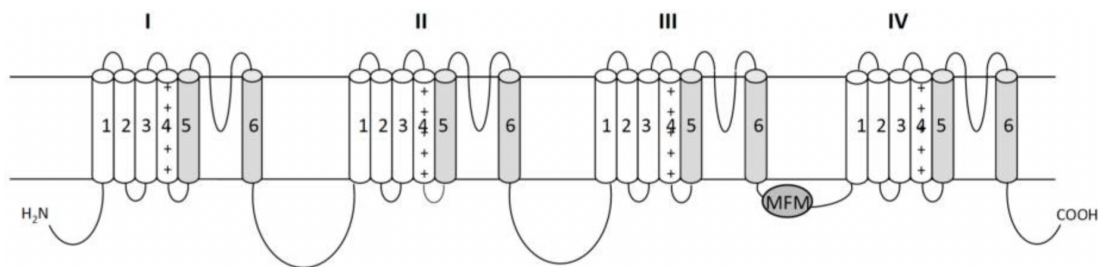


Figura 4.5: Estructura del canal de sodio en *Ae. aegypti*.
(Yuzhe, *et al.*, 2016)

Tras la despolarización de la membrana, los canales de sodio se abren y los iones de sodio fluyen hacia el interior de la célula provocando el aumento acelerado de los potenciales de acción debido a la despolarización del potencial de membrana (Yuzhe, *et al.*, 2016). También se menciona que los piretroides se unen a los canales de sodio abiertos y mejoran la activación e inhiben la inactivación de los canales de sodio, dando como resultado su apertura prolongada y por consiguiente dan paso a bloqueos en la conducción nerviosa y en última instancia la parálisis y muerte del insecto (Soderlund, 2013).

4.4. Resistencia a insecticidas

La resistencia a insecticidas se define como un cambio en la susceptibilidad de poblaciones de insectos debido al uso descontrolado de insecticidas con el fin de alcanzar el nivel adecuado de control de estas poblaciones (IRAC, s.f.). Se cree que el primer caso de este fenómeno se registró entre 1940 y 1950; sin embargo, con la implementación de nuevos insecticidas orgánicos sintéticos como el DDT y los organofosfatados, se observó un rápido incremento en los números de casos de resistencia a estos insecticidas (Sparks, *et al.*, 2021).

Este fenómeno representa un problema a nivel económico, ya que miles de cultivos se han perdido a causa de la resistencia a insecticidas por parte de las principales plagas y se ha reportado que más de 600 especies de plagas han desarrollado resistencia a pesticidas e insecticidas (Pesticide Environmental Stewardship [PES], s.f.). Pero este fenómeno tomó mayor relevancia dentro del campo científico cuando se reportó resistencia en insectos vectores de enfermedades que afectan a los humanos (Naqqash, Gökçe, Bakhsh y Salim, 2016).

Múltiples investigaciones se han desarrollado con el fin de controlar la resistencia a insecticidas que han ido desarrollando los vectores y actualmente existen dos enfoques principales de investigación; el primero se basan en estudiar los mecanismos moleculares implicados en la resistencia y el segundo enfoque de investigación se basa en dilucidar el manejo de la resistencia desarrollada (Knobler, *et al.*, 2003). A continuación, se describen los principales mecanismos de resistencia investigados hasta el momento.

4.4.1. Resistencia por alteraciones del sitio objetivo de los insecticidas

Durante este mecanismo, el mosquito desarrolla la capacidad de mutar el sitio de unión al que es específico el insecticida, causando la incompatibilidad de la activación de este (Khan, *et al.*, 2019). Ishaak, Jaal, Ranson y Wondji (2015) mencionan que en mosquitos del género *Aedes*, una de las principales mutaciones del sitio objetivo es la mutación de “resistencia knockdown” (kdr) que confiere resistencia a los insecticidas piretroides y DDT; donde se da una alteración en el canal de sodio

controlado por voltaje (NaV, por sus siglas en inglés o VGSC), causada por más de alguna sustitución de aminoácidos que alteran la conformación del canal (Melo, *et al.*, 2020).

Este mecanismo es un buen predictor de la eficacia de los piretroides, por medio del genotipado de alelos mutantes *kdr*; por ejemplo, las mutaciones en las posiciones S989P, I1011M/V, V10116G/I y F1534C se han reportado en poblaciones de *Aedes* resistentes a piretroides en todo el mundo. Sin embargo, en el sudeste asiático, predominan las mutaciones en la posición F1534C y V1016G; mientras que, en Latinoamérica, sobresalen las mutaciones I1011V y V1016I (Zuharah y Sufian, 2021).

4.4.2. Resistencia por penetración cuticular reducida

También conocido como mecanismo físico de resistencia y como su nombre lo indica, consiste en la penetración cuticular reducida del insecticida (Bisset, 2002). Balabanidou, Grigoraki y Vontas (2018) se refieren a este mecanismo como aquel donde se presentan modificaciones en la cutícula que eventualmente ralentizan la penetración de las moléculas de insecticida dentro del cuerpo de los insectos y resaltan que funciona por dos principales mecanismos. El primer mecanismo se basa en el engrosamiento de la cutícula y el otro en la alteración de la composición de la cutícula.

Por otro lado, estudios indican que este tipo de resistencia proporciona más tiempo para la detoxificación. Facilita la acción de distintas enzimas metabólicas y por ello, suele estar implicada en la resistencia cruzada de múltiples insecticidas, debido a su propiedad lipofílica; por lo tanto, se depositan grandes cantidades de hidrocarburos cuticulares sobre la cutícula que funcionan como capa impermeabilizante que confiere resistencia a la desecación (Gan, *et al.*, 2021).

4.4.3. Resistencia metabólica

Autores mencionan que este es el tipo de resistencia más común y desafiante de todos los mecanismos de resistencia a los insecticidas. En este tipo de resistencia, las enzimas que detoxifican el insecticida pueden sobreexpresarse o alterar la afinidad de la enzima por el insecticida a través de sustituciones de aminoácidos. Además, la sobreexpresión de genes de resistencia a insecticidas es el mecanismo más frecuente en mosquitos resistentes y el aumento de la expresión de estos genes puede deberse a que actúan sobre el promotor o en la amplificación del gen (Riveron, 2018). Dentro de las principales enzimas detoxificantes, se mencionan los citocromo P450 (P450s por sus siglas en inglés), carboxilesterasas (CCE por sus siglas en inglés) y glutatión-S-transferasas (GSTs por sus siglas en inglés).

Citocromo P450 (P450s)

Son enzimas con un papel relevante en la ruptura de compuestos endógenos, xenobióticos, carcinógenos químicos e insecticidas como los neonicotinoides y los organofosforados (Khan, *et al.*, 2019). Los CYP son una gran familia y *Ae. aegypti* tiene aproximadamente 160 genes CYP, de manera que demostrar los CYP específicos responsables de la resistencia ha sido un gran desafío, debido a la cantidad de CYP y porque este tipo de resistencia puede ser consecuencia de la sobreexpresión de estos genes o a una mutación en el marco de lectura abierto de un CYP (Smith, Tyagi, Kasai y Scott, 2018). Sin embargo, se ha demostrado que diversos miembros de la subfamilia CYP9J, se expresan en diversas cepas de *Ae. aegypti* resistente a piretroides (Rault, O'neal, Johnson y Anderson, 2019).

Carboxilesterasas (CCE)

Estas enzimas pertenecen a un amplio grupo de enzimas metabólicas con la capacidad de metabolizar distintos sustratos endógenos y exógenos; en caso de los piretroides, organofosforados, carbamatos y neonicotinoides, las esterasas E4 y FE4 degradan los enlaces éster antes de que estos alcancen el sitio objetivo y consecuentemente se da la resistencia a los insecticidas (Khan, *et al.*, 2019).

Por ejemplo, en *Ae. aegypti* la sobreexpresión del gen CCEAE3A y otros genes CCE tienen un rol importante en la resistencia a temefos. El mecanismo de acción se da por medio del secuestro y metabolización de la forma activa del insecticida (Cattel, *et al.*, 2021).

Glutatiòn-S-transferasas (GSTs)

Pertenecen a una familia multigénica de proteínas multifuncionales diméricas que desempeñan un papel central en la desintoxicación de compuestos xenobióticos, incluidos fármacos, herbicidas e insecticidas (Prapanthadara, *et al.*, 2005). También se encuentran involucrados en el transporte intracelular, la protección contra el estrés oxidativo y la biosíntesis de hormonas (Khan, *et al.*, 2019).

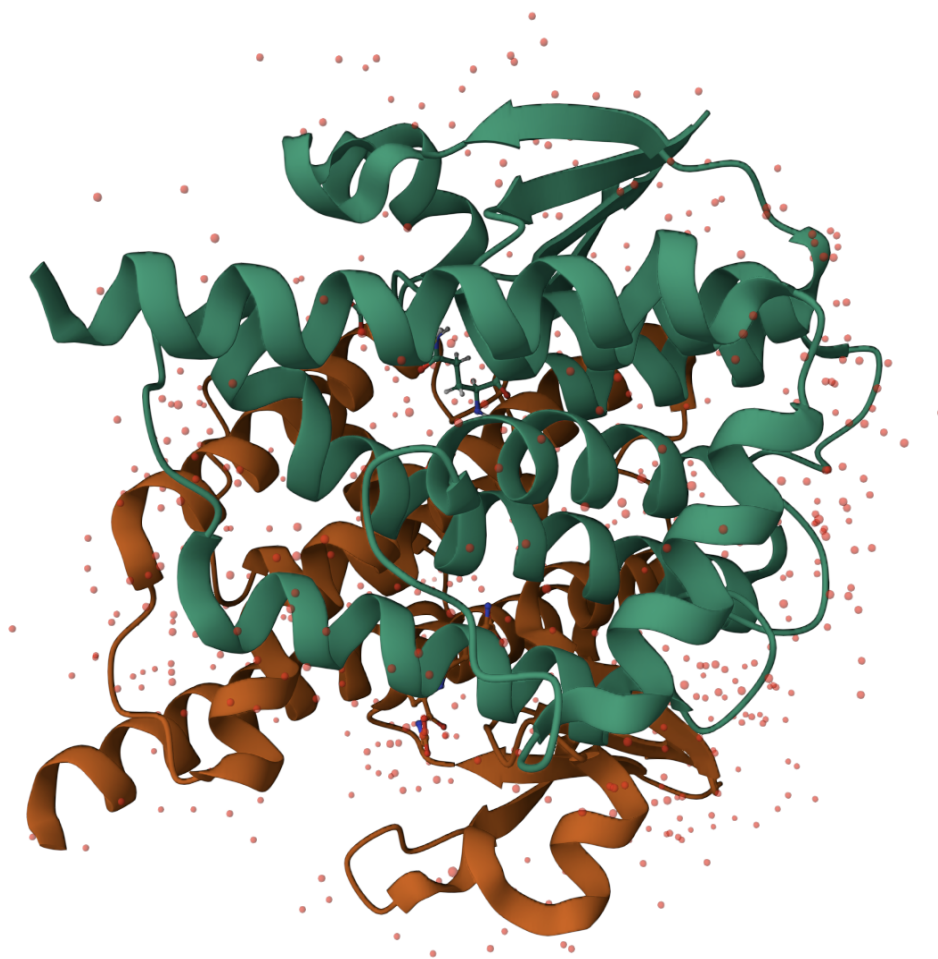


Figura 4.6: Estructura de Glutatiòn S-transferasas 2 en *Ae. aegypti*. (Yunta, 2017).

Helvecio, *et al.* (2020) mencionan que las GSTs se pueden clasificar en tres grupos según su ubicación celular; citosólicas, microsomales y mitocondriales; sin embargo, los mosquitos solo cuentan con las GSTs citosólicas y microsomales, pero solo las citosólicas se han asociado en la resistencia a insecticidas. Las GSTs citosólicas (Figura 4.6) constan de dos subunidades que forman homo y heterodímeros; cada subunidad contiene un sitio específico de unión (sitio G) junto a un sitio de unión de ligandos electrofílicos no específicos (sitio H). El sitio G se encuentra en la N-terminal de la proteína y es altamente conservado mientras que el sitio H interactúa con los sustratos hidrofílicos y se encuentra comúnmente en el C-terminal (Lumjam, *et al.*, 2007).

En *Ae. aegypti* las GSTs constan de un grupo de 8 genes ordenados mapeados genéticamente en el cromosoma 2, superconting 1.291 y estudios han demostrado que GSTe2 es muy eficiente para metabolizar DDT. En muchos casos, las GSTs individuales involucradas no han sido identificadas y las GST han sido implicadas solo por asociación; por ejemplo por aumento en la actividad de la enzima detectando un sustrato modelo o en cepas de insectos resistentes a insecticidas frente a cepas susceptibles (Enayati y Hemingway, 2005).

El rol de las GSTs en la resistencia a insecticidas se ha determinado en diversas especies de mosquito y pestes. Por ejemplo, Tchouaki y colaboradores (2019) encontraron que en poblaciones de *Anopheles funestus*, sin mutación en *kdr*, la resistencia a piretroides y DDT consistentemente es conferida por GSTs. De hecho, en este estudio se buscó detectar el cambio de un aminoácido en el gen de la Glutación S-transferasa Epsilon 2 (GSTe2) como marcador metabólico de resistencia. Por otra parte se cuenta con estudios que han demostrado en *Plutella xylostella* que la detoxificación de (S)-(-)-palasonina se da por metabolismo directo. Además, se demostró que GSTe1 y GSTe2 se encuentran altamente implicado en este proceso de detoxificación (Fan, Liu, Li y Zhang, 2022).

5.1. Muestra

La muestra fue colectada como parte de la Red de Vigilancia Molecular de Resistencia a Insecticidas (ViMoRi) en la Región de América Central y República Dominicana, por el personal de salud, en el año 2021. Siguiendo la metodología del bioensayo de la botella (CDC, s.f.) y utilizando mosquitos hembra *Ae. aegypti* de 2-5 días de edad adulta de la F1, se estableció el perfil de resistencia a deltametrina y permetrina; así mismo, a partir de los resultados de los bioensayos con compuestos sinergistas (CDC, s.f.) (Figura 5.1 y Figura 5.2), se seleccionaron las poblaciones de Villa Consuelo, República Dominicana y Carmen, Costa Rica para el desarrollo del presente estudio. La cepa de laboratorio New Orleans fue utilizada como cepa susceptible a los insecticidas y todos los ejemplares fueron preservados en RNAlater a -20°C .

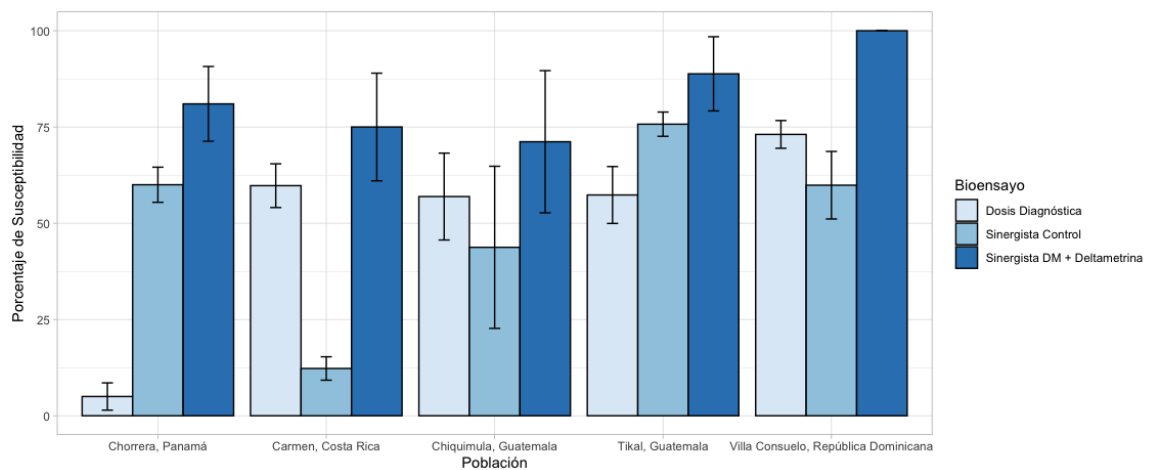


Figura 5.1: Resultados de los bioensayos de deltametrina de dosis diagnóstica y sinergistas. Elaboración propia. Datos no publicados. Unidad de Entomología Médica y Malaria.

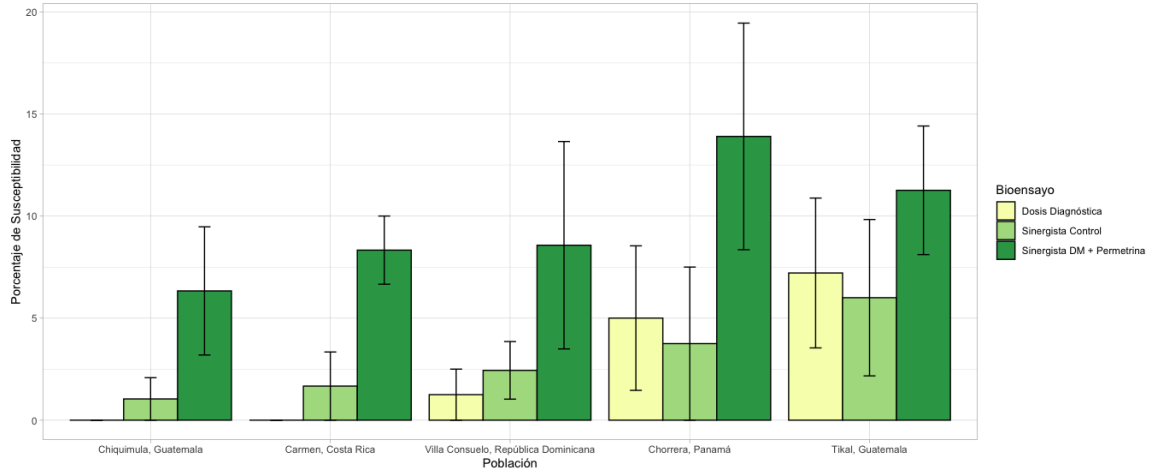


Figura 5.2: Resultados de los bioensayos de permetrina de dosis diagnóstica y sinergistas. Elaboración propia. Datos no publicados. Unidad de Entomología Médica y Malaria.

5.2. Extracción de ARN

La extracción de ARN total se realizó con el kit SV Total ARN Isolation System de Promega® (Promega, s.f.), con modificaciones realizadas por Castañeda (2021) (Anexo A). Se extrajeron 3 muestras de 10 mosquitos cada una, para los siguientes fenotipos: resistentes a deltametrina, resistentes a permetrina, no expuestos al insecticida y cepa de referencia New Orleans. Los mosquitos de cada muestra se colocaron dentro de tubos de 1.5 ml con buffer de lisis y se maceraron con un pistilo para homogenizar la muestra. Seguido, se añadieron 350 uL de buffer de dilución y se incubó el tubo en un bloque térmico por 3 minutos a 70°C. Pasada la incubación, se centrifugó la muestra 14,000g por 10 minutos a temperatura ambiente.

Se transfirió 525 uL del sobrenanate a un tubo nuevo y se agregaron 200 uL de etanol al 95 %, se mezcló y se trasladó el volumen total a la columna provista por el kit. Se centrifugó por 1 minuto a 14,000g a temperatura ambiente, a continuación se preparó la solución de incubación de DNasa I con 40 uL de Yellow Core Buffer, 5 uL de MnCl y 5 uL de DNasa I. Se agregó el volumen total de la solución a la columna y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 200 uL de la solución que detiene la DNasa y se centrifugó a 14,000g por un minuto a temperatura ambiente. Se realizó un lavado con 600 uL de la solución de lavado de ARN, se centrifugó 14,000g por un minuto a temperatura ambiente y se realizó un segundo lavado con 250 uL de la misma solución de lavado, se centrifugó a velocidad máxima por 2 minutos y por último se agregaron a la columna 100 uL de agua libre de nucleasas, se centrifugó a 14,000g por un minuto y se cuantificaron los valores de ARN y purezas por medio de NanoDrop. Las extracciones se almacenaron a -80°C hasta su uso.

5.3. Concentración de muestras y Geles de integridad

Las muestras de ARN que no alcanzaron concentraciones mayores a 250ng/uL se colocaron en un concentrador Vacufuge plus Eppendorf, por 25 minutos y se cuantificaron los valores de ARN y purezas por medio de NanoDrop. Para comprobar la integridad del ARN luego del proceso de concentración se utilizó la metodología descrita por Aranda, LaJoie y Jarczyk (2013), con las siguientes modificaciones: se realizó un gel de agarosa al 1% de 30 uL con buffer TBE 1x y se le agregó 600

uL de cloro comercial al 3%; se dejó reposar por 5 minutos y se mezcló eventualmente, seguido se le agregaron 0.6 uL de BrEt. Se colocó la mezcla dentro de un molde de 8 pozos y se dejó solidificar por 25 minutos. Se tomó 1 ug de las muestras de ARN concentradas y sin concentrar, se cargaron en el gel con 3 mL de Loading Buffer, se dejó correr el gel por 35 minutos a 100V (Aranda, LaJoié y Jorcyk, 2013). De tener disponible dentro del laboratorio se recomienda agregar una escalera de peso molecular de ARN. Sin embargo, es posible analizar la presencia de las bandas sin necesidad de una escalera y esto se realiza por medio de literatura que indiquen las características de las bandas 28S y 18S y permitan comparar los resultados teóricos con los experimentales.

5.4. Síntesis de ADNc

El kit de síntesis de ADNc que se utilizó fue Promega GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, s.f.), con el cebador Oligo (dT) y modificaciones realizadas por Castañeda (2021) (Anexo B). Se tomó 1 ug de ARN de la muestra seleccionada y se colocó en un tubo de 0.2 uL, se completó con agua DEPC para llegar a un volumen total de 4 uL y se le agregó 1 uL del cebador Oligo(dT), se incubó la mezcla en el termociclador por 5 minutos a 70 °C. Terminada la incubación, se colocó el tubo en hielo por un mínimo de 5 minutos. Seguido, se preparó la mezcla para la retro transcripción con 6.5 ul de agua DEPC, 4.0 uL del buffer de reacción 5X, 2.0 uL de MgCl₂, 1 uL de la mezcla de nucleótidos, 0.5 uL de la enzima recombinante RNAsin, 1 uL de la enzima transcriptasa reversa y se agregaron 5 uL de ARN experimental preparado al inicio. El programa de incubación utilizado fue 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos y 70°C a 15 minutos. La síntesis de ADNc se almacenó a 4°C hasta su uso.

5.5. Curva de eficiencia de cebadores

Este procedimiento se replicó para los cebadores GSTe2R, GSTe2F, GSTe5R, GSTe5F, GSTe7R, GSTe7F de los genes GSTe2, GSTe5 y GSTe7, respectivamente (Anexo C). La curva constó de 4 puntos. Se utilizó ADNc sintetizado y se prepararon diluciones seriadas de 1:100, 1:1000, 1:10000 y 1:100000. La receta de qPCR fue la siguiente: 6.8 uL de agua libre de nucleasas, 10 uL SYBR Green a concentración final 1X y 1 ul de cada uno de los cebadores con concentración final de 0.5 uM, por reacción. Se emplearon tiras de tubos de 0.2 uL con tapaderas ópticas (Applied biosystems, 4316567) y se agregaron 18 uL del Master Mix y 2 uL de la dilución. El programa de qPCR fue: 50 °C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos y 60 °C por 10 segundos. Además, se agregó el programa de PCR para la curva de disociación y evaluar la especificidad de los primers a validar, con el siguiente programa: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto y 95 °C por 1 segundo. Se utilizó el termociclador Applied Biosystems Sistema de qPCR QuantStudio 3. El Software utilizado para analizar los datos fue QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System, donde se obtuvo la ecuación de la curva, coeficiente de correlación mayor o igual a 0.99 y porcentajes de eficiencia entre 90 % y 110 %.

5.6. Cuantificación de expresión génica

Se utilizó ADNc sintetizado a partir del extracto de ARN de las muestras a analizar, la cuantificación génica se realizó con una dilución de 1:1000 de la muestra con la siguiente receta de qPCR: 6.8 uL de agua libre de nucleasas, 10 uL de SYBR Green (concentración final 1X) y 1 uL de de GSTe2R y GSTe2F con concentración final 0.5 uM, por reacción. Se emplearon tiras de tubos de 0.2 uL con tapaderas ópticas (Applied biosystems, 4316567) y se agregaron 18 uL del Master Mix y 2 uL de la dilución. El programa de qPCR fue: 50 °C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, 40 ciclos

de 95 °C por 10 segundos y 60 °C por 10 segundos. Los genes de referencia utilizados fueron RSP3 y Ae60sL8. Se utilizó el terminociclador Applied Biosystems Sistema de qPCR QuantStudio 3. El Software utilizado para analizar los datos fue QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System

5.7. Análisis de datos

El análisis estadístico se calculó la expresión relativa de cada muestra por gen por medio del método delta delta Ct (Schmittgen y Livak, 2008). Además, se determinó el “fold change” respecto a la cepa de referencia y por último, se realizó la prueba t-Student para determinar la significancia de la expresión relativa de las muestras resistentes a deltametrina y resistentes a permetrina con respecto a la cepa de referencia.

6.1. Extracción de ARN

En el Cuadro 6.1 se presenta la información de cada una de las muestras de mosquitos hembra de 2-5 días de edad adulta. En cuanto al número de muestras extraídas, para la cepa de referencia New Orleans se extrajeron 3 muestras, para la población de Carmen, Costa Rica se extrajeron 9 muestras distintas, mientras que para la población de Villa Consuelo, República Dominicana se extrajeron 10 muestras.

Cuadro 6.1: Información de las muestras de ARN extraídas

Muestra	Población	Fenotipo	Bioensayo	Individuos
CR1	Carmen, Costa Rica	No expuesto a insecticida	22CR3	C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10
CR2	Carmen, Costa Rica	Resistente de per-metrina	22CR5	R1, R4, R7, R9, R12, R15, R19, R22, R26, R33
CR3	Carmen, Costa Rica	Resistente de per-metrina	22CR5	R18, R28, R34, R36, R39, R43, R46, R48, R51, R60
CR4	Carmen, Costa Rica	Resistente de per-metrina	22CR5	R2, R10, R16, R23, R37, R41, R45, R53, R57, R61
CR5	Carmen, Costa Rica	No expuesto a insecticida	22CR4	C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10
CR6	Carmen, Costa Rica	No expuesto a insecticida	22CR5	C2, C3, C4, C5, C6, C8, C9, C10, C12, C14

Muestra	Población	Fenotipo	Bioensayo	Individuos
CR7	Carmen, Costa Rica	Resistente a delta-metrina	22CR3	R1, R2, R6, R7, R8, R10, R11, R12, R14, R16
CR8	Carmen, Costa Rica	Resistente a delta-metrina	22CR4	R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R11, R13
CR9	Carmen, Costa Rica	Resistente a delta-metrina	22CR18	R1, R4, R5, R6, R8, R10, R11, R12, R14, R16
NO1	New Orleans	Cepa de referencia	-	NO1, NO2, NO5, NO9, NO13, NO14, NO15, NO17, NO18, NO28
NO2	New Orleans	Cepa de referencia	-	NO3, NO6, NO8, NO10, NO11, NO22, NO23, NO26, NO27, NO2
NO3	New Orleans	Cepa de referencia	-	NO4, NO7, NO12, NO16, NO19, NO20, NO21, NO24, NO25, NO30
VC1	Villa Consuelo, República Dominicana	Resistente a delta-metrina	22VC8	R1, R2, R3, R4, R5, R13, R14, R15, R16, R17
VC2	Villa Consuelo, República Dominicana	Resistente a delta-metrina	22VC6	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10
VC3	Villa Consuelo, República Dominicana	Resistente a delta-metrina	22VC4	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10
VC4	Villa Consuelo, República Dominicana	No expuesto a insecticida	22VC4	C1, C4, C5, C7, C10, C12, C13, C15, C17, C18
VC5	Villa Consuelo, República Dominicana	No expuesto a insecticida	22VC6	C1, C5, C6, C7, C11, C12, C13, C16, C17, C20
VC6	Villa Consuelo, República Dominicana	No expuesto a insecticida	22VC5	C2, C4, C6, C7, C11, C14, C16, C17, C22, C23
VC7	Villa Consuelo, República Dominicana	Resistente a permetrina	22VC5	R3, R6, R7, R8, R10, R11, R12, R13, R14, R15

Muestra	Población	Fenotipo	Bioensayo	Individuos
VC8	Villa Consuelo, República Dominicana	Resistente a perme-trina	22VC5	R1, R4, R16, R19, R20, R27, R31, R34, R36, R49
VC9	Villa Consuelo, República Dominicana	Resistente a perme-trina	22VC5	R2, R23, R39, R43, R61, R71, R76, R80, R88, R92
VC10	Villa Consuelo, República Dominicana	Resistente a perme-trina	22VC5	R5, R9, R17, R41, R67, R72, R89, R90, R91, R93

Además, en el Cuadro 6.2 se muestran los datos de las cuantificaciones de cada una de las extracciones de ARN realizadas. Las muestras que se encuentran marcadas por un asterisco (*) son aquellas muestras que no alcanzaron una concentración mayor o igual a 250 ng/uL; dato el cual es requerido por el kit de síntesis de ADNc. Es posible observar que de las 9 extracciones realizadas para la población Carmen, Costa Rica, 6 muestras no alcanzaron la concentración deseada; de las 3 extracciones de la cepa de referencia New Orleans, 2 de estas no presentaron la concentración óptima y por último, de las 10 extracciones de Villa Consuelo, República Dominicana, únicamente 1 extracción no alcanzó los valores deseados. En cuanto a las purezas, es posible observar que todas las muestras presentan valores aceptables de pureza en el radio A260/280, mientras que en el radio A260/230 se obtuvieron valores por debajo del rango óptimo.

Cuadro 6.2: Cuantificación por medio del equipo NanoDrop de la concentración y purezas de las extracciones de ARN.

Muestra	ng/uL	A260/280	A260/230
*CR1	202.0	2.12	1.92
*CR2	236.0	2.09	1.99
*CR3	199.2	2.12	2.01
CR4	275.6	2.10	1.83
CR5	320.8	2.09	1.96
*CR6	235.3	2.10	1.87
*CR7	206.4	2.08	1.89
*CR8	211.5	2.08	1.84
CR9	414.0	2.13	2.00
NO1	278.9	2.11	1.90
*NO2	220.4	2.11	2.12
*NO3	192.7	2.11	2.14
VC1	388.2	2.06	1.75
VC2	596.5	2.13	1.95
VC3	405.2	2.10	2.02
VC4	289.9	2.13	1.53
VC5	475.4	2.13	2.06
VC6	322.0	2.11	1.89
VC7	421.7	2.11	2.00
*VC8	115.4	2.02	1.71
VC9	278.4	2.14	2.06
VC10	267.2	2.04	1.87

Con el fin de aumentar la concentración de las muestras que no alcanzaron los valores de concentración deseados, se realizó una concentración de las muestras y los valores de las cuantificaciones luego de 25 minutos de concentración en SpeedVac se presentan en el Cuadro 6.3. Es posible observar que la concentración aumentó en todas las muestras, excepto en la muestra VC8; por lo que esta muestra se descartó del presente estudio. También se exhibe que los valores de las purezas se mantienen aceptables.

Cuadro 6.3: Cuantificación por medio de NanoDrop de la concentración y purezas de las extracciones de ARN luego de 25 minutos de concentración SpeedVac.

Muestra	ng/uL	A260/280	A260/230
CR1	336.4	2.14	1.89
CR2	379.2	2.12	2.02
CR3	338.0	2.12	1.90
CR6	460.3	2.13	1.84
CR7	393.9	2.12	1.92
CR8	353.0	2.13	1.80
NO2	400.1	2.15	2.10
NO3	320.9	2.17	2.10
VC8	236.0	2.03	1.81

6.2. Concentración de muestras y Geles de integridad

En la Figura 6.1 se muestra el gel de integridad para evaluar la calidad del ARN de las muestras de Carmen, Costa Rica y New Orleans. Tal como se observa, todas las muestras, concentradas y no concentradas, presentaron las bandas 28S y 18S.

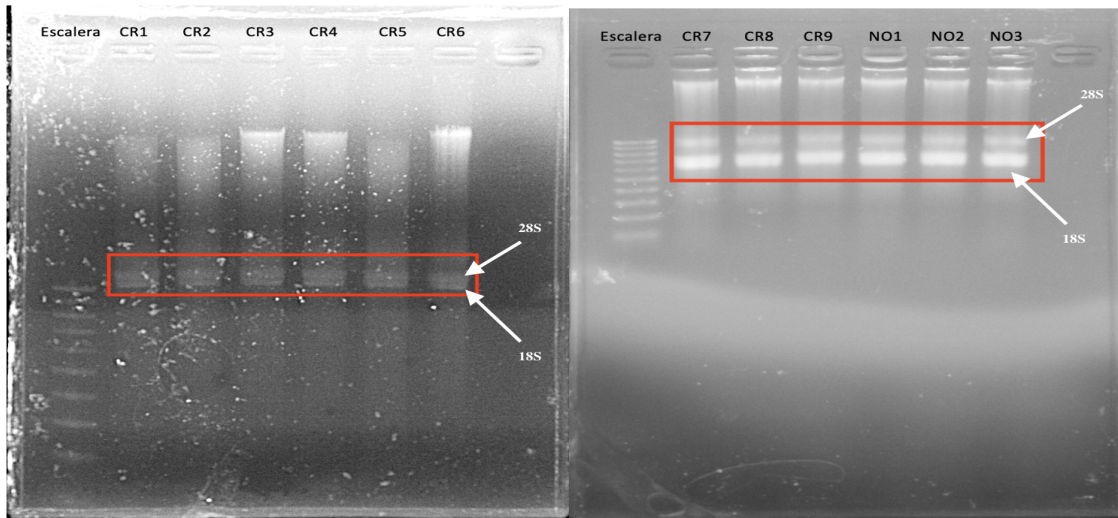


Figura 6.1: Gel de integridad al 1% de agarosa de la población El Carmen, Costa Rica y New Orleans.

En la Figura 6.2 se presenta el gel de integridad para evaluar la calidad del ARN de las muestras de Villa Consuelo, República Dominicana. Tal como se observa, todas las muestras, concentradas y no concentradas, presentaron las bandas 28S y 18S.

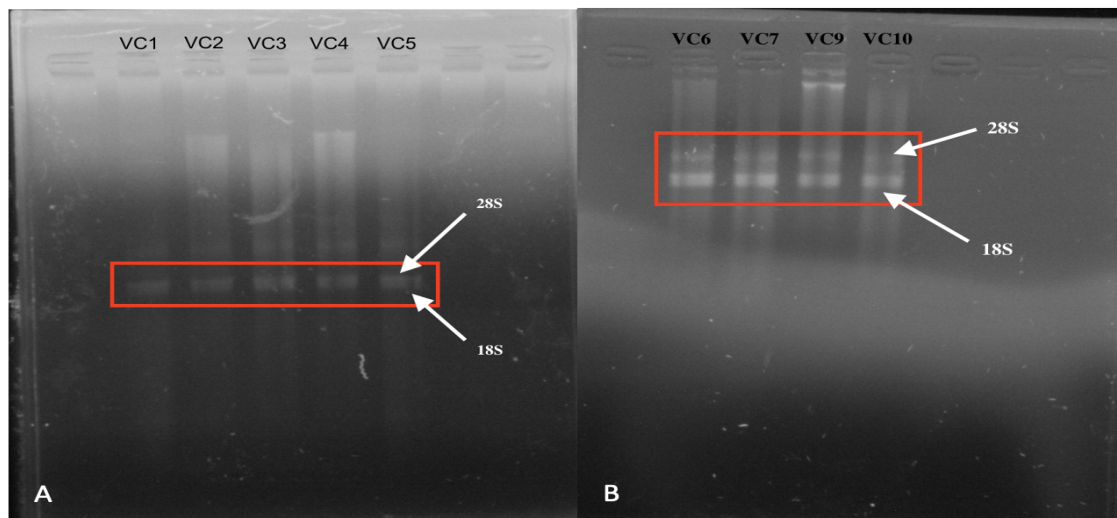


Figura 6.2: Gel de integridad al 1% de agarosa de la población Villa Consuelo, República Dominicana

6.3. Curva de eficiencia de los cebadores

En el Cuadro 6.4 se muestran las condiciones utilizadas para la optimización del par de cebadores del gen GSTe2. La muestra utilizada fue la NO1, una muestra no concentrada; con factor de dilución 1/10, con 0.5 uM de primers y 4 puntos en la curva estándar

Cuadro 6.4: Condiciones de optimización del par de cebadores del gen GSTe2.

Muestra	Factor de dilución	Concentración de cebadores	No. de puntos en la curva
NO1	1/10	0.5 uM	4

En el Cuadro 6.5 se presentan los valores de la eficiencia y el coeficiente de correlación de la curva estándar obtenida a partir de las condiciones del Cuadro 6.4. Tal como se observa, la eficiencia fue de 105.90 % y un R^2 de 0.9987.

Cuadro 6.5: Eficiencia y coeficiente de correlación (R^2) de la optimización del par de primers del gen GSTe2.

Eficiencia	Coeficiente de correlación (R^2)
105.90%	0.9987

En el Cuadro 6.6 se presentan los valores Ct utilizados para construir la curva estándar del gen GSTe2, con las condiciones descritas en el Cuadro 6.4.

Cuadro 6.6: Valores Ct de la optimización del gen GSTe2.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1/100	0.0	27.788	27.854	0.08034
		27.967		
		27.807		
1/1000	-1.0	31.176	30.947	0.17002
		30.768		
		30.898		
1/10000	-2.0	34.397	33.949	0.34131
		33.880		
		33.570		
1/100000	-3.0	36.928	37.481	0.39845
		37.852		
		37.662		

En la Figura 6.3 se expone la curva estándar de los primers del gen GSTe2. Tal como se observa, la curva grafica los valores del Ct en función del logaritmo de la concentración de la muestra: además, la curva cuenta con una ecuación de la recta de $y = -3.1881x + 27.776$.

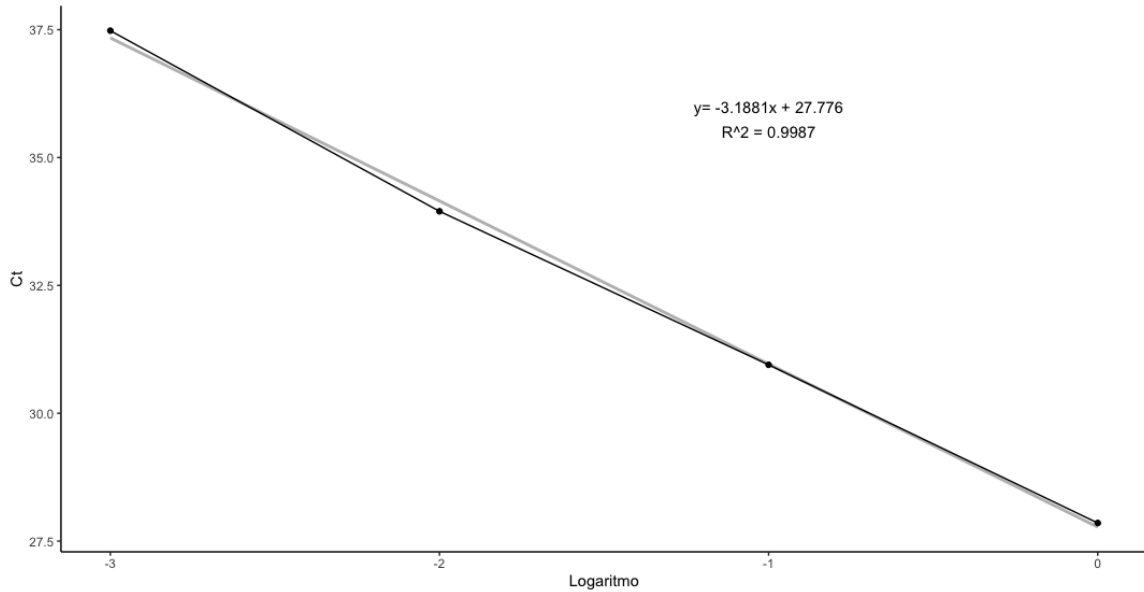


Figura 6.3: Curva estándar del gen GSTe2

Asimismo, se buscó optimizar los cebadores para los genes GSTe5 y GSTe7. Se realizó una prueba para el gen GSTe5 y dos pruebas para el gen GSTe7. En cuanto al gen GSTe5, no se presentó amplificación con las condiciones del Cuadro 6.7; mientras que para el gen GSTe7 se observó amplificación utilizando un factor de dilución de 1/2 y 0.5 uM de cebadores.

Cuadro 6.7: Condiciones de las pruebas de optimización del par de cebadores para los genes GSTe5 y GSTe7.

Gen	Muestra	Factor de dilución	Concentración de cebadores	Amplificó
GSTe5	NO3	1/10	0.3 uM	No
GSTe7	NO3	1/10	0.3 uM	No
	NO1	1/2	0.5 uM	Sí

En el Cuadro 6.8 se muestran los valores Ct de la prueba de optimización del gen GSTe7; estos valores fueron utilizados para construir la curva estándar (Figura 6.4).

Cuadro 6.8: Resultados del qPCR de la prueba que presentó amplificación del gen GSTe7.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1/2	0.0	31.070	31.070	0.0
1/4	-1.0	32.893	32.893	0.0
1/8	-2.0	33.433	33.433	0.0
1/16	-3.0	34.365	34.365	0.0
1/32	-4.0	34.027	34.027	0.0

En cuanto a la eficiencia y el coeficiente de correlación (R^2), para el gen GSTe7, se obtuvieron los valores de 186.28% y 0.8191, respectivamente (Cuadro 6.9).

Cuadro 6.9: Eficiencia y coeficiente de correlación (R^2) de la optimización del par de cebadores del gen GSTe7.

Eficiencia	Coeficiente de correlación (R^2)
186.28 %	0.8191

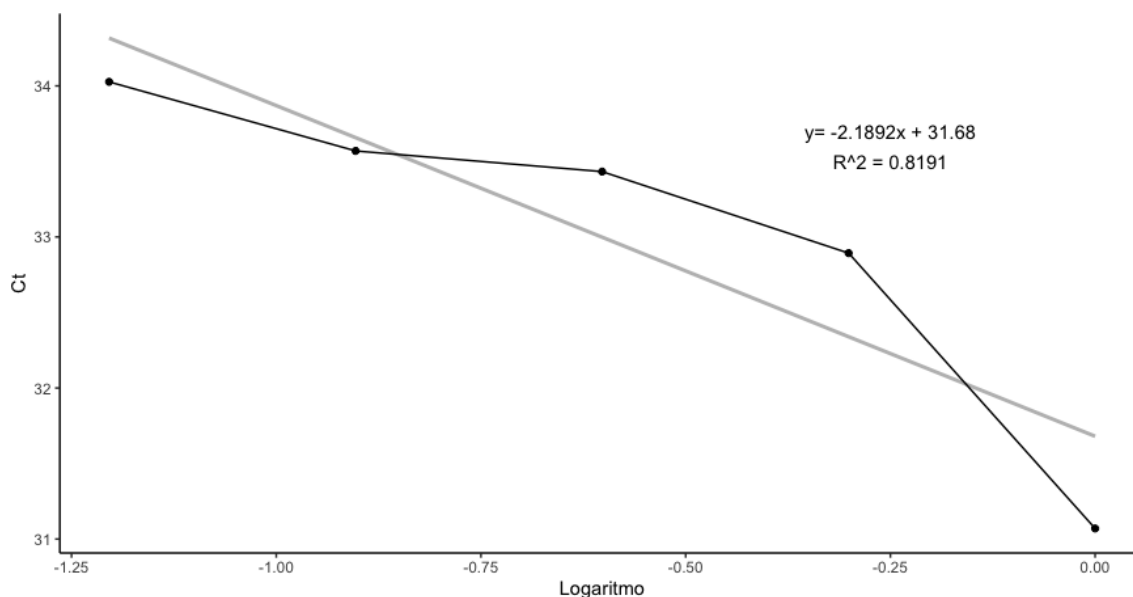


Figura 6.4: Curva estándar del gen GSTe7.

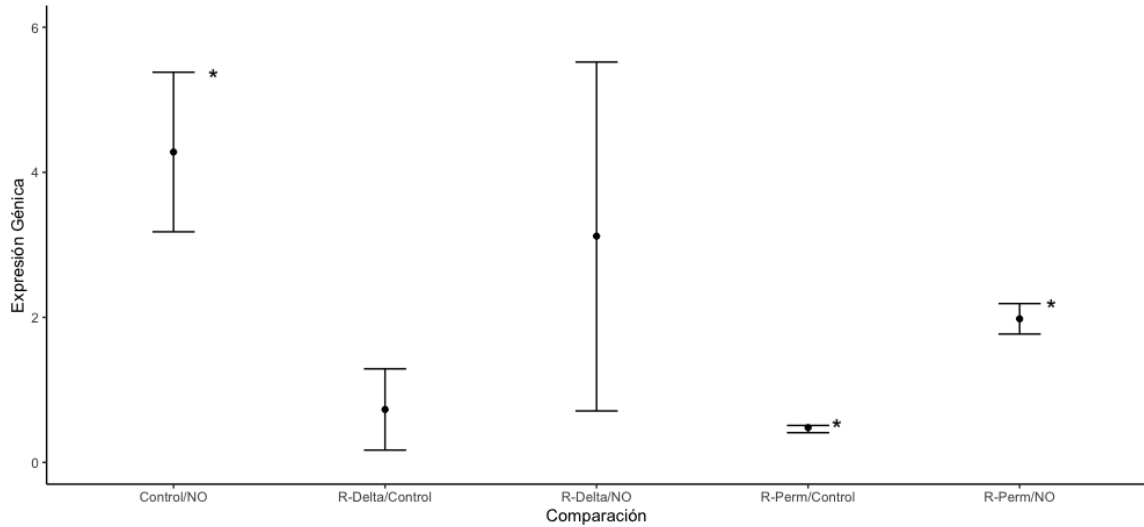
6.4. Cuantificación de expresión génica

En el Cuadro 6.10 y Figura 6.5 se presenta el análisis de expresión génica del gen GSTe2 en la población El Carmen, Costa Rica; el primer dato corresponde al grado de cambio de expresión génica, el segundo valor es el intervalo de confianza al 95 % y el último dato es el valor-p.

Cuadro 6.10: Análisis de expresión génica del gen GSTe2 de la población El Carmen, Costa Rica.

R-Delta/NO ^a	R-Perm/NO	R-Delta/Control	R-Perm/Control	Control/NO
3.12	1.98	0.73	0.46	4.28
(0.71-5.52)	(1.77-2.19)	(0.17-1.29)	(0.41-0.51)	(3.18-5.38)
valor-p 0.08062	valor-p 0.00192*	valor-p 0.21874	valor-p 0.00797*	valor-p 0.00235*

^aR-Delta = Resistentes a deltametrina, R-Perm = Resistentes a permetrina, NO = New Orleans (cepa de referencia), Control = muestras control = No expuestos a insecticida. *valor-p<0.05 significativo.



*valor-p<0.05 significativo. Barras significan intervalo de confianza al 95 %

Figura 6.5: Gráfica del análisis de expresión génica del gen GSTe2 de la población El Carmen, Costa Rica.

Al comparar los resultados de las muestras resistentes a deltametrina con las muestras de New Orleans (cepa de referencia) se determinó que el grado de cambio de expresión fue de 3.12, con un intervalo de confianza de 0.71-5.52 y un valor-p de 0.08062; el cual no es significativo. De la misma forma, al comparar con las muestras control, se obtuvo un grado de cambio en la expresión de 0.73, con un intervalo de confianza de 0.17-1.29 y un valor-p no significativo de 0.21874.

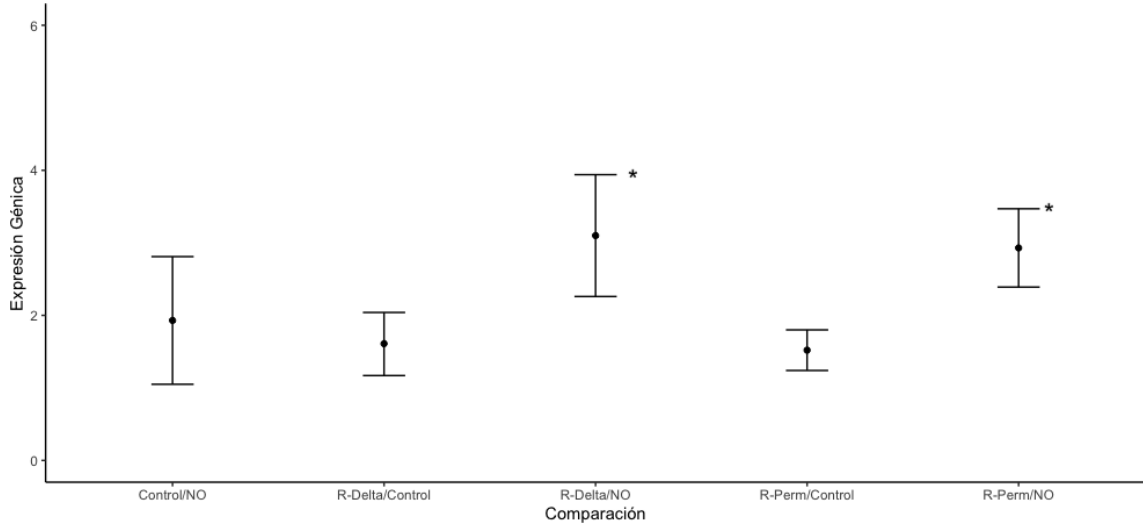
Por otro lado, al analizar los resultados de las muestras resistentes a permetrina, se obtuvo que al compararlos con las muestras de New Orleans el grado de cambio en la expresión es de 1.98, con un intervalo de confianza de 1.77-2.19 y un valor-p significativo de 0.00192. En esa misma línea, al comparar con las muestras control, el grado de cambio de expresión fue de 0.46, con intervalo de confianza de 0.41-0.51 y un valor-p significativo de 0.00797. Por último, al comparar las muestras control con las muestras de New Orleans, se determinó que el grado de cambio en la expresión génica fue de 4.28, con un intervalo de confianza de 3.18-5.38 y un valor-p significativo de 0.00235.

Al igual que en el Cuadro 6.10 y la Figura 6.5, el Cuadro 6.11 y la Figura 6.6 muestran el análisis de expresión génica del gen GSTe2 en la población Villa Consuelo, República Dominicana; el primer dato corresponde a al grado de cambio de expresión génica, el segundo valor es el intervalo de confianza al 95 % y el último dato es el valor-p.

Cuadro 6.11: Análisis de expresión génica del gen GSTe2 de la población Villa Consuelo, República Dominicana.

R-Delta/NO ^a	R-Perm/NO	R-Delta/Control	R-Perm/Control	Control/NO
3.10	2.93	1.61	1.52	1.93
(2.26-3.94)	(2.39-3.47)	(1.17-2.04)	(1.24-1.80)	(1.05-2.81)
valor-p 0.00464*	valor-p 0.00153*	valor-p 0.06669	valor-p 0.06596	valor-p 0.05849

^aR-Delta = Resistentes a deltametrina, R-Perm = Resistentes a permetrina, NO = New Orleans (cepa de referencia), Control = muestras control. *valor-p<0.05 significativo.



*valor- $p < 0.05$ significativo. Barras significan intervalo de confianza al 95 %.

Figura 6.6: Gráfica del análisis de expresión génica del gen GSTe2 de la población Villa Consuelo, República Dominicana.

Se obtuvo que al comparar las muestras resistentes a deltametrina con las muestras de New Orleans, el grado de cambio en la expresión génica fue de 3.10, con un intervalo de confianza de 2.26-3.94 y un valor- p significativo de 0.00464. Del mismo modo, al comparar con las muestras no expuestas a insecticida, se obtuvo un grado de cambio en la expresión génica de 1.61, con un intervalo de confianza de 1.17-2.04 y un valor- p no significativo de 0.06669.

Análogamente, se realizó el análisis con las muestras resistentes a permetrina; al comparar los datos con las muestras de New Orleans se obtuvo que el cambio en la expresión génica fue de 2.93, con un intervalo de confianza de 2.39-3.47 y un valor- p significativo de 0.00153. Asimismo, al comparar con las muestras no expuestas, se determinó que el grado en el cambio de la expresión fue de 1.52, con un intervalo de confianza de 1.24-1.80 y un valor- p no significativo de 0.06596. Al final, se determinó que el cambio en la expresión génica al comparar las muestras no expuestas y las muestras de New Orleans fue de 1.93, con un intervalo de confianza de 1.05-2.81 y un valor- p no significativo de 0.05849.

Análisis de resultados

El objetivo de la presente investigación fue determinar la expresión génica y el rol de Glutación-S-transferasas en la resistencia metabólica a piretroides de *Aedes aegypti*. Asimismo determinar si los genes GSTe2, GSTe5 y GSTe7 se sobreexpresan en poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes a deltametrina y permetrina.

En cuanto a las extracciones de ARN es posible observar en el Cuadro 6.2 que todas las muestras presentaron valores de pureza A260/280 iguales o cercanas a 2, indicando que estas cuentan con niveles adecuados de pureza (ThermoScientific, 2019); sin embargo, en el radio A260/230, algunas muestras, tal como la muestra VC4, presentaron valores de purezas por debajo del rango óptimo de 2.0-2.20. Indicando que estas se encuentran contaminadas por compuestos como carbohidratos, péptidos y compuestos aromáticos en general (QIAGEN, 2010).

Puesto que para realizar la síntesis de ADNc con el kit Promega GoScript™ Reverse Transcription System es necesario utilizar muestras con concentraciones mayores o iguales a 250 ng/uL (Promega, s.f.), aquellas muestras que no alcanzaron la concentración deseada, como las muestras CR1, CR2, CR3 y CR7, fueron concentradas en SpeedVac por 25 minutos. Y se determinó que aquellas muestras que presentaron concentraciones mayores a 190 ng/uL si alcanzaron la concentración deseada luego de los 25 minutos de SpeedVac, mientras que aquellas que contaban con concentraciones menores a 190 ng/uL no, tal como la muestra VC8. Con el objeto de verificar que los 25 minutos de SpeedVac no afectaran la integridad de las muestras, se realizaron geles de agarosa (Figura 6.1 y Figura 6.2); según la literatura, la integridad del ARN se representa con la presencia de una banda 28S y una banda 18S (Aranda, LaJoie y Jorcyk, 2013). Se estableció que todas las muestras se encuentran íntegras y tal como menciona Sánchez, Betsou y Methieson (2019), la concentración de SpeedVac no afecta la integridad ni la pureza de estas y por consiguiente, pueden ser utilizadas en análisis génicos.

Posteriormente, se realizó una serie de pruebas para optimizar los cebadores GSTe2R y GSTe2F, del gen GSTe2 (Anexo F); en estas pruebas se modificó el factor de dilución de los puntos que conformaron las curvas, así como la concentración de los cebadores y la muestra (concentrada en SpeedVac o no concentrada). Se estableció que utilizar una muestra concentrada en SpeedVac para realizar curvas estándares no es lo óptimo, ya que a pesar de tratarse de muestras íntegras, estas cuentan con inhibidores concentrados que interfieren con la eficiencia de los cebadores (Opel, Chung

y McCord, 2010), por lo que se decidió utilizar una muestra no concentrada.

En cuanto a los cebadores, se tomó como punto de inicio la concentración de 0.3 uM, dado que es la concentración utilizada dentro del laboratorio de la Unidad de Entomología Médica y Malaria para análisis génicos de otros genes metabólicos en *Ae. aegypti*; sin embargo, con los cebadores GSTe2R y GSTe2F, esta concentración no fue óptima, ya que la eficiencia obtenida superó el rango de 90-110% recomendado por Svec, Tichopad, Novosadova, *et al.*, (2015). Se decidió aumentar la concentración de los cebadores a 0.5 uM y se observó una disminución en la eficiencia, no obstante esta no se encontró dentro del rango aconsejado. El siguiente paso fue aumentar la concentración de los cebadores a 0.6 uM y la eficiencia obtenida fue mayor a la eficiencia de la prueba anterior, debido a que utilizar concentraciones altas de cebadores permite la formación de dímeros, afectando la eficiencia (Mikeska y Dobrovic, 2009). Por ello, se decidió realizar más pruebas con 0.5 uM de cebadores.

Respecto al factor de dilución, se empleó 1/10, sin embargo, se obtuvo eficiencia superior al rango óptimo, por ende, se aumentó el factor de dilución a 1/2. No obstante, la eficiencia aumentó en comparación con la prueba anterior; debido a que las diluciones más bajas se encontraban demasiado concentradas, causando inhibición e impidiendo que las reacciones fueran eficientes (Merck, s.f.). De modo que se realizó una mezcla con los factores de dilución 1/2 y 1/10, para disminuir la inhibición por cantidad excesivas de plantilla; sin embargo, la eficiencia aumentó con respecto a la eficiencia obtenida utilizando únicamente 1/10 como factor de dilución.

Por último, se observó que al utilizar 4 puntos en la curva estándar empleando 0.5 uM de cebadores y 1/10 como factor de dilución, se obtenía eficiencia dentro del rango óptimo y un buen coeficiente de correlación (Cuadro 6.5). Algunos autores recomiendan emplear 5 puntos en las curvas estándar para validar los cebadores, sin embargo, la cantidad de puntos dentro de la curva resulta variable, debido a las condiciones particulares de cada investigación. Por ejemplo, Zhao, Maren, Kosentka, *et al.* (2021) utilizó entre 3 a 4 puntos para validar genes en *Tripidium ravennae*. De esta manera se estableció que las condiciones de optimización para los cebadores GSTe2F y GSTe2R son 0.5 uM de cebadores, 1/10 como factor de dilución y 4 puntos en la curva estándar (Figura 6.3).

Análogamente, se realizaron pruebas para optimizar los cebadores GSTe5R, GSTe5F, GSTe7R y GSTe7F, de los genes GSTe5 y GSTe7, respectivamente (Cuadro 6.7). En la prueba realizada para analizar los cebadores GSTe5R y GSTe5F no se observó amplificación. Al realizar el análisis de la región del gen GSTe5 al que se une los cebadores (Anexo D) se observó que los primeros cuatro nucleótidos del cebador GSTe5F no coinciden con la secuencia del gen; además, el producto de PCR al que se unen los cebadores sobrepasa 100 pb; longitud que es lo suficientemente larga para ser específica del gen y lo suficientemente corta para que los cebadores se unan fácilmente a la plantilla de ADN (Basu, 2015). Por otro lado, con los cebadores GSTe7R y GSTe7F, se realizó una prueba y esta no presentó amplificación, se realizó el análisis de las secuencias y se observó que estos sí coinciden con la secuencia del gen y el producto de PCR es menor a 100 pb; por lo que se realizó una segunda prueba y esta sí presentó amplificación. Pero la eficiencia fue mayor al rango óptimo y un R^2 menor a 0.99. Por tal razón no se continuó con la optimización de los cebadores de los genes GSTe5 y GSTe7.

Con base a los resultados de la optimización de los cebadores, únicamente se realizó el análisis de expresión génica de GSTe2 en las poblaciones El Carmen, Costa Rica y Villa Consuelo, República Dominicana. En cuanto a la población Carmen, Costa Rica (Cuadro 6.10), se observó que el gen se encuentra sobreexpresado en los mosquitos resistentes a deltametrina y permetrina; sin embargo, se determinó que en las muestras resistentes a permetrina esta sobreexpresión es significativa. Además, se estableció que la sobreexpresión de este gen es constitutiva, debido al valor-p significativo al comparar la muestra control con la cepa de referencia; lo que permite inferir que el gen GSTe2 se sobreexpresa constitutivamente y tiene potencial rol en la resistencia a permetrina. En contraste, en esta investigación no se encontró sobreexpresión del gen GSTe2 en muestras resistentes a deltametrina de El Carmen Costa Rica y por lo tanto no se encuentra involucrado en la resistencia a deltametrina.

En relación a la población de Villa Consuelo, República Dominicana (Cuadro 6.11), se determinó tanto para las muestras resistentes a deltametrina y permetrina, que la sobreexpresión del gen GSTe2 es significativa en comparación a la cepa de referencia, pero no es significativa respecto a las muestras control; por lo que bajo las condiciones de esta investigación se determinó que el gen GSTe2 no está involucrado en la resistencia a permetrina en la población de *Ae. aegypti* de Villa Consuelo, República Dominicana.

En el estudio de Lumjuan, *et al.* (2010) se observó que tanto GSTe2 como GSTe7 se sobreexpresaron significativamente en poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes a piretroides provenientes de la provincia de Chiang Mai, Tailandia, indicando un rol metabólico en la resistencia. Mientras que en la presente investigación no fue posible determinar el rol de GST para las poblaciones resistentes a deltametrina de El Carmen, Costa Rica y Villa Consuelo, República Dominicana y de la población resistente a permetrina de Villa Consuelo, República Dominicana. Se infiere que esto es debido a variaciones genéticas del vector; ya que se ha demostrado que las poblaciones de África Oriental, América del Sur y del Centro y el Caribe se encuentran en un mismo clado que se derivan del África del este. Mientras que en un segundo clado se encuentran especímenes de Asia y el sudeste de Estados Unidos (Zuñiga, 2015). Por lo que estas diferencias genéticas podrían explicar porque en esta investigación no fue posible determinar el rol de las GSTs en la resistencia a piretroides en todas las poblaciones de interés. Además, es importante remarcar que al tratarse de una familia multigénica, se infiere que otras GSTs, distintas a la GSTe2, podrían encontrarse involucradas en la resistencia a piretroides.

Dentro de las limitaciones de este estudio es posible mencionar la ausencia de una escalera de peso molecular de ARN, para evaluar con mayor precisión la presencia o ausencia de las bandas 28S y 18S en las muestras de ARN en el gel de integridad. Otra limitación del estudio fue la disponibilidad del reactivo SYBR Green para la realización de pruebas de optimización de los cebadores, debido al costo de este y su uso en otras investigaciones paralelas. Como consecuencia, no fue posible realizar más pruebas con los cebadores del gen GSTe7.

Conclusiones

1. Las extracciones de ARN de las muestras de Carmen, Costa Rica y Villa Consuelo, República Dominicana se realizaron con éxito, ya que se obtuvo concentraciones y purezas aceptables.
2. Se optimizaron los cebadores GSTe2F y GSTe2R del gen GSTe2, bajo las siguientes condiciones: 0.5 uM de cebadores, 1/10 como factor de dilución y 4 puntos en la curva estándar.
3. Respecto al análisis de expresión génica, únicamente se pudo evaluar el gen GSTe2 y se logró determinar que este gen tiene potencial rol en la resistencia a permetrina en poblaciones de *Ae. aegypti* de Carmen, Costa Rica. Por otro lado, se concluyó que el gen GSTe2 no se encuentra involucrado en la resistencia a deltametrina en esta población, debido a que no se determinó la significancia en la expresión del gen en las muestras resistentes a este insecticida.
4. Por último, se determinó que el gen GSTe2 no está potencialmente asociado en las poblaciones resistentes a deltametrina y permetrina de *Ae. aegypti* de Villa Consuelo, República Dominicana.

Recomendaciones

1. Se recomienda realizar la optimización de los cebadores rediseñados de GSTe5 y GSTe7 (Sección 11.11).
2. En cuanto a gen GSTe2 se recomienda que se analicen las posibles mutaciones del gen que podrían estar relacionadas con la resistencia de permetrina en la población de El Carmen, República Dominicana. Con el fin de validar este gen como marcador metabólico y extender el análisis del rol de este gen en otras poblaciones de Centro América.
3. Para aquellas poblaciones en las que no se determinó el rol de las Glutación S-transferasas en la resistencia a piretroides, se recomienda realizar el análisis génico de otras GSTs, así como otras familias de genes que podrían estar implicadas en la resistencia a piretroides en la región de América del Centro y República Dominicana, tales como los citocromos.

Bibliografía

- Alarcón-Elbal, P., Paulino-Ramírez, R., Diéguez-Fernández, L., Fimia-Duarte, R., Guerrero, K. y González, M. (2017). Arbovirosis transmitidas por mosquitos (Diptera: Culicidae) en la República Dominicana: Una Revisión. *The Biologist*; 15(1). 193-219.
- Aranda, P., LaJoie, D. y Jorcyk, C. (2013). Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analyzing RNA Quality. *Electrophoresis*. 33(2). 366-369. doi: 10.1002/elps.201100335
- Arredondo-García, JL., Méndez-Herrera, A. y Medina-Cortina, H. (2016). Arbovirus en Latinoamérica. *Acta Pediatr Mex*; 37(2). 111-131.
- Balabanidou, V., Grigoraki, L. y Vontas, J. (2018). Insecticide cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*; 27. 68-74. doi: 10.1016/j.cois.2018.03.001.
- Basu, C. (2015) *PCR Primer Design*. SpringerLink.
- Betancourt, M. y Falcón, J. (2020). Arbovirus y Salud Pública. *Ciencia*; 71(1). 8-15
- Bisset, J. (2002). Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista cubana de Medicina Tropical*. 54(3). 202-219.
- Carbajo, A. (2003). *Distribución espacio-temporal de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae): su relación con el ambiente urbano y el riesgo de transmisión del virus dengue en la Ciudad de Buenos Aires*. Universidad de Buenos Aires.
- Castañeda, D. (2021). *Extracción de ARN de Aedes aegypti utilizando el kit SV Total RNA System de Promega*. Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG.
- Castañeda, D. (2021). *Síntesis de ADN complementario (cDNA) Aedes aegypti utilizando el kit GoScript Reverse Transcription System de Promega*. Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG.
- Cattel, J., Haberkorn, C., Laporte, F., Gaude, T., Cumer, T., Renaud, J., Sutherland, I. W., Hertz,

- J. C., Bonneville, J. M., Arnaud, V., Fustec, B., Boyer, S., Marcombe, S., David, J. P. (2021). A genomic amplification affecting a carboxylesterase gene cluster confers organophosphate resistance in the mosquito *Aedes aegypti*: From genomic characterization to high-throughput field detection. *Evolutionary applications*, 14(4), 1009–1022. doi: 10.1111/eva.13177
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (16 de diciembre de 2021). *Dengue*. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/dengue/vaccine/index.html>.
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (21 de mayo de 2019). *Zika Virus. Symptoms*. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/zika/symptoms/symptoms.html>
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2016). Etymologia: *Aedes aegypti*. *Emerg Infect Dis*; 22(10). doi: 10.3201/eid2210.ET2210
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (9 de agosto de 2016). *El Virus del Zika. Efectos y riesgos en la salud*. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/zika/es/healtheffects/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2014). *Chikungunya. Información para el público*. Centers for Disease Control and Prevention.
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (s.f.). *Ciclo de vida del mosquito Aedes aegypti*. División de enfermedades Transmitidas por Vectores.
- Chiramel, A. y Best, S. (2018). Role of Autophagy in Zika Virus Infection and Pathogenesis. *Virus Res*; 254. 34-40. doi: 10.1016/j.virusres.2017.09.006
- Cucunubá, Z. (2016). De la epidemia de Zika en Latinoamérica y la toma de decisiones bajo incertidumbre. *Rev. Univ. Ind. Santander. Salud*; 48(2). 158-160.
- de Alba, D. y Rueda, A. (2013). Problema bioquímico. Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real. *Rev. Educ. bioquím*; 32(1).
- Enayati, A. y Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*; 14(1). 3-8.
- Espinal, M., Andrus, J., Juaregui, B., Hull, S., Morens, D., Santos, J., Horstick, O., Francis, L. y Oison, D. (2019). Emerging and Reemerging Aedes-Transmitted Arbovirus Infections in the Region of the Americas: Implications for Health Policy. *Am J Public Health*. doi: 10.2105/AJPH.2018.304849.
- Fagbohun, I., Idowu, E., Olakiigbe, A., et al. (2020). Metabolic resistance mechanism in *Aedes aegypti* from Lagos Estate, Nigeria. *JoBAZ*. 81(59). doi: 10.1186/s41936-020-00194-8.
- Fan, Q., Liu, J., Li, Y. y Zhang, Y. (2022). Glutathione S-Transferase May Contribute to the Detoxification of (S)-(-)-Palasonin in *Plutella xylostella* (L.) via Direct Metabolism. *Insects*; 13(989). doi: 10.3390/insects13110989
- Fernández, A., Villaverde, S., Echeverría, J., Cilleruelo, M. y de Ory, F. (2017). Enfermedades exantemáticas virales: aspectos clinicoepidemiológicos y de laboratorio. *Enferm Infecc Microbiol clin*. (35). 51-57.
- Fuchun, Z., Jianfeng, H., Jie, P., Xiaoping, T., Chengfeng, Q., Hongzhou, L., Xingwang, L., Qingquan, L., Hong, Z., Jifang, S. y Guiqiang, W. (2021). Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Dengue in China. *Infectious Diseases & Immunity*; 1(3). 144-152. doi: 10.1097/ID9.0000000000000026
- Gan, S.J., Leong, Y.Q., bin Barhanuddin, M.F.H., et al. (2021). Dengue fever and insecticide resistance in *Aedes* mosquitoes in Southeast Asia: a review. *Parasites & Vectors*; 14(315). doi:

10.1186/s13071-021-04785-4

- Helvecio, E., Romao, T., Carvalho-Leandro, D., Ferreira, I., Cayalcanti, A., Reimer, L., de Paiva, M., Silva, A., Guedes, P., Henrique, T., Wallau, G., de Melo, O., Melo-Santos, M. y Flavia, C. (2020). Polymorphisms in GSTE2 is associated with temephos resistance in *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 165. doi: 10.1016/j.pestbp.2019.10.002.
- Higa, Y. (2011). Dengue Vectors and their Spatial Distribution. *Trop Med Health*; 39(4). 17-27. doi: 10.2149/tmh.2011-S04
- Holunska-Iwan, I. y Szewczyk-Golec, K. (2020). Pyrethroids: How They Affect Human and Animal Health?. *Medicina (Kaunas)*; 56(11). doi: 10.3390/medicina56110582.
- Insecticide Resistance Action Committee [IRAC]. (2010). *Mode of Action Classification. Insecticide Resistance Management*. Recuperado de: https://cals.arizona.edu/crops/pdfs/IRAC%20MOA-%20brochure_v4%20_Oct10.pdf
- Insecticide Resistance Action Committee [IRAC]. (s.f.). *¿Qué es la resistencia de insectos?*. Recuperado de: <https://irac-argentina.org/resistencia/>
- International Union of Pure and Applied Chemistry [IUPAC]. (10 de mayo de 2010). *History of Pesticide Use*. Recuperado de: https://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2-Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31
- Ishack, I., Jaal, Z., Ranson, H. y Wondji, C. (2015). Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasites & Vectors*; 8(181). doi: 10.1186/s13071-015-0797-2.
- Jansen, C. y Beebe, N. (2010). The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes and Infection*; 12(4). 272-279. doi: 10.1016/j.micinf.2009.12.011
- Jayarajah, U., Lahiru, M., De Zoysa, I. y Seneviratne, S. (2021). Dengue Infections and the Surgical Patient. *Am J Trop Med Hyg*; 104(1). 52-59. doi: 10.4269/ajtmh.20-0983
- Jones, R., Kulkarni, M., Davidson, T. y 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). doi: 10.1371/journal.pone.0220753
- Juárez, J., Carbajal, E., Dickinson, K., Garcia-Luna, S., Vuong, N., Mutebi, J., Hemme, R., Badillo-Vargas, I. y Hamer, G. (2022). The unreachable doorbells of South Texas: community engagement in colonias on the US-Mexico border for mosquito control. *BMC Public Health*; 22(1176). doi: 10.1186/s12889-022-13426-z
- Khan, S., Uddin, M., Rizwan, M., Khan, W., et al. (2019). Mechanism of Insecticide in Insects/Pests. *Pol. J. Environ. Stud*. 29(3). 2023-2030. doi: 10.15244/pjoes/108513.
- Knobler, S., Lemon, S., Najafi, M., et al. (2003). *The Resistance Phenomenon in Microbes and Infectious Disease Vectors: Implications for Human Health and Strategies for Containment*. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK97131/>
- Kweka, E., Baraka, V., Mathias, L., Mwang'onde, B., Baraka, G., Lyaruu, L. y Mahande, A. (2018). *Ecology of Aedes Mosquitoes, the Major Vectors of Arboviruses in Human Population*. IntechOpen.
- Liu, N. (2015). Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annu. Rev. Entomol.*; 60. 537-539. doi: 10.1146/annurev-ento-010814-020828
- Lumjuan, N., Stevenson, B., Prapanthadara, L., Somboon, P., Brophy, P., Loftus, B., Severson, D.,




- Ranson, H. (2007). The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*; 37. 1026-1035. doi: 10.1016/j.ibmb.2007.05.018
- Lumjuan, N., Rajatileka, S., Changsom, D., Wicheer, J., Leelapat, P., Prapanthadara, L., Somboon, P., Lycett, G., Ranson, H. (2011). The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol*; 41(3). 203-209. doi: 10.1016/j.ibmb.2010.12.005
- Martina, B., Koraka, P. y Osterhaus, A. (2009). Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clin Microbiol Rev*; 22(4). 564-581. doi: 10.1128/CMR.00035-09.
- Merck. (s.f.). *RT-PCR/ RT-qPCR Troubleshooting*. Recuperado de: <https://www.sigmaaldrich.com/GT/es/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/troubleshooting>
- Melo, M., Campos, K., Brito, L., *et al.* (2020). Kdr genotyping in *Aedes aegypti* from Brazil on a nation-wide scale from 2017 to 2018. *Scientific Reports*; 10(13267). doi: 10.1038/s41598-020-70029-7
- Mikeska, T. y Dobrovic, A. (2009). Validation of a primer optimisation matrix to improve the performance of reverse transcription - quantitative real time PCR assays. *BMC Res Notes*; 2. 112. doi: 10.1186/1756-0500-2-112
- Moyes, C., Vontas, J., Martins, A., Ching, L., Koou, S., Dustour, I., Raghavendra, K., Pinto, J., Corbel, V., David, J. y Weetman, D. (2017). Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis*; 11(7). doi: 10.1371/journal.pntd.0005625
- Naqqash, M., Gökçe, A., Bakhsh, A. y Salim, M. (2016). Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pest. *Parasitol Res*. 115. 1363-1373. doi: 10.1007/s00436-015-4898-9.
- National Human Genome Research Institute [NIH]. (29 de julio de 2022). *ADNc*. Recuperado de: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ADN-copia>
- National Library of Medicine. (s.f.). *Primer designing tool*. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- National Pesticide Information Center [npic]. (26 de agosto de 2019). Insecticides. Recuperado de: <http://npic.orst.edu/ingred/ptype/insecticide.html>
- Nawaz, S., Tahir, H., Mahmood, M., Summer, M., Ali, S., Ali, A. y Gormani, A. (2021). Current Status of Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) in Lahore District, Pakistan: A Novel Mechanistic Insight. *Journal of Medical Entomology*; 58(6). 2432-2438. doi: 10.1093/jme/tjab137
- OECD. (2018). *Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment. Consensus Document of the Biology of Mosquito Aedes aegypti*. Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology.
- Ogunlade, S., Meehan, M., Adekunle, A., Rojas, D., Adegboye, O. y McBryde, E. (2021). A Review: *Aedes*-Borne Arboviral Infections, Control and *Wolbachia*-Based Strategies. *Vaccines(Basel)*; 9(1). doi: 10.3390/vaccines9010032
- Opel, K.L., Chung, D. y McCord, B.R. (2010). A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. *Journal of Forensic Sciences*, 55. 25-33. doi: 10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (15 de septiembre de 2020). *Chikungunya*. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>

- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2 de marzo de 2020). *Enfermedades transmitidas por vectores*. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (20 de julio de 2018). *Enfermedad por el Virus del Zika*. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2009). *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition*. Organización Mundial de la Salud.
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2021). *Actualización Epidemiológica. Dengue, chikunguña y Zika en el contexto de COVID-19*. Organización Panamericana de la Salud.
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (13 de noviembre de 2019). *El dengue en las Américas alcanza el mayor número de casos registrados en la historia*. Recuperado de: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_contentview=articleid=15593:dengue-in-the-americas-reaches-highest-number-of-cases-recordedItemid=0lang=esgsc.tab=0
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2016). *Guía de mensajes claves para dirigir individuos y familias sobre la vigilancia y control de Aedes aegypti transmisor del dengue, chikungunya, zika y otras arbovirosis en las Américas*. Organización Panamericana de la Salud.
- Organización Panamericana de la Salud. [OPS] (2015). *156a Sesión del Comité Ejecutivo. Prevención y Control del Dengue en Las Américas*. Organización Panamericana de la Salud.
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (s.f). *Descripción de la situación epidemiológica actual del dengue en las Américas*. Recuperado de: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494:situacion-epidemiologica-dengue-americas&Itemid=40-370&lang=es
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (s.f). *Chikungunya*. Recuperado de: <https://www.paho.org/es/temas/chikungunya>
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (s.f). *Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de dengue*. Plan Nacional de Salud Pública. Recuperado de: https://www.paho.org/col/dmdocuments/Entomologia_DENGUE.pdf
- Padilla, J., Lizarazo, F., Murillo, O., Mendigaña, F., Pachón, E. y Vera, M. (2017). Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. *Biomédica*; 37(2). 27-40. doi: 10.7705/biomedica.v34i2.3769
- Pan American Health Organization [PAHO]. (2017). *Tool for the Diagnosis and Care of Patients with Suspected Arboviral Diseases*. Pan American Health Organization.
- Paul, A., Harrington, L. y Scott, J. (2006). Evaluation of Novel Insecticides for Control of Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*; 43(1). 55-60. doi: 10.1603/0022-2585(2006)043[0055:EONIFC]2.0.CO;2
- Paz, M. (2018). *Neurotoxicidad inducida por deltametrín sobre el metabolismo aminoacédérgico*. Universidad Complutense de Madrid.
- Pereira-Palacio, J., Gaviria-Mejía, L., Zea-Castrillón, S., Jaramillo, P. y Bedoya, A. (2018). Descripción de pruebas moléculas en el diagnóstico del virus Zika en el periodo 2008-febrero 2018. Revisión sistemática. *NOVA*; 16(30). 81-93.
- Pergolizzi, J., LeQuang, J., Umeda-Raffa, S., Fleischer, C., Pergolizzi, J., Pergolizzi, C. y Raffa, R. (2021). The Zika virus: Lurking behind the COVID-19 pandemic? *J Clin Pharm Ther*; 46(2). 267-276. doi: 10.1111/jcpt.13310

- Pesticide Environmental Stewardship [PES]. (s.f.). *Introduction to Pesticide Resistance*. Recuperado de: <https://pesticidestewardship.org/resistance/>
- Prapanthadara, L., Reunkum, W., Suwan, W., et al. (2005). *Glutathione S-transferase Isoenzymes and the DDTase Activity in Two DDT-resistant Strains of Aedes aegypti*. WHO Regional Office for South-East Asia. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/164044/dbv29p183.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Promega. (s.f.). *SV Total RNA Isolation System*. Recuperado de: <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/rna/sv-total-rna-isolation-system/?catNum=Z3101>
- Promega. (s.f.). *Promega GoScript™ Reverse Transcription System*. Recuperado de: <https://worldwide.promega.com/products/pcr/rt-pcr/goscript-reverse-transcriptase/?catNum=A5003>
- Pruss-Navarrete, A., Lucas-Mendoza, G. y Mendiza-Rodríguez, E. (2016). Prevalencia de chikungunya en Sudamérica. *Dom. Cien.*; 2(1). 66-77.
- Public Health Vectors and Pests. (s.f.). *Aedes aegypti*. Recuperado de: <http://www.kznhealth.gov.za/environ/vector/aedes.htm>
- QIAGEN. (2010). *Newsletter. Gene Expression and Function Studies*. QIAGEN.
- Rault, L., O'neal, S., Johnson, E. y Anderson, T. (2019). Association of age, sex, and pyrethroid resistance status on survival and cytochrome P450 gene expression in *Aedes aegypti* (L.). *Faculty Publications: Department of Entomology*.
- Riveron, J.M., Tchouaki, M., Mugenzi, L. D., Menze, B., Chiang, M. y Wondji, C. S. (2018). *Insecticide Resistance in Malaria Vectors: An Update at a Global Scale*. IntechOpen.
- Robles, V., Ortega, A. y Huerta, H. (2020). Mosquitos vectores de arbovirus. *Ciencia*; 71(1). 24-33.
- Rocha, M., Santos, E., Maciel-de-Freitas, R., Torres, C., Enrich, A. y Lourenço-de-Oliveira, R. (2021). Influence of Larval Habitats Environmental Characteristics on Culicidae Immature Abundance and Body Size of Adult *Aedes aegypti*. *Front. Ecol. Evol.*; 9. doi: 10.3389/fevo.2021.626757
- Rossi, G. y Almirón, W. (s.f.). *Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina*. Fundación Mundo Sano.
- Salles, T., da Encarnação, T., de Alvarenga, E., Guimaraes-Ribeiro, V., Ferreira, M., Castro-Salles, P., Rocha, C., do Amaral, A., Soares, M., Fernandes, S. y Ferreira, M. (2018). History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. *Parasit & Vectors*; 11(1). doi: 10.1186/s13071-018-2830-8
- Sánchez, A. (2019). *Análisis de Situación de Dengue, Guatemala 2019*. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
- Sánchez, I., Betsou, F. y Mathieson, W. (2019). Does vacuum centrifugal concentration reduce yield or quality of nucleic acids extracted from FFPE biospecimens? *Anal Biochem.* 1 (566). 16-19. doi: 10.1016/j.ab.2018.10.020
- Schluep, S. y Buckner, E. (2021). Metabolic Resistance in Permethrin-Resistant Florida *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Insect*; 12(10). doi: 10.3390/insects12100866
- Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, 3(6). 1101–1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V. et al. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendation for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Dect Quantif*; 3. 9-16. doi: 10.1016/j.bdq.2015.01.005.

- Silva, L. y Dermody, T. (2017). Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest*; 127(3). 737-749. doi: 10.1172/JCI84417
- Smith, L., Tyagi, R., Kasai, S. y Scott, J. (2018). CYP-mediated permethrin resistance in *Aedes aegypti* and evidence for trans-regulation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. doi: 10.1371/journal.pntd.0006933
- Soderlund, D. (2013). Molecular Mechanisms of Pyrethroid Insecticide Neurotoxicity: Recent Advances. *Arch. Toxicol*; 86(2). 165-181. doi: 10.1007/s00204-011-0726-x
- Sparks, T., Storer, N., Porter, A., Slater, R. y Nauen, R. (2021). Insecticide resistance management and industry: the origins and evolution of the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) and the mode of action classification scheme. *Pest Management Science*; 77(6). 2609-2619. doi: 10.1002/ps.6254
- Tchouakui, M., Chiang, MC., Ndo, C. *et al.* (2019). A marker of glutathione S-transferase-mediated resistance to insecticides is associated with higher Plasmodium infection in the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Sci Rep* 9, 5772. doi: 10.1038/s41598-019-42015-1
- ThermoFisher. (s.f.). *RNA Extraction Kits and RNA Isolation Reagents*. Recuperado de: <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/rna-extraction.html>
- ThermoScientific. (2019). *260/280 and 260/230 Ratios*. Recuperado de: https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf
- Trdan, S. (2016). *Insecticides Resistance*. IntechOpen.
- United States Environmental Protection Agency. (4 de abril de 2022). *Insecticides*. Recuperado de: <https://www.epa.gov/caddis-vol2/insecticides>
- Viglietta, M., Bellone, R., Blisnick, A. y Failloux, A. (2021). Vector Specificity of Arbovirus Transmission. *Front. Microbiol.*; 12. doi: 10.3389/fmicb.2021.773211
- Vu, D., Jungkind, D. y LaBeaud, A. (2017). Chikungunya Virus. *Clin Lab Med*; 37(2). 371-382. doi: 10.1016/j.cl.2017.01.008
- Yunta, C. (2017). 5FT3. *PDB*. doi: 10.2210/pdb5FT3/pdb
- Wilson, A., Courtenay, O., Kelly-Hope, L., Scott, T., Takken, W., Torr, S. y Lindsay, S. (2020). The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne disease. *PLoS neglected tropical diseases*; 14(1). doi: 10.1371/journal.pntd.0007831
- Zhao, F., Maren, N.A., Kosentka, P.Z. *et al.* An optimized protocol for stepwise optimization of real-time RT-PCR analysis. *Hortic Res* 8, 179. doi: 10.1038/s41438-021-00616-w
- Zuharah, WF. y Sufian, M. (2021). The Discovery of a novel knockdown resistance (kdr) mutation A1007G on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Malaysia. *Sci Rep*; 11(1). doi: 10.1038/s41598-021-84669-w
- Zuñiga, M. (2015). *Estudio piloto de la variación genética del mosquito Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) en el Ecuador, vector principal del virus del dengue y del virus del chikungunya*. Universidad San Francisco de Quito.

11.1. Procedimiento Operacional Estandarizado de la Extracción de ARN utilizando el kit SV Total RNA Isolation System de Promega

	SOP Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG	 
	Extracción de ARN de <i>Aedes aegypti</i> utilizando el kit SV Total RNA Isolation System de Promega	Pág. 1 de 6

Preparado por: David Castañeda Fecha: Agosto 2021

Revisado por: _____ Fecha: _____

Aprobado por: _____ Fecha: _____

Objetivo

Estandarizar la forma de almacenar mosquitos (*Aedes*) para su posterior extracción de ARN.

Introducción

Extracción de ARN de *Aedes aegypti* utilizando el kit SV Total RNA Isolation System de Promega

Definiciones y Acrónimos

N/A




Responsabilidades

Es responsabilidad del laboratorista entender este procedimiento 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 protocolo operacional estándar y aclarar cualquier duda de ello.

Equipo, materiales y reactivos

1. Materiales

- Tubos de 1.5 o 1.7 ml estériles
- Sharpie punta ultrafina
- Micro-pipeta de 100-1000µl y 20-200µl y de 0.5 – 10 µl
- Puntas bloqueadas 100-1000µl y 20-200µl y 0.5 – 10 µl
- Papel toalla
- Kim wipes
- Gradillas para tubos de 1.5 o 2ml
- Gradillas para tubos de 0.2 ml
- Gradilla fría para tubos de 1.5-2.0 ml
- Beaker de 500 ml o un recipiente de descarte
- Beaker para pistilos sucios
- Bolsa para descarte
- Hielera pequeña con hielo
- Pinza entomológica
- Pistilos estériles

	SOP Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG	 
	Extracción de ARN de <i>Aedes aegypti</i> utilizando el kit SV Total RNA Isolation System de Promega	Pág. 2 de 6

- Macerador eléctrico

2. Reactivos

2.1. Reactivos para limpieza del área de trabajo:

- Etanol al 70%
- Cloro al 10%

2.2. Reactivos para Extracción y Cuantificación de ARN

- Kit de extracción de ARN “SV Total RNA Isolation System” de Promega. RNALater
 - RNA Lysis Buffer (Almacenado a 4°C)
 - RNA Dilution Buffer (Almacenado a temperatura ambiente)
 - RNA Wash Solution (Almacenado a temperatura ambiente)
 - Yellow Core Buffer (Almacenado a temperatura ambiente)
 - MnCl₂ (Almacenado a temperatura ambiente)
 - DNAase I (Almacenado a -20°C)
 - Nuclease Free Water -Agua Libre de Nucleasas (Almacenado a temperatura ambiente)
- Etanol 95% (absoluto)
- *Agua DEPC*
- *RNAzap*

3. Equipo de laboratorio

- *Bloque térmico*
- *Congelador -20°C*
- *Ultracongelador -80°C*

Precauciones/Seguridad

- Utilizar guantes durante todo el proceso de almacenamiento
- Descartar los desechos biológicos en una bolsa especial para desechos biológicos y los desechos químicos según indique la ficha de seguridad




Procedimiento

1. Preparación de los reactivos incluidos en el Kit

- 1.1. Al abrir un nuevo Kit SV Total RNA Isolation System de Promega deben prepararse los reactivos según indica el manual.
- 1.2. Se debe verificar de cuantas reacciones es el Kit, 10, 50 y 250.

2. Preparación del área de trabajo

- 2.1. Limpie el área donde se va a trabajar con cloro al 10%, etanol al 70% y RNAzap.
- 2.2. Limpie las gradillas, micro-pipetas y cajas de puntas que va utilizar con etanol al 70% y RNAzap.

	SOP Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG	 
	Extracción de ARN de <i>Aedes aegypti</i> utilizando el kit SV Total RNA Isolation System de Promega	Pág. 3 de 6




- 2.3. Rotule un beaker de 500mL para descarte de las puntas.
- 2.4. Rotule un beaker para colocar los pistilos sucios (estos se limpian de acuerdo al POE X).
- 2.5. Encienda el bloque térmico a una temperatura de 70°C para tenerla lista cuando sea necesaria la incubación.
- 2.6. Asegúrese de tener hielo listo en la hielera para la extracción de ARN, el cual debe estar listo al momento de ir a traer las muestras.

3. Preparación de material biológico

- 3.1. Retirar 20 mosquitos (10 mosquitos por pool) almacenados a -20°C y colóquelos en hielo, si los va a trabajar en las próximas horas o a temperatura ambiente si los va a trabajar inmediatamente. No se recomienda trabajar más de dos pools por ronda de extracción por persona.
- 3.2. Para cada pool a trabajar, rotular un tubo de 1.5 o 1.7mL con la información pertinente de cada pool: No. de pool, Población, fecha.
- 3.3. Colocar los tubos de 1.5 o 1.7mL en hielo.
- 3.4. A cada tubo, agregar 175uL del “RNA Lysis Buffer” provisto en el Kit de Promega, el cual se mantiene en el refrigerador a 4°C.
NOTA: Esto debe mantenerse en frío.
- 3.5. Los individuos que fueron almacenados individualmente en tubos de 0.2mL con RNALater pueden presentar cristales formados por el mismo reactivo. Con una pinza entomológica eliminar la mayor cantidad de cristales presionándolos con fuerza.
NOTA: El RNALater se cristaliza cuando se almacena a temperaturas de -20°C o -80°C. Es importante asegurarse de tener la menos cantidad posible de cristales en los individuos ya que el exceso de estas sales y reactivos puede afectar el rendimiento de la extracción. Algunos mosquitos pueden perder sus patas, alas o fragmentarse al momento de destruir estos cristales. Asegúrese de recuperar la mayor cantidad del mosquito, libre de cristales, posible para aumentar el rendimiento de la extracción.
- 3.6. Una vez eliminados la mayor cantidad de cristales, retirar el mosquito con la misma pinza entomológica del tubo de 0.2mL y presionarlos levemente contra el papel toalla para eliminar el exceso de RNALater.
- 3.7. Colocar el mosquito en el tubo de 1.5 o 1.7mL previamente rotulado designado para los pools.
- 3.8. Repetir los pasos 2.3 a 2.5 hasta completar los 10 individuos de cada pool. Mantener estos pools en frío.

4. Extracción de ARN




- 4.1. Colocar un pistilo estéril en el macerador eléctrico.
- 4.2. Macerar el pool de 10 individuos con el macerador eléctrico hasta no observar ninguna parte reconocible del mosquito. Esta maceración debe mantenerse en frío y no más de un minuto de duración.
- 4.3. Repetir del paso 4.1 al 4.2 para cada pool que se vaya a extraer.
- 4.4. Una vez estén macerados los pools a procesar, agregar 350uL de RNA Dilution Buffer provisto por el Kit mencionado con anterioridad.

	SOP Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG	 
	Extracción de ARN de <i>Aedes aegypti</i> utilizando el kit SV Total RNA Isolation System de Promega	Pág. 4 de 6

- 4.5. Mezclar por inversión 4 veces y colocar a incubar en el bloque térmico previamente calentado a 70°C por tres minutos.
NOTA: No debe incubarse por más de 3 minutos.
- 4.6. Una vez terminada la incubación centrifugar a 14,000g por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 4.7. Rotular nuevos tubos para cada uno de los pools con la misma información colocada en el tubo original y colocarlos en el hielo.
- 4.8. Terminada la centrifugación, colocar los tubos en el hielo, y transferir toda la fase acuosa clara, aproximadamente 525uL al nuevo tubo de 1.5-1.7mL previamente rotulado.
- 4.9. Armar las columnas provistas por el kit mencionado previamente, con una columna y un tubo de colecta y rotular estas columnas con la información que se colocó en el tubo original de 1.5 o 1.7mL. Colocar las columnas en la gradilla para tubos de 1.5 a 2.0mL.
- 4.10. Agregar 200uL de Etanol al 95% (No provisto por el Kit) a cada tubo que contiene la fase acuosa individualmente, mezclar por pipeteo 5 veces y transferir todo el contenido a una columna previamente rotulada.
- 4.11. Centrifugar a 14,000g por un minuto a temperatura ambiente (siempre verificar que el filtro de la columna esté totalmente seco).
- 4.12. Una vez centrifugado, retirar la columna, vaciar el tubo colector y volver a colocar la columna sobre el tubo colector en una gradilla para tubos de 1.5-2.0mL.
NOTA: A partir de este paso, los tubos ya no son necesarios colocarlos en hielo.
- 4.13. Preparar la mezcla de incubación de ADNasa (DNAase) mezclando los siguientes reactivos incluidos en el kit:

	Yellow Core Buffer	MnCl2 0.09M	DNase I
N =1	40uL	5uL	5uL
N= 2	80uL	10uL	10uL

- 4.14. Estos son los volúmenes usados para 1 tubo o una columna de extracción de ARN. Se deben de aumentar las cantidades dependiendo de cuantos pools se están extrayendo.
NOTA: Esta mezcla debe realizarse justo antes de utilizarse y se debe mantener en frío, especialmente la DNase I.
- 4.15. Añadir 50uL de la mezcla de ADNasa directamente a la membrana de cada columna.
- 4.16. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4.17. Después de los 30 minutos de incubación, agregar 200uL of DNase Stop Solution (incluida en el kit).
- 4.18. Centrifugar a 14,000g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 4.19. No vaciar el contenido del tubo colector.
- 4.20. Agregar 600uL del RNA Wash Solution (incluida en el kit).
- 4.21. Centrifugar a 14,000g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 4.22. Una vez centrifugado, retirar la columna, vaciar el tubo colector y volver a colocar la columna sobre el tubo colector en una gradilla para tubos de 1.5-2.0mL.
- 4.23. Añadir 250uL de RNA Wash Solution.
- 4.24. Centrifugar a velocidad máxima por 2 minutos a temperatura ambiente.

	SOP Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG	 
	Extracción de ARN de <i>Aedes aegypti</i> utilizando el kit SV Total RNA Isolation System de Promega	Pág. 5 de 6

- 4.25. Tomar tubos de elución (incluidos en el kit) y rotularlos debidamente con información apropiada, Cepa o población, generación, número de pool, ARN y la fecha de la extracción.
- NOTA: Este tubo de elución es el tubo final donde será almacenado el ARN, este debe poder ser identificado por cualquier miembro del laboratorio o equipo para su posterior uso.**
- 4.26. Una vez terminada la centrifugación retirar la columna del tubo colector (verificar que el filtro de la columna esté totalmente seco, si no lo está, repetir el paso de centrifugación) y colocar en los tubos de elución, descartar el tubo de colección anterior.
- 4.27. Agregar a la columna 100uL de agua libre de nucleasas (Nuclease Free Water incluida en el kit).
- 4.28. Centrifugar a 14,000g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 4.29. Remover la columna y descartarla.
- 4.30. Cerrar el tubo de elución, colocarlo en hielo y cuantificar inmediatamente.
- 4.31. En dado caso no se pueda cuantificar inmediatamente, tome una alícuota de aproximadamente 2.2uL y colóquela en un tubo rotulado con la misma información que el tubo de elución más información que esta alícuota es para cuantificar.

5. Cuantificación del ARN




- 5.1. Encender el NanoDrop One.
- 5.2. En la pantalla de inicio escoger la opción de ARN o RNA.
- 5.3. Utilizar agua libre de nucleasas o DEPC como blanco.
- 5.4. Una vez el blanco este aceptado puede procederse a cuantificar las muestras de ARN extraídas.
- 5.5. Cuantificar cada muestra en triplicado y registrar los datos de concentración y pureza (A260/A280 y A260/A230).
- 5.6. Calcular la concentración promedio para cada muestra.
- 5.7. En base a las concentraciones promedio, hacer alícuotas de 1 ug de ARN para posteriormente realizar la síntesis de ADN complementario.
- 5.8. Las alícuotas deben de ir en tubos rotulados con toda la información de la muestra original más la concentración de la alícuota, en este caso 1 ug.
- 5.9. Almacenar a -70°C estas alícuotas hasta su uso.

6. Concentración de Muestras.

- 6.1. En caso las muestras estén debajo de 250 ng/μL concentrarlas en el Speed-Vac Eppendorf sin temperatura por 25 min utilizando la opción “VA-AQ”. Si está aún no llega a la concentración deseada puede concentrarlas por 10 min más. En caso las muestras tengan una concentración muy baja se recomienda repetir la extracción con nuevo material.

Control de Calidad

La cuantificación de ARN utilizando el equipo Nanodrop da indicios acerca de la calidad, pureza y concentración del ARN extraído. En caso las concentraciones sean muy bajas, se puede concentrar utilizando en el SpeedVac Eppendorf. Se puede realizar un gel con condiciones desnaturalizantes para observar la integridad del ARN extraído.

	SOP Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG	 
	Extracción de ARN de <i>Aedes aegypti</i> utilizando el kit SV Total RNA Isolation System de Promega	Pág. 6 de 6

Documentación

Registrar cada una de las muestras extraídas en el cuaderno de laboratorio, y dejar un record electrónico en el archivo de Excel correspondiente.

Documentos Asociados

Referencias



Promega. SV Total RNA Isolation System Technical Manual TM048 Z3100.

<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/sv-total-rna-isolation-system-protocol.pdf>

Historia de Revisión

Revisión 0

11.2. Procedimiento Operacional Estandarizado de la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando el kit GoScript Reverse Transcription System de Promega

	SOP Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG	 
	Síntesis de ADN complementario (cDNA) <i>Aedes aegypti</i> utilizando el kit GoScript™ Reverse Transcription System de Promega	Pág. 1 de 4

Preparado por: Ivanna López Fecha: 20 de octubre 2021

Revisado por: _____ Fecha: _____

Aprobado por: _____ Fecha: _____

Objetivo

Sintetiza el ADN complementario a partir de ARN de *Aedes aegypti*.

Introducción

La síntesis de ADN complementario es descrita a continuación mediante el uso del kit fabricado por Promega de GoScript™ Reverse Transcription System (A5001). Este kit incluye transcriptasa reversa y un set de reactivos diseñados para una óptima y eficiente síntesis de cDNA de hembra simple en preparación para una amplificación por PCR.

Definiciones y Acrónimos

N/A




Responsabilidades

Es responsabilidad del laboratorista entender este procedimiento 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 protocolo operacional estándar y aclarar cualquier duda de ello.

Equipo, materiales y reactivos

1. Materiales

- Tubos 0.2mL autoclaveados y libres de nucleasa
- Tubos 1.7mL autoclaveados
- Sharpie punta ultrafina
- Micro-pipeta de 100-1000µL y 20-200µL y de 0.5 – 10 µL
- Puntas bloqueadas 100-1000µL y 20-200µL y 0.5 – 10 µL
- ARN objetivo de alta calidad diluido en agua libre de nucleasa
- Baño de hielo
- Papel toalla
- Gradillas para tubos de 0.5 mL
- Gradilla fría para tubos de 0.5 mL

	SOP Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG	 
	Síntesis de ADN complementario (cDNA) <i>Aedes aegypti</i> utilizando el kit GoScript™ Reverse Transcription System de Promega	Pág. 2 de 4

- Beaker de 500 ml o un recipiente de descarte
- Bolsa para descarte
- Hielera pequeña con hielo

2. Reactivos

2.1. Reactivos para limpieza del área de trabajo:

- Etanol al 70%
- Cloro al 10%

2.2. Reactivos para Síntesis de ADN complementario

- Kit de síntesis de ADNc GoScript™ Reverse Transcription System
 - GoScript™ Transcriptasa Reversa
 - GoScript™ 5X Buffer de Reacción
 - MgCl₂ 25mM
 - PCR Nucleotide Mix
 - Primer Oligo(dT)₁₅
 - Agua libre de nucleasas

3. Equipo de laboratorio

- Bloque térmico o baño maría a temperaturas controladas de 25, 42 y 70 °C.
- Congelador -20°C
- Ultracongelador -80°C
- Vórtex
- Minicentrífuga
- Termociclador

Precauciones/Seguridad

- Utilizar guantes durante todo el proceso de almacenamiento
- Descartar los desechos biológicos en una bolsa especial para desechos biológicos y los desechos químicos según indique la ficha de seguridad

Procedimiento

1. Síntesis de primera hebra de ADN complementario

En esta sección del procedimiento se convertirán hasta 5µg de ARN total en la primera hebra de ADN complementario.

	SOP Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG	 
	Síntesis de ADN complementario (cDNA) <i>Aedes aegypti</i> utilizando el kit GoScript™ Reverse Transcription System de Promega	Pág. 3 de 4

a. Preparación de alícuotas de ARN experimental

Primero se preparan alícuotas de RNA para que haya 5µg por reacción. Este cálculo se hace en base a la concentración obtenida durante la cuantificación del extracto de ARN en NanoDrop (Ver POE LBM4A Extracción ARN). Tomar en cuenta que cada reacción tiene un volumen final de 5µL.

Cada uno de los siguientes componentes se mezcla en vórtex (menos la muestra de ARN) y se centrifuga brevemente en la minicentrífuga para un *spin down*.

Componente	Concentración esperada	Volumen (µL)
ARN experimental	1 µg/reacción	X
Primer – Oligo(dT) ₁₅	0.5µg/reacción	1
Agua libre nucleasas	----	X
Volumen final		5µL




El encargado de la síntesis deberá calcular los volúmenes de ARN experimental y agua libre de nucleasas con base en la concentración del ARN experimental. El Oligo(dT)₁₅ y el agua se agrega en un tubo 1.5 o 2 mL en la campana blanca. Luego, en la campana gris se agrega el ARN usando puntas rotuladas para ARN.

Se cierra bien el tubo y se colocan en el bloque térmico por 5 minutos a 70°C. Al finalizar el tiempo trasladar inmediatamente a un baño de hielo por un mínimo de 5 minutos. Luego, se centrifuga cada tubo por 10 segundos en la minicentrífuga para coleccionar el condensado. Mantener los tubos en una hielera pequeña con hielo hasta que se agregue la mezcla de reacción de la transcripción inversa.

b. Preparación de la mezcla de reacción para la retrotranscripción

En un tubo de 1.5 o 2 mL, se prepara la mezcla de reacción para la retrotranscripción en un ambiente estéril dentro de la campana blanca. Se requieren 15µL para cada reacción de síntesis de ADN complementario. A continuación, se presentan los componentes y sus respectivos volúmenes.

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Agua libre de nucleasas	--	--	6.5
GoScript™ 5X Reaction Buffer	5X	--	4.0
MgCl ₂	25µM	2.5 mM	2.0
PCR Nucleotide Mix (dNTP)	10µM	0.5mM	1.0
Recombinant RNASin	40U/µL	20U	0.5
GoScript™ Reverse Transcriptase	--	-	1.0
		Volumen final (para cada reacción)	15µL

	SOP Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG	 
	Síntesis de ADN complementario (cDNA) <i>Aedes aegypti</i> utilizando el kit GoScript™ Reverse Transcription System de Promega	Pág. 4 de 4

Este máster mix se mezcla suavemente en el vórtex y se mantiene en hielo o gradilla fría antes de dispensarlo en los tubos de reacción.

c. Síntesis del ADN complementario

Dentro de la campana blanca, se agregan alícuotas de 15µL del máster mix para cada reacción en tubos de 0.2mL. Los tubos deben mantenerse fríos por lo que se recomienda colocarlos en una gradilla fría.

Luego, se agregan los 5µL de las alícuotas de ARN preparado en la campana gris para un volumen final de 20µL.

En un termociclador, se coloca la siguiente programación.

Paso	Temperatura	Minuto
Alineamiento	25°C	5 min
Extensión	42°C	1 hora
Inactivación de transcriptasa reversa	70°C	15 min

Los productos de la reacción se almacenan a 4°C.

Control de Calidad

N/A

Documentación

Registrar cada una de las muestras extraídas en el cuaderno de laboratorio, y dejar un record electrónico en el archivo de Excel correspondiente.

Documentos Asociados

N/A

Referencias

Promega. (2018). GoScript™ Reverse Transcription System. Promega Corporation.

Historia de Revisión

Revisión 0

11.3. Información de los cebadores GSTe2R y GSTe2F, del gen GSTe2

Cuadro 11.1: Secuencia 5'—3' de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

Cebador	Secuencia 5'—3'	Fuente
GSTe2F	AAG ATC TAC GGC TGG CTG GA	Helvecio, Romao, Carvalho-Leando, <i>et al.</i> , 2020
GSTe2R	TCT GCG ACA GGA CAA ACT GC	

Cuadro 11.2: Características de los cebadores GSTe2F y GSTe2R

Cebador	Longitud (pb)	Tm (°C)	GC %
GSTe2F	20	60.69	55.0
GSTe2R	20	60.88	55.0

```

agtgactgtggttatgtctaaatacatagaacaagagagatTTGGGTattcagagtatcgcagagata
cagtgatgatcgaccataataacgttatcaagaaaactcacgattttacgtgtaaacataatattaca
tacatTTTatgtaggtatccactTTGGCaccaatacagatcaaatcaaaacaggtccatttcatcgcac
gatcatcatcagTTTcacttaggccggcaaacgaaccgggtcacaattcactactgctctccaagaac
aaattatctgctccacaATGACGAAGCTCATTTTGTACACGCTCCATGTGAGCCCACCCTGTCCGGCA
GTGGAACCTGTGTGCCAAAGCGCTGGGCCTTGAATTGGAACAAAAACGGTCAATTTGTTGACCAAAGA
GCATCTTACACCGAATTTATGAAGgTTTgtagatcgaagcaatttcgggtgatgctaaatgtaattt
tctgtattatTTTcaaagATGAACCTCAACACACCGTGCCGGTGTAGACGATAACGGTACCATCGT
TTGTGAAAGTCATGCAATTATGATTTATCTGGTGTCAAAGTACGGCAAAGATGACAGTCTCTACTCGA
AAGAAGTGGTTAAGCAAGCCAAACTGAATGCTGCTCTTCACTTCGAGAGCGGTGTCCTGTTTCGCTCGT
TTGCGGTTTGTGTGTgtaagtattctcgagcgtgataaatacctatgcagtagtgtgtggcctatTTT
tgtattatTTTTTaaacagtagcttaaacactcaaatcacataaaatagaacataaaatagTTTta
aactacaactagtagtTTaacgtaggttgcctctgattttccatcatttcaactaataaattgagtt
tgTTTgatcataacttcatgaatacttgaccatttTGTgaagcTTTTTgcatttgaagaagattcgatt
gtctTTgaactacaaaagtagtcaatgaagTTTTTtagcacctaaaaacgtgaattttcatgcaaaa
agattgctgataaTTTaaatagtTTTactccaaattTtaggTTTTctcttcttatgTTTgTTTTctag
ttcagaagataacgcgaactTTTgTTTTgagaactTgtgaaatataagccacacctTaaacacatc
ttggactctgaacttactctgtcaattTTTcgcacctcatagGAACCAATCCTTTTCGCCGGAGGGTC
TGAGATTCCAGCGGATCGTGCCGAATATGTGCAAAAGGCTTACCAACTGTTGGAGGATACCCTGGTGG
ATGACTATATCGTGGGAAATTCGCTGACAATCGCGGATTTTCAAGTTGCGTTTCGAGCGTTTCGTCGATT
ATGGGAGTAATTCGATGGATAAGGAGAAGTTCCCGAAGATCTACGGCTGGCTGGACCGCTTGAAGGC
GCTGCCCTACTACGAGGCAGCCAACGGAAGTGGAGCCGAGCAGGTGGCGCAGTTTGTCTGTTCGAGA
AGGAGAAGAATGCTCAAAAGGCATAATTTTTatattctTTTgaaactcatactcatatctTTTTattgc
aattTaaatacagagaaaaa

```

utr intrones REGIÓN DONDE SE UNEN LOS CEBADORES

Figura 11.1: Secuencia del gen GSTe2 y región donde se unen los cebadores GSTe2F y GSTe2R. Secuencia recuperada de: <https://vectorbase.org/vectorbase/app/record/gene/AAEL007951>

11.4. Información de los cebadores GSTe5R y GSTe5F, del gen GSTe5

Cuadro 11.3: Secuencia 5'—3' de los cebadores GSTe5F y GSTe5R.

Cebador	Secuencia 5'—3'	Fuente
GSTe5F	CAC CAT GAC CAA ACC AAT TGT ATA C	Lumjuan, Rajatileka, Changsom,
GSTe5R	CGG TTC AAC CAA GCG TAG AT	<i>et al.</i> , 2011

Cuadro 11.4: Características de los cebadores GSTe5F y GSTe5R.

Cebador	Longitud (pb)	T _m (°C)	GC %
GSTe5F	25	58.67	40.0
GSTe5R	20	58.28	50.0

tgagctggtaatatgagtaacagactcaaacgtacataaatgaagcttcaagcattcaaatcaattta
 attggatacttatctcctacctatccatttgggtggaatctaacttactcggaataaaaacgaca**ATGA**
CCAAACCAATTGTATACACGCTCTACTTAAAGTCCACCTTCGCGAGCTGTGGATCTCTGTGCGGTAGCG
 CTGGGAATCGAATTGGAACGCAAAGTTATGAATCTGCTAGAGAGGGAACATTTGGACCCGAAATTTCT
 CAAGgtacaggttggtggaagattggtggtacagattgagacttaaacgttacttttcaacagATGAA
 TCCTCAACATACGATTCCGGTGTGGATGATGGTGGGATAATTGTTTCGTGATAGCCATGCCATCATGA
 TCTATTTGGTATCCAAGTATGGGAAGGACGATAGTTTGTACCCGAAGGATTTGGCTGAACAGGCGAAA
 GTTAATGCTGCCTTATACTTTGATTGTGGAGTCCTGTTTCGCTCGTTTTCGGTTCATTACTgtagtct
 tcatagtgtggcagataatttacaggttcgaaatagttaattgactttattaaacattgtagGAACAA
 ATTCTGATGGGAGGAAGTGAAATTCGGCGGAAAAGGCTGCTTACGTGGAGTCGGCTTACCAACTGCT
 GGAAGATGCCCTGACCGATGACTTCATCGCAGGAAACTCTCTGACTATCGCAGATCTTAGCTGCGGGT
 CCACTGTCTCCACCGCATGGGATTAATTCCGATGGACCGGGACAAATATCCGAAG**ATCTACGCTTG**
TGAACCGCTTGAAGGCACTGCCCTACTTTCGAAGAATTGAACGACCAAGGGCTGTGGAGTTACCGGC
 TATTATGAAAAACCTCATGGAGACCAATGCTCGCAAGGCTTGAgttgaaactctaactaataaa
 agctagtaattcacagtggttgatttta

utr
 intrones
 REGIÓN DONDE SE UNEN LOS CEBADORES

Figura 11.2: Secuencia del gen GSTe5 y región donde se unen los cebadores GSTe5F y GSTe5R. Secuencia recuperada de: <https://vectorbase.org/vectorbase/app/record/gene/AAEL007964>

11.5. Información de los cebadores GSTe7R y GSTe7F, del gen GSTe7

Cuadro 11.5: Secuencia 5'—3' de los cebadores GSTe7F y GSTe7R.

Cebador	Secuencia 5'—3'	Fuente
GSTe7F	TGAGGCGGCTTACGATCTAT	Lumjuan, Rajatileka, Changsom,
GSTe7R	CCATCCGTTTAAGAAAAGCG	<i>et al.</i> , 2011

11.6. Características de los cebadores GSTe7F y GSTe7R.

Cebador	Longitud (pb)	Tm (°C)	GC %
GSTe7F	20	58.38	50.0
GSTe7R	20	55.38	45.0

taacatTTTTgtcagcacaaccattcagtttactggctgcagttgataagcgcacatctccaacATG
 AGTTCCAAAATAGTGTGCATACAACCCGTCGCACCCCGGAGGACGAGCTGTTCAAATCTTGTC
 CATTGGGGCTGGATCTCGATCTCAAGTTTGTTCGATCTGTCCAAAAGGAACAGATGAGCGAGGAGT
 TTCTCAAGgttaggtggcaactcaattagagatgatctttcataactctcgatcttttcagTTAAACCC
 ATCCACACGATACCGACCATTGACGACGATGGTGTCCGGTGTACGACAGCCATGCCATTCTCGTCT
 ATCTGGTGTCCAAGTACGCCAAGGATCGGGATCTCTTCCGGAGGATCCCGTCATCCAAGCTCGCATC
 AACGCTTGGTTCCTTCCGACTCCGGAGTTTTGTTTCCGAGACTGCGTGGTGCCGTTGAACAGTGTT
 CTACTTGGTCTGAAGAAGATTCCCCGGGATCGAATGGAAGCAAT**TGAGGCGGCTTACGATCTAT**TCG
 AAGGAGCGCTGAAGGGCGATTTCCCTGGTAGGAGATTCGTTGACGCTGGCGGATATAAGCGTAACCACT
 TGTTTGGTGTCTTGAATGGAGTTTGCCCTATGGAGGAGTCTAAATATCCGAAAAGCTG**CGCTTTTCT**
TAAACGGATGGAACAGTCAATGCCGTGCTACAAGGAGTTCAACGCTGAAGTGTGGAAGAGACCAAGG
 TATTTCTAAAGCAGAACTGGATGAAAACAATAAGAAATAAaatcaaccactgtgaattacta

utr
 intrones
 REGIÓN DONDE SE UNEN LOS CEBADORES

Figura 11.3: Secuencia del gen GSTe7 y región donde se unen los cebadores GSTe7F y GSTe7R. Secuencia recuperada de <https://vectorbase.org/vectorbase/app/record/gene/AEL007948>

11.7. Optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

Cuadro 11.6: Condiciones de las pruebas de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

Prueba	Muestra	Factor de dilución	Concentración de cebadores (uM)	Puntos de la curva	Eficiencia	(R^2)
1	NO3	1/10	0.3	5	210.08 %	0.9915
2	NO3	1/5	0.3	5	138.16 %	0.9780
3	NO3	1/5	0.5	5	207.62 %	0.9849
4	NO1	1/5	0.3	5	229.95 %	0.9775
5	NO1	1/10	0.3	4	159.15 %	0.9881
6	NO1	1/10	0.5	5	125.85 %	0.9949
7	NO1	1/10	0.6	5	150.56 %	0.9930
8	NO1	1/2	0.5	5	225.66 %	0.9930
9	NO1	1/2	0.3	4	147.93 %	0.9687
10	NO1	1/2 y 1/10	0.5	5	157.82 %	0.9865
11	NO1	1/10	0.5	5	136.84 %	0.9760
12	NO1	1/10	0.5	4	105.90 %	0.9987

Cuadro 11.7: Resultados del qPCR de la prueba 1 de optimización.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1.0000	0.0	29.634	29.634	0.0
0.1000	-1.0	31.816	31.816	0.0
0.0100	-2.0	33.502	33.502	0.0
0.0010	-3.0	36.261	36.261	0.0
0.0001	-4.0	37.585	37.585	0.0

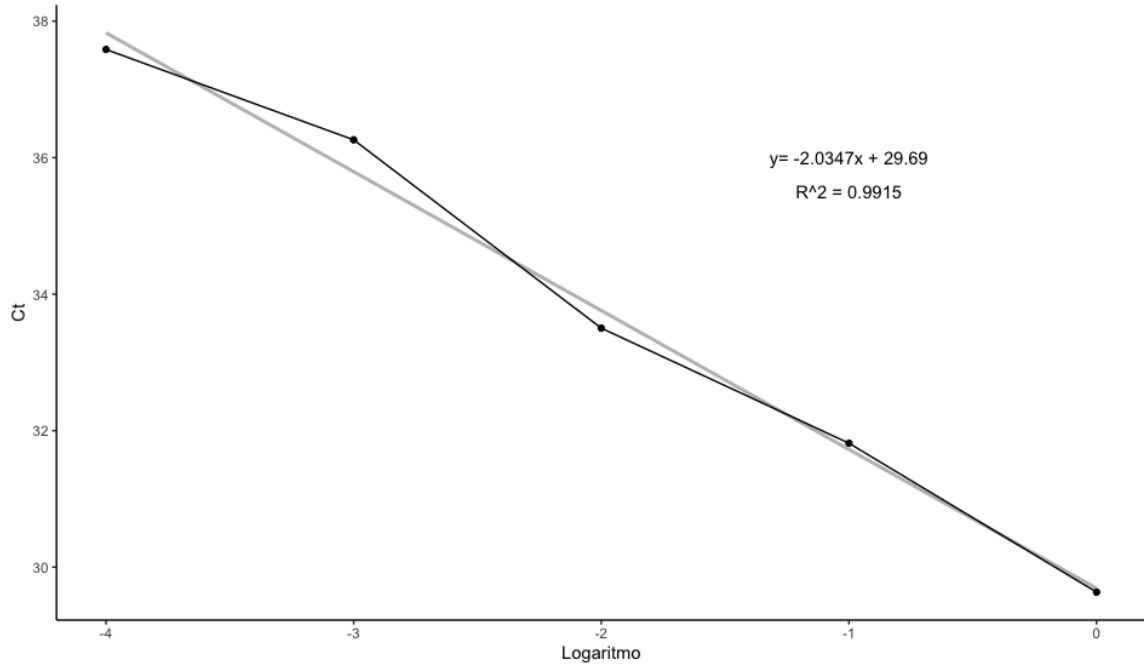


Figura 11.4: Curva estándar de la prueba 1 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

Cuadro 11.8: Resultados del qPCR de la prueba 2 de optimización.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1.0000	0.0	28.149	28.149	0.0
0.2000	-0.7	29.162	29.162	0.0
0.0400	-1.4	31.014	31.014	0.0
0.0080	-2.1	32.943	32.943	0.0
0.0016	-2.8	35.532	35.532	0.0

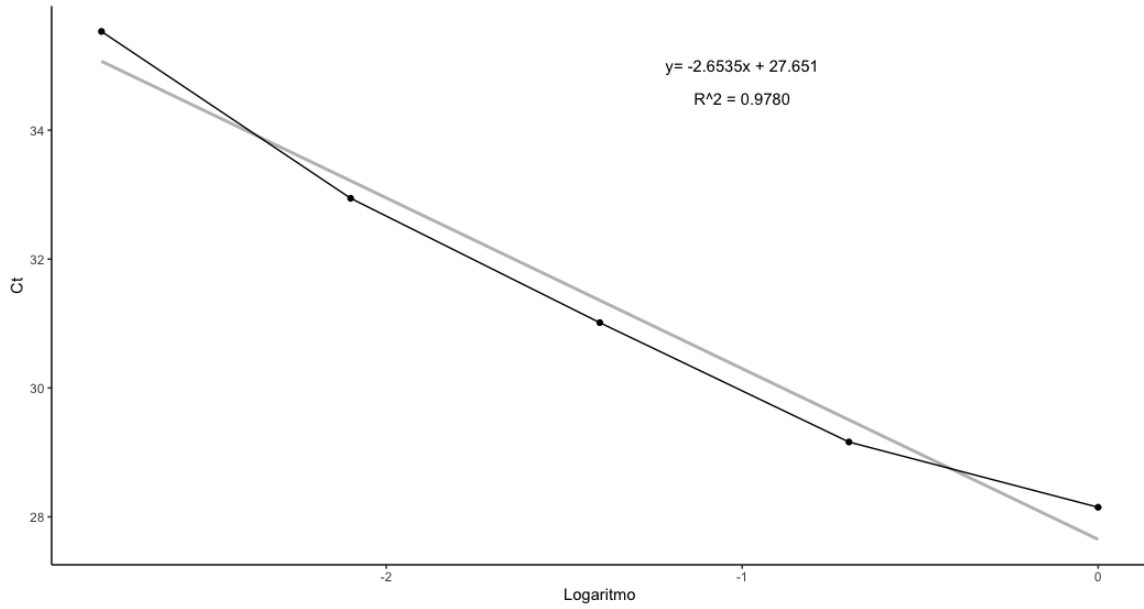


Figura 11.5: Curva estándar de la prueba 2 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

Cuadro 11.9: Resultados del qPCR de la prueba 3 de optimización.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1.0000	0.0	26.583	26.583	0.0
0.2000	-0.7	27.730	27.730	0.0
0.0400	-1.4	29.331	29.331	0.0
0.0080	-2.1	30.335	30.335	0.0
0.0016	-2.8	32.442	32.442	0.0

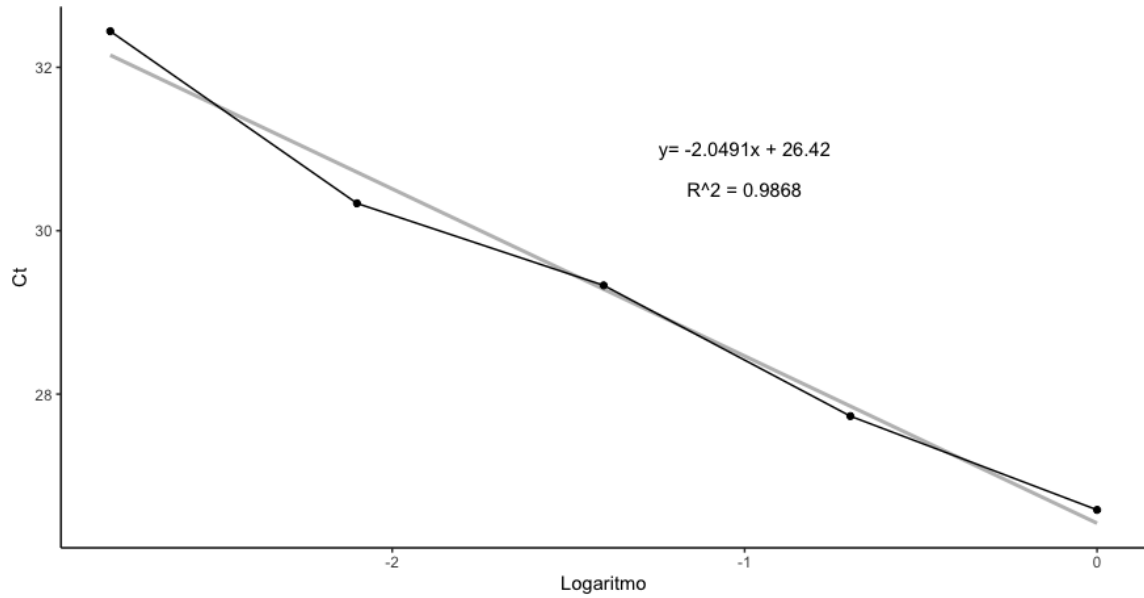


Figura 11.6: Curva estándar de la prueba 3 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

Cuadro 11.10: Resultados del qPCR de la prueba 4 de optimización.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1.0000	0.0	28.406	28.406	0.0
0.2000	-0.7	28.967	28.967	0.0
0.0400	-1.4	30.550	30.550	0.0
0.0080	-2.1	31.933	31.933	0.0
0.0016	-2.8	33.665	33.665	0.0

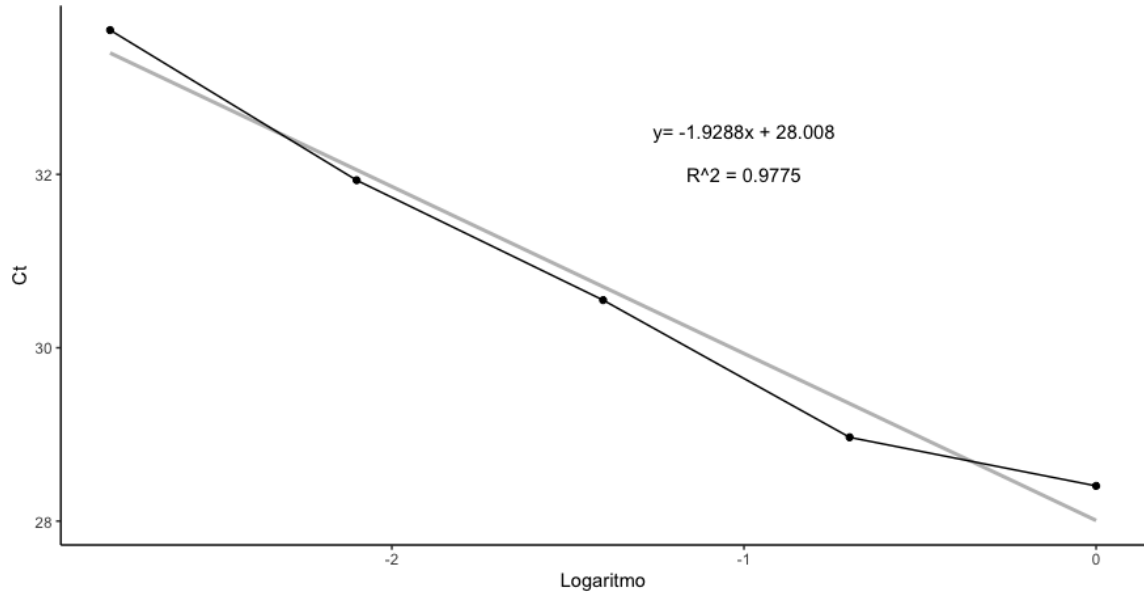


Figura 11.7: Curva estándar de la prueba 4 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

Cuadro 11.11: Resultados del qPCR de la prueba 5 de optimización.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1.0000	0.0	29.634	29.229	0.0
0.1000	-1.0	31.040	31.040	0.0
0.0100	-2.0	33.479	33.479	0.0
0.0010	-3.0	36.476	36.476	0.0

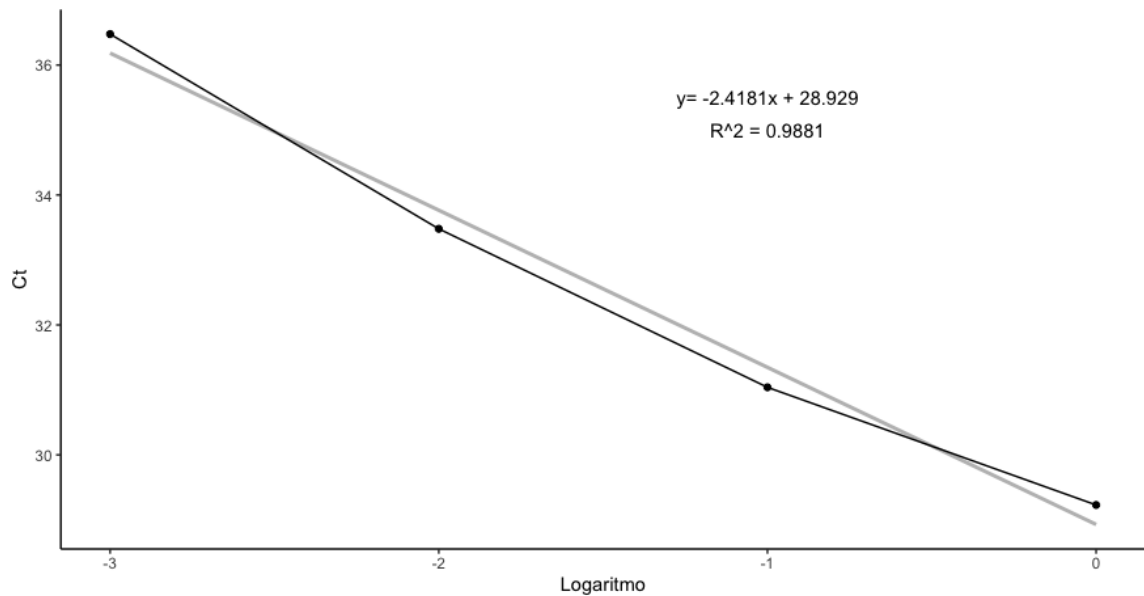


Figura 11.8: Curva estándar de la prueba 5 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

Cuadro 11.12: Resultados del qPCR de la prueba 6 de optimización.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1.0000	0.0	27.165	27.165	0.0
0.1000	-1.0	28.772	28.772	0.0
0.0100	-2.0	31.414	31.414	0.0
0.0010	-3.0	33.995	33.995	0.0
0.0001	-4.0	38.685	38.685	0.0

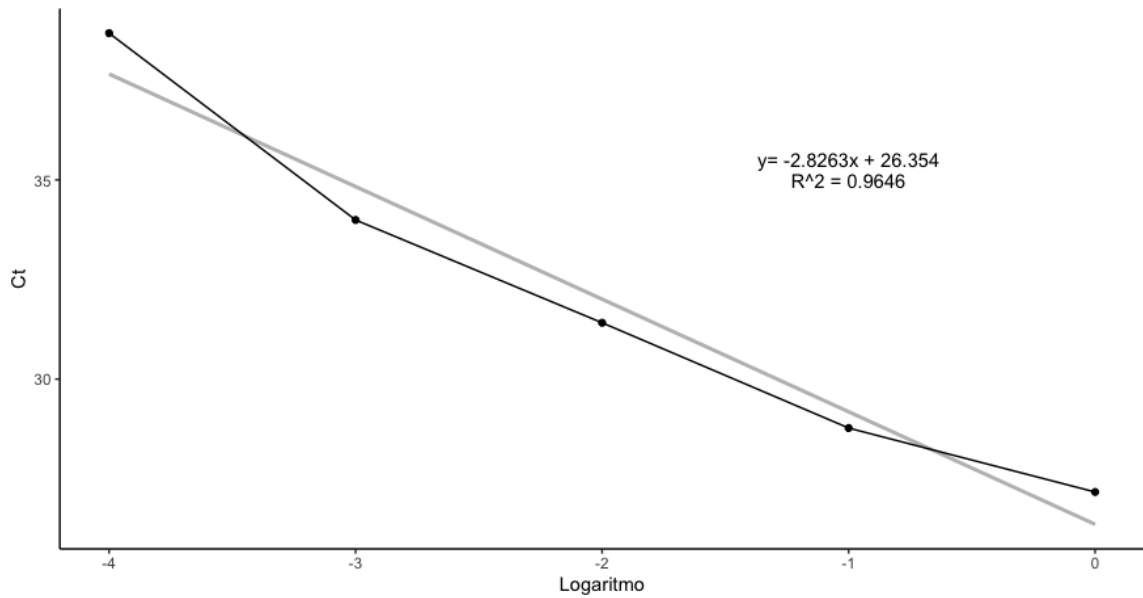


Figura 11.9: Curva estándar de la prueba 6 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

Cuadro 11.13: Resultados del qPCR de la prueba 7 de optimización.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1.0000	0.0	26.402	26.402	0.0
0.1000	-1.0	28.120	28.120	0.0
0.0100	-2.0	30.728	30.728	0.0
0.0010	-3.0	33.496	33.496	0.0
0.0001	-4.0	36.248	36.248	0.0

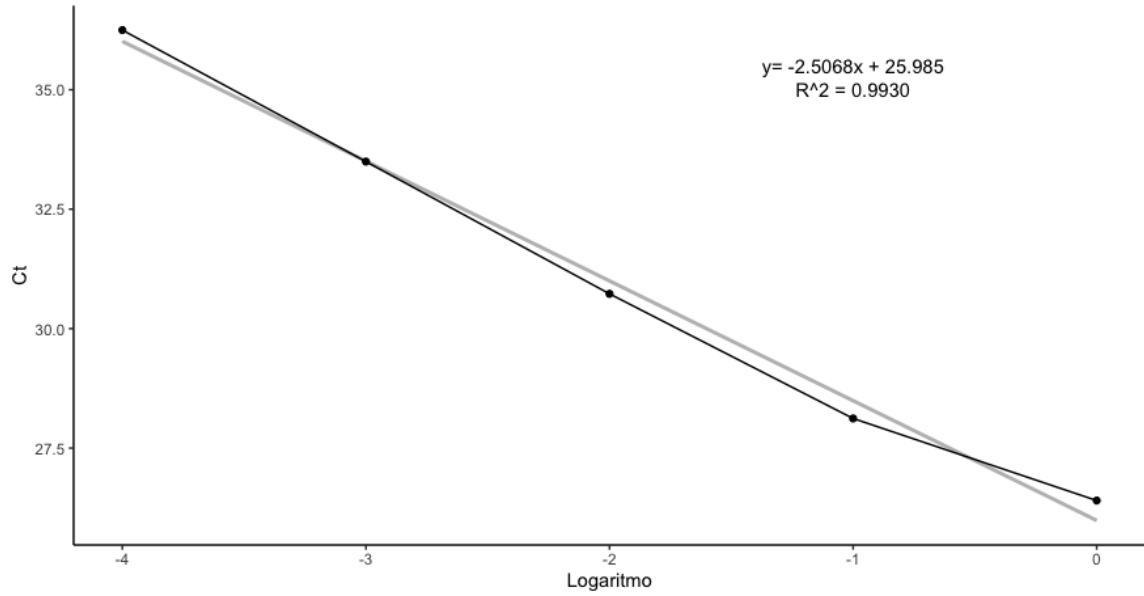


Figura 11.10: Curva estándar de la prueba 7 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

Cuadro 11.14: Resultados del qPCR de la prueba 8 de optimización.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1.0000	0.0	24.794	24.794	0.0
0.5000	-0.3	24.878	24.878	0.0
0.2500	-0.6	26.105	26.105	0.0
0.1250	-0.9	26.708	26.708	0.0
0.0625	-1.2	26.814	26.814	0.0

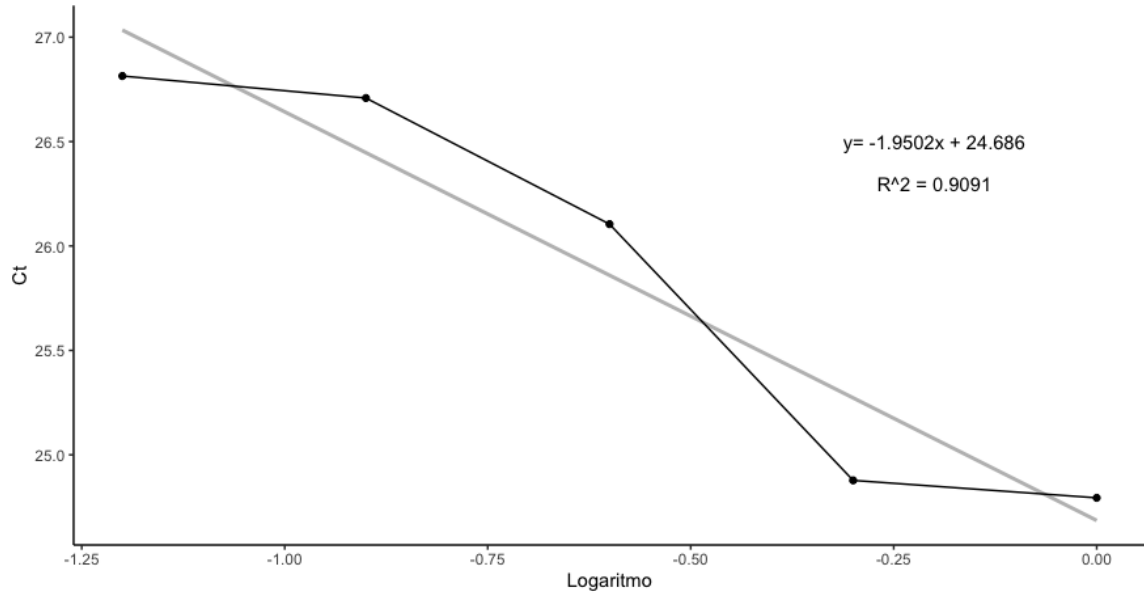


Figura 11.11: Curva estándar de la prueba 8 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

Cuadro 11.15: Resultados del qPCR de la prueba 9 de optimización.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1.0000	0.0	27.011	27.011	0.0
0.5000	-0.3	27.434	27.434	0.0
0.2500	-0.6	28.597	28.597	0.0
0.1250	-0.9	29.168	29.168	0.0

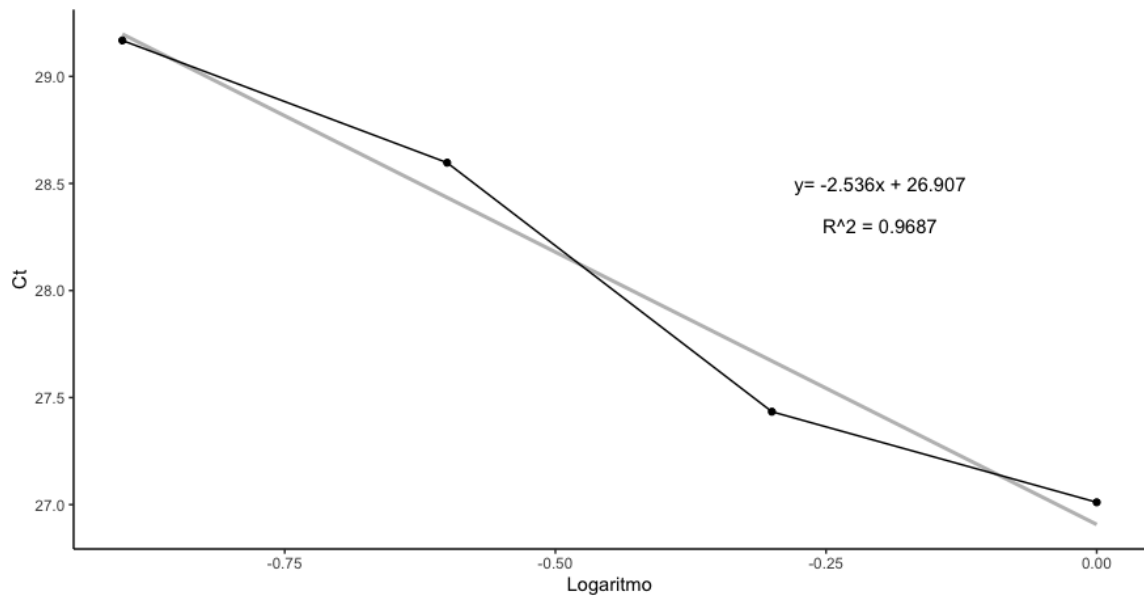


Figura 11.12: Curva estándar de la prueba 9 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

Cuadro 11.16: Resultados del qPCR de la prueba 10 de optimización.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1.0000	0.0	25.454	25.454	0.0
0.1000	-1.0	28.021	28.021	0.0
0.0100	-2.0	29.368	29.368	0.0
0.0010	-3.0	32.703	32.703	0.0
0.0001	-4.0	35.269	35.269	0.0

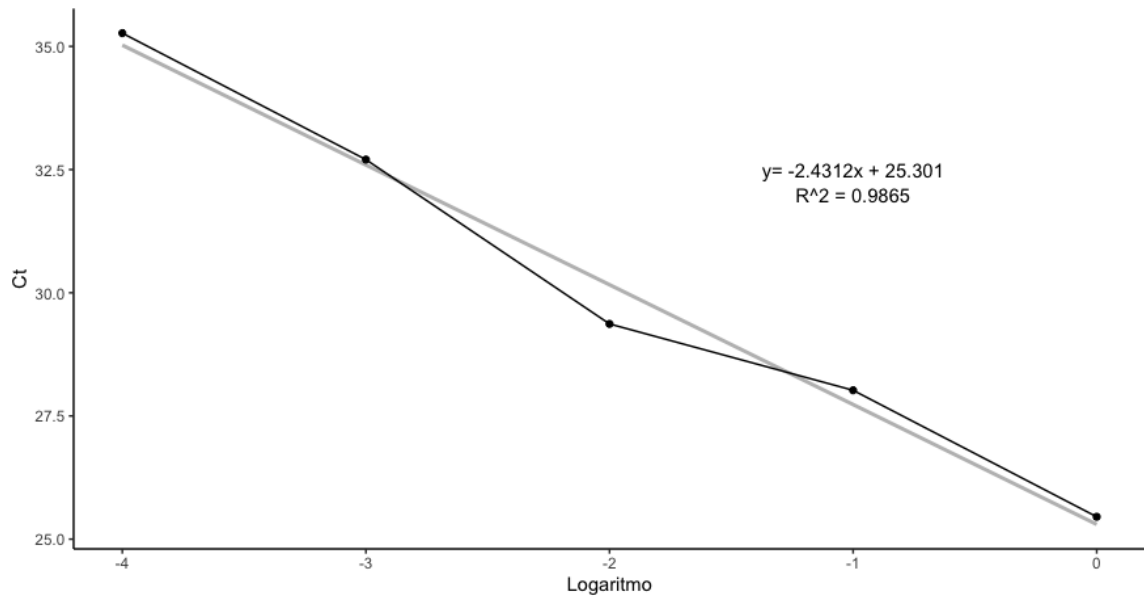


Figura 11.13: Curva estándar de la prueba 10 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

Cuadro 11.17: Resultados del qPCR de la prueba 11 de optimización.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1.0000	0.0	26.970 26.903 26.838	26.904	0.066003
0.1000	-1.0	28.244 29.159 27.970	28.458	0.62285
0.0100	-2.0	31.442 31.088 31.028	29.368	0.22354
0.0010	-3.0	35.026 34.853 35.692	35.190	0.44329
0.0001	-4.0	37.800 36.738 36.134	36.891	0.84316

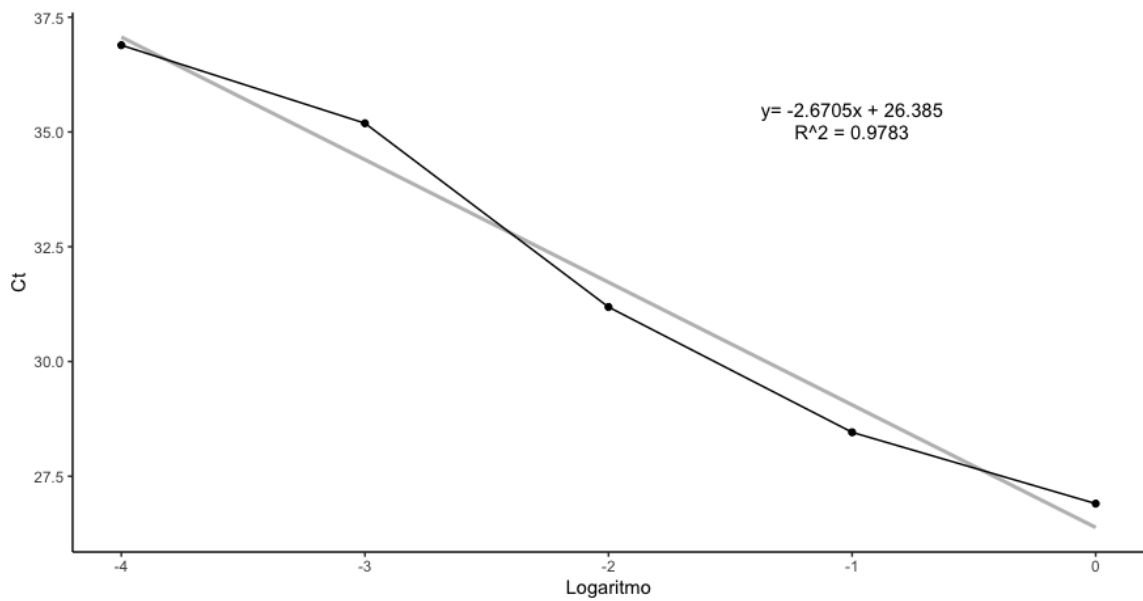


Figura 11.14: Curva estándar de la prueba 11 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

Cuadro 11.18: Resultados del qPCR de la prueba 12 de optimización.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1.0000	0.0	27.788 27.967 27.807	27.854	0.08034
0.1000	-1.0	31.176 30.768 30.898	30.947	0.17002
0.0100	-2.0	34.397 33.880 33.570	33.949	0.34131
0.0010	-3.0	36.928 37.852 37.662	37.481	0.39845

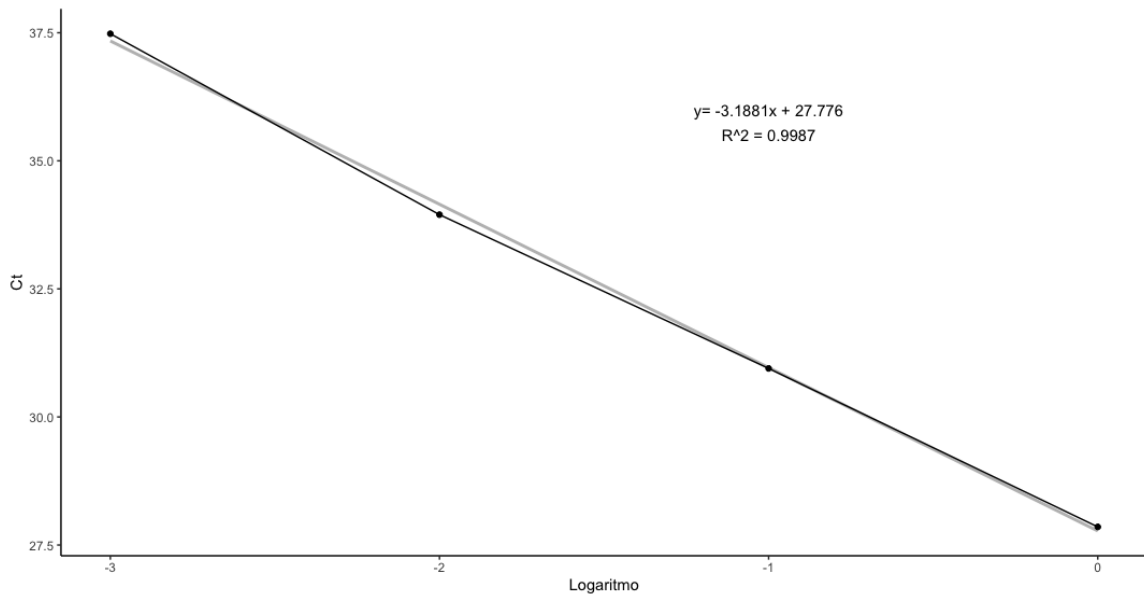


Figura 11.15: Curva estándar de la prueba 12 de optimización de los cebadores GSTe2F y GSTe2R.

11.8. Genes de referencia

Cuadro 11.19: Condiciones de qPCR para los genes RSP3 y Ae60sL8

Factor de dilución	Concentración de cebadores	No. de puntos en la curva
1/10	0.3 uM	4

Cuadro 11.20: Eficiencia y coeficiente de correlación (R^2) de los genes de referencia RSP3 y Ae60sL8.

Gen	Eficiencia	Coeficiente de correlación (R^2)
RSP3	101.83 %	0.9981
Ae60sL8	100.18 %	0.9991

Cuadro 11.21: Resultados del qPCR del gen de referencia RSP3.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1.0000	0.0	23.114 22.426 22.669	22.736	0.34890
0.1000	-1.0	25.434 25.765 25.558	25.586	0.16722
0.0100	-2.0	29.067 29.184 29.121	29.124	0.05855
0.0010	-3.0	32.546 32.239 32.673	32.486	0.22313

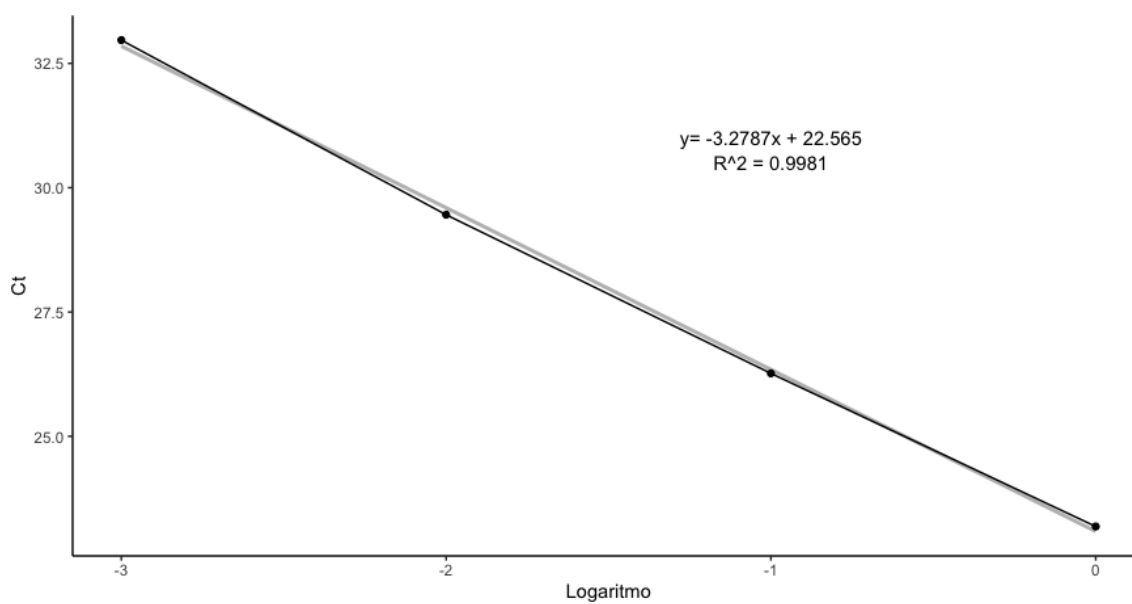


Figura 11.16: Curva estándar del gen RSP3.

Cuadro 11.22: Resultados del qPCR del gen de referencia Ae60sL8.

Concentración del punto	Logaritmo de la concentración	Ct	Promedio Ct	Desviación estándar
1.0000	0.0	23.005 22.426 23.185	22.872	0.39659
0.1000	-1.0	26.253 26.261 26.283	26.266	0.01553
0.0100	-2.0	29.501 29.411	29.456	0.06363
0.0010	-3.0	33.201 32.533	32.867	0.47234

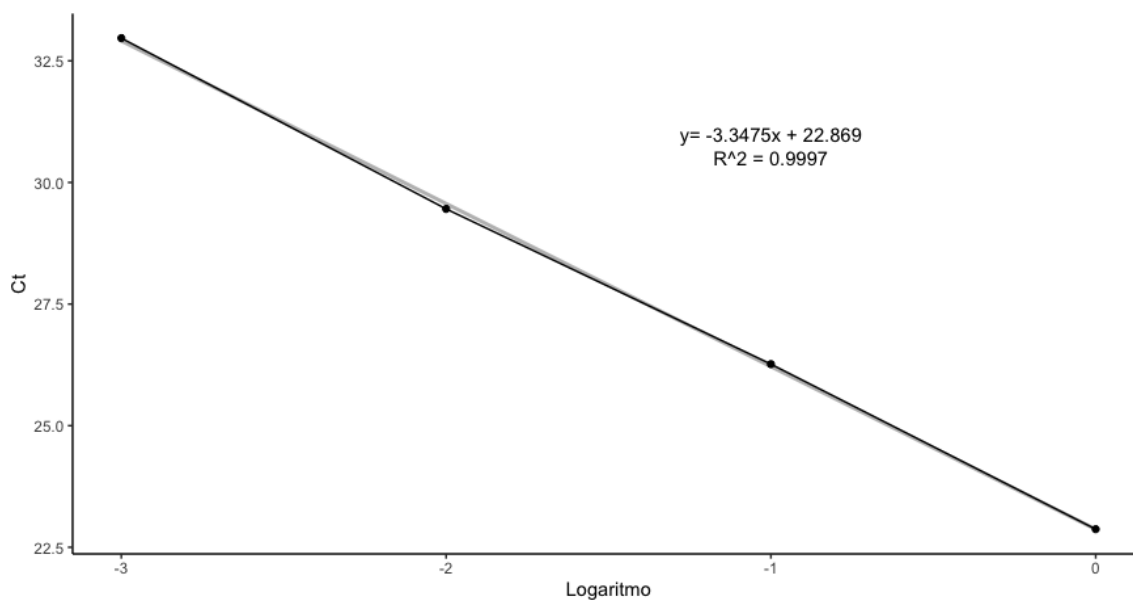


Figura 11.17: Curva estándar del gen Ae60sL8.

11.9. Expresión génica de GSTe2 de la población Carmen.

Cuadro 11.23: Valores de Ct obtenidos del equipo de qPCR.

Muestra	GSTe2	RSP3	Ae60sL8
CR1	27.948	22.339	21.230
	27.930	22.339	21.399
	27.806	22.339	21.449
CR5	29.367	23.682	24.370

	29.053	23.140	23.695
	29.384	23.485	24.109
CR6	28.712	22.918	22.268
	28.767	22.681	22.186
	28.503	22.809	22.283
CR7	30.250	22.972	23.158
	30.331	23.130	23.118
	30.297	23.319	22.998
CR8	29.275	21.947	22.556
	28.928	21.742	22.535
	28.980	22.081	22.378
CR9	29.096	23.230	23.637
	28.824	23.081	23.574
	28.753	23.335	23.537
CR2	29.789	22.865	23.065
	29.707	22.976	22.973
	29.945	22.822	22.800

Muestra	GSTe2	RSP3	Ae60sL8
CR3	29.992	23.095	23.166
	30.199	23.026	23.256
	30.191	22.537	23.156
CR4	30.366	23.477	23.680
	30.425	23.814	23.332
	30.496	23.818	23.577
NO1	30.015	22.601	21.734
	29.373	22.444	21.548
	29.954	22.285	21.713
NO2	30.754	23.206	22.765
	30.524	23.068	22.619
	30.678	23.021	22.681
NO3	30.411	22.499	22.005
	30.517	22.606	22.335
	31.032	22.438	22.322

Cuadro 11.24: Corrección de los valores Ct de acuerdo con las eficiencias de los PCRs.

Muestra	GSTe2	RSP3	Ae60sL8
CR1	29.12	22.63	21.25
	29.10	22.63	21.42
	28.97	22.63	21.47
CR5	30.60	23.99	24.40
	30.27	23.44	23.72
	30.62	23.79	24.14
CR6	29.92	23.22	22.29
	29.97	22.98	22.21
	29.70	23.11	22.31
CR7	31.52	23.27	23.18
	31.60	23.43	23.14
	31.57	23.62	23.02
CR8	30.50	22.23	22.58
	30.14	22.03	22.56
	30.20	22.37	22.40
CR9	30.32	23.53	23.66
	30.03	23.38	23.60
	29.96	23.64	23.56

Muestra	GSTe2	RSP3	Ae60sL8
CR2	31.04	23.16	23.09
	30.95	23.28	23.00
	31.20	23.12	22.83
CR3	31.25	23.40	23.19
	31.47	23.33	23.28
	31.46	22.83	23.18
CR4	31.64	23.78	23.71
	31.70	24.13	23.36
	31.77	24.13	23.60
NO1	31.27	22.90	21.76
	30.61	22.74	21.57
	31.21	22.58	21.74
NO2	32.04	23.51	22.79
	31.80	23.37	22.64
	31.96	23.32	22.71
NO3	31.69	322.79	322.03
	331.80	322.90	322.36
	332.33	322.73	322.35

Cuadro 11.25: Promedio de las réplicas técnicas.

Réplica biológica	GSTe2	RSP3	Ae60sL8
CR1	29.06	22.63	21.38
CR5	30.50	23.74	24.08
CR6	29.86	23.10	22.27
CR7	31.56	23.44	23.12
CR8	30.28	22.21	22.51
CR9	30.10	23.52	23.61
CR2	31.06	23.19	22.97
CR3	31.39	23.19	23.22
CR4	31.71	24.01	23.56
NO1	31.03	22.74	21.69
NO2	31.94	23.40	22.71
NO3	31.94	22.81	22.24

Cuadro 11.26: Valores de delta Ct.

Réplica biológica	dCt RSP3	dCt Ae60sL8
CR1	6.43	7.68
CR5	6.75	6.41
CR6	6.76	7.59
CR7	8.12	8.45
CR8	8.07	7.77
CR9	6.58	6.49
CR2	7.88	8.09
CR3	8.21	8.17
CR4	7.69	8.15
NO1	8.29	9.34
NO2	8.54	9.22
NO3	9.13	9.69

Cuadro 11.27: Promedio de los valores de delta Ct.

Réplica biológica	dCt promedio
CR1	7.06
CR5	6.58
CR6	7.18
CR7	8.28
CR8	7.92
CR9	6.54
CR2	7.99
CR3	8.19
CR4	7.92
NO1	8.82
NO2	8.88
NO3	9.41

Cuadro 11.28: Valores de delta delta Ct.

Réplica biológica	2-dCt
CR1	0.007507209
CR5	0.010433607
CR6	0.006908172
CR7	0.003208197
CR8	0.004135096
CR9	0.010751706
CR2	0.003945541
CR3	0.003425968
CR4	0.004124848
NO1	0.002217226
NO2	0.002120647
NO3	0.001467609

Cuadro 11.29: Promedio de los valores de delta delta Ct por réplica biológica.

Réplica biológica	Promedio 2-dCt
CR1	
CR5	
CR6	0.008282996
CR7	
CR8	
CR9	0.006031666
CR2	
CR3	
CR4	0.003832119
NO1	
NO2	
NO3	0.001935161

11.10. Expresión génica de GSTe2 de la población Villa Consuelo.

Cuadro 11.30: Valores de Ct obtenidos del equipo de qPCR.

Muestra	GSTe2	RSP3	Ae60sL8
VC4	30.244	22.490	22.446
	30.045	22.099	22.378
	30.087	22.026	22.456
VC5	30.131	23.518	23.729
	30.416	23.558	23.646
	30.163	23.998	23.741
VC6	29.962	23.201	23.554
	30.667	23.083	23.756
	30.138	23.307	23.725
VC1	30.444	24.871	23.883
	29.622	24.162	23.759
	30.499	24.964	23.325
VC2	29.970	23.507	23.065
	30.300	23.759	23.020
	29.956	23.665	23.030
VC3	29.078	23.403	22.643
	29.392	23.412	22.737
	29.549	23.764	22.767
VC7	30.089	24.053	23.813
	30.175	24.137	23.810
	29.918	23.873	23.931

Muestra	GSTe2	RSP3	Ae60sL8
VC9	29.333	22.504	22.930
	28.970	22.299	22.802
	29.159	22.164	22.827
VC10	30.491	23.808	24.372
	30.489	23.803	24.329
	30.705	23.857	24.402
NO1	30.015	22.601	21.734
	29.373	22.444	21.548
	29.954	22.285	21.713
NO2	30.754	23.206	22.765
	30.524	23.068	22.619
	30.678	23.021	22.681
NO3	30.411	22.499	22.005
	30.517	22.606	22.335
	31.032	22.438	22.322

Cuadro 11.31: Corrección de los valores Ct de acuerdo con las eficiencias de los PCRs.

Muestra	GSTe2	RSP3	Ae60sL8
VC4	31.51	22.78	22.47
	31.31	22.39	22.40
	31.35	22.31	22.48
VC5	31.40	23.83	23.75
	31.69	23.87	23.67
	31.43	24.31	23.77
VC6	31.22	23.50	23.58
	31.95	23.39	23.78
	31.40	23.61	23.75
VC1	31.72	25.20	23.91
	30.86	24.48	23.78
	31.78	25.29	23.35
VC2	31.23	23.81	23.09
	31.57	24.07	23.04
	31.21	23.97	23.05
VC3	30.30	23.71	22.67
	30.62	23.72	22.76
	30.79	24.07	22.79

Muestra	GSTe2	RSP3	Ae60sL8
VC7	31.35	24.37	23.84
	31.44	24.45	23.84
	31.17	24.18	23.96
VC9	30.56	22.80	22.95
	30.18	22.59	22.83
	30.38	22.45	22.85
VC10	31.77	24.12	24.40
	31.77	24.11	24.36
	31.99	24.17	24.43
NO1	31.27	22.90	21.76
	30.61	22.74	21.57
	31.21	22.58	21.74
NO2	32.04	23.51	22.79
	31.80	23.37	22.64
	31.96	23.32	22.71
NO3	31.69	22.79	22.03
	31.80	22.90	22.36
	32.33	22.73	22.35

Cuadro 11.32: Promedio de las réplicas técnicas.

Réplica biológica	GSTe2	RSP3	Ae60sL8
VC4	31.39	22.50	22.45
VC5	31.50	24.00	23.73
VC6	31.52	23.50	23.70
VC1	31.45	24.99	23.68
VC2	31.34	23.95	23.06
VC3	30.57	23.83	22.74
VC7	31.32	24.33	23.88
VC9	30.38	22.61	22.88
VC10	31.84	24.13	24.39
NO1	31.03	22.74	21.69
NO2	31.94	23.40	22.71
NO3	31.94	22.81	22.24

Cuadro 11.33: Valores de delta Ct.

Réplica biológica	dCt RSP3	dCt Ae60sL8
VC4	8.89	8.94
VC5	7.50	7.77
VC6	8.02	7.82
VC1	6.47	7.77
VC2	7.38	8.27
VC3	6.74	7.83
VC7	6.99	7.44
VC9	7.76	7.50
VC10	7.71	7.45
NO1	8.29	9.34
NO2	8.54	9.22
NO3	9.13	9.69

Cuadro 11.34: Promedio de los valores de delta Ct.

Réplica biológica	dCt promedio
VC4	8.92
VC5	7.64
VC6	7.92
VC1	7.12
VC2	7.83
VC3	7.28
VC7	7.22
VC9	7.63
VC10	7.58
NO1	8.82
NO2	8.88
NO3	9.41

Cuadro 11.35: Valores de delta delta Ct.

Réplica biológica	2-dCt
VC4	0.002069876
VC5	0.005016746
VC6	0.004121915
VC1	0.007187911
VC2	0.004397789
VC3	0.006418928
VC7	0.006729764
VC9	0.005045313
VC10	0.005227756
NO1	0.002217226
NO2	0.002120647
NO3	0.001467609

Cuadro 11.36: Promedio de los valores de delta delta Ct por réplica biológica.

Réplica biológica	Promedio 2-dCt
VC4	
VC5	
VC6	0.003736179
VC1	
VC2	
VC3	0.006001543
VC7	
VC9	
VC10	0.005667611
NO1	
NO2	
NO3	0.001935161

11.11. Rediseño de cebadores para GSTe5 y GSTe7

Todos los cebadores fueron rediseñados por medio de la herramienta Primer-BLAST (National Library of Medicine, s.f.).

Cuadro 11.37: Secuencia 5'—3' de los cebadores GSTe5F y GSTe5R rediseñados.

Cebador	Secuencia 5'—3'
GSTe5F	GGG AAT CGA ATT GGA ACG CA
GSTe5R	GGC ATG GCT ATC ACG AAC AA

Cuadro 11.38: Características de los cebadores GSTe5F y GSTe5R rediseñados.

Cebador	Longitud (pb)	Tm (°C)	GC %
GSTe5F	20	58.91	50.0
GSTe5R	20	58.62	50.0

Cuadro 11.39: Secuencia 5'—3' de los cebadores GSTe7F y GSTe7R rediseñados.

Cebador	Secuencia 5'—3'
GSTe7F	CAT TTT GGG GCT GGA TCT CG
GSTe7R	ATC CTT GGC GTA CTT GGA CA

Cuadro 11.40: Características de los cebadores GSTe7F y GSTe7R rediseñados.

Cebador	Longitud (pb)	Tm (°C)	GC %
GSTe7F	20	58.97	55.0
GSTe7R	20	59.02	50.0