

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Estudio de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de una muestra de campo y dos cepas de laboratorio: una susceptible y una resistente a deltametrina, de adultos hembra *Anopheles albimanus* – vector de malaria en Guatemala - mediante el análisis bioinformático de la región hipervariable V3 - V4 del gen 16S ARN ribosomal

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Andrea Alejandra Cuadra Granados

para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2018

Estudio de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de una muestra de campo y dos cepas de laboratorio: una susceptible y una resistente a deltametrina, de adultos hembra *Anopheles albimanus* – vector de malaria en Guatemala - mediante el análisis bioinformático de la región hipervariable V3 - V4 del gen 16S ARN ribosomal

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Estudio de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de una muestra de campo y dos cepas de laboratorio: una susceptible y una resistente a deltametrina, de adultos hembra *Anopheles albimanus* – vector de malaria en Guatemala - mediante el análisis bioinformático de la región hipervariable V3 - V4 del gen 16S ARN ribosomal

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Andrea Alejandra Cuadra Granados

para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2018

Vo. Bo.

(f) 
Dra. Pamela Marie Pennington Aycinena

Tribunal Examinador:

(f) 
Dra. Pamela Marie Pennington Aycinena

(f) 
Dr. Javier Arturo Ceja - Navarro

(f) 
Dra. Dalia Mei Ling Lau Bonilla

Fecha de aprobación: 31 de mayo del 2018.

AGRADECIMIENTOS

«Be thankful for all the struggles you go through. They make you stronger, wiser and humble. Don't let them break you, let them make you» (Anónimo)

Para emprender un camino de éxito se necesita el consejo de Dios y las personas correctas en el momento correcto. Los grandes logros no se alcanzan solos, sino con la ayuda de Dios y aquellas personas que creyeron en nuestras capacidades y objetivos. Por ende, agradezco primeramente a Dios por poner en mi corazón pasión por la ciencia, permitirme completar mis estudios, darme la determinación y fuerza necesaria para perseverar y bendecirme con oportunidades de éxito. Segundo, a nivel personal agradezco a mi familia, a mi madre Claudia Granados por apoyarme incondicionalmente económica y moralmente durante todo el camino, por enseñarme con su ejemplo y amor que todo en la vida es posible cuando se tiene un objetivo claro; a mi padre Ivo Cuadra, que desde el cielo me cuida y guía; a Benny De Ketele por brindarme consejos acertados a la situación, ayudarme a tomar decisiones y fomentar un pensamiento crítico; a mi hermana Daniela Cuadra por aconsejarme como colega en la ciencia; a mis abuelitos Carlos Granados y Gloria Moreno por apoyarme en todo momento y brindarme amor de padres y un segundo hogar; y a Rodrigo Arbizú por su amor, amistad y paciencia a lo largo de esta etapa.

A nivel académico, agradezco a la Dra. Pennington por asesorar este trabajo, creen en mis capacidades, estar siempre dispuesta a responder dudas y, sobre todo, por preocuparse que los estudiantes sean profesionales de éxito y tengan contacto con el mundo profesional tanto fuera como dentro de Guatemala; al Dr. Javier Ceja-Navarro por abrir las puertas con amabilidad y entusiasmo del Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley, creen en los objetivos de la presente investigación y apoyar económicamente y académicamente cada parte del procedimiento y análisis de resultados; a la Dra. Norma Padilla por permitirme realizar mi trabajo de graduación en el laboratorio de la Unidad de Entomología Médica, apoyar económicamente en las primeras etapas del proyecto y confiar en mis capacidades y potencial del presente trabajo; a la Dra. Dalia Mei Ling Lau Bonilla por aconsejarme y apoyarme académicamente y moralmente a lo largo de todo el proceso; al personal del insectario, Pedro Peralta y Alfonso Salam, por ayudarme en la crianza de las cepas de laboratorio y obtención de las muestras de campo; y a la Dra. Susana Arrechea por amablemente ofrecerse múltiples veces a llevar muestras y documentos desde Guatemala al Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley, California – Estados Unidos.

Por último, agradezco a cada uno de mis amigos – Diane Avalos, Pablo Salazar, Ana Cristina Benedict, Santiago Rodas, Guido Rossi y Madahí Mejía– por vivir conmigo esta etapa, brindarme su amistad, apoyarme en mis flaquezas y ser mis compañeros de aula y vida. Ellos hicieron inolvidables estos cuatro años de universidad.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
GLOSARIO.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
A. General	3
B. Específicos	3
III. JUSTIFICACIÓN	4
IV. MARCO TEÓRICO	6
A. Malaria	6
1. Generalidades	6
2. Transmisión	9
3. Prevención	11
B. Métodos de control vectorial.....	11
1. Control biológico.....	11
2. Gestión ambiental	12
3. Control químico.....	12
C. Insecticidas.....	13
1. Insecticidas utilizados para el control de la malaria.	13
2. Piretroides.....	14
3. Deltametrina	15
D. Mecanismos de resistencia a insecticidas en anofelinos.....	16
1. Metabólicos	17
2. Sitio objetivo	18
3. Cambio de comportamiento.....	19
4. Reducción de la absorción o penetración del insecticida.....	19
E. Relación entre la microbiota bacteriana intestinal y resistencia a insecticidas.....	20
1. Adquisición de la microbiota bacteriana en anofelinos	21
2. Diversidad de la microbiota intestinal en anofelinos	23

3.	Evidencia del rol de la microbiota bacteriana intestinal en la desintoxicación y resistencia a insecticidas	28
F.	Métodos utilizados para el estudio de la microbiota bacteriana	29
1.	Cultivo dependiente.....	30
2.	Cultivo independiente.....	31
G.	Estudio de la microbiota bacteriana desde un enfoque metagenómico	31
1.	Gen 16S ARN ribosomal	32
2.	Análisis metagenómicos basados en el gen 16S ARN ribosomal	35
V.	HIPÓTESIS	51
VI.	METODOLOGÍA.....	52
A.	Enfoque de la investigación	52
B.	Alcance de la investigación.....	52
C.	Diseño de investigación	52
D.	Tiempo y lugar de la investigación	52
E.	Recursos humanos.....	52
F.	Muestras	53
G.	Variables	54
H.	Viabilidad.....	56
I.	Metodología	56
1.	Crianza <i>An. albimanus</i>	56
2.	Sexado de pupas <i>An. albimanus</i>	58
3.	Diseción del tracto digestivo de <i>An. albimanus</i>	59
4.	Extracción de ADN genómico.....	60
5.	Envío de muestras.....	63
6.	Secuenciación y análisis filogenético.	65
VII.	RESULTADOS	67
A.	Optimización del método de extracción de ADN genómico de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas <i>An. albimanus</i>	67
B.	Análisis de rarefacción	68
C.	Composición de la microbiota bacteriana	69
D.	Análisis ecológicos.....	74
1.	Agrupación UPGMA.....	74

2. Diversidad alfa.....	76
3. Diversidad beta.....	76
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	78
A. Optimización del método de extracción de ADN genómico	78
B. Composición de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas <i>An. albimanus</i> de campo, resistentes a deltametrina y susceptibles a deltametrina	80
C. Diversidad microbiana en y entre la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas <i>An. albimanus</i> de campo, resistentes a deltametrina y susceptibles a deltametrina	84
IX. CONCLUSIONES	87
X. RECOMENDACIONES.....	89
XI. BIBLIOGRAFÍA	90
XII. ANEXOS	108
A. Procedimiento para elaboración de soluciones desinfectantes y buffer PBS 1X.....	108
1. Preparación solución de etanol al 75%.....	108
2. Preparación de solución hipoclorito de sodio al 5%	108
3. Preparación buffer PBS 1X.	108
B. Amplificación de los dominios hipervariables V3 - V4 del gen 16S ARNr y preparación de biblioteca de secuenciación	109
1. Metabarcoding y amplificación, por la PCR, de los dominios hipervariables V3 - V4 del gen 16S ARN ribosomal.....	110
2. Purificación, con perlas magnéticas, de los amplicones V3 - V4 del gen 16S ARN ribosomal	113
C. Cuantificación de la concentración de ADN genómico resultante del proceso de extracción, previo y posterior a un tratamiento de purificación con perlas magnéticas.....	114
D. Cuantificación de la concentración de amplicones, región hipervariable V3-V4 del gen 16S ARNr, resultantes del proceso de amplificación y metabarcoding.....	116
E. Control de calidad biblioteca de secuenciación.....	117
F. Metadatos gráfico abundancia relativa	122

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Variaciones del diseño experimental para el estudio de la microbiota bacteriana, que se reporta con más frecuencia en la literatura.	24
Cuadro 2. Paquetes empelados para el análisis y procesamiento de datos crudos generados por las plataformas de NGS.	40
Cuadro 3. Descripción de los principales scripts QIIME requeridos para llevar a cabo el análisis bioinformático.	41
Cuadro 4. Análisis estadísticos reportados con frecuencia en literatura con enfoque a estudio de microbiomas bacterianos.	50
Cuadro 5. Descripción de fecha y sitio de colecta de las muestras de campo utilizadas en el presente estudio.	54
Cuadro 6. Variables de estudio de principal interés en la investigación.	54
Cuadro 7. Información de envío de las muestras de ADN seleccionadas para ser trabajadas en el Laboratorio Nacional de Lawrence Berkeley.	64
Cuadro 8. Concentración e integridad del ADN genómico extraído, por dos ensayos diferentes, del tracto digestivo de hembras adultas <i>An. albimanus</i> – cepa susceptible (Sanarate).....	67
Cuadro 9. Antecedentes de los géneros bacterianos representativos que fueron identificados como parte de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas <i>An. albimanus</i> de campo, resistentes a deltametrina y susceptibles a deltametrina.	71
Cuadro 10. Medidores de diversidad alfa determinados para la microbiota bacteriana del tracto digestivo de los tres grupos de hembras adultas <i>An. albimanus</i> evaluados.	76
Cuadro 11. Gramos de sales que se requieren para realizar 1L de solución buffer PBS1X.	109
Cuadro 12. Receta para el montaje de la reacción en cadena de la polimerasa empleada para la amplificación de los dominios hipervariables V3 - V4.	112
Cuadro 13. Parámetros para el programa de la PCR, para la amplificación de los dominios hipervariables V3 - V4.	112
Cuadro 14. Concentración de ADN genómico, extraído del tracto digestivo de hembras adultas <i>An. albimanus</i> , previo y posterior a tratamiento de purificación con perlas magnéticas.	115
Cuadro 15. Concentración de amplicones, región hipervariable V3-V4 del gen 16S ARNr, resultantes del proceso de amplificación y metabarcoding.....	116
Cuadro 16. Abundancia relativa, en porcentaje, de los géneros bacterianos identificados como parte de la microbiota del tracto digestivo de ejemplares hembras adultas <i>An. albimanus</i> de campo, ejemplares susceptibles a deltametrina y ejemplares resistentes a deltametrina.....	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Países y regiones endémicas de malaria entre los años 2000 y 2016.	7
Figura 2. Mapa de la distribución de malaria en América Latina en el 2014 por índice de parasitemia anual (IPA).....	8
Figura 3. Malaria por índice de parasitemia anual (IPA) en Guatemala para el año 2014.	9
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp., agente causal de malaria.	10
Figura 5. Sitios de acción de insecticidas sintéticos utilizados para el control vectorial.....	14
Figura 6. Estructuras y clasificación de los piretroides.	15
Figura 7. Clases de insecticidas, a nivel mundial, en los cuales se ha reportado resistencia. Datos recolectados en el año 2011.	16
Figura 8. Número de géneros bacterianos reportados por especie anofelina.	23
Figura 9. Géneros bacterianos identificados, hasta el 2014, en la microbiota de <i>Anopheles</i> spp. por continente.	28
Figura 10. Estructura secundaria de la subunidad 16S del ARNr.	34
Figura 11. Esquema de los elementos que conlleva la preparación de bibliotecas de secuenciación por Illumina®.	36
Figura 12. Método de amplificación por puente.....	36
Figura 13. Método de secuenciación por síntesis.	37
Figura 14. Análisis de datos generados	38
Figura 15. Panorama general de los pasos para análisis de microbiomas bacterianos.	40
Figura 16. Curva de rarefacción.	45
Figura 17. Formatos gráficos para representar la abundancia relativa.	46
Figura 18. Ejemplificación del método de construcción del árbol filogenético basado en distancia evolutiva.....	48
Figura 19. Análisis de coordenadas principales.	49
Figura 20. Ejemplo del tipo de criadero, noria, donde se realizó la colecta de los ejemplares de campo.	53
Figura 21. Procedimiento crianza cepa resistente y cepa susceptible a deltametrina.	57
Figura 22. Procedimiento crianza muestra de campo.	58
Figura 23. Morfología de la bolsa genital de <i>An. punctipennis</i>	58
Figura 24. Procedimiento de sexado pupas.	59
Figura 25. Procedimiento para la disección del tracto digestivo (TD).	60
Figura 26. Proceso de lisis del tracto digestivo (TD).	61
Figura 27. Proceso para la precipitación del ADN genómico extraído de la microbiota bacteriana del tracto digestivo.	62
Figura 28. Proceso de lavado y resuspensión del ADN genómico extraído de la microbiota bacteriana del tracto digestivo.	63

Figura 29. Curva de rarefacción comparando el número de secuencias generadas contra el número de ZOTUs observados, por muestra, en la microbiota bacteriana del tracto digestivo de ejemplares <i>An. albimanus</i> hembras adultas de campo (WDT), ejemplares resistentes a deltametrina (RDT) y ejemplares susceptibles a deltametrina (SDT).	68
Figura 30. Abundancia relativa de los géneros bacterianos que constituyen la microbiota del tracto digestivo de una muestra de campo (WDT) y dos cepas de laboratorio: una susceptible (SDT) y una resistente a deltametrina (RDT), de hembras <i>An. albimanus</i> adultas.	70
Figura 31. Agrupación UPGMA en base a similitudes en y entre las comunidades bacterianas de la microbiota del tracto digestivo de hembras adultas <i>An. albimanus</i> de campo (WDT), resistente a deltametrina (RDT) y susceptible a deltametrina (SDT).	75
Figura 32. Gráfica PCoA UniFrac repesado comparando la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas <i>An. albimanus</i> de ejemplares de campo, ejemplares resistentes a deltametrina y ejemplares susceptibles a deltametrina.	77
Figura 33. Carta de invitación para pasantía en el Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley.	110
Figura 34. Secuencia de los cebadores 515FB y 806FB, listados en orientación 5' → 3'.	111
Figura 35. Parámetros para el programa de la PCR, para la amplificación de los dominios hipervariables V3 - V4.	113
Figura 36. Procedimiento purificación, con perlas magnéticas, de los amplicones resultantes de la amplificación de la región hipervariable V3 - V4 del gen 16S ARN ribosomal.	114
Figura 37. Gel de electroforesis, empleando sistema High Sensitivity D1000 ScreenTape®, de la biblioteca de secuenciación.	118
Figura 38. Electroferograma High Sensitivity D1000 ScreenTape®, para control de calidad de biblioteca de secuenciación.	120
Figura 39. Determinación del tamaño promedio, concentración y molaridad de la biblioteca de secuenciación, a través del análisis de la señal emitida por el pico comprendido entre los 178 y 837 pares de bases (pb).	121

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
IPA	Índice de parasitemia anual
LLINs	Mosquiteros con insecticidas alta duración
NGS	Secuenciación de última generación
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
OTU	Unidades taxonómicas operacionales
PBS	Buffer de fosfatos en solución salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RRI	Rociado residual intradomiciliar
RE	Rociado espacial
16S ARNr	Gen 16S ARN ribosomal

GLOSARIO

Amplificación	Generación de múltiples copias de un fragmento específico de ADN, gracias a la acción en cadena del ADN polimerasa.
Amplicones	Fragmento de ADN resultante de un proceso de amplificación por la acción en cadena del ADN polimerasa, ya sea bajo un proceso natural o controlado.
Cepa	Grupo de organismos que descienden de una colonia específica y que puede distinguirse de otros grupos, del mismo género o especie, por sus características fenotípicas y/o genotípicas.
Endémico	Que pertenece a un lugar en específico.
Taxón	Se refiere a la agrupación de organismos que pertenecen a la misma categoría taxonómica, comúnmente a nivel de género o especie.
Hipervariable	Cadena polipeptídica corta, que posee una secuencia nucleotídica altamente variable.
Parasitemia	Término que se acuña cuando en el torrente sanguíneo se detectan parásitos. En el caso de malaria, presencia de trofozoítos maduros de <i>Plasmodium</i> spp.
Pool	Termino que se refiere a un grupo de muestras, de tamaño definido, que han sido seleccionadas en un marco de muestreo y que resulta siendo la muestra final de donde se recopilan los datos de la investigación.
Relación Simbiótica	Interacción estrecha entre dos o más especies diferentes, en donde las partes participantes se benefician mutuamente.

Resistencia Cruzada	Tolerancia a un determinado agente toxico, que no es adquirida por la exposición directa a este, sino por la exposición a un agente químico relacionado.
Secuenciación	Método que se utiliza para establecer la secuencia específica de nucleótidos, en una determinada hebra de ADN.
Secuencias	Orden exacto de la combinación de una serie de nucleótidos en un gen determinado o segmento de este.
Vector	Organismo, comúnmente artrópodos, que son capaces de transmitir un agente infeccioso entre individuos de una misma o diferente especie.
Xenobióticos	Compuestos químicos a los cuales un determinado organismo se encuentra expuesto y son extrínsecos al metabolismo normal de este.

RESUMEN

La malaria es una enfermedad causada por el parásito del género *Plasmodium* spp, el cual es transmitido por la picadura de mosquitos del género *Anopheles* spp (vector). Se caracteriza por prevalecer en zonas tropicales y con bajos índices de desarrollo, como África y América Latina. Es causante de la muerte de, por lo menos, 1 millón de personas al año, representado una carga para la economía y sistema de salud global (WHO, 2016a). Debido a su incidencia, se han desarrollado múltiples estrategias para prevenir, controlar y eliminar la malaria. Los enfoques se han dirigido al control del mosquito, utilizando principalmente medidas químicas que consisten en el uso de insecticidas de diferentes familias, como por ejemplo piretroides (World Health Organization, 2015a). A pesar del impacto positivo que dicha medida significó para el combate contra la malaria, actualmente se reporta el surgimiento de resistencia contra, al menos, un insecticida en el 62% de los países endémicos de malaria (Hemingway y Ranson, 2000). Esto ha llevado al desarrollo de diversos estudios, donde recientemente se ha comprobado que la microbiota bacteriana del tracto digestivo se encuentra implicada en el desarrollo de resistencia a insecticidas (Nkya *et al.*, 2014; Dada *et al.*, 2018). No obstante, a pesar de este descubrimiento, no se conoce cómo los factores ambientales a los que se expone el vector influyen el moldeamiento de una microbiota bacteriana potencialmente detoxificante. Por ende, la presente investigación surge por la necesidad de entender cómo la microbiota del tracto digestivo de hembras adultas *Anopheles albimanus*, género poco estudiado, se ve influenciada a la exposición constante, variante y nula del insecticida deltametrina. Evaluando, a partir de los resultados, la posibilidad de que la microbiota bacteriana del tracto digestivo de *An. albimanus* posea un rol en el establecimiento de la resistencia.

El objetivo principal de la investigación fue identificar y analizar la diversidad de la microbiota bacteriana del tracto digestivo en y entre tres grupos de estudio: hembras adultas *An. albimanus* de campo, colectadas en las localidades El Terrero y Las Cruces, hembras adultas *An. albimanus* susceptibles a deltametrina y hembras adultas *An. albimanus* resistentes a deltametrina. Para esto se empleó una metodología que consistió en cinco pasos principales. El primer paso se basó en la crianza de los tres grupos de estudio, la cual se llevó a cabo bajo condiciones ambientales controladas en las instalaciones del insectario del Centro de Estudios en Salud. El segundo paso dio inicio en el momento en el que las larvas empuparon, en ese punto las pupas fueron sexadas, tomando las hembras de tres días de edad adulta para ser disectadas y así obtener el tracto digestivo. Se obtuvo alrededor de 15 a 20 tractos digestivos por grupo de estudio. Con el tejido biológico de partida disponible, se procedió al tercer paso, extracción de ADN genómico con DNAzol®, trabajando cada tejido por individual. El procedimiento de extracción fue optimizado en la fase de lisis y precipitación de ADN. El material genético resultante fue enviado al Laboratorio Nacional de Lawrence Berkeley (California, Estados Unidos). En el cuarto paso, se procedió a la amplificación y secuenciación de última generación de la región hipervariable V3 - V4

del gen 16S ARN ribosomal. Por último, quinto paso, las secuencias obtenidas fueron tratadas y analizadas empelando los paquetes bioinformáticos Clustal Omega, USEARCH y QIIME I. La composición de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus* fue representada a través de gráficos de abundancia relativa, mientras que el enfoque ecológico fue abordado empleando análisis de diversidad alfa y diversidad beta.

Los resultados obtenidos demostraron que la microbiota bacteriana presente en las cepas de laboratorio, cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina, presentan una estructura similar. Se comprobó, estadísticamente, que únicamente el género *Burkholderia* – *Paraburkholderia* presentó una diferencia significativa en cuanto a la abundancia relativa entre la cepa resistente y la cepa susceptible a deltametrina. Lo cual se atribuyó a la representatividad de dicho género en la cepa resistente. En cuanto a las muestras de campo, se observó una variación en la composición de la microbiota según el sitio de crianza. Las muestras recolectadas en El Terrero mostraron una microbiota dominada por *Elizabethkingia*; mientras que las muestras recolectadas en Las Cruces mostraron una microbiota con estructura similar a la observada en las cepas de laboratorio. En tanto, al realizar los análisis ecológicos, se mostró que la composición del microbioma bacteriano entre las muestras de campo y las cepas de laboratorio no mostro una variación significativa al evaluar la diversidad alfa. Sin embargo, al determinar la diversidad beta mediante el método UniFrac repesado, se identificó que el 45% de la variación significativa se debía al grado de recambio filogenético entre los géneros bacterianos presentes en la microbiota de las muestras de campo y los géneros bacterianos presentes en la microbiota de las cepas de laboratorio. Resultados que demuestran la influencia directa del sitio de crianza, el ecosistema de interacción dinámica entre raíces de plantas y microorganismos, en el moldeamiento del microbioma bacteriano del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*.

I. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad potencialmente mortal, sin embargo tratable, que predomina en las áreas con altos porcentajes de humedad y altas temperaturas, como las regiones subtropicales y tropicales (CDC - Centers for Disease Control, 2016). El agente causal de la malaria es el parásito del género *Plasmodium* spp., el cual es transmitido de persona a persona por la picadura de los mosquitos hembra del género *Anopheles* spp (vector) (Sokhna *et al.*, 2013). La incidencia es mayor en los países más pobres del mundo, debido a la falta de recursos para tratar los casos emergentes y establecer un sistema de vigilancia, siendo el continente africano y países de Latino América los más afectados (Unicef, 2000). La población más vulnerable a contraer dicha enfermedad son los niños menores de 5 años, mujeres embarazadas y personas inmunosuprimidas. No obstante, cualquier persona que se encuentre en un área endémica de malaria posee altas probabilidades de contraerla (Cibulskis *et al.*, 2016).

Los mecanismos de control que se han implementado en las últimas décadas se han enfocado en el control del vector. Múltiples estrategias han sido desarrolladas para poder lograr establecer una línea primaria de interrupción de la transmisión, siendo los principales métodos: control biológico, control ambiental y control químico. El método químico es el más implementado, debido a su inmediata efectividad y bajo costo, en estrategias como RRI (rociado residual intradomiciliario) e impregnación de mosquiteros con insecticidas alta duración (LLINs, por sus siglas en inglés) (World Health Organization, 2015a). Los insecticidas que generalmente son empelados son aquellos que poseen una acción insecticida prolongada y al mismo tiempo una toxicidad baja hacia humanos y animales, como lo es el caso de los insecticidas de la familia de los piretroides, principalmente deltametrina (Rozendaal, 1997; Ortiz-Pérez *et al.*, 2005).

A pesar de la eficacia del método químico, su uso excesivo ha llevado al surgimiento de resistencia de parte de los anofelinos, lo que ha generado que el control de vector en los últimos años sea un reto (Organización Panamericana de la Salud, 2017a). Los mecanismos responsables de la amplia distribución de la resistencia son principalmente de dos tipos: cambios en el sitio objetivo del insecticida y aumento en la producción de enzimas metabólicas capaces de degradar el insecticida (Hemingway y Ranson, 2000). Sin embargo, existen otros mecanismos como cambio de comportamiento y reducción de la absorción o penetración del insecticida, que han contribuido a la prevalencia de la resistencia (Awolola *et al.*, 2009). Dentro de los mecanismos de reducción de la absorción o penetración del insecticida se ha inferido que, modificaciones en la microbiota bacteriana, contribuyen a que la capacidad de absorción del insecticida sea reducida (Nkya *et al.*, 2014; Dada *et al.*, 2018).

La microbiota ha sido uno de los temas más estudiados, desde el descubrimiento de la interacción interdependiente que logran consolidar en el organismo en el cual se establecen. (Behar *et al.*, 2008; Cho y Blaser, 2012; Shreiner *et al.*, 2015). En consecuencia, se ha encontrado que cuando el hospedero se encuentra expuesto a factores de estrés, la microbiota contribuye a la selección o desarrollo de características que aseguran la adaptación y supervivencia del hospedero. Se ha demostrado, en plagas agrícolas, que dentro de la microbiota bacteriana existen microorganismos capaces de catabolizar el insecticida. Llevando a una reducción significativa en la permeabilidad de los compuestos químicos activos en el tracto digestivo y, en consecuencia, a que el hospedero sea menos susceptible a los efectos tóxicos y genere tolerancia (Kikuchi *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2017). Recientemente se encontró que en la microbiota bacteriana de una cepa de *An. albimanus* resistente a fenitrotión, *Klebsiella pneumoniae* era el microorganismo predominante. Especie que posee la capacidad de metabolizar organofosfatos (Dada *et al.*, 2018). Dichos hallazgos han dado la pauta para inferir que, cuando el hospedero se encuentra expuesto a concentraciones constantes y elevadas de insecticidas, los simbiontes juegan un papel en la mediación de la resistencia.

Actualmente se conoce poca información de cómo la microbiota de vectores de enfermedades, como anofelinos, varía y se adapta a diferentes condiciones ambientales. Lo cual es el primer paso para diseñar estudios que se enfoquen en determinar cómo la microbiota bacteriana del tracto digestivo de anofelinos posee un rol en la detoxificación de dosis letales de insecticidas. Por lo tanto, en esta investigación se buscó identificar y evaluar la diversidad de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de una muestra de campo y dos cepas de laboratorio, una susceptible y una resistente a deltametrina, de hembras *An. albimanus* adultas. A través de un enfoque molecular, basado en la amplificación, secuenciación de última generación y análisis bioinformático de la región hipervariable V3 - V4 del gen 16S ARNr ribosomal; gen que al estar presente en todas las bacterias y sufrir pocas variaciones a través del tiempo es considerado el cronómetro evolutivo ideal para describir, bajo un enfoque filogenético, la composición de la microbiota bacteriana a nivel de género (Janda y Abbott, 2007).

II. OBJETIVOS

A. General

Identificar y analizar la diversidad de la microbiota bacteriana del tracto digestivo en y entre muestras de campo y dos cepas de laboratorio, una susceptible y una resistente a deltametrina, de hembras adultas *An. albimanus*.

B. Específicos

1. Optimización del método de extracción empleado para el aislamiento de ADN genómico de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*.
2. Identificación de los taxones bacterianos que constituyen la microbiota del tracto digestivo de muestras de campo y dos cepas de laboratorio, una susceptible y una resistente a deltametrina, de hembras adultas *An. albimanus*.
3. Caracterizar la diversidad bacteriana en la microbiota del tracto digestivo de muestras de campo y dos cepas de laboratorio, una susceptible y una resistente a deltametrina, de hembras adultas *An. albimanus*.

III. JUSTIFICACIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la malaria es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, ya que se encuentra distribuida en 100 países y territorios alrededor del mundo, especialmente en regiones pobres del área tropical y subtropical. Se estima que al año provoca alrededor de más de un millón de muertes, donde el grupo más vulnerable son los niños menores de 5 años (WHO, 2016b; Organización Panamericana de la Salud, 2017b). El impacto que esta enfermedad genera no únicamente es en la pérdida de vidas, sino también en pérdidas económicas que se ven reflejadas en el sistema de salud pública y en una marcada reducción de la producción económica (Shane, 2002).

En Guatemala, según el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, a nivel regional únicamente Totonicapán y Sacatepéquez no se consideran endémicos de malaria. De los 20 departamentos restantes, (en orden ascendente) Alta Verapaz, Santa Rosa e Izabla presentaron las tasas de incidencia más altas del último reporte realizado entre el 2015 y 2017 (Vásquez, 2016; Padilla, 2018). Dentro de la población total, la población indígena es la más afectada, especialmente aquella comprendida por menores de 15 años. A pesar de que los casos han reducido un 75% del 2000 al 2017 (World Health Organization, 2015b; Organización Panamericana de la Salud, 2017b), la malaria sigue siendo una enfermedad recurrente dentro de la población guatemalteca más vulnerable, fomentando la pobreza y aumentando la carga en el sector de salud.

Debido al alto impacto que ha tenido la malaria, múltiples organizaciones han fomentado programas para reducir las tasas de transmisión, siendo una de las estrategias principales el control del vector: *Anopheles* spp. Las principales estrategias usadas alrededor del mundo y en Guatemala se han basado en el uso de insecticidas, en particular piretroides, los cuales han sido implementado mediante RRI he impregnación de LLINs (World Health Organization, 2015a; Organización Panamericana de la Salud, 2017a). Sin embargo, el uso desmedido de insecticidas en el campo de la salud y agricultura, ha llevado a que se reporte resistencia a dichos químicos en las principales especies de vectores (WHO global malaria program, 2012), como *An. albimanus*: vector de malaria en Guatemala (Lol *et al.*, 2013).

En respuesta al incremento de resistencia entre los vectores de malaria, se han fomentado una serie de acciones que se basan en el manejo integrado de vectores, donde se busca interrumpir o disminuir la transmisión de malaria a través de intervenciones que sean ambientalmente, ecológicamente, socialmente, políticamente y económicamente viables; donde la comprensión de los factores que afectan el desarrollo, comportamiento y distribución del vector juegan un rol principal para fomentar las bases

de un programa efectivo para el control del vector (Beier *et al.*, 2008; Juárez, 2013; World Health Organization, 2015c).

Dentro de estos factores se encuentra la microbiota bacteriana del tracto digestivo, ya que se ha comprobado que esta influye en el desarrollo, comportamiento, nutrición, reproducción, adaptación y sistema inmune del mosquito (Pumpuni *et al.*, 1996; Kikuchi *et al.*, 2012; Osei-Poku *et al.*, 2012; Ricci *et al.*, 2012; Coon *et al.*, 2014; Dada *et al.*, 2018). Por tal razón, estudios donde la microbiota bacteriana del tracto digestivo de anofelinos sea evaluada en diferentes situaciones, ayudaría a describir ampliamente la composición de la microbiota de anofelinos. En el caso específico de este estudio, cuando *An. albimanus* se encuentra expuesto a entornos donde el insecticida está ausente, como lo es el caso de la cepa susceptible; presente de forma variable, como el caso de la muestra de campo; o de forma constante, como en la cepa resistente. Siendo posible, a partir de los resultados obtenidos, generar futuras investigaciones que permitan conjeturar hasta qué grado la microbiota de *An. albimanus* afecta los programas de control del vector y como pueden ser integrada para desarrollar estrategias que asistan la fase de pre-eliminación en la que Guatemala se encuentra (Kambris *et al.*, 2010; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011; Ricci *et al.*, 2012).

IV. MARCO TEÓRICO

A. Malaria

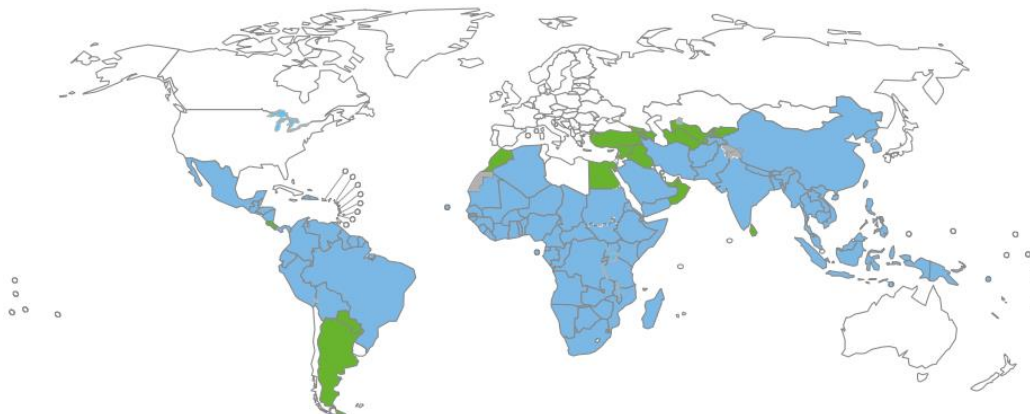
1. Generalidades. La malaria fue reportada por primera vez hace 4,000 años. Los primeros síntomas fueron descritos en escrituras médicas Nei Chin de la China antigua. Pero no fue sino hasta que la malaria arribó a Roma, que se reportaron los síntomas y se describió que la posible causa de su aparición en la población rural se debía a un insecto, sin dar mayor especificación (CDC - Centers for Disease Control, 2016).

Se cree que la malaria apareció en América debido a los exploradores y conquistadores colonos que eran portadores de *Plasmodium malariae* y *P. vivax*. En el caso de *P. falciparum*, se fundamenta que este fue importado al nuevo mundo por esclavos africanos inmunes al parásito, que luego sus descendientes colonos vulnerables lo importaron hacia América (Sherman, 1998). Para 1750, la malaria provocada por *P. vivax* y *P. falciparum* era común desde los trópicos de América Latina hasta el valle de Mississipi e Inglaterra (Arrow *et al.*, 2004). Actualmente la malaria es una epidemia global, donde las condiciones de deforestación, cambios climáticos y pobreza ayudan a que su dispersión sea más fácil y por lo tanto difícil de controlar (Laveran, 2000).

a. Prevalencia. En el 2000 se reportaron 106 países y territorios con transmisión activa de malaria. A finales del 2016 dicho número descendió a 91. La causa de este gran cambio se debió a las múltiples acciones que se realizaron para controlar su transmisión desde los años 2000 (WHO, 2016a). A pesar de este notable progreso, la malaria sigue teniendo un impacto en regiones como América Latina, África, Oriente Próximo, Asia del Sur y Sur-Este Asiático (Figura 1) (WHO, 2016a), donde la pobreza y el sistema de salud ineficiente son los principales factores que provocan que las acciones de control y prevención que se aplican sean poco eficientes (Unicef, 2000).

Figura 1. Países y regiones endémicas de malaria entre los años 2000 y 2016.

Las regiones y países en azul se consideran endémicos de malaria; las regiones y países en verde han sido considerados no endémicos desde el 2016; las regiones y países en gris no aplican para el análisis; y las regiones y países sin marcar se consideran no endémicos desde el 2000.

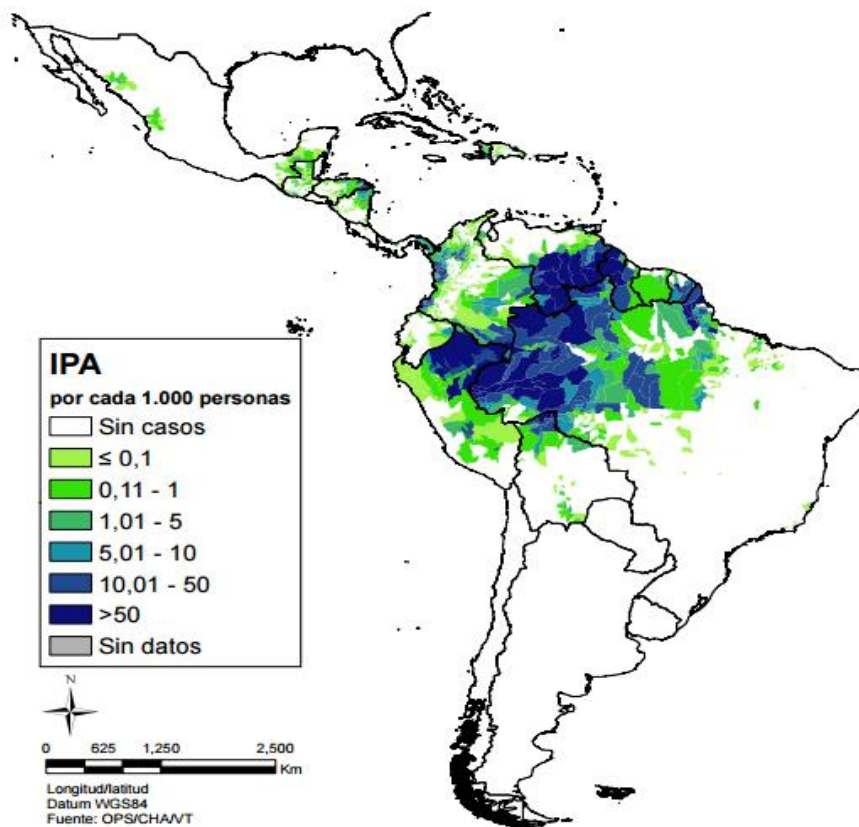


(WHO, 2016a)

Cada año 500 millones de personas contraen malaria y alrededor de 3 millones mueren a causa de esta, en su mayoría niños menores de 5 años (Kokwaro, 2009). A nivel mundial, se calcularon 212 millones de casos de malaria en el 2015, siendo la mayor parte de las infecciones causadas por *P. falciparum*, responsable del 99% de las muertes; y *P. vivax*, responsable del 86% de las muertes fuera de África (WHO, 2016b). Entre el 2010 y 2015 se estimó que la tasa de mortalidad disminuyó un 40% en 39 de los 91 países con transmisión de malaria activa. Sin embargo, se estima que alrededor del 40% de la población mundial está propensa a contraer malaria, debido a que millones de personas aún no tienen acceso a los servicios necesarios para prevenir y tratar dicha epidemia (WHO, 2016a).

En el caso específico de América Latina, la malaria es endémica en 21 países con un estimado de 427,000 casos por año, donde 69% de los casos de la región son causados por *P. vivax* y el 24% por *P. falciparum*. En el 2014 se reportaron 389,390 casos de malaria, de los cuales 87 resultaron en muertes, siendo Brasil (36.8%), Venezuela (23.3%) y Perú (16.6%) los países que representan el 76.7% de los casos de malaria en la región en el 2014, Figura 2. A pesar de que los casos reportados no son tan elevados, posiblemente por la recopilación de datos deficiente, actualmente en América Latina existen 108 millones de personas que corren riesgo de contraer malaria, siendo los países en vías de desarrollo y con mayores índices de pobreza los más vulnerables (Cruz *et al.*, 2013).

Figura 2. Mapa de la distribución de malaria en América Latina en el 2014 por índice de parasitemia anual (IPA).

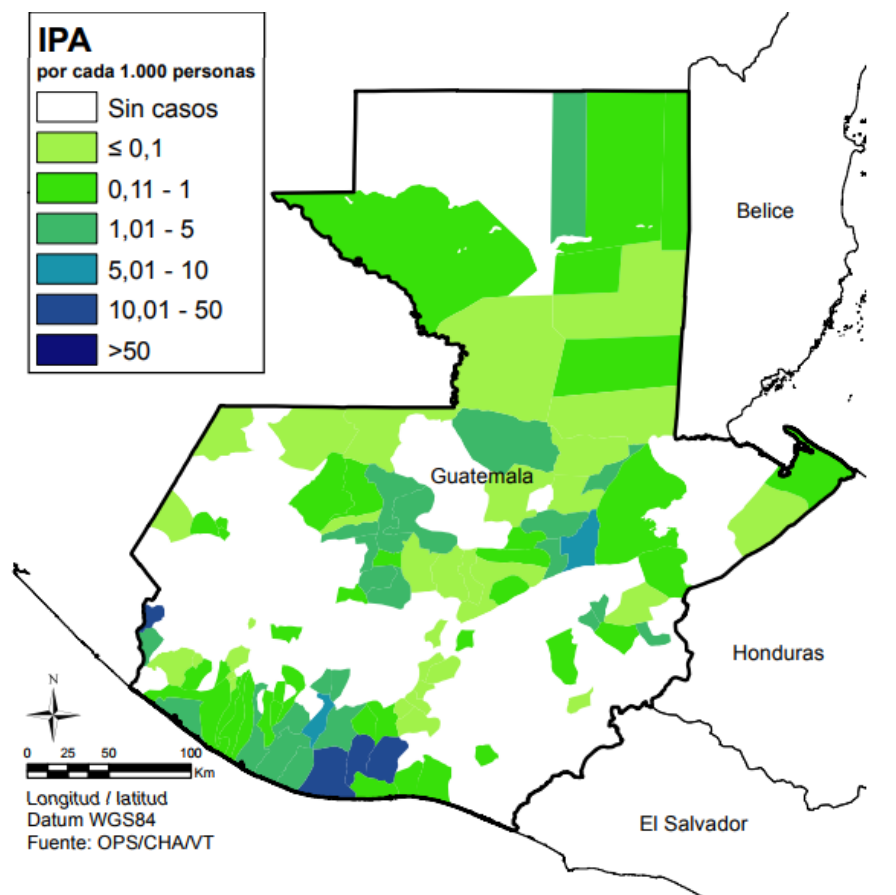


(Organización Panamericana de la Salud, 2014)

Guatemala es un ejemplo de estos países, donde los casos de malaria poseen mayor incidencia en la costa del pacífico (Organización Panamericana de la Salud, 2014). Siendo la causa principal de la transmisión en dicha región, los hábitats idóneos que brindan las fincas agropecuarias y plantaciones de caña de azúcar para la formación de criaderos. Componente que, junto con las condiciones precarias en las que viven los trabajadores, forman un ambiente ideal para que la transmisión de malaria sea activa (Organización Panamericana de la Salud, 2017a).

A pesar de que la incidencia es mayor en la costa del pacífico, la malaria se considera endémica en 20 de los 22 departamentos. Siendo las especies *P. falciparum* y *P. vivax* los responsables de que los índices de parasitismo anual se mantengan desde la reducción del 20.7% notificada en el 2014, Figura 3 (Vásquez, 2016; Organización Panamericana de la Salud, 2017a). Se cree que uno de los factores que contribuye a las estadísticas mencionadas, es la migración constante de trabajadores agrícolas a las áreas endémicas en época de cosecha. Siendo las personas infectadas que regresan a sus regiones de origen, los que importan la malaria a áreas con bajo parasitismo. Hecho que, junto con la ineficacia en los sistemas de vigilancia, provocan que Guatemala aún se categorice como país endémico en la mayor parte de sus departamentos (Organización Panamericana de la Salud, 2017a).

Figura 3. Malaria por índice de parasitemia anual (IPA) en Guatemala para el año 2014.



(Organización Panamericana de la Salud, 2014)

2. **Transmisión.** La malaria es causada por un parásito protozoario del género *Plasmodium* spp., el cual es transmitido de persona a persona a través de la picadura de los mosquitos hembras del género *Anopheles* spp. (Sokhna *et al.*, 2013). Las principales especies de parásitos son *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. viva*; donde *P. falciparum* es la especie más prevalente y responsable de la mayor parte de muertes a nivel global (Arrow *et al.*, 2004).

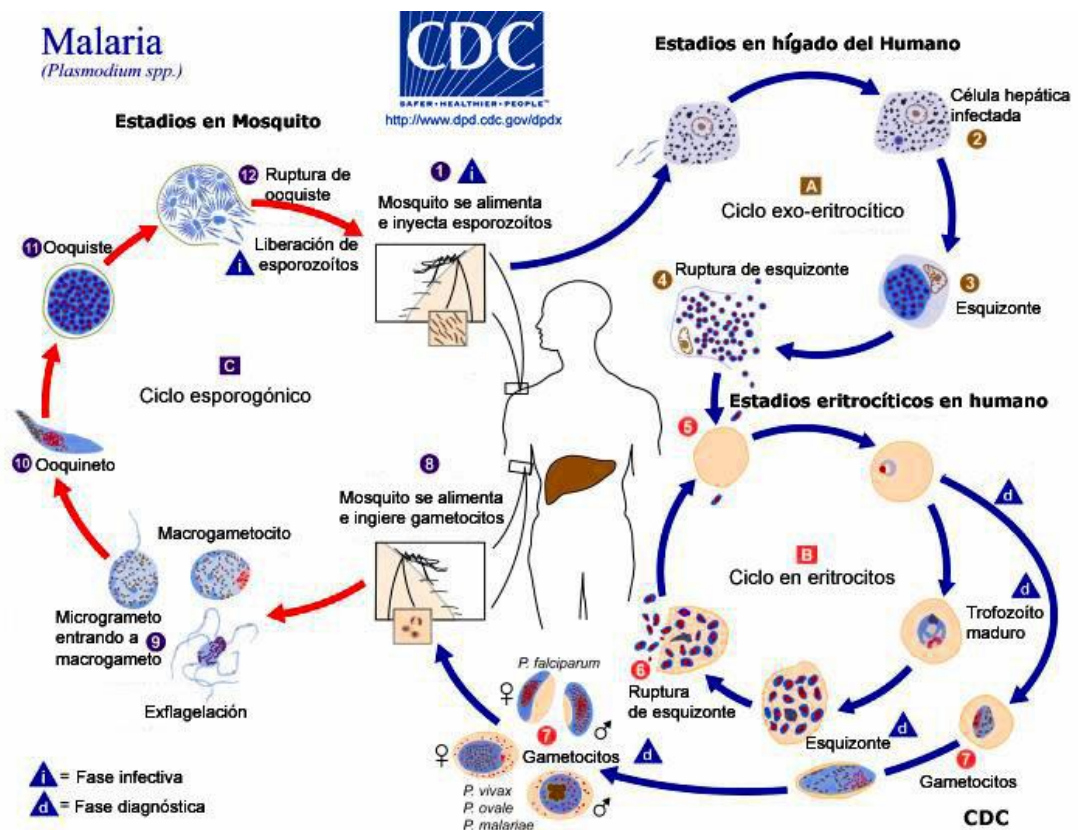
La mayor tasa de transmisión sucede en regiones donde los patrones de lluvia son constantes y la temperatura y porcentaje de humedad son altos. Ya que brindan el clima ideal para que el ciclo de vida del vector se complete y, por ende, el parásito pueda completar su desarrollo. Igualmente el comportamiento de picadura con tendencia predominante hacia humanos, es otro factor que junto con el clima, contribuyen a aumentar las tasas de transmisión (WHO, 2016b).

El ciclo de vida del parásito es complejo, pues involucra dos tipos de hospederos: humanos y mosquitos hembras del género *Anopheles* spp., Figura 4. Cuando un mosquito anofelino hembra infectada pica al hospedero humano en busca de sangre para alimentar a los huevos, inyecta los esporozoítos, iniciando el ciclo exo-eritrocítico. En el momento que los esporozoítos ingresan al torrente sanguíneo, se dirigen a las células del hígado, donde maduran a la etapa de trofozoítos y posteriormente

a la etapa de esquizonte, el cual se rompe liberando merozoitos. Luego de esta etapa inicial de replicación, los merozoitos inician una multiplicación asexual en los eritrocitos, dando inicio al ciclo eritrocítico, etapa responsable de la manifestación clínica de la enfermedad: fiebres recurrentes (CDC - Centers for Disease Control, 2016).

Los gametocitos macho (microgametocitos) y hembra (macrogametocitos) que, viajan en el torrente sanguíneo de la persona infectada, son ingeridos por el mosquito hembra anofelino durante la picadura. Una vez en el mosquito, en el intestino se inicia el ciclo esporogónico, donde los gametocitos se unen para crear cigotos. Los cigotos se vuelven motiles y alargados, siendo esta etapa conocida como ookinetes. Estos últimos invaden la pared del intestino del mosquito en donde se desarrollan a oocitos. Los oocitos crecen se rompen y liberan esporozoitos, los cuales viajan hasta las glándulas salivales del vector. La inoculación de los esporozoitos al humano, mediante la picadura del anofelino hembra infectado, perpetua el ciclo de vida del parásito (CDC - Centers for Disease Control, 2016).

Figura 4. Ciclo de vida de *Plasmodium spp.*, agente causal de malaria.



(CDC - Centers for Disease Control, 2016)

3. **Prevención.** Debido a la constante incidencia de malaria, muchas entidades (como OMS) han lanzado programas para reducir los casos de malaria en los lugares endémicos (Kokwaro, 2009). Muchos de los programas que se han implementado han sido con el fin de informar a la población, desarrollar métodos de diagnóstico temprano, fortalecer el sistema de salud e impulsar inversiones en proyectos de control de la malaria, en especial en el control del vector (World Health Organization, 2015).

La protección contra las picaduras de los mosquitos representa la primera línea de defensa contra la malaria (Coosemans y Carnevale, 1995). Por ese motivo el control del vector, mosquito hembra *Anopheles* spp., ha sido uno de los programas de prevención que han tenido mayor éxito en la erradicación y disminución de malaria en varias partes del mundo. En Guatemala los programas de control del vector se han implementado desde el 2011, con enfoque en los departamentos de Alta Verapaz, Escuintla, Petén y Zacapa (Lol *et al.*, 2017). No obstante, el control de vector en los últimos años ha sido un reto, a causa del surgimiento de mecanismos de resistencia contra insecticidas, en especial por su aplicación intensiva en el área de la agricultura (Juárez, 2013; Organización Panamericana de la Salud, 2017a).

B. Métodos de control vectorial

Múltiples estrategias han sido desarrolladas para lograr implementar la línea primaria de interrupción de la transmisión, siendo los principales esfuerzos orientados al desarrollo de técnicas de control biológico, control ambiental y control químico. Abarcando el estadio adulto e inmaduro del mosquito (Rozendaal, 1997).

1. **Control biológico.** El uso de organismos vivos y sus productos metabólicos (Ej. toxinas) como método de control vectorial, es conocido como control biológico. El objetivo principal de esta estrategia es reducir la densidad de anofelinos, sin alterar el ecosistema, evitando el desarrollo del estadio larval. Mediante el uso de organismos y microorganismos como bacterias, protozoarios, plantas, hongos y depredadores (Kamareddine, 2012). Esta estrategia permite adaptarse a la diversidad biológica y al comportamiento de aquellos anofelinos capaces de transmitir malaria. Lo que la hace una técnica flexible y no limitada a una única especie (Rozendaal, 1997).

Las ventajas del control biológico son: la baja toxicidad en los humanos y el ecosistema, el bajo riesgo de desarrollar resistencia y el bajo costo de la aplicación y producción de los organismos mediadores (Abdul-Ghani *et al.*, 2012). Sin embargo, esta estrategia de control no siempre puede ser normalizada y monitoreada para comprobar su efectividad. Debido a que diversas variables como el nivel de depredación de las larvas y la eficacia de liberación y acción directa de las toxinas; interfieren en la interacción entre el agente de control y la larva (Blanford *et al.*, 2005). En consecuencia, los métodos de control biológico normalmente son viables cuando son combinados con métodos de gestión ambiental (Raghavendra *et al.*, 2011).

2. **Gestión ambiental.** El medio ambiente juega un rol importante en el manejo y control de la transmisión de malaria, ya que está estrechamente ligado con el desarrollo del vector. Distintos factores ambientales como el clima, topografía y manejo de las tierras por parte de los humanos influyen directamente en la abundancia del vector (Keiser *et al.*, 2005). La gestión ambiental es una técnica económica que estudia e interviene en los ecosistemas donde el vector se desarrolla. Modificando ambientes acuáticos estancados o de poco movimiento, criaderos, que son puntos clave en el ciclo de vida de los anofelinos (Randell *et al.*, 2010).

La implementación de un sistema adecuado de control ambiental reduce efectivamente los criaderos de mosquitos, sin afectar el medio ambiente, lo que disminuye la propagación del vector y como consecuencia el contacto con el humano (Vais *et al.*, 2001). No obstante, para que genere resultados requiere de la total integración y participación de la comunidad donde se implementa (Lindsay *et al.*, 2004). De modo que, debe ser ejecutada como parte de un conjunto de acciones integradas para el control del vector. Donde se combine con otras estrategias, como control químico, para reducir IPA en la región objetivo (Randell *et al.*, 2010).

3. **Control químico.** La aplicación de agentes químicos ha sido la principal herramienta para el control vectorial, desde el descubrimiento del Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT) (Raghavendra *et al.*, 2011). Durante muchos años el DDT fue utilizado como el primer agente químico activo para controlar la población de anofelinos. Sin embargo, debido a su toxicidad al ecosistema y humanos, se buscaron otras alternativas que tuvieran el mismo impacto. Como producto, surgió la aparición de la familia de los piretroides y los organofosforados (Rozendaal, 1997).

Los piretroides y organofosforados han sido utilizados para controlar la transmisión de malaria en lugares endémicos, ya que son altamente efectivos. Las estrategias más empleadas han sido RRI, rociado espacial (RE) e impregnación de LLINs (World Health Organization, 2015a). Los fundamentos del RRI se apoyan en la aplicación de diversas fórmulas de insecticidas a superficies interiores. Con el fin de que, cuando el mosquito se repose dentro de la vivienda, absorba el insecticida y muera. Dicha técnica ha sido responsable de la marcada reducción en la incidencia de malaria, incluyendo su eliminación en muchos países (Mabaso *et al.*, 2004).

A pesar de que el RRI es una de las estrategias con mayor efectividad, esta implica de inversión económica para que sea sostenible y viable. Puesto que requiere la adquisición de equipo y personal capacitado para implementarla. Por lo que en muchas áreas endémicas, la introducción de esta medida de prevención fue tardía (Sadasivaiah *et al.*, 2007). La técnica RE fue una alternativa de emergencia, que logró detener epidemias y reducir rápidamente las poblaciones de mosquitos adultos. Durante el período donde el RRI empezaba su proceso de implementación. Esta técnica se basa en, mediante el calentamiento de insecticidas líquidos (Ej. piretroides sintéticos), formar una niebla de gotas finas que permite controlar la población de mosquitos adultos sin dejar residuos (World Health Organization - WHO, 2003). No obstante, esta únicamente es efectiva cuando se aplica en las horas de mayor actividad,

ya que a horas de baja actividad los mosquitos se encuentran en áreas donde el insecticida pulverizado no llega (Raghavendra *et al.*, 2011).

La principal función del control químico es generar una barrera que proteja a los humanos de los mosquitos. Por lo que el uso de LLINs (Ej. Olyset®), fue un método desarrollado como complemento del método de RRI y en respuesta al bajo impacto de la técnica de RE (World Health Organization, 2015a). La utilización de LLINs permite formar una barrera física entre el humano y los mosquitos infectados. Disminuyendo las picaduras por mosquitos anofelinos hematófagos y eliminando al vector con el efecto residual del insecticida (Apinjoh *et al.*, 2015). Características que hacen que los mosquiteros impregnados sean una técnica factible para el control del vector en poblaciones endémicas de malaria de bajos recursos (Welch y Fuster, 2012).

En Guatemala el primer método de control químico fue RRI. Sin embargo, por información adquirida de forma oral de Norma Padilla – PhD, desde sus inicios este método no ha sido constante, realizándose esporádicamente sin abarcar todas las áreas afectadas. Siendo la última aplicación conocida a mediados del 2017 (Padilla, 2018). A pesar de esta inconsistencia, desde el 2011 se ha implementado de manera sistemática el uso de LLINs, principalmente en los departamentos de Petén, Alta Verapaz, Izabal, Zacapa y Escuintla. En consecuencia, la resistencia por parte de los vectores que se reporta en Guatemala se ha acreditado al uso de LLINs e insecticidas utilizados en el campo de la agricultura, específicamente de banano y azúcar (Lol *et al.*, 2017).

En general de la técnica utilizada, la efectividad del método de control químico implementado se basa en la composición química, dosis y concentración del insecticida. Donde la integración y educación de la población objetivo, influencia directamente en la duración y éxito del método aplicado (Rozendaal, 1997).

C. Insecticidas

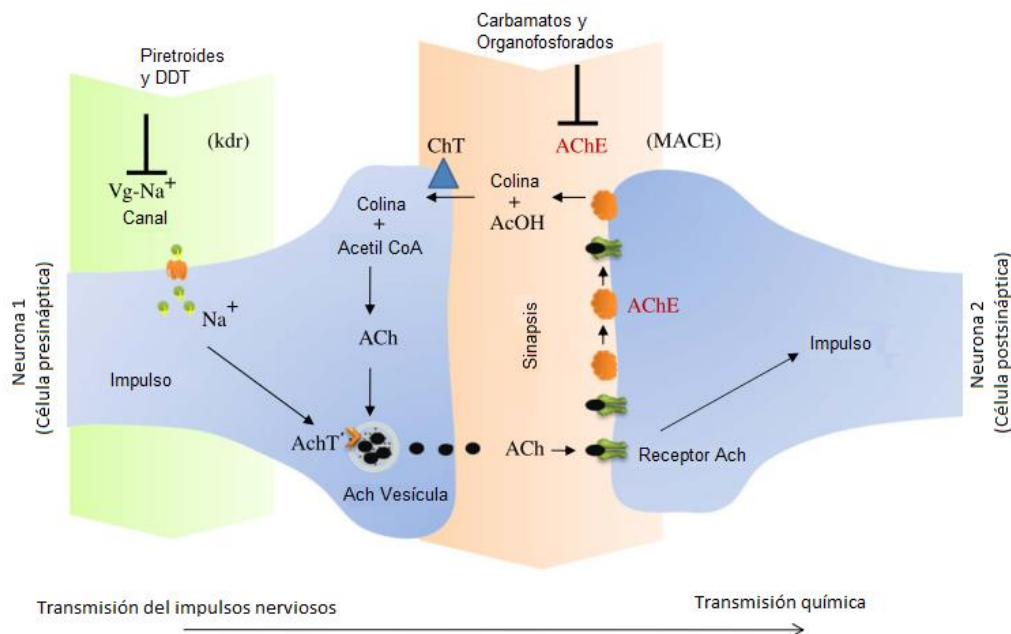
1. Insecticidas utilizados para el control de la malaria. A partir del descubrimiento de la capacidad de los compuestos químicos para el control del vector, múltiples clases de insecticidas han sido desarrollados, entre los cuales están organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. Los principales mecanismos de acción de este grupo de insecticidas se dividen en la inhibición de la acetilcolinesterasa (carbamatos y organofosforados) y la disrupción del canal de sodio (piretroides y organoclorados), Figura 5. Siendo por lo tanto, el sistema nervioso del mosquito el principal sitio de acción (Turner *et al.*, 2016).

El grado de eficacia de estos agentes químicos depende de la concentración y duración de la capacidad del insecticida de permanecer activo y eliminar al vector. Dichas características son determinantes para asegurar que los compuestos activos de los insecticidas, al entrar en contacto con los

mosquitos, tengan mayor probabilidad de alcanzar su molécula objetivo y llevar a cabo su acción insecticida (World Health Organization, 2011).

Figura 5. Sitios de acción de insecticidas sintéticos utilizados para el control vectorial.

Los piretroides y DDT exhiben su efecto tóxico al bloquear los canales de sodio, lo cual produce una respuesta neutralizadora inmediata. Por otro lado, los carbamatos y organofosforados inhiben la acetilcolinesterasa (AChE), bloqueando como resultado los impulsos nerviosos. ACh, acetilcolina; AChT, transportador; AcOH, ácido acético; ChT, transportador de colina; Canal Vg-Na⁺, canal de sodio con voltaje; y *kdr*, “knock-down resistance”.



(David *et al.*, 2013)

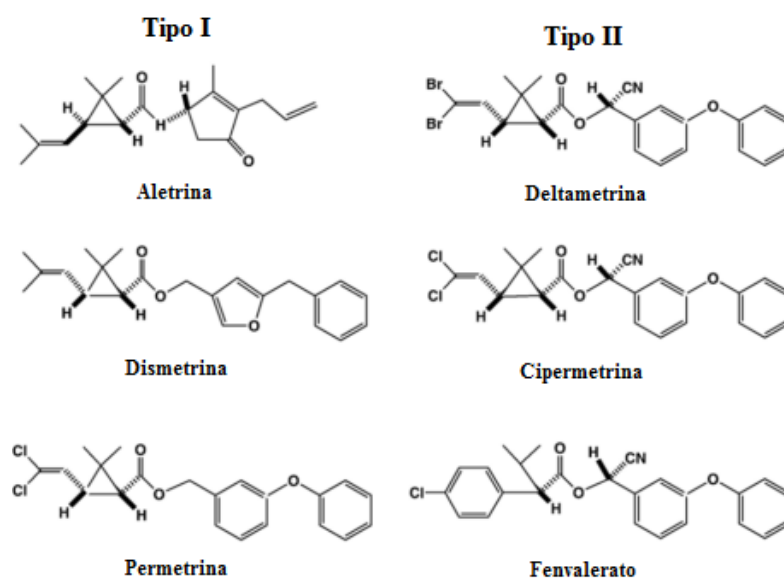
Diversas presentaciones de los diferentes grupos de compuestos químicos utilizados para la fabricación de insecticidas han sido elaboradas, permitiendo que estos sean aplicados como pulverizadores para RRI y como agentes activo de LLINs (Rozendaal, 1997). La amplia variedad con la que han sido utilizados e implementados para el control del vector ha ayudado a disminuir las tasas de transmisión de malaria, siendo los organoclorados y piretroides los más ampliamente utilizados. Desafortunadamente su intenso uso ha causado repercusiones en el medio ambiente e incitado el desarrollo de resistencia a insecticidas (World Health Organization, 2013).

2. **Piretroides.** Los insecticidas piretroides son los más utilizados para el control de la malaria, no solo por su bajo costo y toxicidad a mamíferos, sino también por su duración en la eficacia residual. Estos insecticidas han sido ampliamente utilizados en la agricultura y como pesticidas domésticos. Actualmente son aplicados en LLINs y forman la base de la mayor parte de programas de RRI (World Health Organization, 2013).

Los piretroides son insecticidas sintéticos estables en presencia de rayos UV, cuya estructura química es una adaptación de la estructura de las piretrinas de origen botánico (Elliott, 1989). Su mecanismo de acción va dirigido al sistema nervioso de los insectos, causando una parálisis nerviosa que lleva a la muerte del organismo. Esta acción se logra debido a la capacidad de los piretroides de unirse con alta selectividad a los canales de sodio. Lo que genera que el canal se mantenga abierto por mayor tiempo, causando un aumento en el impulso nervioso (Bass *et al.*, 2007).

Los piretroides pueden ser clasificados como: piretroides de tipo I y piretroides de tipo II. Aquellos que carecen del grupo ciano, grupo funcional que consta de un triple enlace entre carbono y nitrógeno, son clasificados como tipo I. Mientras que los que poseen grupo ciano en la posición α -bencílico son clasificados como tipo II, Figura 6 (Vais *et al.*, 2001). Los piretroides tipo II suelen tener un efecto neurotóxico más prolongado y fuerte que los piretroides de tipo I. Debido a que los piretroides tipo II alargan por mayor tiempo la corriente de despolarización durante el potencial de acción. Permitiendo que el efecto de inactivación sea 50% mayor que los piretroides tipo I (David *et al.*, 2013).

Figura 6. Estructuras y clasificación de los piretroides.



(Choi y Soderlund, 2006)

3. **Deltametrina.** La deltametrina es uno de los insecticidas más recomendados por la OMS para el control de la transmisión de malaria. Puesto que es capaz de matar al insecto por contacto o digestión, sin ser tóxico para los humanos y animales acuáticos. Esto hace que este insecticida sintético, perteneciente al grupo de piretroides tipo II, sea uno de los más utilizados para el control del vector y como insecticida de elección en la agricultura (Ortiz-Pérez *et al.*, 2005).

Al pertenecer al grupo de los piretroides, su modo de acción va dirigido al sistema nervioso de los insectos, específicamente a los canales de sodio. Dicho modo de acción es ideal para controlar la población de vectores y poder formar una barrera que reduzca los episodios de malaria en las regiones

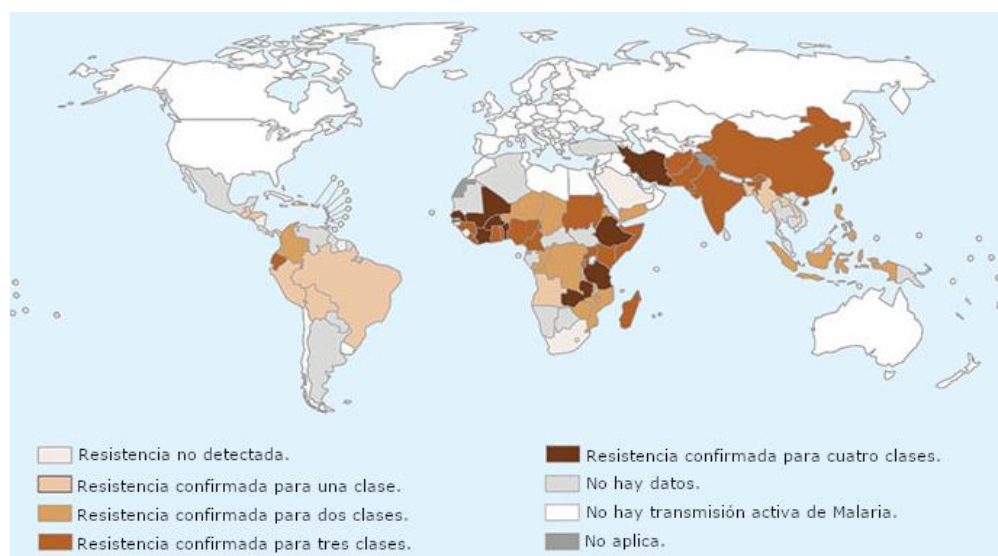
endémicas (Vais *et al.*, 2001). Por tales razones, la deltametrina ha sido excesivamente utilizada en los programas de control y agricultura. Lo que ha conducido al desarrollo de resistencia en las principales especies de anofelinos: *An. gambiae*, *An. albimanus*, *An. coluzzi*, *An. funestus* y *An. arabiensis* (World Health Organization, 2016).

D. Mecanismos de resistencia a insecticidas en anofelinos

La resistencia se define como la capacidad de un insecto de tolerar los efectos causados por los químicos activos de los insecticidas mediante mutaciones generadas a través de la selección natural (Karunamoorthi y Sabesan, 2013). La resistencia es una característica hereditaria que se basa en la genética tradicional, que resulta de la selección de una o varias modificaciones genéticas que ocurren cuando el mosquito es expuesto al insecticida (Corbel y N'guessan, 2013). El uso excesivo de insecticidas, ha contribuido significativamente a la selección y prevalencia de la resistencia (WHO, 2016a).

Desde el 2010, reportes de la OMS han evidenciado el surgimiento de resistencia contra, al menos, un insecticida en el 62% de los países endémicos de malaria, Figura 7. Por lo que actualmente, ya existen mecanismos de resistencia para los cuatro tipos de insecticidas más empleados para el control del vector. Siendo los mecanismos responsables de la amplia distribución de la resistencia: cambios en el sitio objetivo del insecticida y metabólicos (Hemingway y Ranson, 2000). Sin embargo, existen otros mecanismos como cambio de comportamiento y reducción de la absorción o penetración del insecticida, que han contribuido a que la resistencia se vuelva difícil de controlar (Awolola *et al.*, 2009).

Figura 7. Clases de insecticidas, a nivel mundial, en las cuales se ha reportado resistencia. Datos recolectados en el año 2011.



(World Health Organization - WHO, 2011)

Estos mecanismos de resistencia han emergido a causa de factores: biológicos, operacionales y genéticos (Ugurlu, 2012). Los factores biológicos se refieren a las condiciones bióticas y de comportamiento que los mosquitos manifiestan. Es decir, la cantidad de descendencia generada, migración, mecanismos de supervivencia, distribución y comportamiento reproductivo (Ej. polígama) (Martins *et al.*, 2012). Cuando una población de mosquitos que no había sido expuesta a insecticidas es tratada con dichos químicos, los factores biológicos propios de la población cambian (Crowder *et al.*, 2008).

El grado en el que este cambio sucede depende de la naturaleza del insecticida, concentraciones empleadas, modo de aplicación y frecuencia con la que se aplica. En otras palabras, de los factores operacionales (Crowder *et al.*, 2008). Cualquier cambio en el comportamiento biológico, trae consigo consecuencias a nivel genético. Puesto que la expresión, frecuencia, número y dominancia de alelos se ven afectadas por los cambios biológicos efectuados en respuesta a la presión de selección generada por los químicos. Dando lugar a que genes de resistencia evolucionen, se transcriban y expresen (Georghiou y Taylor, 1977).

1. **Metabólicos.** La resistencia metabólica es el mecanismo más complejo, debido a que es altamente dinámico y común en los insectos. Esta se basa en la síntesis de enzimas que son capaces de ayudar a que el insecto se desintoxique antes que el insecticida pueda actuar (Nkya *et al.*, 2013). Estas enzimas normalmente son sobre expresadas o sufren de la sustitución de aminoácidos que potencia la afinidad de la enzima por el insecticida (Nardini *et al.*, 2013). En el caso específico de los anofelinos, se ha comprobado que hay tres sistemas enzimáticos que son responsables de metabolizar insecticidas: monooxigenasas (Ej. citocromos P450), glutatión-S-transferasas y esterasas (Corbel y N'Guessan, 2013).

Los Citocromos P450 son una familia de enzimas que induce grupos reactivos o polares en compuestos xenobióticos o endógenos (Zanger y Schwab, 2013). Niveles elevados de transcripción de los genes pertenecientes a las familias CYP4, CYP6 y CYP9 se han visto en varias especies de anofelinos resistentes a insecticidas (Feyereisen, 2006). Concretamente, se ha encontrado que los genes CYP6M2 y CYP6P3 son sobre expresados rápidamente en aquellas poblaciones de anofelinos resistentes a piretroides. Puesto que codifican enzimas capaces de metabolizar piretroides tipo I y tipo II (Djouaka *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2008). Igualmente se ha encontrado que este mecanismo en *An. gambiae*, posee efectos sobre los organoclorados, en específico el gen CYP6M2. Lo que evidencia el primer caso de resistencia metabólica cruzada en los vectores de malaria (Mitchell *et al.*, 2012).

Las glutatión-S-transferasas son enzimas solubles multifuncionales que están involucradas en diversos mecanismos de desintoxicación de muchos compuestos endógenos y xenobióticos (Sheehan *et al.*, 2001). Se han reportado altas actividades enzimáticas de glutatión-S-transferasas, en las cuatro clases de insecticidas utilizados para el control vectorial. Donde la respuesta es causada como resultado de la amplificación de genes o por aumentos en la tasa de transcripción (Corbel y N'Guessan, 2013).

En anofelinos se ha encontrado que las enzimas glutatión-S-transferasas son responsables de la desintoxicación de organoclorados (Ej. DDT). Al secuestrar al insecticida (reduciendo concentración *in vivo*) o al inducir una respuesta de estrés oxidativo. Lo que aumenta la cantidad de antioxidantes y la actividad de glutatión-S-transferasas (Vontas *et al.*, 2001). En el caso de los piretroides, investigaciones realizadas por Riveron y colaboradores demostraron que un cambio del aminoácido leucina en la posición 119 por fenilalanina (L119F), en el sitio del gen glutatión-S-transferasa épsilon 2 (*GSTe2*), confiere resistencia a permetrina en *An. funestus*. Lo que evidencian un caso de resistencia cruzada a piretroides (Riveron *et al.*, 2014).

Por último, en el grupo de las esterasas se encuentran las carboxil/colinesterasas. Las cuales son enzimas que secuestran o hidrolizan los enlaces éster de los insecticidas con una selectividad alta por el sustrato (Colovic *et al.*, 2013). La sobreproducción de estas enzimas en los anofelinos se ha asociado a resistencia contra organofosforados, carbamatos y piretroides, a causa de su alto contenido de enlaces éster en sus estructuras (Olé Sangba *et al.*, 2016). A pesar de que se han reportado mecanismo de resistencia mediado por esterasas en la mayor parte de insecticidas, únicamente el mecanismo de resistencia malatión-carboxilesterasa es comprendido y reportado con mayor frecuencia en anofelinos (Hemingway y Karunaratne, 1998; Karunaratne y Hemingway, 2001). Lo que señala que, el hecho que se desconozca la función del 90% de los genes metabólicos, impide que se comprenda con exactitud, como todas las familias enzimáticas se ven implicadas en la resistencia metabólica (Corbel y N'Guessan, 2013).

2. Sitio objetivo. El segundo tipo de resistencia más común y mejor comprendida en los anofelinos es la denominada sitio objetivo. Esta se da cuando la proteína a la cual el insecticida está diseñado a atacar, es alterada por una mutación. Provocando que este no pueda unirse con efectividad al receptor y por lo tanto el mecanismo de acción contra el insecto se vea reducido o deje de ser eficiente (Ilias *et al.*, 2014). Las mutaciones más conocidas suceden en los receptores de los canales de sodio y en la proteína acetilcolinesterasa (Busvine, 1951; Smitsaert, 1964; O'Reilly *et al.*, 2006; World Health Organization, 2013; Mitchell *et al.*, 2014).

Cuando la mutación ocurre en los receptores de los canales de sodio, se confiere la resistencia que se conoce como *kdr* o "knockdown resistance". Nombre otorgado por la reducción del efecto noqueador de los insecticidas (Singh *et al.*, 2011). Las mutaciones más comunes consisten en un cambio de bases en el segmento 6 transmembranal del segundo dominio de los canales de sodio (codón 1014), en el cual se reemplaza una leucina por una fenilalanina (L1014F) o serina (L1014S) (Soderlund y Knipple, 2003). Se ha reportado que esta mutación no interactúa directamente con el insecticida, sino que altera la conformación del canal de sodio. Originando una disminución en la sensibilidad al compuesto activo de los insecticidas, disminuyendo los efectos neurotóxicos (Bass *et al.*, 2007). La presencia de esta mutación en América Latina se ha observado únicamente en *An. albimanus*, siendo las mutaciones L1014F y L1014C las más estudiadas (Silva *et al.*, 2014).

La acetilcolinesterasa (Ace-1) es una enzima que se encuentra en abundancia en el sistema nervioso. Su función es mediar la hidrólisis de los neurotransmisores acetilcolina en la membrana postsináptica, para que los impulsos nerviosos puedan ser transmitidos a través de sistema nervioso central y periférico (Downes y Granato, 2004). Cuando un mosquito es expuesto a un insecticida (Ej. organofosforados y carbamatos) se da la inhibición en la función de esta enzima. Lo que causa la acumulación de acetilcolina y en consecuencia efectos neurotóxicos (Ej. parálisis) que llevan a la muerte del vector (Hayes y Laws, 2010).

El mecanismo de resistencia desarrollado por anofelinos para contraatacar este efecto, ha sido el desarrollo de mutaciones en los codones 119, 290 y 331 (resistencia *Ace-1*). La mutación más común es en el codón 119, donde se sustituye una glicina por una serina (G119S) (Alout *et al.*, 2007; 2009). Investigaciones por Feng y colaboradores evidenciaron que, la frecuencia con la que el genotipo G119S se presentaba, era mayor que las mutaciones en los codones 290 y 331 en *An. sinensis* y *An. gambiae* (Feng *et al.*, 2015). Igualmente, investigaciones realizadas por Weill, demostraron que cuando *An. albimanus* es expuesto a concentraciones tóxicas de organofosforados o carbamatos, exhibe la mutación G119S, que implica insensibilidad a la acetilcolinesterasa. Hallazgos que también se han reportado en *Culex pipiens* (Weill *et al.*, 2004; Osta *et al.*, 2012).

3. Cambio de comportamiento. Aunque la resistencia metabólica y por mutaciones en el sitio blanco son las más estudiadas, no son las únicas que colaboran con el aumento de resistencia a insecticidas en los vectores de malaria. Se ha encontrado que, ante una exposición prolongada a insecticidas, los mosquitos presentan un cambio en el comportamiento de picada. Contribuyendo a que no se vean expuestos a dosis letales de insecticidas y sean más propensos a desarrollar resistencia (Sokhna *et al.*, 2013). Este tipo de respuesta puede derivarse a una respuesta errática, al tener contacto con el insecticida. Siendo igual de probable que la respuesta se deba a repelencia, en donde el vector se aleja del área tratada antes de tener contacto directo con el insecticida (Tisgratog *et al.*, 2011).

Cambios en el comportamiento del vector se ha observado como una respuesta adaptativa a los programas de control vectorial que implementan tanto el RRI, como el uso de LLINs. Se ha demostrado que *An. funestus* cambió su comportamiento de picada intradomiciliaria a externa. Se desconoce si dicha respuesta conductual se debe a variaciones fenotípicas o al resultado de la presión de selección de estos rasgos de comportamiento (Lyimo y Ferguson, 2009; Russell *et al.*, 2011).

4. Reducción de la absorción o penetración del insecticida. Para que el insecticida ingrese al interior del vector y pueda llevar a cabo sus funciones neurotóxicas, debe ser absorbido primero, ya sea por contacto directo o ingestión. No obstante, cuando esta capacidad de absorción es reducida, la toxicidad del agente activo de los insecticidas baja. Modificaciones en la cutícula e intestino de los mosquitos ha contribuido a que dicho fenómeno se presente recurrentemente. Provocando que se considere como un mecanismo de resistencia (Nkya *et al.*, 2013).

La absorción de los insecticidas se puede dar a través de la cutícula o a través del intestino. Una reducción en la permeabilidad cuticular y en la absorción intestinal a los compuestos activos de los insecticidas, puede tener un impacto grande en la bioviabilidad de este *in vivo*, haciendo que los mosquitos se vuelvan más resistentes a las dosis a las cuales son expuestos (Alves *et al.*, 2010; Kasai *et al.*, 2014). En el caso de la permeabilidad en la cutícula, se ha identificado mediante estudios del transcriptoma de *An. funestus*, que la disminución en la penetración y absorción de los compuestos activos se debe a un engrosamiento de las capas de la cutícula del insecto. Resultado de la sobreexpresión de ciertos genes cuticulares, como por ejemplo el *gen 76* (Gregory *et al.*, 2011). Igualmente se ha encontrado que genes que codifican proteínas cuticulares, como *CPLC8* y *CPLC#*, se encuentran sobre expresados en cepas de *An. gambiae* resistentes a piretroides (Awolola *et al.*, 2009).

A pesar de que el reforzamiento de la cutícula es uno de los mecanismos de reducción de la absorción de insecticidas más comprendido, no es el único. Se ha documentado que un cambio en la composición del intestino de invertebrados, principalmente en la microbiota bacteriana, tiene un impacto grande en el desarrollo de parásitos, virus y bioviabilidad de insecticidas (Cirimotich *et al.*, 2011; Boissière *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2017). Estudios recientes han demostrado que dentro de la microbiota del intestino de plagas agrícolas y vectores existen determinados microorganismos capaces de catabolizar el insecticida. Dichos microorganismos provocan una reducción significativa en la permeabilidad de los insecticidas en el intestino, estimulando a que el hospedero sea menos susceptible a los efectos tóxicos (Kikuchi *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2017; Dada *et al.*, 2018). A pesar de este descubrimiento, actualmente poca información se conoce del papel que juega la microbiota bacteriana intestinal, en general del tracto digestivo, en la resistencia a insecticidas en vectores de enfermedades.

E. Relación entre la microbiota bacteriana intestinal y resistencia a insecticidas

La microbiota es un sistema complejo conformado por un conjunto de microorganismos que residen en un hábitat en particular (Shreiner *et al.*, 2015). En los últimos años la microbiota ha sido uno de los temas más estudiados, debido a la interacción interdependiente que logran consolidar en el organismo en el cual se establecen. Se sabe que a causa de que los microorganismos dependen del hospedero para reproducirse y transmitirse, ya sea en la misma especie o en diferentes, cualquier beneficio conferido al hospedero por parte de los simbioses que garantice la supervivencia de este, es sustancial para instituir su conservación (Behar *et al.*, 2008; Cho y Blaser, 2012; Shreiner *et al.*, 2015).

1. Adquisición de la microbiota bacteriana en anofelinos. Para establecer qué tipo de beneficios adquieren los anofelinos de la relación mutualista con las bacterias que constituyen la microbiota intestinal, es necesario conocer cómo primera aproximación cómo la microbiota bacteriana es adquirida. Se ha descubierto que la microbiota en anofelinos es transmitida de manera vertical, horizontal o a través del entorno; variando en cada estadio del ciclo de vida. Se cree que la microbiota bacteriana que se transmite de manera vertical, constituye la microbiota núcleo. Mientras que la microbiota que es adquirida de manera horizontal o a través del entorno, constituyen la microbiota secundaria (Damiani *et al.*, 2010; Garcia, 2010).

La transmisión vertical únicamente se ha comprobado en miembros del género *Asaia*, la cual posee una asociación estable con el intestino medio, glándulas salivales y órganos reproductivos. *Asaia* se ha detectado en todos los estadios pre-maduros: huevos, estadios larvales 1ro al 4to y pupa. Evidenciando un caso de transmisión transestadial en anofelinos de campo y laboratorio. Lo que sugiere que *Asaia* se encuentra distribuida en muchas especies de anofelinos, formando una relación estable a lo largo del ciclo de vida del vector. Estudios realizados por Damiani y colaboradores, mostraron en *An. gambiae* que la aparición perseverante de *Asaia* en todos los estadios, se debe principalmente a su mecanismo de transmisión vertical. Proporcionaron evidencia que sugiere que *Asaia* es transferida de la madre a la descendencia por un mecanismo de manchado de huevos, en donde *Asaia* queda adherida a la periferia de los huevos. Permitiendo posteriormente que la bacteria sea ingerida por la larva durante la eclosión, perpetuando su transmisión (Damiani *et al.*, 2010; Damiani *et al.*, 2008).

La asociación mutualista exitosa que logra consolidar *Asaia* con *Anopheles* spp., es no generalizable para la mayor parte de la microbiota bacteriana. Debido a que *Asaia* coloniza con éxito diferentes órganos y tejidos de los anofelinos, en específico lo órganos reproductivos, su riesgo de ser eliminadas durante procesos de metamorfosis disminuye. Aumentando sus posibilidades de permanecer en el mosquito en todas las etapas de su ciclo de vida. El resto de bacterias que conforman la microbiota bacteriana del intestino medio de anofelinos, no poseen esta ventaja, ya que no tienden a colonizar otros órganos o tejidos. Lo cual disminuye sus probabilidades de persistir en el intestino desde el estadio larval a adulto. Explicando porque entre estudios que poseen como objetivo evaluar la diversidad microbiana en la microbiota de anofelinos, presentan resultados variantes y poco consistentes (Lindh *et al.*, 2008; Damiani *et al.*, 2010).

Se sabe que los mosquitos adquieren bacterias del entorno donde se desarrollan. El primer contacto bacterias – adulto *Anopheles* spp. se da cuando la pupa eclosiona y el mosquito adulto se ve expuesta al entorno acuático. En el estadio larval, las larvas se alimentan de las bacterias del entorno. En esta etapa, la presencia de bacterias es tan importante, a tal punto que se ha visto que si son anuladas del medio acuático en donde se encuentran, las larvas no se desarrollan correctamente (Wotton *et al.*, 1997). Pese a que las bacterias son un factor fundamental en el desarrollo *Anopheles* spp, desde temprana etapa, se ha comprobado que la mayor parte de la microbiota bacteriana adquirida en la etapa larval no persiste hasta la etapa adulta. Estudios realizados por Lindh y colaboradores utilizaron una cepa de *Pantoea*

stewartii, genéticamente modificada para expresar proteína verde fluorescente, para determinar si existía una transmisión transestadial de la microbiota bacteriana. Los resultados mostraron que *P. stewartii* fue transmitida de larvas a pupas, pero no de pupas a adultos (Lindh *et al.*, 2008).

La no continuidad de la transmisión transestadial de pupas a adultos se debe a un factor de metamorfosis. En específico, en el período donde el mosquito se encuentra en el estadio de pupa. Debido a que en el estadio larval se da una ingesta constante e indiscriminada de bacterias, se introduce la probabilidad de adquirir bacterias patógenas (Moll *et al.*, 2001). La evolución, como mecanismo de defensa, originó un sistema de membranas peritróficas que purga todo el contenido intestinal adquirido durante el estadio larval. Se reconocen dos tipos de membranas peritróficas: tipo I, que son aquellas formadas por secreciones de células distribuidas en toda la superficie del intestino medio; y tipo II que son aquellas producidas por las células epiteliales del intestino medio (Lehane, 1991). En los mosquitos, ambas membranas se forman durante su ciclo de vida, siendo el punto crítico de cambio en el estadio de pupa (Lindh *et al.*, 2008).

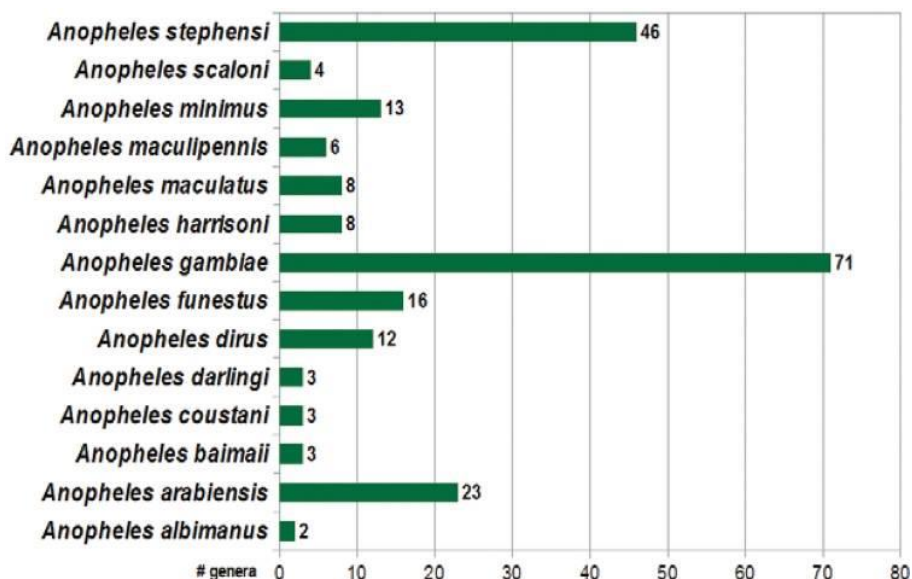
Unas horas después de la pupación, se forma la membrana tipo I, cambiando a membrana tipo II en el momento en el que el adulto emerge. En este proceso, las membranas peritróficas secuestran las bacterias que se encuentran en el intestino medio y las eliminan por agestión a las 38 u 48 horas que los adultos emergieron. Conjuntamente al secuestro de bacterias, el adulto ingiere fluidos del exuvial al emerger, la cual es una fuente alta en agentes antimicrobianos. El resultado final es una carga bacteriana baja en el intestino medio de los mosquitos con 38 a 48 horas de haber eclosionado (Moll *et al.*, 2001).

Es claro que la mayor parte de la microbiota bacteriana del intestino medio de los mosquitos adultos no es adquirida en los estadios previos, si no del medio ambiente. Se ha comprobado que la “primer” microbiota que los anofelinos adquieren es del agua del sitio donde emergieron. Igualmente se ha visto que puede ser transmitida de madre a descendencia cuando la hembra deposita los huevos, ya que en dicho acto parte de la microbiota intestinal es liberada al medio acuático, por las heces. Por ello, la microbiota bacteriana puede ser variante entre individuos de una misma especie y entre especies. Lo cual aumenta la diversidad de la microbiota intestinal anofelina (Lindh *et al.*, 2008).

2. Diversidad de la microbiota intestinal en anofelinos. Desde el descubrimiento del rol de la microbiota bacteriana en el desarrollo y biología del vector, los estudios mayoritariamente se han enfocado en encontrar simbioses que puedan ser aplicados en paratransgénesis (Villegas y Pimenta, 2014). A pesar de dicha preponderancia, desde la disposición de técnicas NGS, han surgido nuevos enfoques que buscan estudiar la ecología de la microbiota bacteriana de anofelinos y recientemente el rol de la microbiota en el establecimiento de resistencia a insecticida. Gran parte de los resultados reportados en la literatura se han enfocado en el estadio larval y adulto de las especies *An. gambiae*, *An. arabiensis* y *An. stephensi* vectores principales en África subsahariana (primeros dos) y Asia sudoriental, respectivamente, Figura 8. Con poca priorización a los vectores de América Latina (Djadid *et al.*, 2011; Manguin *et al.*, 2013; Chavshin *et al.*, 2014; Villegas y Pimenta, 2014).

Figura 8. Número de géneros bacterianos reportados por especie anofelina.

Un total de 109 géneros se identificaron de 218 artículos publicados hasta el 2014.



(Villegas y Pimenta, 2014)

El diseño experimental que se encuentra publicado en la mayor parte de estudios, ha sido variado y poco constante. La forma de abordar las muestras ha divergido en cuanto estadio del ciclo de vida trabajado, tamaño y forma de trabajarlas, Cuadro 1. Las variaciones se han basado principalmente en los objetivos del estudio y las limitaciones de la recolección y crianza del material biológico (Djadid *et al.*, 2011; Boissière *et al.*, 2012; Chavshin *et al.*, 2012; Chavshin *et al.*, 2014a; Chandel *et al.*, 2013; Gimonneau *et al.*, 2014; Akorli *et al.*, 2016; Dada *et al.*, 2018). Cuando se trabaja con seres vivos, es difícil mantener un tamaño de muestra homogéneo, mayormente cuando las muestras provienen de poblaciones de campo, donde las condiciones no son controladas (Romoli y Gendrin, 2018).

Cuadro 1. Variaciones del diseño experimental para el estudio de la microbiota bacteriana, que se reporta con más frecuencia en la literatura.

Estadio estudiado	Especie estudiada	Tamaño de muestra	Forma de trabajar la muestra	Referencia
Adultos hembra	<i>An. gambiae</i> y <i>An. coluzzii</i>	Entre las dos especies, 212 intestinos.	Pools de 2 a 5 intestinos.	(Akorli <i>et al.</i> , 2016)
Adultos hembra	<i>An. gambiae</i>	32 intestinos	Se trabajó cada intestino por individual.	(Boissière <i>et al.</i> , 2012)
Adultos hembra	<i>Culex quinquefasciatus</i>	100 intestinos	Se trabajó cada intestino por individual.	(Chandel <i>et al.</i> , 2013)
Larvas de 4to estadio y adultos hembra	<i>An. culicifacies</i>	68 intestinos de larvas y 34 intestinos de adultos hembras.	Se trabajó por separado y en pool, cada grupo estudiado.	(Chavshin <i>et al.</i> , 2014a)
Larvas de 4to estadio y adultos hembra	<i>An. stephens</i>	50 intestinos de larvas y 48 intestinos de adultos hembras.	Se trabajó por separado y en pool, cada grupo estudiado.	(Chavshin <i>et al.</i> , 2012)
Adultos hembra	<i>An. albimanus</i>	10 adultos de la cepa susceptible y 30 adultos de la cepa resistente a fenitrotión.	Por separado, pool de 10 adultos enteros de la cepa susceptibles y pool de 30 adultos enteros de la cepa resistente.	(Dada <i>et al.</i> , 2018)
Larvas de 4to estadio y adultos hembra	<i>An. stephensi</i> y <i>An. maculipennis</i>	10 intestinos de adultos hembra y 15 intestinos de larvas de <i>An. stephensi</i> . 32 intestinos de adultos hembra y 7 intestinos de larvas de <i>An. maculipennis</i> .	Se trabajó por separado y en pool, cada grupo estudiado.	(Djadid <i>et al.</i> , 2011)
Larvas de 4to estadio y adultos hembra	<i>An. coluzzii</i> y <i>An. gambiae</i>	Entre las dos especies, 20 intestinos de larvas y 15 intestinos de adultos hembras.	Se trabajó cada intestino por individual. Tanto para las larvas, como para los adultos.	(Gimonneau <i>et al.</i> , 2014)
Adultos hembra	<i>An. barbumbrosus</i> , <i>An. crawfordi</i> , <i>An. dirus</i> , <i>An. maculatus</i> y <i>An. gigas</i>	13 abdómenes de <i>An. barbumbrosus</i> , 12 abdómenes de <i>An. crawfordi</i> , 23 abdómenes de <i>An. dirus</i> , 28 abdómenes de	Se trabajó por separado y en pool, cada grupo estudiado.	(Ngo <i>et al.</i> , 2015)

Estadio estudiado	Especie estudiada	Tamaño de muestra	Forma de trabajar la muestra	Referencia
		<i>An. maculatus</i> y 24 abdómenes de <i>An. gigas</i> .		
dultos hembra	<i>Anopheles</i> sp., <i>Mansonia</i> sp., <i>Culex</i> sp. y <i>Aedes</i> sp.	Entre las cuatro especies, 86 intestinos.	Pools de 3 a 13 intestinos, dependiendo de la cantidad de ejemplares recolectados.	(Osei-Poku <i>et al.</i> , 2012)
Adultos hembra	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	30 intestinos	Pool de 30 intestinos.	(Pidiyar <i>et al.</i> , 2004)
Larvas de 4to estadio y adultos hembra y macho	<i>An. stephensi</i>	24 intestinos de adultos macho, 25 intestinos de adultos hembra y 30 intestinos de larvas.	Se trabajó por separado y en pool, cada grupo estudiado.	(Rani <i>et al.</i> , 2009)
Larvas de 4to estadio y adultos hembra	<i>Aedes albopictus</i>	30 intestinos de adultos y 30 intestinos de larvas.	Pools de 30 intestinos para cada estadio.	(Yadav <i>et al.</i> , 2016)
Adultos hembra	<i>Ae. albopictus</i> y <i>Ae. aegypti</i>	30 intestinos de cada especie.	Se trabajó cada intestino por individual.	(Yadav <i>et al.</i> , 2015)
Pupas, larvas de 4to estadio y adultos hembra	<i>An. gambiae</i>	30 intestinos por cada estadio.	Pools de 30 intestinos por estadio.	(Wang <i>et al.</i> , 2011)

Independientemente de las dificultades que implica alcanzar un tamaño de muestra determinado, se ha visto que los análisis son afectados mayormente por la forma de trabajar los intestinos. Si los intestinos se trabajan individualmente, es posible ver la variación de la microbiota bacteriana no solo entre diferentes poblaciones, sino también entre individuos de una misma población. Algo que no es posible de alcanzar cuando las muestras de tejido son trabajadas en pool (Cutler y Jensen, 2010). Esto brinda una ventaja, ya que permite ver un panorama más amplio de la ecología del microbioma y representar en mejor forma los análisis correspondientes de cada enfoque en el que al momento se ha estudiado la microbiota, desde paratransgénesis hasta el posible rol en la resistencia a insecticidas.

Los estudios de paratransgénesis fueron y siguen siendo uno de los enfoques principales en las investigaciones de la microbiota bacteriana de anofelinos, ya que buscan utilizar bacterias simbiotas como moduladores para evitar la interacción *Plasmodium* spp. – *Anopheles* spp. (Villegas y Pimenta, 2014). La efectividad de este método recae en la interacción bacterias - *Plasmodium* spp., ya que la microbiota del mosquito reside e interactúa con *Plasmodium* spp. en los órganos y tejidos donde los

estadios más vulnerables del parásito ocurren (Whitten *et al.*, 2006). Diversos estudios han identificado cuatro géneros bacterianos para ser utilizados como vectores paratransgénicos: *Asaia*, *Serratia*, *Pantoea* y *Wolbachia*. (Pumpuni, 1996; Gonzalez-Ceron *et al.*, 2003; Kambris *et al.*, 2010; Cirimotich *et al.*, 2011; Djadid *et al.*, 2011; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011; Boissière *et al.*, 2012; Chavshin *et al.*, 2012; 2014a; Villegas y Pimenta, 2014). Dichos géneros se reportan continuamente en la literatura porque poseen el perfil adecuado, ya sea por su asociación estable con anofelinos, porque son cultivables y transformables, porque se transmiten vertical u horizontalmente, porque estimulan la regulación de genes inmunitarios y se encuentran en más de una especie anofelina.

Si bien los estudios de paratransgénesis han evaluado de forma aplicada la microbiota bacteriana de anofelinos, como método de control vectorial, el enfoque global que posee es escaso. Impidiendo que se evalué de qué manera la microbiota de anofelinos se compone, varía dentro de una misma especie o entre especies e interactúa con su entorno. Por tal razón, el estudio de la microbiota bacteriana desde un punto ecológico surgió como necesidad de identificar el ecosistema interno de los anofelinos, con el fin de ampliar el panorama y evaluar alternativas complementarias al método de paratransgénesis (Boissière *et al.*, 2012; Chavshin *et al.*, 2012; Villegas y Pimenta, 2014).

Como aproximación a este enfoque, se han derivado estudios que tienen como fin identificar la microbiota bacteriana del intestino medio de larvas y adultos *Anopheles* spp., en su mayoría hembras. En ejemplares de laboratorio y campo han encontrado predominancia de bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Asaia*, *Bacteroidetes*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium*, *Flavobacter*, *Firmicutes*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Myroides*, *Pantoea*, *Proteobacteria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Staphylococcus* y *Wolbachia* (Gonzalez-Ceron *et al.*, 2003; Djadid *et al.*, 2011; Boissière *et al.*, 2012; Chavshin *et al.*, 2012; 2014a; Gimonneau *et al.*, 2014; Akorli *et al.*, 2016). A pesar de que se ha identificado la comunidad microbiana mínima esencial (microbiota núcleo) para la supervivencia y bienestar de los anofelinos, gracias a los esfuerzos de muchos investigadores, no siempre dichas bacterias están presentes en todas las especies *Anopheles* spp. que se han estudiado. Lo que sugiere que dentro del género *Anopheles*, no existen simbiontes naturales obligados. Proponiendo que la composición de la microbiota bacteriana varía dependiendo el entorno donde el mosquito se desarrolla, ya que la mayor parte de la microbiota es adquirida del medio ambiente. Por lo que es de esperar que la microbiota bacteriana de anofelinos varíe en presencia/ausencia entre la misma especie, especies y continentes, Figura 9 (Djadid *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Manguin *et al.*, 2013; Villegas y Pimenta, 2014).

Desde un enfoque ecológico, la relación entre la composición de la microbiota bacteriana y el entorno donde el mosquito se desarrolla, ha sido más evidente. Investigaciones en donde se ha evaluado cómo el entorno local influye en la diversidad de la microbiota bacteriana de *Anopheles* spp., se ha encontrado que los factores climáticos y de urbanización generan un impacto significativo en la composición de la microbiota bacteriana. Igualmente han demostrado que los géneros bacterianos entre individuos de una misma especie anofelina, variaran en cuanto a abundancia, según el sitio de crianza

donde se recolectaron las muestras. Dado que la composición de la microbiota depende de la riqueza bacteriana de la fuente acuática de origen. Por ende, el criadero donde las larvas se desarrollan, tiene un impacto significativo en la constitución de la microbiota bacteriana del intestino medio de los mosquitos adultos (Osei-Poku *et al.*, 2012; Manguin *et al.*, 2013; Ngo *et al.*, 2015; Akorli *et al.*, 2016).

La influencia directa del sitio de crianza en la determinación de la microbiota bacteriana del intestino medio de mosquitos adultos, se ha visto magnificada en estudios donde han comparado cepas de laboratorio y muestras de campo. Los resultados exponen que la diversidad microbiana es menor en cepas de laboratorio que en cepas de campo, observando predominancia de un solo género bacteriano. Dicha tendencia, denota que las condiciones de laboratorio homogéneas en las que son criadas las cepas, puede generar una drástica pérdida de diversidad microbiota. Siendo una de las principales causas, la dieta estandarizada con la que son alimentados los mosquitos de laboratorio. Mostrando nuevamente, la importancia de los factores ambientales en la determinación de la diversidad y riqueza bacteriana (Rani *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Boissière *et al.*, 2012; Villegas y Pimenta, 2014).

En vista de la innegable influencia del medio ambiente en la conformación de la microbiota bacteriana del intestino medio de anofelinos, surgió la necesidad de evaluar cómo la microbiota variaba en presencia de diversos factores de estrés. Numerosos estudios se han enfocado en evaluar variaciones en ambientes con depredadores, en ambientes urbanizados y ambientes que están constantemente expuestos a insecticidas. A causa de la premura por encontrar nuevas estrategias para el control vectorial, recientemente los esfuerzos han sido dirigidos a estudiar cómo la microbiota bacteriana de anofelinos varía en presencia de una constante exposición a insecticidas. Actualmente solo existe un estudio que proporciona la primera caracterización de la microbiota del mosquito en relación con la resistencia a los insecticidas. Los hallazgos reportados, mostraron una variación significativa entre la microbiota bacteriana del intestino medio de una cepa susceptible y una cepa resistente. Evidenciando una diversidad bacteriana menor en la cepa susceptible, comparada con la cepa resistente. Donde la constante exposición al insecticida, fue el factor principal que contribuyó a que la microbiota fuera forzada a la selección exclusiva de bacterias capaces de utilizar el insecticida como fuente de carbono (Dada *et al.*, 2018).

spp. para degradar dosis letales de fenitrotión (Kikuchi *et al.*, 2012). Resultados similares se reportaron en *Spodoptera frugiperda*, en donde estudiaron la dinámica de la microbiota intestinal, de una cepa resistente a cinco diferentes tipos de insecticida y una cepa susceptible a estos. Los resultados mostraron que la cepa resistente presentó bacterias calificadas para utilizar dichos insecticidas como fuente de carbono. En el caso de deltametrina, se encontró que esta era degradada por *Arthrobacter nicotinovorans* (Almeida *et al.*, 2017).

Pese a que la mayor parte de bibliografía en donde se relaciona la microbiota bacteriana de insectos con resistencia a insecticidas se enfoca en plagas agrícolas, un estudio reciente evidenció la presencia de bacterias capaces de degradar organofosforados en la microbiota intestinal de *An. albimanus*. El estudio se enfocó en comparar la microbiota bacteriana de una cepa susceptible y una cepa resistente a fenitrotión, en hembras adultas. Los hallazgos de dicho estudio evidenciaron que la composición de la microbiota bacteriana en ambas cepas vario significativamente, siendo la microbiota de la cepa resistente menos variada y enriquecida con *Klebsiella pneumoniae*: bacteria capaz de metabolizar organofosfatos. En general, se observó una abundancia diferencial de enzimas bacterianas xenobióticas degradadoras entre la cepa susceptible y la cepa resistente. Con una predominancia de enzimas carboxilesterasas y fosfomonoesterasas en la cepa resistente (Dada *et al.*, 2018).

La presencia de bacterias degradadoras de insecticidas dentro de la microbiota bacteriana de hospederos que son expuestos continuamente a dichos agentes tóxicos, evidencia cómo la microbiota intestinal pasa por un proceso selectivo que favorece la predominancia de microorganismos capaces de metabolizar insecticidas. Llevando a que tanto el hospedero como la microbiota, aumenten su tolerancia gradualmente a dosis letales mínimas, fomentando resistencia (Almeida *et al.*, 2017).

La evidencia del surgimiento de un mecanismo de resistencia que se basa en el establecimiento de una relación simbiótica en las especies *Riptortus pedestris* y *Spodoptera frugiperda*; y la presencia de enzimas bacterianas degradadoras de organofosforados en *An. albimanus*, permite conjeturar la posibilidad de que la microbiota bacteriana intestinal de los anofelinos posee un rol en el establecimiento de la resistencia a los insecticidas. Sin embargo, aún no se conoce si existe dicho mutualismo y bajo qué circunstancias se establecería para favorecer evolutivamente a ambas contrapartes. Entender cómo el mutualismo se ve involucrado en el desarrollo y supervivencia del hospedero, llevaría a una mejor comprensión de a qué nivel los beneficios otorgados por los microorganismos suscitan el surgimiento de resistencia en los vectores de malaria (Nkya *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2013; Dada *et al.*, 2018).

F. Métodos utilizados para el estudio de la microbiota bacteriana

En el campo de la microbiología, la identificación de las especies bacterianas que conforman la microbiota de un determinado nicho, puede llevarse a cabo por dos enfoques: cultivo dependiente y cultivo independiente. Desde los inicios de la microbiología, los análisis se basaron en métodos tradicionales, los cuales eran completamente cultivo dependientes (Sommer, 2015). Permitiendo el estudio de aquellos microorganismos que crecían fácilmente bajo condiciones controladas de laboratorio.

Actualmente se sabe que no todos los microorganismos pertenecientes a un nicho, son cultivables. Por ende, se desarrollaron métodos moleculares que se basan en el análisis de ADN genómico obtenido de una muestra representativa, a los cuales se les denominó métodos cultivo independientes (Vartoukian *et al.*, 2010; Hiergeist *et al.*, 2015).

1. **Cultivo dependiente.** Este método se basa en el cultivo y aislamiento de un solo microorganismo a partir de una muestra, mediante el uso de medios sintéticos que proveen todas las necesidades nutricionales y ambientales que aseguran el crecimiento de la célula (Rani *et al.*, 2009; Dickson *et al.*, 2014). Si la bacteria es viable en el medio de cultivo en el cual se sembró, forma colonias. En específico unidades formadoras de colonia, donde se asume que la colonia se originó de una célula individual (Hiergeist *et al.*, 2015).

Las colonias bacterianas obtenidas, posteriormente pueden ser identificadas a través de diversos métodos. Los métodos empleados se basan en criterios fenotípicos y genotípicos. Los criterios fenotípicos evalúan características observables, como la morfología y capacidades metabólicas de las colonias obtenidas. Mientras que los criterios genotípicos evalúan genes específicos o secuencias de aminoácidos compartidas, pero no iguales, entre diferentes especies bacterianas (García, 2010; Kootallur *et al.*, 2011). La identificación de bacterias rutinariamente se ha realizado mediante criterios fenotípicos, en específico en el ámbito clínico. Sin embargo, se han encontrado incongruencias entre las características fenotípicas observadas y la correspondencia con las cepas especie tipo, haciendo de los criterios fenotípicos un método probable, pero no definitivo (Bou *et al.*, 2011).

Los criterios genotípicos, al basarse en el estudio de genes o secuencias específicas, permiten realizar estudios filogenéticos entre los distintos taxones. Mediante amplificación y secuenciación de secuencias conservadas que, tras ser analizadas por algoritmos matemáticos, posibilitan la identificación precisa de las colonias bacterianas estudiadas. Amortiguando las carencias y problemas inherentes que representan los criterios fenotípicos (Hiergeist *et al.*, 2015; Bou *et al.*, 2011).

A pesar de que los métodos de cultivo dependientes han ayudado a determinar gran parte de las bacterias que habitan en diversos insectos, el mayor problema es que se restringen a microorganismos que son viables en condiciones de laboratorio. Aquellos que son capaces de utilizar los agentes y nutrientes de los medios de cultivo como fuente de energía para crecer. Grupo constituido únicamente por el 5% de todas las bacterias que conforman la microbiota de un determinado nicho (Jany y Barbier, 2008). De modo que, los métodos cultivo dependientes no permiten obtener resultados representativos y fieles a las condiciones naturales en las que se produce el fenómeno estudiado. Figurado un modelo experimental inadecuado para la interpretación de la diversidad de la microbiota existente. Por ende, representa una limitante para la evaluación de la dinámica poblacional bacteriana y las posibles ventajas o desventajas que la interacción de la microbiota posee con el hospedero (Hiergeist *et al.*, 2015).

2. **Cultivo independiente.** El método de cultivo independiente se desarrolló como una alternativa para cubrir las carencias y limitaciones de los métodos cultivo dependientes. Este método se basa en el análisis del material genético de toda la microbiota bacteriana bajo estudio, independientemente de la viabilidad de las bacterias en condiciones de laboratorio. Un enfoque que es más conocido como metagenómica, donde su principio recae en la amplificación y secuenciación de ADN genómico aislado de muestras ambientales. Posibilitando, tras un análisis bioinformático, explorar la dinámica de la microbiota a detalle desde el punto de vista ecológico y evolutivo (Thomas *et al.*, 2012; Hiergeist *et al.*, 2015).

Estudios basados en el análisis y caracterización de la microbiota intestinal de *An.culicifacies*, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, *An. stephensi* y *An. gambiae* demostraron que es posible determinar alrededor de 12 a 15 géneros de bacterias de la microbiota mediante los métodos cultivo dependientes. No obstante, estudios con los mismos objetivos, pero utilizando metagenómica, identificaron en las mismas especies alrededor de 22 a 25 géneros de bacterias de la microbiota. Evidenciando que la implementación de métodos cultivo dependientes para abordar análisis de diversidad microbiana son inadecuados, dado que pasa por alto gran parte de la información genética requerida para poder describir la diversidad microbiana de un sitio en específico (Boissière *et al.*, 2012; Chavshin *et al.*, 2012; Chavshin *et al.*, 2014; Osei-Poku *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2015;).

En consecuencia, actualmente la mayor parte de los estudios de microbiomas, se basan en la utilización de métodos metagenómicos. Puesto que logra la identificación de todos los microorganismos que habitan en un ambiente en específico, que en su mayoría son no cultivables. Permitiendo así, con alta sensibilidad y reproducibilidad, el estudio de la dinámica bacteriana a través del tiempo (Dickson *et al.*, 2014).

G. Estudio de la microbiota bacteriana desde un enfoque metagenómico

Los estudios metagenómicos de microbiomas bacterianos actualmente se han basado en la amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr ribosomal. Ya que al ser un gen conservado e hipervariable, es ideal como parámetro de comparación en análisis genéticos (Woo *et al.*, 2008). Esto ha facilitado la exploración de la dinámica y diversidad de la microbiota, a través de la ejecución de numerosas técnicas de alta sensibilidad. Como es el caso de la secuenciación de regiones discriminativas de ADN, productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés); y recientemente, secuenciación de última generación (NGS) (Jany y Barbier, 2008).

1. Gen 16S ARN ribosomal. Si bien los análisis metagenómicos se basan en algoritmos matemáticos que fueron desarrollados para reducir el error en las predicciones y comprobar que los datos son representativos, si no se selecciona el marcador molecular apropiado, la predicción final no es confiable. La correcta elección de marcador molecular en un análisis genético dictará el éxito de la predicción final. Dado que representa la información biológica que se usará como base para inferir las relaciones evolutivas entre las muestras de interés. Por tanto, en análisis genéticos es indispensable utilizar marcadores moleculares conservados que funcionen como cronómetros evolutivos. En especial en estudios en donde se analizan comunidades complejas, como lo son las comunidades microbianas (Choudhuri, 2014).

El 16S ARNr es un poli ribonucleótido presente en todos los procariotas, con un tamaño de aproximadamente 1500pb. Dicha macromolécula, procedente de la subunidad pequeña del ribosoma, se caracteriza por presentar secuencias cortas conservadas con regiones variables. Donde su estructura y función ha permanecido constantes durante un prolongado período de tiempo (Rodicio y Mendoza, 2004). Lo que hace que el 16S ARNr difiera entre individuos con genomas distintos (Morgan y Huttenhower, 2012). Esto sugiere que los cambios aleatorios de secuencia son una medida precisa de la evolución de una población biológica. Por lo que son excelentes cronómetros evolutivos, para estudios taxonómicos y filogenéticos de microbiomas bacterianos (Janda y Abbott, 2007).

A pesar de que el gen 16S ARNr es altamente conservado, posee nueve regiones hipervariables (V1 a V9) que exhiben diferentes grados de diversidad en sus secuencias. Lo cual permite medir la distancia evolutiva entre especies, Figura 10 (Yarza *et al.*, 2014). Generalmente dichas regiones están flanqueadas por secciones conservadas que, acceden a que se utilice la PCR para la amplificación de secuencias objetivas, mediante el uso de cebadores universales (Farrelly *et al.*, 1995). Facilitando que los análisis filogenéticos se realicen a través de softwares con la capacidad de comparar y alinear las secuencias generadas contra una base de datos de ADN extensa (Chakravorty *et al.*, 2007).

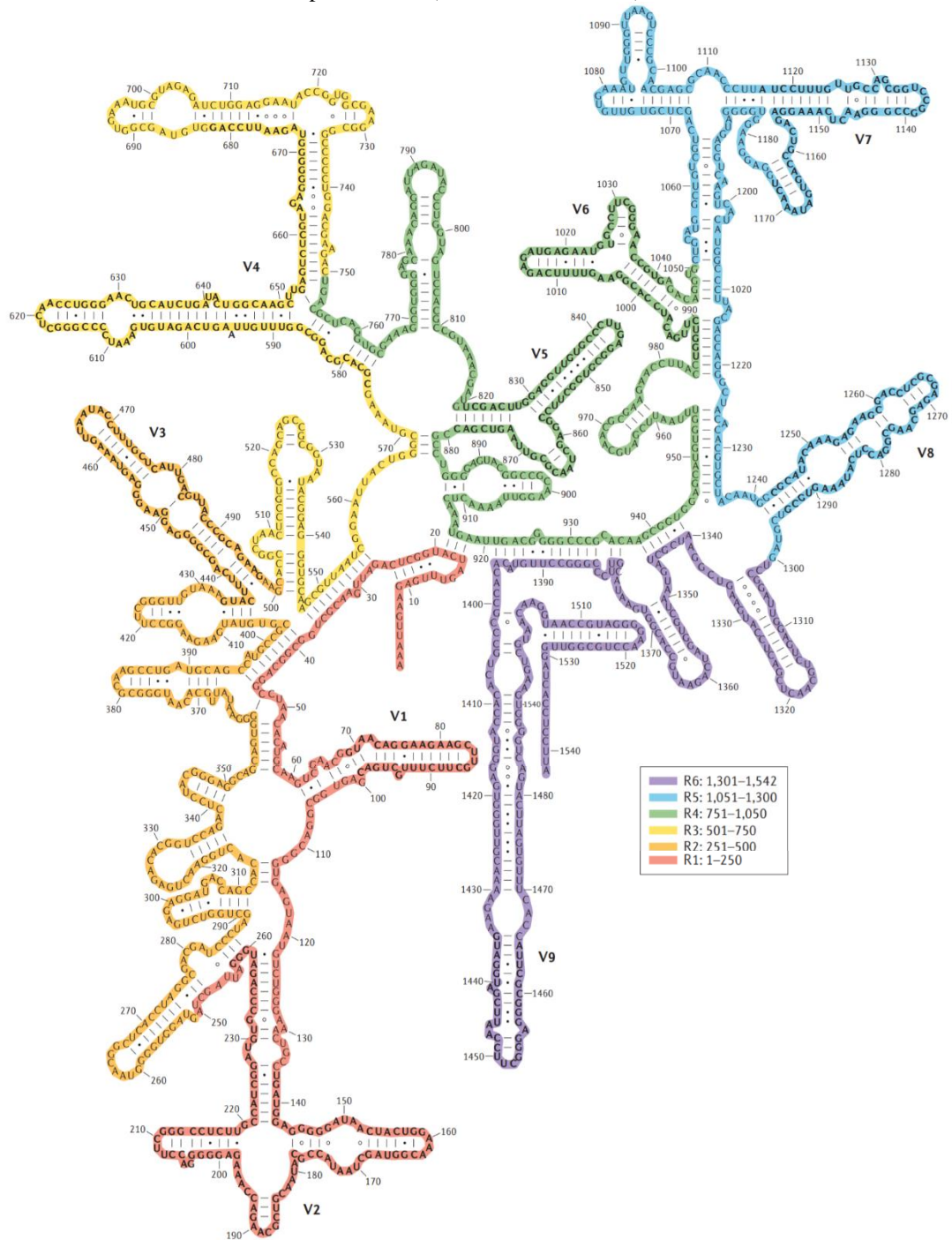
No todas las regiones hipervariables del gen 16S ARNr son ideales para distinguir organismos estrechamente relacionados. Dado que no todas las regiones presentan un tamaño razonable (entre 20 a 1,000 pares de bases) para generar resultados de amplificación y secuenciación confiables. Además, se necesita que la región posea una variabilidad adecuada para lograr la identificación de poblaciones, pero al mismo tiempo secuencias altamente conservadas que ayuden a diseñar cebadores adecuados para trabajar con una gran variedad de microorganismos (Yang *et al.*, 2016). Según dichos criterios, diversas investigaciones se han enfocado en comparar la cobertura taxonómica de cebadores diseñados para diferentes regiones hipervariables, llegando al consenso de utilizar la región V3 – V4 para identificar taxonómicamente al microbioma bacteriano de los diversos ecosistemas terrestres, debido a que cubre el 93% de las secuencias bacterianas disponibles en la base de datos del gen 16S ARNr (DeSantis *et al.*, 2006; Caporaso *et al.*, 2011; 2012; Hugerth *et al.*, 2014; Herbold *et al.*, 2015; Parada *et al.*, 2016; Walters *et al.*, 2016).

Si bien el gen 16S ARNr es un cronómetro evolutivo ideal, presenta ciertas limitaciones para realizar un análisis filogenético exhaustivo. Al ser el gen 16S ARNr altamente conservado y con algunas secuencias hipervariables, pocas variaciones en los pares de bases suceden en un corto período de tiempo evolutivo. Por lo que el 16S ARNr posee una resolución limitada entre especies relacionadas, brindando un análisis filogenético a nivel de género. Igualmente, factores como la transferencia horizontal de genes, ambigüedad en los marcadores de ADNr, discrepancias en la longitud del fragmento amplificado y errores en la secuenciación; desenfocan la posibilidad de definir el significado de especie. Evitando que los análisis filogenéticos puedan brindar un resultado predictorio sin margen de error (Morgan y Huttenhower, 2012; Poretsky *et al.*, 2014).

A pesar de las limitaciones que implica el uso del 16S ARNr para identificar organismos bacterianos, la elección de dicho gen para determinar la composición microbiana de un ecosistema en particular, es predominante sobre otros. A la fecha, muchos estudios de caracterización de ecosistemas microbianos se han basado en el gen 16S ARNr, por lo que las bases de datos son extensas. Por ende, ha sido estandarizado para ser analizados en las plataformas de NGS y en los respectivos softwares con algoritmos capaces de analizar la gran cantidad de datos generados (Morgan y Huttenhower, 2012; Villegas *et al.*, 2014).

Figura 10. Estructura secundaria de la subunidad 16S del ARNr.

Cada sección coloreada represente un fragmento R (clave en la figura) con sus respectivas regiones hipervariables (denotadas con una V).



(Yarza *et al.*, 2014)

2. Análisis metagenómicos basados en el gen 16S ARN ribosomal. Debido al predominante uso del gen 16S ARNr en estudios de caracterización del microbioma bacteriano de diversos ecosistemas y tejidos, se han desarrollado métodos para facilitar el procesamiento y análisis de los resultados. En los últimos años, el método más implementado ha sido la secuenciación de última generación. La aplicación de NGS ha posibilitado que la información genómica de una comunidad bacteriana pueda ser obtenida con alta resolución y rendimiento. Estimulando al desarrollo de herramientas bioinformáticas sofisticadas para analizar y representar las enormes cantidades de datos generados.

a. Secuenciación de amplicones del gen 16S ARN ribosomal en plataforma Illumina®. Una de las plataformas de NGS más utilizada hoy en día, es la plataforma Illumina®. Su tecnología permite una secuenciación masiva, rápida y precisa; gracias a su método de amplificación clonal y secuenciación por síntesis. En otras palabras, las bases nitrogenadas son identificadas al mismo tiempo que se incorpora a la cadena complementaria. La versatilidad del método, ayuda a que la tecnología de NGS de Illumina® pueda ser empleada en secuencias de ADN de cualquier longitud, sin perder su principio: secuenciaciones masivas de alta resolución (Illumina, 2018a).

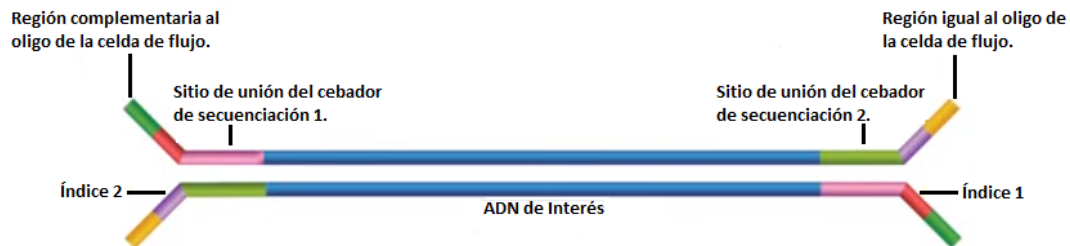
Dentro de las opciones de secuenciación, se encuentra la secuenciación dirigida. La cual permite la secuenciación de regiones genómicas específicas. Comparado con los enfoques más generales, como lo es la secuenciación de un genoma entero, la secuenciación dirigida posee un mayor nivel de cobertura. Por ende, se reducen costos, tiempo, cantidad de datos generados y complejidad del análisis. Una de las modalidades de secuenciación dirigida más utilizada en estudios de microbiomas bacterianos, está la secuenciación de amplicones (productos de la PCR). Esta modalidad es altamente específica, permitiendo identificar y caracterizar variantes en las secuencias. Por lo que es ideal para la secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr (Illumina, 2018b).

La secuenciación de amplicones utiliza sondas de oligonucleótidos para capturar e identificar las regiones de interés, las cuales pueden ser adaptadas a conveniencia del estudio. Viabilizando multiplexación de miles de miles de amplicones por amplificación, logrando una alta cobertura. En otras palabras, permite la evaluación de múltiples genes, que no necesariamente son los mismos, en una sola ejecución. Este tipo de análisis se realizan generalmente en el sistema MiniSeq, el cual tiene un rango de salida de 1.65 a 1.7 Gb, capacidad de lecturas por corrida de 7 a 25 millones y una máxima longitud de lectura de $2 \times 150\text{pb}$ (Illumina, 2018b).

El sistema de trabajo de Illumina® que permite tanta flexibilidad, se basa en 4 pasos básicos: preparación de la muestra, amplificación de las secuencias por clústeres, secuenciación y análisis de datos. La preparación de la muestra inicia con la extracción y purificación del ADN de interés. Si las secuencias de ADN son mayores a 400pb, deben ser tagmentadas, de lo contrario pueden proseguir a la fase de adición de adaptadores. En el caso de secuenciación de amplicones, en algunos casos esta fase es omitida, debido a que hay productos de PCR menores a 400pb. Como lo es el caso de los amplicones

del gen 16S ARNr. Independientemente el paso de tagmentación, a los segmentos de ADN se les añade adaptadores en los extremos. Con el fin de reducir los ciclos de amplificación, a los adaptadores se les agrega regiones que contiene a los cebadores para iniciar la secuenciación, los índices para diferenciar las secuencias y las regiones complementarias a los oligonucleótidos de la celda de flujo donde se lleva a cabo la replicación, Figura 11 (Illumina, 2018c).

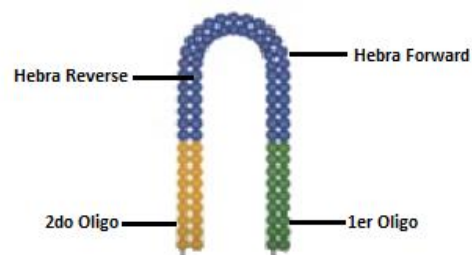
Figura 11. Esquema de los elementos que conlleva la preparación de bibliotecas de secuenciación por Illumina®.



(Illumina, 2018c)

El procedimiento de amplificación tiene como objetivo replicar isotérmicamente cada molécula de ADN presente (amplicones). Esto sucede en la celda de flujo, la cual posee canales recubiertos de dos tipos de oligos. La amplificación inicia cuando el primer oligo de la celda se une a la región complementaria de la hebra, sección marcada en verde que se muestra en la Figura 11. Una vez establecida la unión, la polimerasa sintetiza una hebra complementaria del fragmento hibridado. La doble hebra es desnaturalizada y la plantilla original es lavada. La clonación de la hebra sigue mediante el método de amplificación por puente, Figura 12. En este proceso la hebra se dobla y la región con el adaptador se hibrida con el segundo tipo de oligo, sección marcada en amarillo que se muestra en la Figura 11. Posteriormente, la polimerasa sintetiza la hebra complementaria, formando un puente de doble hebra. La doble hebra es desnaturalizada resultando en dos copias (forward y reverse) de hebra simple. Todo el proceso es repetido una y otra vez simultáneamente a lo largo de la celda, formando clústeres resultantes de la amplificación clonal de todos los fragmentos (Illumina, 2018c).

Figura 12. Método de amplificación por puente.

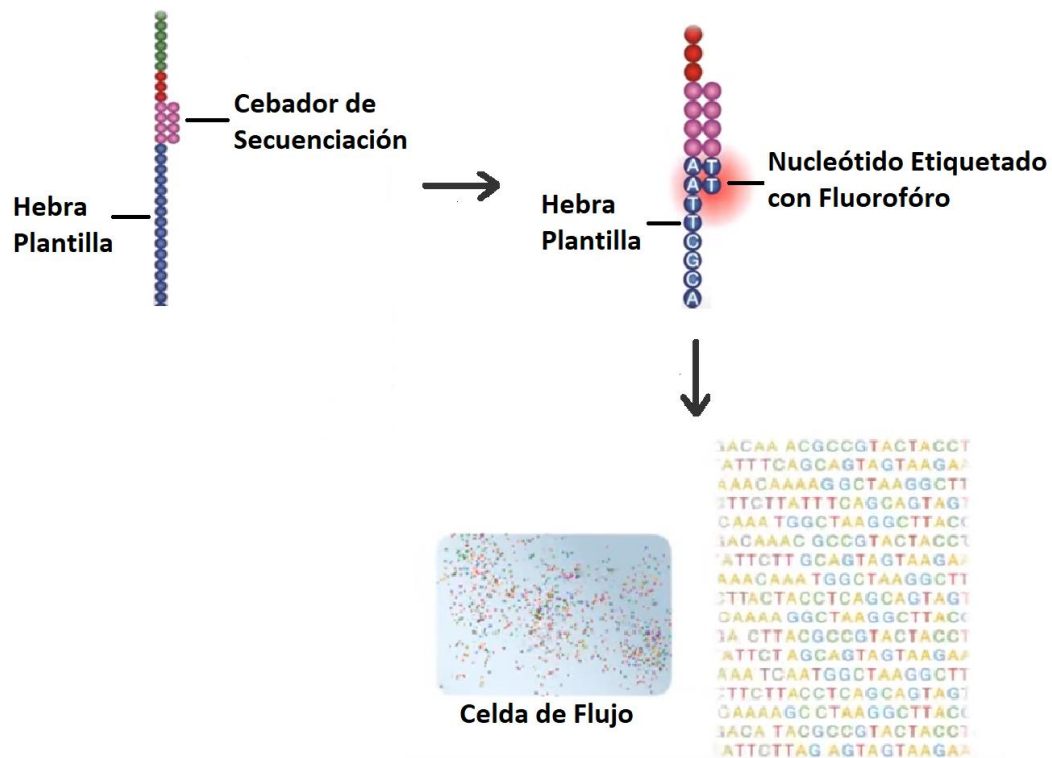


(Illumina, 2018c)

Una vez terminada la fase de amplificación, las hebras reverse son lavadas, dejando adherida a la celda únicamente las hebras forward. Las primeras tres bases nitrogenadas del cebador expuesto (extremo 3') son bloqueadas, para evitar la síntesis no deseada de una cadena de ADN. Desde este punto inicia la fase de secuenciación. Como primer paso, se da la extensión del cebador de secuenciación 1, produciendo

la primera lectura. En cada ciclo, nucleótidos etiquetados con fluorofóros únicos, compiten para seguir el patrón de apareamiento y formar la hebra complementaria. Cada vez que un nucleótido es adicionado, este se excita con una fuente de luz para emitir una señal fluorescente. Cada nucleótido emite una señal de fluorescencia distinta. La longitud de onda de emisión, junto con la intensidad de la señal, determinan la base nitrogenada y por ende la secuencia. A este proceso se le conoce como secuenciación por síntesis, y se da masivamente y en paralelo a lo largo de la celda, Figura 13 (Illumina, 2018c).

Figura 13. Método de secuenciación por síntesis.



(Illumina, 2018c)

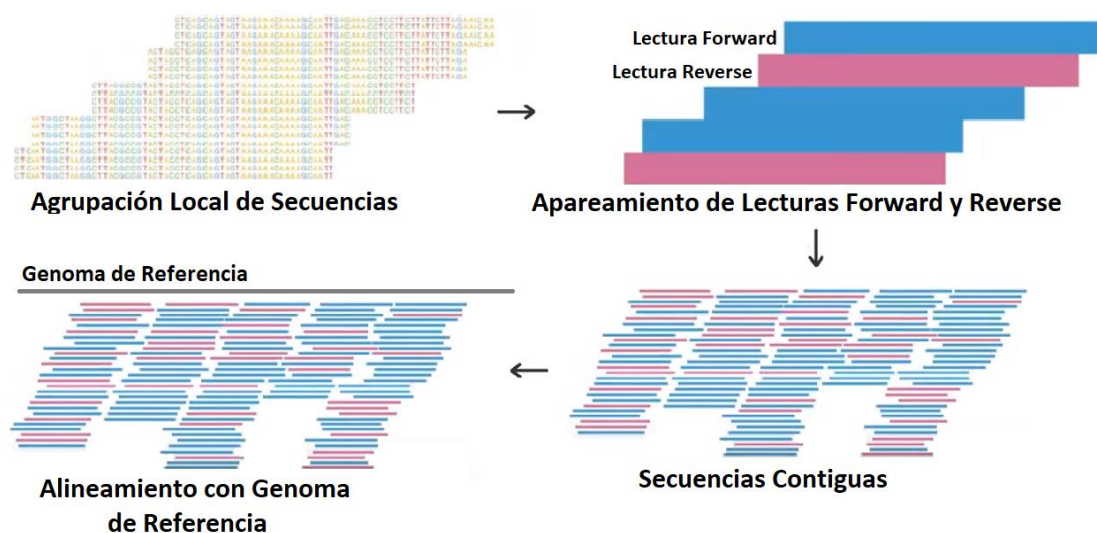
Después de completar la primera lectura, el producto de la amplificación por síntesis es lavado. Posteriormente el cebador del índice de identificación 1 es introducido e hibridado con la hebra plantilla. Esto incita a que se genere la lectura de amplificación. Después de la culminación de la lectura del índice, el producto de amplificación por síntesis es lavado y el extremo 3' de la hebra plantilla es desprotegido. Provocando que la hebra se doble e hibride con el oligo complementario de la celda de flujo. En este punto, el índice 2 es leído de la misma manera que el índice 1. Luego de la lectura del índice 2, la polimerasa sintetiza por puente la hebra reverse. La doble hebra es desnaturalizada y la hebra forward es lavada (Illumina, 2018c).

La lectura de la hebra reverse, inicia al bloquear de nuevo los extremos 3'. Luego de bloquear, se introduce los cebadores de secuenciación 2. El proceso de secuenciación por síntesis se da de la misma manera que la lectura 1, hasta que el largo deseado de la lectura es alcanzado. Todo este proceso genera millones de lecturas que representan todos los fragmentos analizados. Por ende, es necesario filtrar la

información. En el caso de secuenciación de un pool, en donde normalmente hay más de dos muestras distintas, las secuencias son separadas y agrupadas en base a los índices únicos asignados en la preparación de las muestras (Illumina, 2018c).

Para cada muestra, las lecturas con la misma secuencia de bases nitrogenadas son agrupadas localmente. Posteriormente las lecturas forward y reverse son apareadas, con el fin de crear secuencias contiguas. Las secuencias contiguas luego son alineadas al genoma de referencia, para su identificación, Figura 14. La información brindada por el extremo emparejado sirve para resolver alineamientos ambiguos. Una vez los alineamientos llegan a un consenso, el resultado es presentado, dando fin al proceso de secuenciación (Illumina, 2018c).

Figura 14. Análisis de datos generados.



(Illumina, 2018c)

b. Análisis de datos metagenómicos. Una vez que el ADN de interés es secuenciado, la gran cantidad de información generada necesita ser filtrada y organizada, para poder ser analizada e interpretada. El primer paso consiste en separar, limpiar y homogenizar las secuencias obtenidas. En la separación o filtración, las secuencias forward y reverse son separadas, seguido de su filtración y agrupamiento en base a los códigos de barras asignados. Una vez separadas y filtradas las secuencias, se continúa con la limpieza, la cual tiene como principio eliminar cebadores, secuencias redundantes y adaptadores de secuenciación y amplificación. Igualmente, se remueven las secuencias de los blancos de extracción y amplificación del grupo de secuencias de interés. El fin último es establecer un umbral en donde se asegure que únicamente las secuencias de alta calidad y sin ruido, entren a análisis. En productos de secuenciación de regiones hipervariables del gen 16S ARNr, este paso cobra mayor importancia, debido a que los algoritmos de agrupamiento han sido desarrollados para detectar pequeñas diferencias a lo largo de los amplicones. Por tanto, se ha demostrado que sacrificar secuencias con baja calidad, ha ayudado a mejorar la precisión de los análisis (Morgan y Huttenhowe, 2012; Jovel *et al.*, 2016).

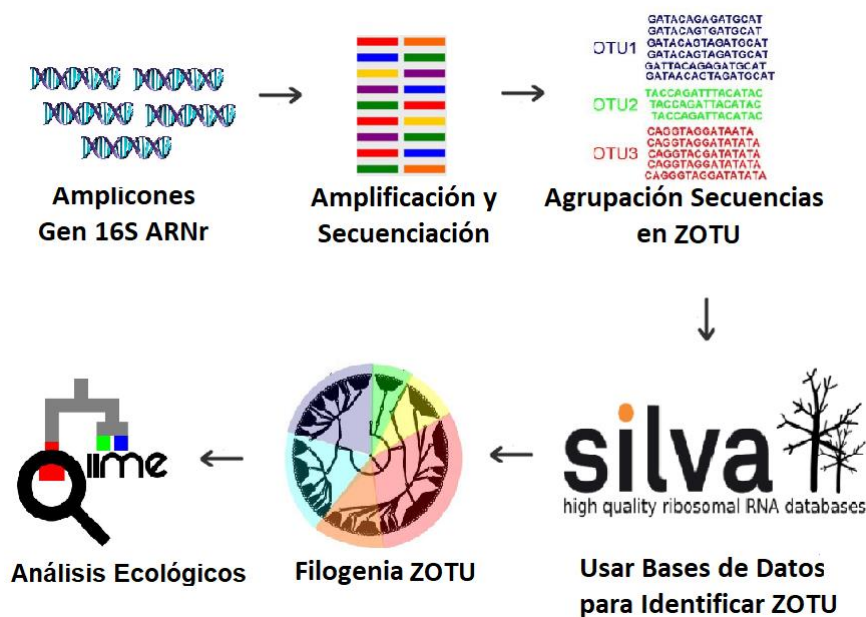
En productos resultantes de secuenciaciones en la plataforma Illumina®, se ha observado que las bases del extremo 5' de las secuencias, muestran una mayor calidad que las bases del extremo 3'. De modo que, en el proceso de limpieza, es aconsejable empezar el recorte de las secuencias en el extremo 5', Procurando dejar suficientes secuencias para llevar a cabo un análisis bioinformático competente. Igualmente, este proceso se realiza para homogenizar el largo de las secuencias que se analizarán. A fin de que los análisis filogenéticos y de diversidad se basen en las variaciones encontradas en las secuencias, y no por diferencias en el tamaño (Morgan y Huttenhove, 2012; Jovel *et al.*, 2016).

Ya que se ha terminado la limpieza y homogenización de las secuencias del gen 16S ARNr, se procede al alineamiento y agrupación de secuencias similares: binning. Debido a que el gen 16S ARNr es altamente conservado y posee regiones hipervariables que cambian en períodos cortos de tiempo (en escala evolutiva), no puede ser definido y tratado como una secuencia única. De modo que para simplificar los análisis y mejorar los resultados, se requiere un proceso de binning en las secuencias (Morgan y Huttenhower, 2012). El binning se realiza por agrupación de las secuencias en unidades taxonómicas operacionales (OTU, por sus siglas en inglés). Dicha agrupación se basa en el grado de similitud entre las secuencias bajo análisis, la cual es determinada por el porcentaje de pares de bases que se alinean (Nguyen *et al.*, 2016). El porcentaje de similitud límite que regularmente ha sido aceptado entre los pares de bases ha sido del 97%. Sin embargo, se ha comprobado que los resultados obtenidos al realizar análisis de microbiomas son más representativos cuando se utilizan ZOTUs en lugar de OTUs. Donde la diferencia principal entre estos es que, en la agrupación por ZOTUs, el porcentaje de similitud límite aceptado entre los pares de bases es del 100%. Disminuyendo así, la probabilidad que secuencias que pertenecen a diferentes taxones bacterianos, sean agrupadas a pesar de presentar desigualdad en pocos pares de bases (Edgar, 2013; Nguyen *et al.*, 2016).

Cuando las secuencias ya se encuentran agrupadas en ZOTUs, por algoritmos la secuencia más representativa es seleccionada para representar a todo el bin. Dicha secuencia toma el lugar de “especie”, por lo que permite que la microbiota bacteriana sea analizada en términos de ZOTUs (Schloss y Westcott, 2011; Tanaseichuk *et al.*, 2014). Los ZOTUs luego son comparados con bases de datos del gen 16S ARNr, como por ejemplo SILVA, para ser identificados con la mayor precisión posible (Morgan y Huttenhove, 2012).

Una vez que los ZOTUs ya han sido identificados, se procede a realizar el análisis filogenético ZOTUs, que cumplen los mismos principios que un análisis filogenético tradicional, ya que como se mencionó con anterioridad, los ZOTUs toman el lugar de “especies”. Sin embargo, la resolución de la clasificación taxonómica es baja, por lo que no es común que se llegue a clasificar hasta especie. Por ello, los árboles filogenéticos ZOTUs únicamente se utilizan para identificar los taxones bacterianos y ejecutar análisis ecológicos, y no como un resultado final. Los resultados de interés radican en describir la comunidad microbiana, empleado análisis ecológicos para representar la composición y variaciones en y entre las comunidades bacterianas bajo estudio (Caporaso *et al.*, 2011; Morgan y Huttenhove, 2012).

Figura 15. Panorama general de los pasos para análisis de microbiomas bacterianos.



(Morgan y Huttenhowe, 2012; Morgan *et al.*, 2013)

Diversos softwares se han desarrollado para manipular e interpretar los mega datos generados de secuenciaciones del gen 16S ARNr. En específico, para estudios ecológicos de microbiomas bacterianos paquetes gratuitos como USEARCH, Clustal Omega y QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), son de gran ayuda para llevar los datos crudos a resultados textuales y gráficos que ayudan a interpretar el microbioma bacteriano bajo estudio. A continuación se hace una breve descripción de la funcionalidad de cada paquete (Kuczynski *et al.*, 2011; Edgar, 2013; Sievers *et al.*, 2014).

Cuadro 2. Paquetes empelados para el análisis y procesamiento de datos crudos generados por las plataformas de NGS.

Paquete	Funcionalidad
Clustal Omega	Alineamiento de millones de secuencias con alta exactitud.
QIIME	Análisis de microbioma a partir de datos de secuenciación de ADN en bruto. Desde un enfoque ecológico y estadístico.
USEARCH	Agrupación de las secuencias en unidades taxonómicas operacionales, en base a predicciones precisas.

(Kuczynski *et al.*, 2011; Edgar, 2013; Sievers *et al.*, 2014)

QIIME es un programa basado en la plataforma LINUX que emplea un lenguaje de programación basado en Python. Los principales comandos utilizados para filtrar, ordenar, analizar y representar los resultados se muestran y describen en el Cuadro 3. El orden (sugerido) en cómo se presenta los comandos, va acorde al pipeline cronológico a seguir para realizar análisis ecológico explorativos de un microbioma en específico. Los argumentos [Requeridos] son obligatorios para que el comando ejecute. Los

argumentos [Opcionales] son elegidos según la conveniencia en la que se desea analizar y representar los datos (Caporaso *et al.*, 2010).

Cuadro 3. Descripción de los principales scripts QIIME requeridos para llevar a cabo el análisis bioinformático.

Script	Argumentos	Descripción	Output
\$validate_mapping_file.py	[Requeridos] -m, indica la ruta donde están los metadatos.	Revisa que los metadatos, previamente ordénalos en un archivo de mapeo, no presenten errores y el formato sea válido para poder ser procesado en la plataforma.	Archivo con el registro de los cambios, archivo en formato html y un archivo con las correcciones (si aplica).
\$add_qiime_labels.py	[Requeridos] -m, indica el archivo mapa a trabajar. -i, directorio de los archivos fasta (secuencias) que se van a rotular. -c, especifica la columna, en el archivo mapa, que posee el nombre de los archivos fasta. [Opcional] -o, permite indicar la ruta donde se desea guardar el archivo mapa ya rotulado.	Toma el archivo mapa, el directorio donde se encuentran los archivos fasta de las secuencias y el nombre de la columna, en el archivo mapa, donde están los nombres de los archivos fasta. Combina toda la información, para generar un solo archivo fasta con todas las secuencias con sus respectivas etiquetas QIIME.	Archivo fasta combinado: todas las secuencias con sus respectivas etiquetas QIIME.
\$pick_otus.py	[Requeridos] -i, indica ruta y archivo donde se encuentran las secuencias de entrada. [Opcional] -m, establece el método, múltiples opciones a elegir, que se utilizara para generar los OTUs. -z, le indica al comando que	Agrupar las secuencias en unidades taxonómicas operacionales (OTU).	Se generan dos archivos, uno en formato de texto con una matriz que indica el número de clúster generados y las secuencias que conforman cada agrupación. Y otro archivo que indica los parámetros que el script uso para generar los OTUs.

Script	Argumentos	Descripción	Output
	incluya la secuencia reverse en la generación de los OTUs.		
\$pick_rep_set.py	<p>[Requeridos]</p> <p>-i, indica ruta para el archivo OTU que se usara como input.</p> <p>[Opcional]</p> <p>-f, indica ruta para ingresar al archivo fasta de las secuencias.</p> <p>-m, establece el método, múltiples opciones a elegir, que se utilizara para elegir los sets representativos.</p> <p>-o, permite brindar un nombre específico al archivo generado como output.</p>	Elige un set de secuencias representativas.	Archivo fasta que contiene una secuencias representativa para cada OTU.
\$align_seqs.py	<p>[Requeridos]</p> <p>-i, indica ruta para el archivo input.</p> <p>[Opcional]</p> <p>-t, indica ruta de archivo plantilla que se usara para la alineación.</p> <p>-o, indica ruta donde se desea almacenara el archivo con los resultados.</p> <p>-m, establece el método, múltiples opciones a elegir, que se utilizara para generar alinear las secuencias.</p>	Alinea las secuencias representativas (de cada OTU) con una base de datos.	Tres archivos: archivo fasta con las secuencias alineadas, archivo fasta con las secuencias que no cumplieron con todos los criterios y un archivo de texto con resultados complementarios (ej. porcentaje de identidad).
\$make_phylogeny.py	<p>[Requeridos]</p> <p>-i, indica ruta para el archivo input.</p>	Genera el árbol filogenético, a partir de alineamientos	Un archivo en formato Newick (.tre) que contiene el árbol

Script	Argumentos	Descripción	Output
	<p>[Opcional]</p> <p>-t, establece el método, múltiples opciones a elegir, que se utilizara para construir el árbol filogenético.</p> <p>-o, permite indicar la ruta donde se desea guardar el resultado, árbol filogenético.</p>	múltiples, que relaciona los OTUs. Utiliza FastTree por defecto.	filogenético generado.
\$assign_taxonomy.py	<p>[Requeridos]</p> <p>-i, indica ruta para el archivo input.</p> <p>[Opcional]</p> <p>-t, indica la ruta donde se encuentra el archivo con las secuencias de mapeo para asignar la taxonomía.</p> <p>-r, indica ruta donde se encuentra las secuencias referencia. Sacadas de SILVA.</p> <p>-o, permite indicar la ruta donde se desea guardar el resultado.</p>	Asigna la taxonomía a cada secuencia del árbol filogenético, mediante múltiples métodos (ej. BLAST, RDP, uclust, etc).	Genera 2 archivos. El primero con la información del linaje de cada secuencia. El segundo es un archivo conflicto, que contiene aquellos desacuerdos de asignación taxonómica.
\$make_otu_table.py	<p>[Requeridos]</p> <p>-i, indica ruta para el archivo input, mapa OTU.</p> <p>-o, permite indicar en que formato se desea el output de la tabla OTU (.biom).</p> <p>[Opcional]</p> <p>-t, indica la ruta donde se</p>	Indica el número de veces que un OTU, taxonómicamente identificado, aparece en los diferentes grupos de muestras analizadas.	Genera un archivo en formato biom, donde las columnas corresponden a las muestras y las filas a los OTUs.

Script	Argumentos	Descripción	Output
	<p>encuentran las secuencias con sus asignaciones taxonómicas.</p> <p>-m, indica archivo de mapeo, los metadatos.</p>		
\$summarize_taxa_through_plots.py	<p>[Requeridos]</p> <p>-i, indica ruta para el archivo input, tabla OTU.</p> <p>-o, permite indicar el directorio donde se desea el archivo output.</p> <p>[Opcional]</p> <p>-m, indica la ruta para el archivo mapa.</p>	Resume el análisis taxonómico en tablas y gráficas.	El resultado es un folder que contiene los archivos con el resumen taxonómico.
\$alpha_diversity.py	<p>[Requeridos]</p> <p>-i, indica la ruta de la tabla OTU o el directorio input.</p> <p>-o, permite indicar el directorio donde se desea el archivo output.</p> <p>[Opcional]</p> <p>-m, permite indicar las métricas de la diversidad alfa que se desean analizar (ej. Chao1).</p>	Calcula la diversidad alfa, empleando diversas métricas, de cada muestra estudiada. Se basa en una tabla OTU.	Los archivos resultantes son dados en una tabla en formato de texto, con las métricas de la diversidad alfa que se analizaron.
\$beta_diversity_through_plots.py	<p>[Requeridos]</p> <p>-i, indica la ruta de la información input.</p> <p>-m, indica la ruta al archivo mapa.</p> <p>-o, permite indicar el directorio donde se desea el archivo output.</p>	Calcula la diversidad beta a través de matrices de distancia y gráficas PCoA.	Un archivo de matriz de distancia y un archivo con la gráfica PCoA.

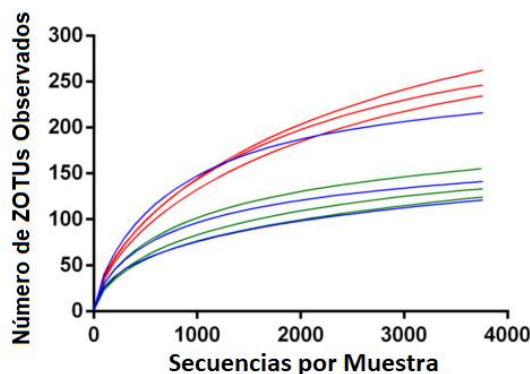
Script	Argumentos	Descripción	Output
	[Opcional]		
	-t, indica la ruta al archivo del árbol filogenético. Esto aplica si se desea una medida filogenética.		
	-e, permite indicar la profundidad de cobertura, homogeniza el muestreo.		

*Debido a que los comandos que maneja QIIME, únicamente la descripción OTUs es aceptada, no se hace referencia a ZOTUs. Sin embargo, como en el presente estudio se implementaron ZOTUs, todo lo referido a OTUs es equivalente a ZOTUs (Caporaso *et al.*, 2010).

c. Ecología de comunidades microbianas. Una vez que la microbiota bacteriana de un área, tejido u órgano específico es caracterizada, lo que prosigue en estudios metagenómicos de microbiomas, es realizar análisis ecológicos de comunidades microbianas. A fin de poder describir la composición y dinámica ecológica del microbioma en y entre las muestras bajo estudio. Logrando así correlacionar el comportamiento ecológico del microbioma con el problema de estudio en cuestión (Morgan y Huttenhowe, 2012; Bledsoe *et al.*, 2016).

Para asegurar que la inferencia en la descripción sea asertiva, previo a cualquier análisis, se debe de verificar que el proceso de secuenciación fue suficiente para captar, de manera general, la riqueza bacteriana del área estudiada. Esto se consigue a través de análisis de rarefacción, los cuales grafican el número de ZOTUs generados en función del número de secuencias analizadas, por grupo de muestras evaluadas. Representando los resultados mediante curvas de rarefacción, Figura 16. El resultado deseado es aquel donde gráficamente se observa que la fase plateau es alcanzada hasta cubrir la mayor parte de secuencias generadas por muestra. Mostrando que el esfuerzo de secuenciación fue suficiente para captar la diversidad microbiana en las muestras evaluadas y por ende, las estimaciones inferidas por los análisis correspondientes serán precisas (Akorli *et al.*, 2016; Ben Guerrero *et al.*, 2016; Bahrndorff *et al.*, 2017).

Figura 16. Curva de rarefacción.

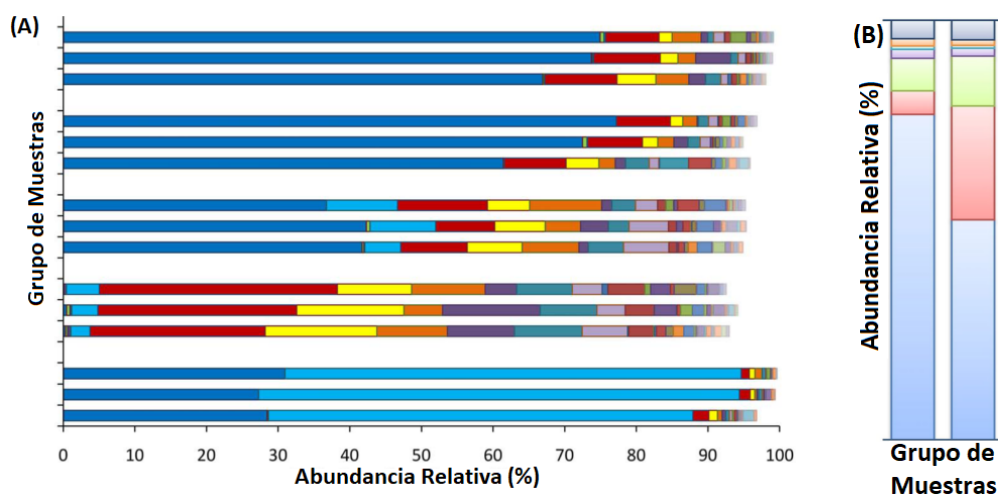


(Ben Guerrero *et al.*, 2016)

Como primer acercamiento para describir la composición y dinámica ecológica del microbioma, se realizan análisis de abundancia relativa. El objetivo del análisis es evaluar qué tan común o escasa es una especie con respecto al total de especies encontradas en un área definida. Los resultados son representados a través de gráfico de barras horizontal o vertical, que muestra la composición porcentual de las especies bacterianas encontradas por muestra, en relación con el total de especies identificadas en la comunidad delimitada por el estudio, Figura 17. Los gráficos se leen de izquierda a derecha en formato horizontal y de arriba hacia abajo en formato vertical. Por la simplicidad de la presentación de los resultados, permite dar una idea previa de composición y variación de la microbiota bacteriana evaluada en una población o entre poblaciones (Groves, 2018). El paso siguiente, es complementar los resultados con análisis de diversidad, los cuales utilizan algoritmos más complejos que ayudan a validar qué tan fiel es la representación de la abundancia relativa en cuanto a la composición de la microbiota.

Figura 17. Formatos gráficos para representar la abundancia relativa.

(A) Formato horizontal y (B) formato vertical. Los colores que seccionan cada una de las barras en los gráficos mostrados, representan cada taxón bacteriano identificado en la población bajo estudio.



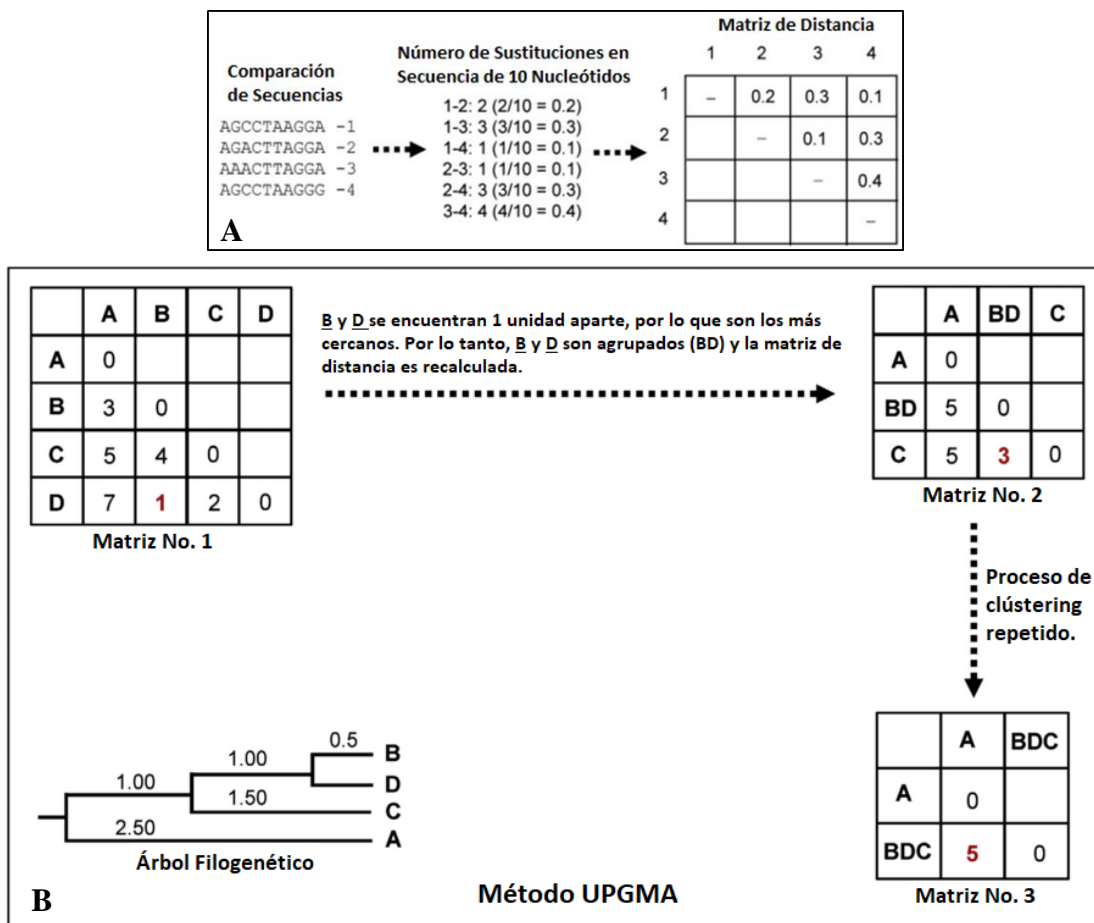
(Boissière *et al.*, 2012; Dada *et al.*, 2018)

La diversidad puede ser medida en y entre las muestras bajo estudio, diversidad alfa y beta correspondientemente (Morgan *et al.*, 2012). Cuando la diversidad se desea determinar en una sola población, alfa, generalmente se utilizan los índices de Shannon/Simpson, diversidad filogenética y ZOTUs observados. El índice de Shannon es sensible a la riqueza entre especies, por lo que le da un peso mayor a los ZOTUs con menor representación o raros. Lanza un valor que aumenta a medida que aumenta la riqueza y la uniformidad de la comunidad. Por otro lado, el índice de Simpson es sensible a la uniformidad de especies, por lo que le da un peso mayor a los ZOTUs dominantes. Los índices están entre los rangos de 0 a 1, los valores más cercanos a 1 indican mayor diversidad y viceversa (Jost, 2007a; Budka *et al.*, 2018; Veech, 2018).

La diversidad alfa también puede ser medida a partir de análisis filogenéticos, implementando la métrica diversidad filogenética. Esta medida de diversidad incorpora patrones de transmisión de genes entre diferentes taxones, para medir las diferencias entre las especies. Es determinada mediante la suma de las distancias que existen entre dos nodos de los diferentes clados, representados por un árbol filogenético. Un valor grande de diversidad filogenética corresponde a una mayor diversidad y viceversa (Faith y Baker, 2006). Por último, la diversidad alfa puede ser medida por el número de ZOTUs observados, entre mayor sea el número observado, mayor es la diversidad en el grupo de estudio (Kuczynski *et al.*, 2011). Debido a que los cuatro parámetros de análisis determinan la diversidad de una población (alfa) a partir de dos diferentes enfoques, los tres son incluidos con regularidad en publicaciones. Ayudando a brindar un panorama descriptivo de la riqueza y la uniformidad de los taxones que se esperan dentro de una sola población.

En lo que concierne con la diversidad beta, esta es aplicada cuando se desea evaluar la diversidad entre muestras. En términos simples, es una medida del recambio de especies entre comunidades o paisajes diferentes (Whittaker, 1960). Entre las opciones para determinar la diversidad beta, se encuentra la agrupación UPGMA y el algoritmo UniFrac repesado. La agrupación por grupo de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA, por sus siglas en inglés) es un método basado en la distancia evolutiva entre cada par de secuencias, basándose en la cantidad de nucleótidos que difieren entre estas. UPGMA emplea un clústering secuencial, en donde las secuencias son comparadas mediante una alineación. El resultado de dicha comparación es presentado como una matriz de distancia que puede ser representada por un dendograma o árbol circular. Aquellas secuencias que presentan la distancia más pequeña entre ellas se agrupan como una sola (clúster), generando otra matriz en donde se recalcula la distancia de la agrupación generada contra el resto de secuencias, Figura 18. El proceso de comparación y agrupación de secuencias se repite hasta que todas las secuencias hayan sido incluidas en un clúster, asumiendo que la sustitución de bases es constante a lo largo del tiempo y linajes (Weiß y Göker, 2011).

Figura 18. Ejemplificación del método de construcción del árbol filogenético basado en distancia evolutiva. (A) Ejemplifica el principio por el cual se basa la formación de las matrices y (B) ejemplifica el principio del clústering secuencial que emplea el método UPGMA.



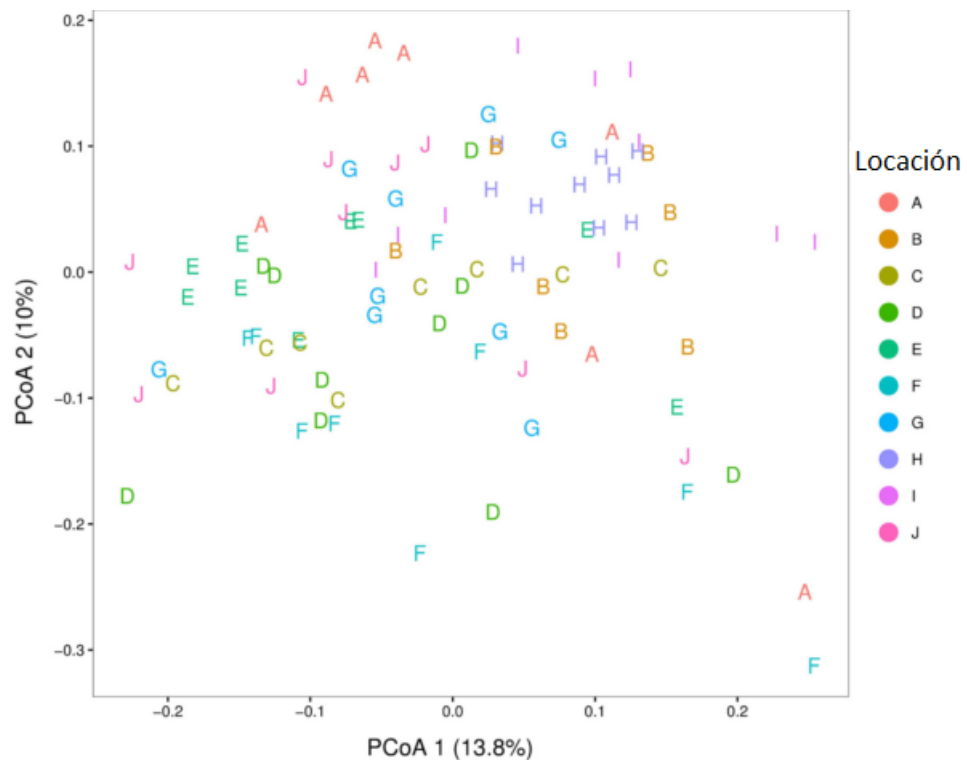
(Choudhuri, 2014)

Por otro lado, el algoritmo UniFrac repesado es una Matriz de distancia que integra información filogenética para calcular la diversidad beta. Revela la diferencia entre comunidades debido a cambios en la abundancia relativa de los taxones bacterianos detectados (Lozupone *et al.*, 2011). La estimación de la precisión del cálculo de diversidad es determinada con el método estadístico no paramétrico jackknife, el cual realiza el proceso de remuestreo de manera sistemática y sin modificar los datos. Elimina un taxón de la matriz de datos original, reduciéndola. Por ende, para una muestra con n cantidad de taxones, $n - 1$ cantidad de subconjuntos se pueden obtener. En base a esto, construye un árbol filogenético para cada n subconjunto creado, a los cuales se les denomina árboles jackknife. Cada uno de los árboles jackknife son comparados con el árbol original que contiene todos los taxones. Luego de repetir la comparación cientos de veces, se combinan las observaciones para generar un consenso estricto. El cual identifica las áreas topológicas en las que se observó acuerdos o desacuerdos, determinando así la información genética a tomar en cuenta para calcular la diversidad (Lapointe *et al.*, 1994).

Los resultados de UniFrac repesado se presentan en una matriz de distancia que se visualiza normalmente a través de una gráfica de análisis de coordenadas principales (PCoA). La representación

gráfica de la matriz de disimilitud permite ver las diferencias entre las comunidades microbianas y su estructura, al resumir la variabilidad del conjunto de datos en un espacio Euclidiano de baja dimensión (2D), Figura 19. Al igual que en cualquier análisis gráfico, PCoA produce un conjunto de ejes ortogonales que resumen la variabilidad que existe en el set de datos. Los ejes se caracterizan por tener un valor eigen, cuya magnitud indica la variación que es capturada por cada eje. Se espera que un PCoA genere ejes (de 2 a 3) con valores eigen que capturen por arriba del 50% de la variación de los datos input. Con una buena representación de los datos, la interpretación de los resultados es simple, entre más cerca estén los objetos ordenados en el espacio 2D o 3D más similares son y viceversa (Zuur *et al.*, 2007).

Figura 19. Análisis de coordenadas principales.



(Bahrndorff *et al.*, 2017)

Si bien los resultados que lanzan los diversos medidores de diversidad ecológica, presentan una inferencia clara de cómo el microbioma bacteriano se comporta, para poder realizar deducciones entre las poblaciones estudiadas y determinar si lo que se observa es significativo para ejecutar una conclusión, es necesario implementar estadística. Sin embargo, previo a cualquier análisis es imperativo que se verifiquen los supuestos para determinar si la estadística a aplicar será paramétrica o no paramétrica. Entre los supuestos está: la distribución de los datos, independencia entre los datos y homogeneidad de las varianzas. Es común que al evaluar datos de microbiomas, los supuestos indiquen que se trata de datos no paramétricos y por ende se aplique estadística acoplada a dicho comportamiento (Wang, 1986; Buttigieg y Rematte, 2014). A continuación, se muestra un cuadro con las pruebas estadísticas implementadas para calificar el comportamiento de los datos y determinar el nivel de significancia de las pruebas ecológicas aplicadas.

Cuadro 4. Análisis estadísticos reportados con frecuencia en literatura con enfoque a estudio de microbiomas bacterianos.

Análisis estadístico aplicado	Objetivo del análisis	Tipo de representación de los resultados	Referencia
ADONIS	Análisis de varianza usando matrices de distancia. Las cuales determinan la significancia de cada variable explicativa en la distribución de las familias bacterianas.	Arroja un valor- <i>p</i> que indica, en un alfa de 0.05, si la agrupación de muestras por individuo es estadísticamente significativa. Si el valor- <i>p</i> <0.05, se concluye que variables explicativas como: sitios de crianza y localidades, tienen un efecto significativo en la distribución de las familias de bacterias.	(Caporaso <i>et al.</i> , 2010)
Prueba de Mann-Whitney	Determina una correlación entre dos variables, una cuantitativa y otra cualitativa. Estas variables deben ser independientes una de la otra.	Si el valor- <i>p</i> es mayor a 0.05, se acepta la hipótesis nula y viceversa para rechazarla. La H_0 indica que la mediana de las dos muestras son idénticas, es decir que no hay una diferencia significativa entre las variables que se están estudiando.	(McDonald <i>et al.</i> , 2014)
Prueba Kruskal-Wallis	Prueba si los rangos medios de los grupos son significativamente diferentes. Se realiza entre variables nominales y variables cuantitativas. No requiere supuestos de varianzas iguales.	Arroja un valor- <i>p</i> . Si el valor- <i>p</i> es menor a 0.05, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que hay una diferencia significativa entre los grupos evaluados.	(McDonald <i>et al.</i> , 2014)

V. HIPÓTESIS

Hi: existe diferencia entre la microbiota del tracto digestivo de una muestra de campo y dos cepas de laboratorio, una susceptible y una resistente a deltametrina, de adultos hembras *An. albimanus*.

Ho: no existe diferencia entre la microbiota del tracto digestivo de una muestra de campo y dos cepas de laboratorio, una susceptible y una resistente a deltametrina, de adultos hembras *An. albimanus*.

VI. METODOLOGÍA

A. Enfoque de la investigación

La presente investigación posee un enfoque cuantitativo.

B. Alcance de la investigación

Debido a que la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras *An. albimanus* es un tema que ha sido poco estudiado y del cual no se dispone mucha información, la presente investigación posee un alcance exploratorio y descriptivo.

C. Diseño de investigación

La investigación realizada posee un diseño no experimental transversal, ya que no se hicieron variar de forma intencional las variables independientes para evaluar su efecto en las variables dependientes. La inferencia sobre las relaciones entre las variables se realizó sin intervención e influencia directa, donde las relaciones fueron observadas como suceden en su contexto natural.

D. Tiempo y lugar de la investigación

La investigación se llevó a cabo en la Universidad del Valle de Guatemala - Guatemala, específicamente en la Unidad de Malaria del Centro de Estudios en Salud, y en el departamento de Ecología del Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley – California, Estados Unidos. El período de tiempo que se utilizó para cumplir los objetivos, inicio en julio del 2017 y culminó mayo del 2018.

E. Recursos humanos

Las personas que asesoraron el desarrollo de la presente investigación fueron Pamela Pennigton – PhD, del departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala - Guatemala; y Javier Ceja Navarro - PhD, del departamento de ecología del Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley – California, Estados Unidos.

F. Muestras

Las cepas de laboratorio: una resistente (RDelta, establecida en 2011) y una susceptible a deltametrina (Sanarate, establecida en 1987), fueron obtenidas del insectario del Centro de Estudios Salud de la Universidad de Guatemala. La cepa resistente utilizada fue la filial 88, hijos de hembras y machos (filial 87) sobrevivientes a una exposición de 8.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 2.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de deltametrina, correspondientemente.

Figura 20. Ejemplo del tipo de criadero, noria, donde se realizo la colecta de los ejemplares de campo.

La noria mostrada se encuentra dentro de un parcelamiento de caña de azúcar, ubicada en la comunidad Las Cruces – municipio La Gomera.



(Lopez, 2016)

Las muestras de campo fueron colectadas de norias, Figura 20. Caracterizadas por ser cuerpos de agua sin movimiento que se alimentan de filtraciones de cauces naturales y/o precipitaciones pluviales, empleadas para riego de las plantaciones de azúcar. El método de muestreo estándar aplicado fue la técnica dipping según (O'Malley, 1995). El muestreo se realizó en las comunidades Las Cruces (Latitud: 14.12° N, Longitud: -91.15° E), donde se reportado resistencia, y El Terrero (Latitud: 14.07° N, Longitud: -91.02° E). Ubicadas en el municipio La Gomera, dentro del departamento de Escuintla, región sur-central de la República de Guatemala. A continuación, se muestra un cuadro en donde se especifica la localidad de colecta por muestra.

Cuadro 5. Descripción de fecha y sitio de colecta de las muestras de campo utilizadas en el presente estudio.

ID de la muestra	Fecha de colecta	Localidad
WDT_2.1	19 octubre 2017	El Terrero
WDT_2.2	19 octubre 2017	El Terrero
WDT_2.3	19 octubre 2017	El Terrero
WDT_2.4	19 octubre 2017	El Terrero
WDT_2.5	19 octubre 2017	El Terrero
WDT_2.8	19 octubre 2017	El Terrero
WDT_2.10	19 octubre 2017	El Terrero
WDT_2.12	18 octubre 2017	Las Cruces
WDT_2.13	18 octubre 2017	Las Cruces
WDT_2.14	18 octubre 2017	Las Cruces
WDT_2.15	18 octubre 2017	Las Cruces
WDT_2.17	18 octubre 2017	Las Cruces
WDT_2.18	21 de octubre 2017	El Terrero
WDT_2.20	21 de octubre 2017	El Terrero
WDT_2.21	21 de octubre 2017	Las Cruces

G. Variables

El presente cuadro explica con detalle la naturaleza, interrelación y nivel de medición de las variables de interés para el estudio.

Cuadro 6. Variables de estudio de principal interés en la investigación.

Variable	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Interrelación	Forma en la que se medirá o determinará
Resistencia	Capacidad de un insecto de tolerar los efectos causados por los químicos activos de los insecticidas mediante mutaciones generadas a través de la selección natural.	Cualitativa	Nominal	Independiente	Resistente y susceptible.
Concentración de ADN genómico	Cantidad de ADN genómico presente en un determinado volumen. Normalmente es medido mediante espectrofotometría o fluorescencia.	Cuantitativa	Razón	Dependiente	ng/ μ L
ZOTUs	Agrupación que se basa en el grado de similitud entre	Cuantitativa	Razón	Dependiente	Número de ZOTUs generados por número de

Variable	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Interrelación	Forma en la que se medirá o determinará
	las secuencias bajo análisis, la cual es determinada por el porcentaje de pares de bases que se alinean.				secuencias. Determinado por análisis de rarefacción.
Taxones bacterianos	Agrupamiento de organismos basado en relaciones evolutivas.	Cualitativa	Nominal	Dependiente	Análisis filogenético
Abundancia relativa	Proporción calculada en base a los individuos de una especie en específico, respecto a la población total.	Cuantitativa	Razón	Dependiente	Porcentaje (%)
Índice de Shannon	Índice que caracteriza la diversidad de especies en una comunidad en particular. Le da un peso mayor a los ZOTUs “extraños” (con menor representación).	Cuantitativa	Razón	Dependiente	Valor menor a 4, que indica el grado de diversidad.
Índice de Simpson	Índice que caracteriza la diversidad de especies en una comunidad en particular. Le da un peso mayor a los ZOTU dominantes.	Cuantitativa	Intervalo	Dependiente	Valor entre 0 y 1, que indica el grado de diversidad.
Diversidad filogenética	Medida de diversidad incorpora patrones de transmisión de genes entre diferentes taxones, para medir las diferencias entre las especies.	Cuantitativa	Razón	Dependiente	Valor decimal que indica el grado de diversidad.
Diversidad beta	Medida del recambio de especies entre comunidades o	Cuantitativa	Intervalo	Dependiente	UniFrac repesado

Variable	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Interrelación	Forma en la que se medirá o determinará
	paisajes diferentes.				

H. Viabilidad

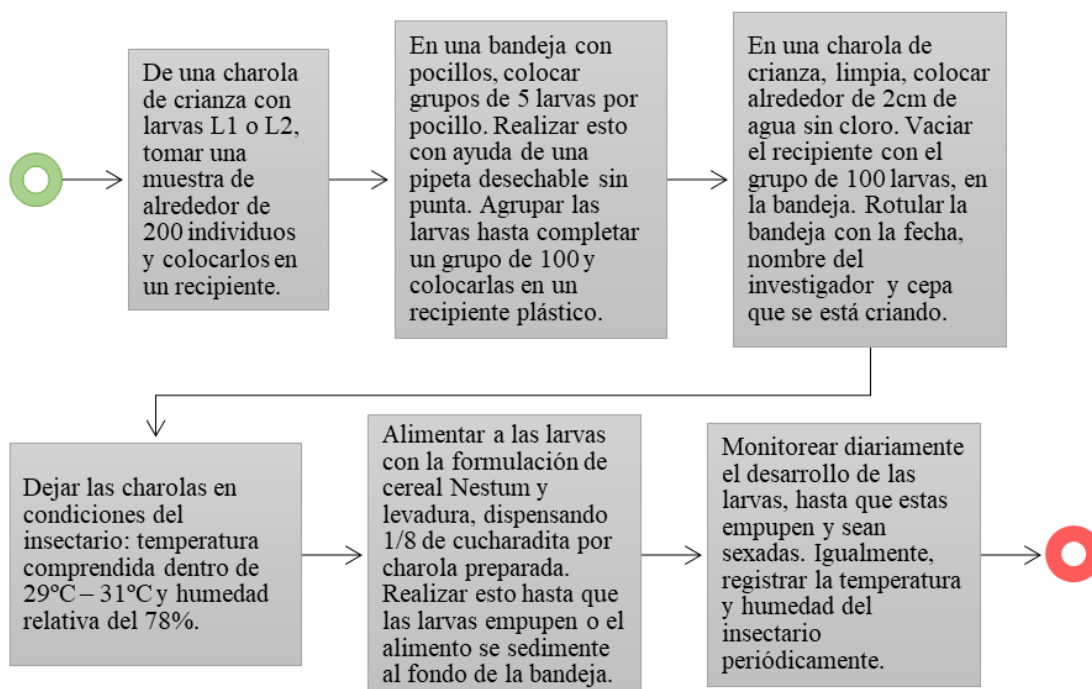
La investigación fue cofinanciada bajo el programa de Enfermedades Parasitarias Transmitidas por Vectores, la cual está a cargo de Norma Padilla – PhD y el departamento de Ecología del Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley, a cargo de Javier Ceja Navarro - PhD. Desarrollándose en la Universidad del Valle de Guatemala, en los laboratorios del Centro de Estudios en Salud – Unidad de Malaria; y en el departamento de Ecología del Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley. El análisis de resultados se llevó a cabo de forma colaborativa entre la Unidad de Malaria y Javier Ceja-Navarro.

I. Metodología

1. *Crianza An. albimanus*. La crianza de las dos cepas de laboratorio: una resistente (RDelta) y una susceptible (Sanarate) a deltametrina, se llevó a cabo en el insectario del Centro de Estudios en Salud. El cual posee una temperatura comprendida dentro de 29°C – 31°C y a una humedad relativa del 78%, con períodos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno. Para el proceso se utilizaron charolas de 34.5cm X 25.6cm, con alrededor de 2cm de agua libre de cloro. En ellas se depositaron 100 larvas por bandeja, de estadio larval 1 o estadio larval 2. Las cepas fueron trabajadas en diferente tiempo, para asegurar que la cepa susceptible no fuera contaminada por ejemplares de la cepa resistente y viceversa.

El alimento brindado fue a base de una mezcla de 25g de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) comercial marca Levaduras Industriales del Golfo S.A. y 75g de cereal marca NESTUM 5 cereales (<https://www.comienzosano.cl/cereal-nestumr-5-cereales#>). La alimentación se realizó periódicamente dispensando 1/8 de cucharadita por bandeja, hasta que las larvas empuparan o el alimento se sedimentara en el fondo de la bandeja. Para mayor claridad del flujo de trabajo, a continuación, se presenta un diagrama con los puntos importantes.

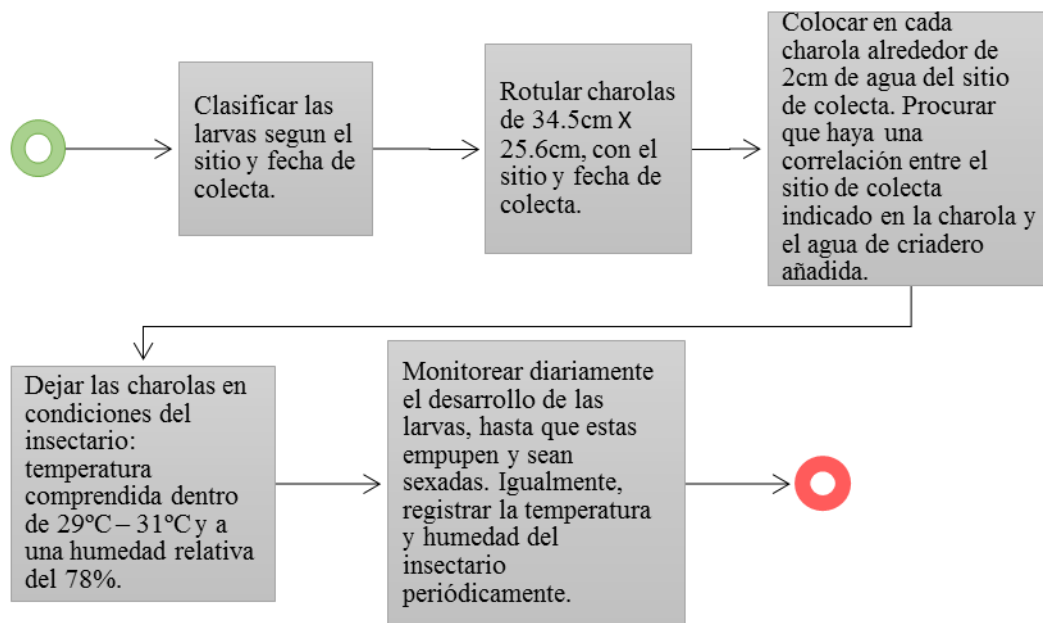
Figura 21. Procedimiento crianza cepa resistente y cepa susceptible a deltametrina.



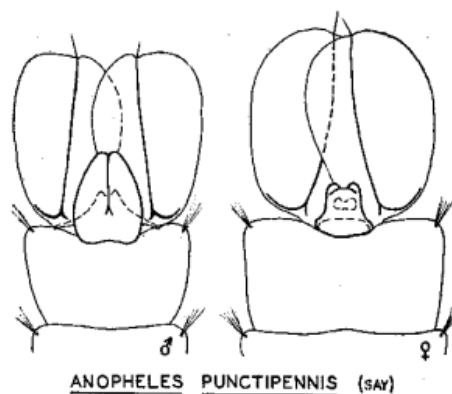
En el caso de la muestra de campo, la crianza se realizó a partir de una colecta constituida por ejemplares en estadio larval 3 y 4. Las larvas fueron clasificadas y colocadas en charolas de 34.5cm X 25.6cm, según el sitio y fecha de colecta. A cada charola se le agregó alrededor de 2cm de agua del sitio de colecta. Posteriormente todas las charolas fueron colocadas en el insectario del Centro de Estudios en Salud, para inducir la transición al estado de pupa.

Durante el proceso de crianza, las larvas no fueron alimentadas con la formulación utilizada para la crianza de la cepa susceptible y la cepa resistente a deltametrina. En cambio, se dejó que la alimentación fuera obtenida a partir de los microorganismos y nutrientes disponibles en el agua del sitio de colecta. Para mayor claridad del flujo de trabajo a continuación, se presenta un diagrama con los puntos importantes.

Figura 22. Procedimiento crianza muestra de campo.



2. Sexado de pupas *An. albimanus*. Las pupas obtenidas del proceso de crianza, fueron colocadas en una caja Petri y posteriormente bajo el estereoscopio. Con ayuda de un pincel, se observó la bolsa genital. Las hembras poseían bolsa genital pequeña con terminación puntiaguda, mientras que los machos poseían bolsa genital alargada con una terminación circular, Figura 23. Según esta característica morfológica, se separaron hembras de machos.

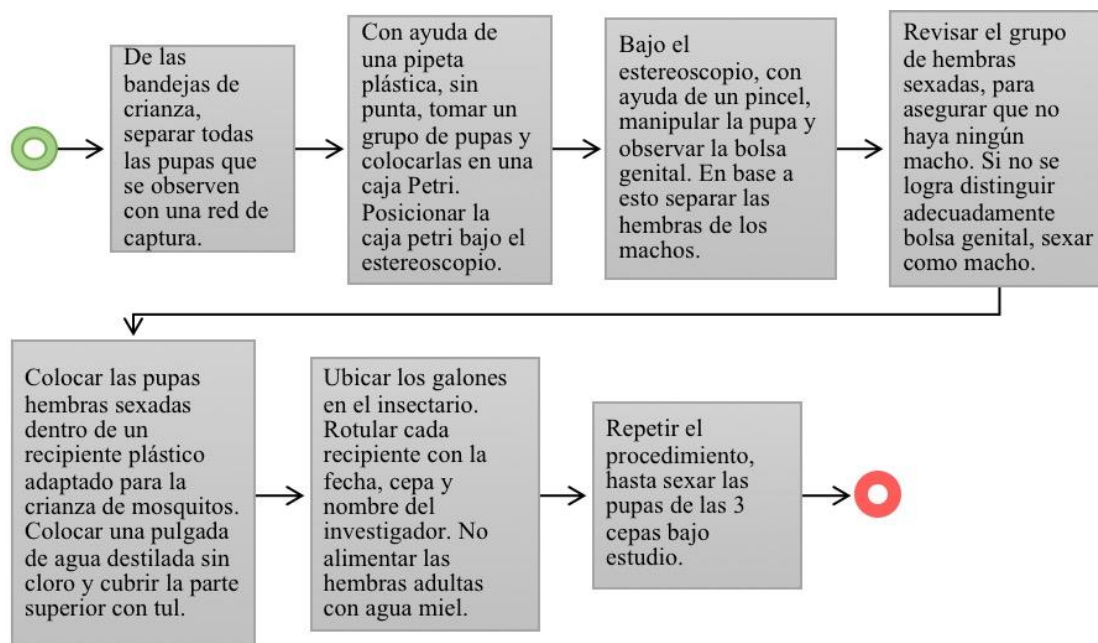
Figura 23. Morfología de la bolsa genital de *An. punctipennis*.

(Moorefield, 1951)

Un total de 30 pupas hembras, fueron colocadas dentro de galones de plástico adaptado para la crianza de mosquitos. Cada galón fue llenado con una pulgada de agua destilada sin cloro y cubierta con tul. Para permitir la eclosión de las pupas, los galones fueron colocados en el insectario del Centro de Estudios en Salud. Las hembras *An. albimanus* adultas no fueron alimentadas con agua miel.

El procedimiento fue realizado para las pupas de la muestra de campo y las pupas de las dos cepas de laboratorio: una resistente y una susceptible a deltametrina. Trabajando cada cepa por separado, para evitar mezclas entre estas. Para mayor claridad del flujo de trabajo a continuación, se presenta un diagrama con los puntos importantes.

Figura 24. Procedimiento de sexado pupas.



3. **Diseccción del tracto digestivo de *An. albimanus*.** Previo a realizar la diseccción de hembras vírgenes de 2 días de edad adulta, todo el material utilizado para la diseccción fue autoclaveado. El material que no era apto para soportar temperaturas y presiones altas, fue sometido a tratamientos de UV y esterilización con cloro y etanol. La elaboración de las soluciones desinfectantes y buffer de fosfatos en solución salina (PBS) 1X, se realizó junto con la preparación del material. Especificaciones de las recetas, adjuntas en anexos.

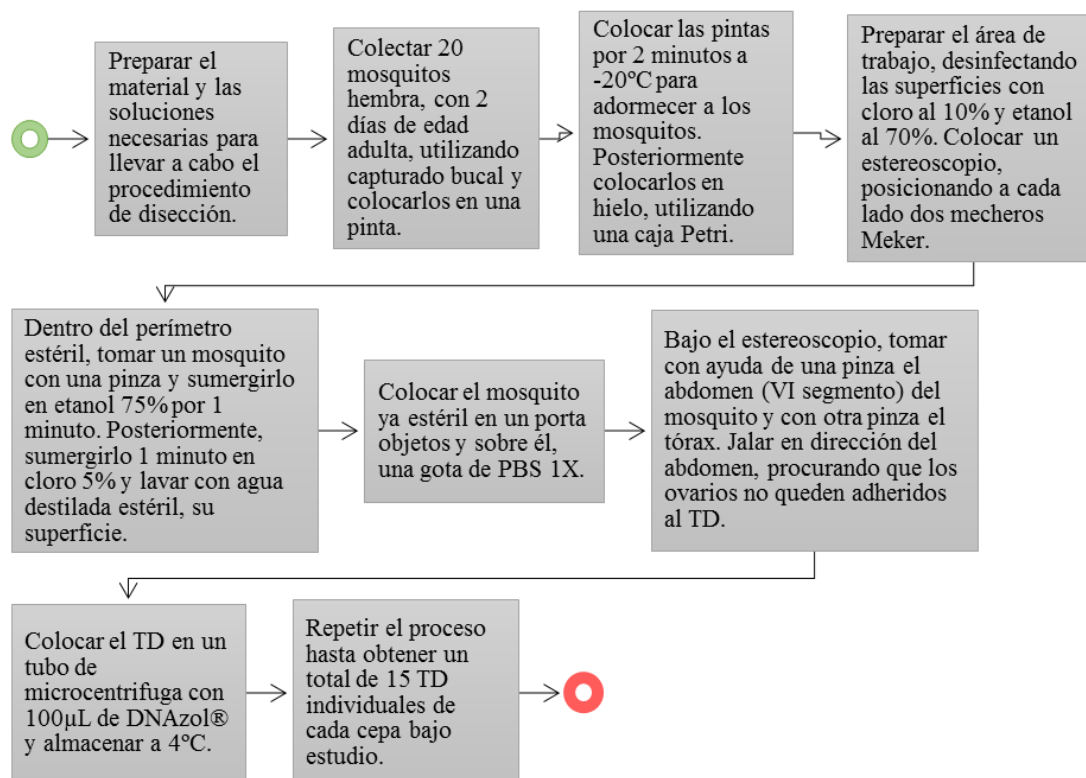
Los mosquitos a disectar fueron transferidos del recipiente de crianza, con ayuda de un captador bucal, a una pinta y se colocaron por 2 minutos a -20°C para adormecerlos. Una vez listos las soluciones, el material biológico y material de diseccción, se procedió a preparar el área de trabajo. Para esto se desinfectaron las superficies con cloro al 10% y etanol al 70%. Sobre la superficie desinfectada, se colocó un estereoscopio, posicionando a cada lado dos mecheros Meker. Dentro del área estéril establecida, los mosquitos adormecidos fueron colocados en una caja Petri en hielo. Con una pinza entomológica, se tomó un mosquito y se sumergió en etanol 75% por 1 minuto. Posteriormente, se sumergió por 1 minuto en hipoclorito de sodio 5% y se lavó su superficie con agua destilada estéril, con ayuda de una pipeta.

Seguido de la esterilización superficial del mosquito, este se colocó en un portaobjetos y sobre él, una gota de PBS 1X. Bajo el estereoscopio se tomó, con ayuda de dos pinzas, el VI segmento del abdomen y el tórax. Una vez sujetos, se jaló en dirección del abdomen, procurando que los ovarios o

cualquier resto del mosquito no se quedarán adheridos al tracto digestivo. Este procedimiento se realizó con mucho cuidado, tratando de perturbar lo menos posible la integridad del interior del tracto digestivo.

Las muestras de tracto digestivo obtenidas, se colocaron en tubos de microcentrifuga con 100µL de DNAzol® (Thermo Fisher Scientific, número de catálogo: 10503-027) y fueron almacenados a 4°C por no más de 3 días. El proceso se repitió hasta obtener un total de 15 tractos digestivos individuales de cada cepa bajo estudio, esterilizando las pinzas en etanol 70% entre disecciones. Para mayor claridad del flujo de trabajo a continuación, se presenta un diagrama con los puntos importantes.

Figura 25. Procedimiento para la disección del tracto digestivo (TD).



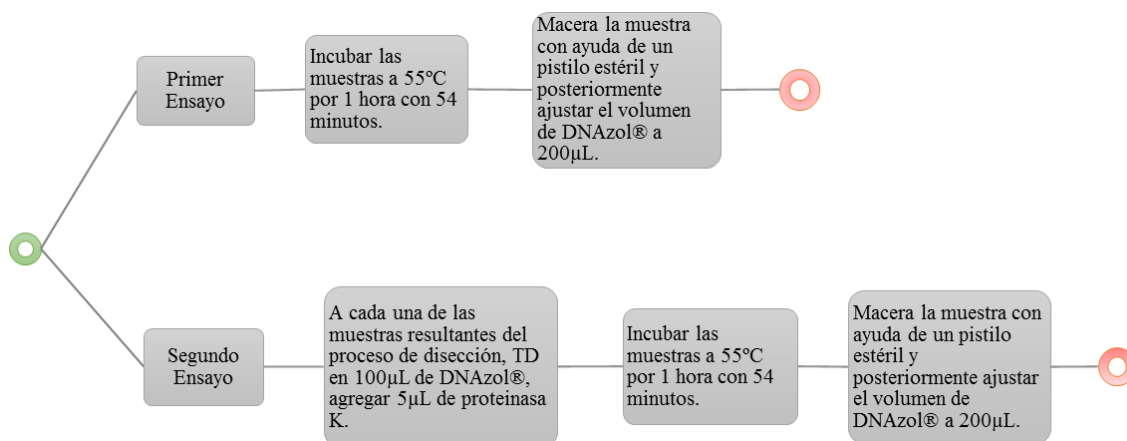
4. Extracción de ADN genómico. El proceso de extracción de ADN genómico se llevó a cabo con las muestras de los tractos digestivos resultantes de la disección. El procedimiento de extracción fue optimizado en la fase de lisis y precipitación de ADN, realizando los ensayos únicamente con la cepa susceptible a deltametrina. La técnica y principios fueron aplicados según los parámetros establecidos en el protocolo “Extraction of DNA using DNAzol® Reagent” (Life Technologies, 2001), con las modificaciones correspondientes del proceso de optimización. Las muestras de campo y las dos cepas de laboratorio, fueron trabajadas de igual manera, incluyendo en cada extracción, un control negativo.

a. **Lisis del tejido.** En el primer ensayo de lisis, las muestras resultantes del proceso de disección, fueron incubadas por 1 hora 54 minutos a 55°C. Una vez terminado el período de incubación, las muestras fueron maceradas con ayuda de un pistilo estéril, ajustando el volumen de DNAzol® (Invitrogen™, número de catálogo: 10503-027) a 200µL.

En el segundo ensayo de lisis, se adicionó a cada una de las muestras resultantes del proceso de disección 5µL proteínasa K (Roche Diagnostics, número de catálogo: 03 115 828 001) y se incubó por 1 hora con 54 minutos a 55°C. Consecutivamente se maceró el tejido con ayuda de un pistilo estéril y se ajustó el volumen con DNAzol® a 200µL. Cabe remarcar que, en cada ensayo, se utilizó un grupo de muestras distintito, constituido por 10 ejemplares.

Debido al rendimiento final obtenido de cada ensayo (mostrado en sección de resultados, parte A), se seleccionó el segundo ensayo para aplicarlo a la cepa de laboratorio resistente a deltametrina y a las muestras de campo. Para mayor claridad del flujo de trabajo a continuación, se presenta un diagrama con los puntos importantes.

Figura 26. Proceso de lisis del tracto digestivo (TD).



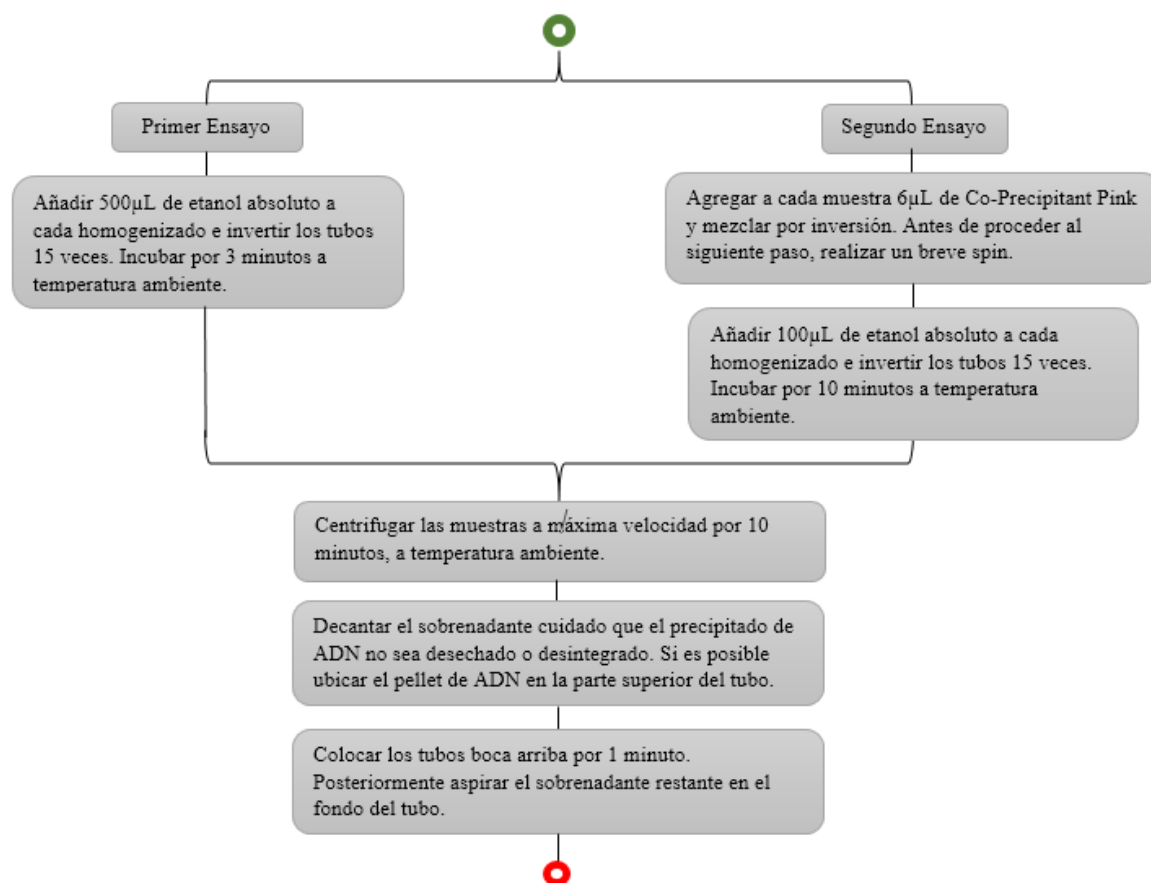
b. **Precipitación del ADN.** En el primer ensayo de precipitación, a los tubos de microcentrífuga con el tejido lisado, se le añadió 0.5mL de etanol absoluto. Los tubos fueron invertidos 15 veces he incubados 3 minutos a temperatura ambiente. Posterior al período de incubación, los tubos fueron centrifugados a máxima velocidad (14.0×1000 rpm) por 10 minutos sin refrigeración.

En el segundo ensayo de precipitación, a los tubos de microcentrífuga con el tejido lisado, se les agregó 6µL de Co-Precipitant Pink/ poliacrilamida lineal (Bioline Reagents, número de catálogo: BIO – 37075). Los tubos fueron invertidos 15 veces y centrifugados brevemente. Posteriormente se añadió 100µL de etanol absoluto a cada homogenizado, invirtiendo 15 veces para mezclar. Las muestras fueron incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente y seguidamente centrifugadas a máxima velocidad por 10 minutos sin refrigeración. Cabe remarcar que, en cada ensayo, se utilizó un grupo de muestras distinto, constituido por 10 ejemplares.

Independientemente del ensayo realizado, el sobrenadante resultante fue decantado, cuidando que el precipitado de ADN no fuese desechado o desintegrado. Para ello el pellet de ADN, transparente (ensayo uno) o rosado (ensayo dos), fue ubicado en la parte superior del tubo. Por último, los tubos fueron incubados boca arriba por 1 minuto, aspirando con una micropipeta el sobrenadante restante en el fondo del tubo.

Debido al rendimiento final obtenido de cada ensayo (mostrado en sección de resultados, parte A), se seleccionó el segundo ensayo para aplicarlo a la cepa de laboratorio resistente a deltametrina y a las muestras de campo. Para mayor claridad del flujo de trabajo a continuación, se presenta un diagrama con los puntos importantes.

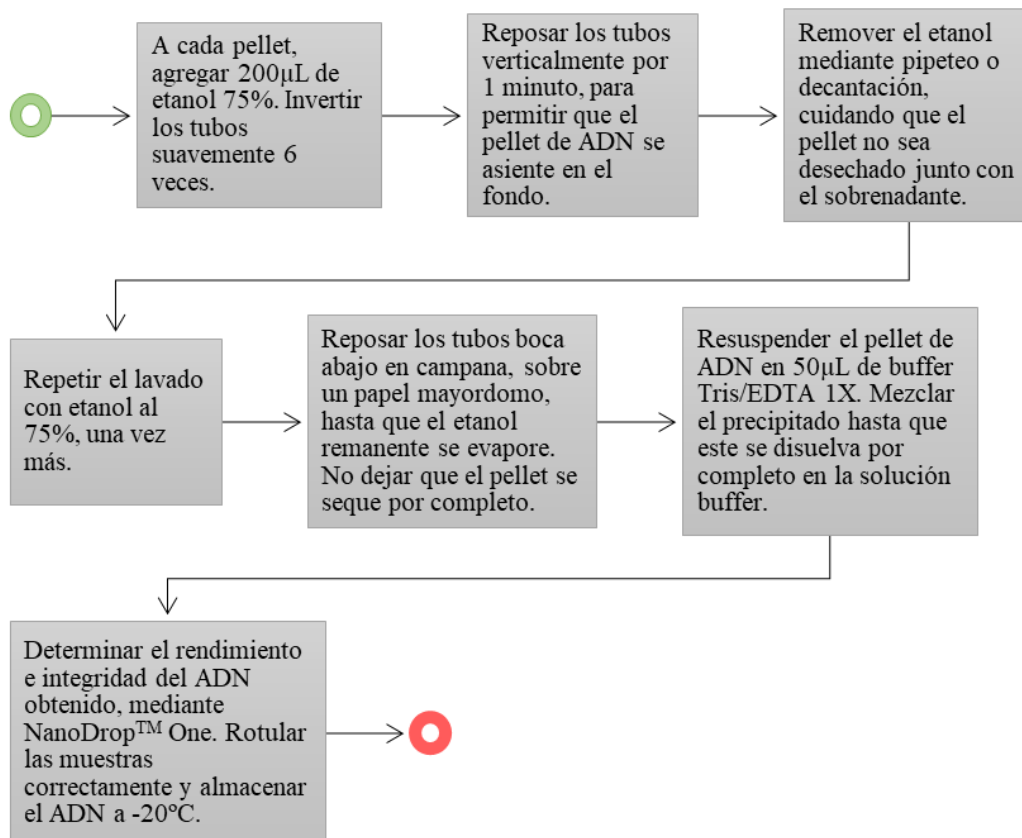
Figura 27. Proceso para la precipitación del ADN genómico extraído de la microbiota bacteriana del tracto digestivo.



c. Lavado y resuspensión del ADN. El lavado del precipitado de ADN se realizó dos veces, como se menciona a continuación: a cada uno de los pellets producidos en el paso de precipitación se le agregó 200µL de etanol 75%. Los tubos fueron invertidos 6 veces e incubados verticalmente por 1 minuto, para permitir que el pellet de ADN se asentara al fondo. El etanol remanente fue removido mediante pipeteo o decantación, cuidando que el pellet no fuese desechado con el sobrenadante.

Previo a la resuspensión, todas las muestras tratadas fueron colocadas boca abajo, durante 15 minutos, sobre un papel mayordomo. Se revisó cada 5 minutos, si el etanol ya se había evaporado, tratando de evitar que el pellet se secase por completo. Finalmente, las muestras fueron resuspendidas en 50 μ L de buffer Tris-EDTA 1X y cuantificadas por espectrofotometría, mediante NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific). Todas las muestras tratadas, debidamente rotuladas, fueron almacenadas a -20°C. A continuación, se presenta un diagrama con los puntos importantes.

Figura 28. Proceso de lavado y resuspensión del ADN genómico extraído de la microbiota bacteriana del tracto digestivo.



5. Envío de muestras. Los extractos de ADN que presentaron alta concentración e integridad, fueron enviados al Laboratorio Nacional de Lawrence Berkeley (California, Estados Unidos) vía área, gracias a Susana Arrechea – PhD. La preparación de las muestras consistió en colocar 25 μ L del resuspendido de ADN en tubos de microcentrífuga de 0.5mL. Cada tubo fue rotulado con la identificación de la muestra, fecha de extracción e investigador responsable. Se utilizó un código de colores, para ayudar a diferenciar cada grupo de estudio y evitar confusiones. La cepa susceptible (Sanarate) a deltametrina fue codificada con color verde, la cepa resistente a deltametrina (RDelta) fue codificada con color azul y las muestras de campo fueron codificadas de color anaranjado.

Cada tubo de microcentrífuga fue sellado con parafilm, para evitar derrames, y colocados en una bolsa ziploc®. El paquete fue rotulado con el nombre de la persona que recibió el pedido: Javier Ceja-Navarro. Se mandaron un total de 11 muestras de la cepa resistente y 11 muestras de la cepa susceptible

a deltamentrina; y un total de 16 muestras del grupo de campo. Tomando en cuenta, en los tres grupos, el control negativo.

Las muestras pasaron aproximadamente 3 días sin refrigeración, previo a su arribo al Laboratorio Nacional de Lawrence Berkeley. A continuación, se muestra un cuadro con la información de envío.

Cuadro 7. Información de envío de las muestras de ADN seleccionadas para ser trabajadas en el Laboratorio Nacional de Lawrence Berkeley.

Grupo de muestra trabajada	Identificación de la muestra	Concentración de ADN (ng/μL)
Cepa susceptible (Sanarate)	SDT_1	29.3
	SDT_2	32.6
	SDT_3	40.5
	SDT_4	23.2
	SDT_5	27.3
	SDT_6	27.4
	SDT_7	32.8
	SDT_8	22.1
	SDT_9	28.4
	SDT_11	36.3
	C-	6.3
Cepa resistente (RDelta)	RDT_1	33.9
	RDT_2	35.3
	RDT_3	27.3
	RDT_4	31.9
	RDT_5	28.8
	RDT_6	32.1
	RDT_7	38.8
	RDT_8	30.3
	RDT_9	27.4
	RDT_10	22.6
	C-	11.5
Muestras de campo	WDT_2.1	32.8
	WDT_2.2	33.1
	WDT_2.3	31.0
	WDT_2.4	38.7
	WDT_2.5	27.5
	WDT_2.8	49.0
	WDT_2.10	39.2
	WDT_2.12	20.6
	WDT_2.13	29.6
	WDT_2.14	21.9
	WDT_2.15	21.2

Grupo de muestra trabajada	Identificación de la muestra	Concentración de ADN (ng/μL)
	WDT_2.17	22.1
	WDT_2.18	28.3
	WDT_2.20	41.4
	WDT_2.21	31.8
	C-	11.0

El posterior procesamiento de las muestras, en cuanto a la amplificación de los dominios hipervariables V3 - V4 del gen 16S ARNr y preparación de biblioteca de secuenciación, se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Lawrence Berkeley (California, Estados Unidos), en la división de Earth Sciences, Ecology Department. En específico por el grupo de investigación bajo la dirección de Javier Ceja Navarro -PhD. La metodología aplicada, se detalla en anexos.

6. Secuenciación y análisis filogenético. La secuenciación de los amplicones V3 - V4 del gen 16SARNr, fue llevado a cabo utilizando la plataforma Illumina® – MiSeq™. Servicio que fue adquirido de la compañía GENEWIZ® (Nueva Jersey, Estados Unidos). Los análisis descritos a continuación fueron ejecutados con la ayuda y asesoría de Javier Ceja Navarro – PhD.

a. Tratamiento de las secuencias. Las secuencias forward y reversed crudas obtenidas de GENEWIZ® fueron filtradas y separadas, utilizando un script desarrollado en el Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley. Estas fueron separadas según los códigos de barras agregados en el proceso de preparación de librerías. El resultado final fueron tres archivos distintos con las secuencias correspondientes de las muestras de campo, cepa de laboratorio resistente a deltametrina y cepa de laboratorio susceptible a deltametrina. Posteriormente se realizó un análisis de calidad a todas las muestras, para eliminar secuencias de baja calidad o dudosas. Únicamente las secuencias forward de alrededor de 200 a 250pb fueron utilizadas para completar los análisis de microbioma, ya que la fusión de secuencias forward y reversed resultaba en pérdida de más del 50% de las secuencias sin aportar un incremento significativo en la longitud de las secuencias.

Del grupo de secuencias resultantes del análisis de calidad, se extrajo las secuencias de los blancos de extracción y amplificación. Las secuencias blanco de los tres grupos de estudio, fueron concatenadas, homogenizadas a un mismo tamaño y agrupadas entre ellas a una similitud del 100%, utilizando el paquete USEARCH. Seguidamente, las secuencias de las muestras de campo, cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina fueron combinadas en un solo archivo, implementando el paquete QIIME 1. Esto con el fin de remover las secuencias contaminantes de un solo archivo, en lugar de tres.

El archivo combinado posteriormente fue depurado, utilizando las agrupaciones de los blancos para alinear a un 100% de similitud, y luego eliminar, secuencias contaminantes dentro de las muestras. El archivo limpio prosiguió a ser dereplicado, esto es remover secuencias redundantes. El archivo FASTA

resultante, fue entonces sometido a un proceso de agrupamiento para crear ZOTUs. Para cada grupo de estudio, se agruparon las secuencias al 100% de similitud. El proceso de limpieza como generación de ZOTUs fueron realizados con el paquete USEARCH. Los ZOTUs obtenidos fueron entonces usados para calcular sus frecuencias en el grupo original de secuencias, o archivo combinado.

Estos ZOTUs fueron también caracterizados taxonómicamente usando QIIME 1.9 y la base de datos SILVA. De esta forma, frecuencias e identidad taxonómica fueron utilizadas para generar una tabla biom, la cual mostraba de manera organizada la frecuencia de cada ZOTU por muestra, así como la identidad taxonómica de cada ZOTU. La determinación de alfa y beta diversidad requirió la construcción de un árbol filogenético que representó las comunidades microbianas asociadas a las muestras analizadas. Para obtener este árbol filogenético, los ZOTUs fueron primero alienados usando Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2014). El alineamiento obtenido fue después usado para construir el árbol filogenético por el método FastTree en QIIME 1.9 (Caporaso *et al.*, 2010).

b. Descripción de la composición de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de *An. albimanus* y análisis de diversidad. Antes de iniciar la descripción y análisis ecológicos del microbioma, se determinó qué número de secuencias representó el total de la población microbiana por grupos de estudio, con el fin de incluir a todas las muestras en el análisis. Para esto se llevó a cabo un análisis de rarefacción alfa, en el que se determinó que un mínimo de 800 secuencias sería suficiente para caracterizar el microbioma bacteriano de *An. albimanus*. Este límite fue usado como parámetro de muestreo durante los análisis de diversidad alfa y beta realizados en la plataforma QIIME 1.9.

La composición y distribución de los grupos bacterianos asociados a la microbiota bacteriana del tracto digestivo de *An. albimanus* de los tres grupos bajo estudio, se representó a través de un gráfico de abundancia relativa, llegando a nivel de género. La distribución observada a través del gráfico de abundancia relativa, fue posteriormente analizado con los medidores de diversidad alfa y beta. La diversidad alfa de cada grupo de muestras bajo estudio fue calculada usando los índices de Shannon, Simpson, diversidad filogenética y ZOTUs observados. Los parámetros determinados fueron después comparados entre las muestras para determinar la significancia estadística mediante las pruebas no paramétrica Kruskal – Wallis y Mann-Whitney, a un nivel de confianza del 95%.

Diferencias en la composición de la microbiota entre las muestras analizadas fue comparada por medio del análisis beta; el cual fue calculado usando la matriz de distancia generada a partir de la tabla biom y el árbol filogenético, es decir mediante el método UniFrac repesado. Los resultados fueron representados mediante un gráfico PCoA, en un plano 3D y el efecto de las categorías (tipo de muestra vs microbiota) en las variaciones de los datos, calculadas por medio de un análisis multivariante (ADONIS) con 999 permutaciones, a un nivel de confianza del 95%.

VII. RESULTADOS

A. Optimización del método de extracción de ADN genómico de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*

Con el fin de establecer una metodología de extracción de ADN genómico que brindara un rendimiento final satisfactorio, se procedió a realizar dos ensayos de extracción en la cepa susceptible a deltametrina. Ambos ensayos partieron del mismo material genético: tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*; variando la metodología en la lisis del tejido y precipitación del ADN. Se logró determinar que la implementación de la enzima proteínasa K para lisar el tejido y Co-Precipitant Pink/poliacrilamida lineal para precipitar el ADN (ensayo dos), aumentó por más de la mitad la concentración final de ADN genómico, con respecto al primer ensayo. No obstante, al determinar la integridad del ADN genómico utilizando NanoDrop™ One, fue evidente una razón A260/A230 menor a 2.0, demostrando contaminación por guanidina.

En cuanto a la razón A260/A280 fue mayor al parámetro esperado, ~1.8. Evidenciando que el etanol logró ser removido del producto en el proceso de extracción de ADN. Dichos parámetros de pureza, fueron similares tanto en el primer como en el segundo ensayo. Sustentando las aseveraciones anteriores, realizadas según a los valores A260/A230 y A260/A280.

Cuadro 8. Concentración e integridad del ADN genómico extraído, por dos ensayos diferentes, del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus* – cepa susceptible (Sanarate).

Identificación de la muestra		Concentración ADN genómico (ng/μL)		Integridad ADN genómico (A260/A280 A260/230)	
Primer ensayo	Segundo ensayo	Primer ensayo	Segundo ensayo	Primer ensayo	Segundo ensayo
SDT_A	SDT_1	6.2	29.3	2.56 0.01	3.57 0.02
SDT_B	SDT_2	7.5	32.6	3.63 0.01	3.39 0.03
SDT_C	SDT_3	9.6	40.5	2.81 0.01	3.74 0.04
SDT_D	SDT_4	6	23.2	3.28 0.01	3.22 0.02
SDT_E	SDT_5	4.9	27.3	3.78 0.01	2.65 0.03
SDT_F	SDT_6	8.1	27.4	2.75 0.01	3.56 0.02
SDT_G	SDT_7	8.2	32.8	4.32 0.01	3.19 0.03
SDT_H	SDT_8	3.7	22.1	2.76 0.01	3.00 0.02
SDT_I	SDT_9	13.2	28.4	4.35 0.01	2.83 0.03
SDT_J	SDT_11	13.1	36.3	3.84 0.01	3.15 0.03

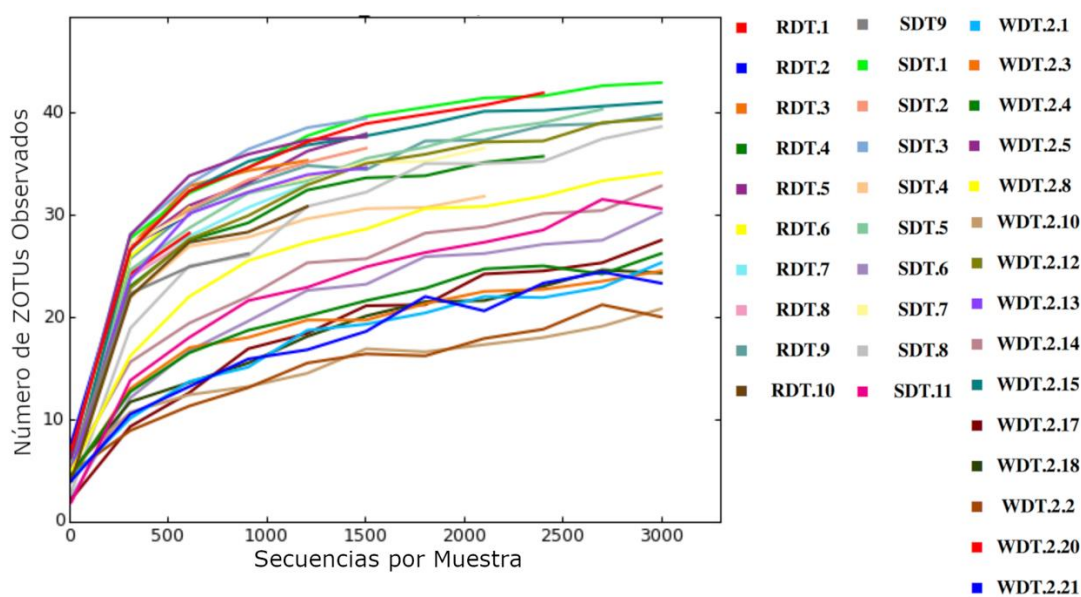
B. Análisis de rarefacción

Previo a realizar los análisis que mostrarían la composición y ecología de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de ejemplares hembras adultas *An. albimanus* de campo (WDT), ejemplares resistentes a deltametrina (RDT) y ejemplares susceptibles a deltametrina (SDT); fue necesario definir qué número de secuencias representaban el total de la diversidad de la comunidad microbiana de los grupos de muestras evaluados. En consecuencia, se realizó un análisis de rarefacción con ZOTUs generados con un 100% de similitud.

Observando las curvas creadas, en Figura 29, se determinó que la comunidad microbiana de todas las muestras estaba representada por 800 a 1000 secuencias. Por ende, se determinó un umbral de 800 secuencias por muestra para los análisis posteriores. Logrando incluir todas las poblaciones estudiadas y como consecuente, permitir que las estimaciones inferidas por los análisis correspondientes sean válidos, y la composición y diversidad en y entre las muestras puedan ser comparadas.

Algo a notar en las curvas generadas, es que la microbiota bacteriana del tracto digestivo de las muestras de campo generaron mayor número de secuencia a comparación de las cepas de laboratorio: cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina. Igualmente es evidente que la mayoría de las curvas iniciaron su fase plateau al redor de las 800 secuencias.

Figura 29. Curva de rarefacción comparando el número de secuencias generadas contra el número de ZOTUs observados, por muestra, en la microbiota bacteriana del tracto digestivo de ejemplares *An. albimanus* hembras adultas de campo (WDT), ejemplares resistentes a deltametrina (RDT) y ejemplares susceptibles a deltametrina (SDT).



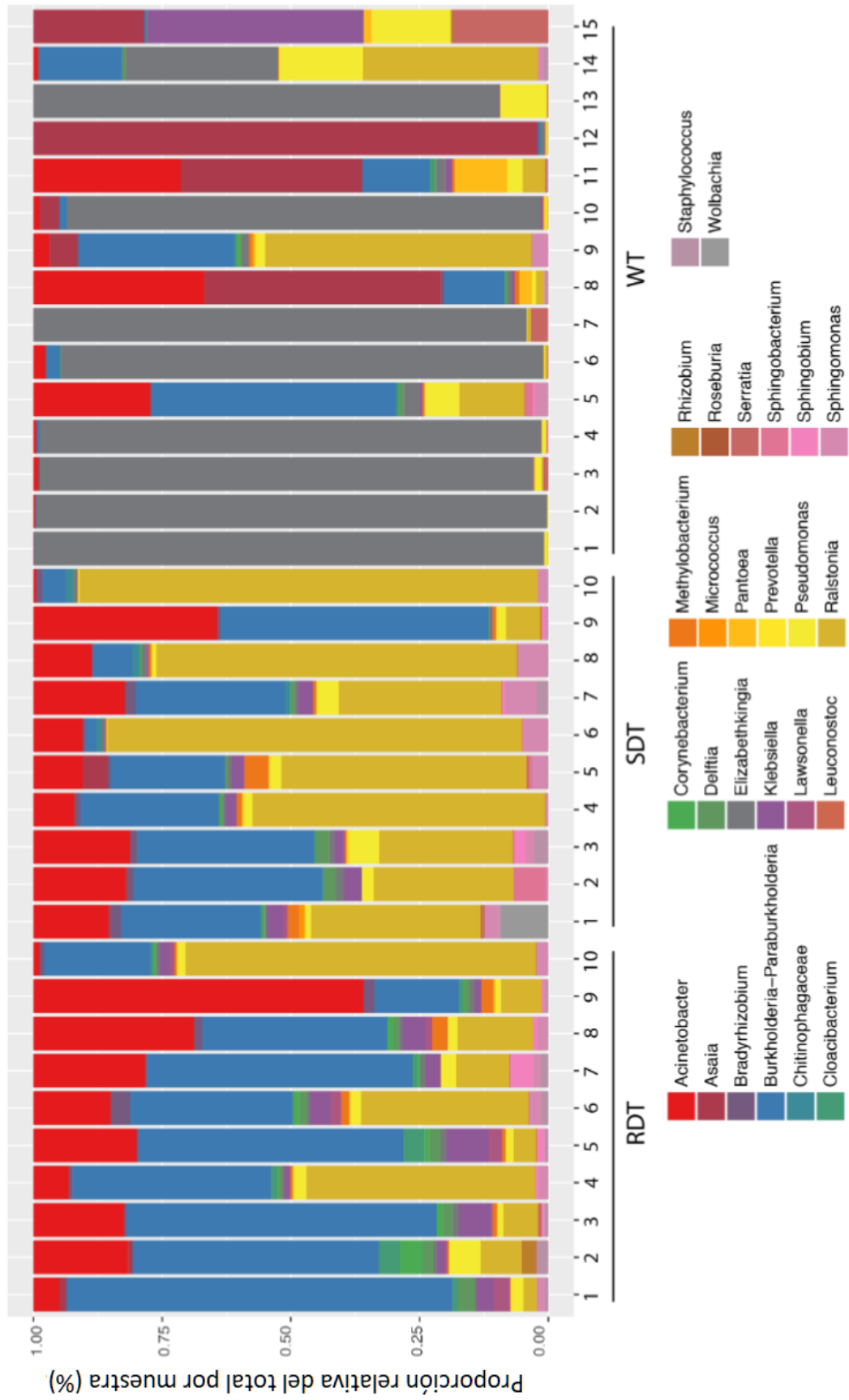
C. Composición de la microbiota bacteriana

La composición de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de ejemplares hembras adultas *An. albimanus* de campo (WDT), ejemplares resistentes a deltametrina (RDT) y ejemplares susceptibles a deltametrina (SDT) fue determinado a través de un análisis de abundancia relativa, visualizado en formato de grafica de barras, Figura 30. Se identificaron un total de 26 géneros bacterianos entre los tres grupos de estudio evaluados. En la cepa resistente a deltametrina (RDT), en la mayor parte de los ejemplares predominó *Burkholderia - Paraburkholderia* ($42.73\% \pm 0.18$ de la abundancia relativa), seguido de *Acinetobacter* ($20.40\% \pm 0.18$) y por último *Ralstonia* ($19.44\% \pm 0.22$). En la cepa susceptible a deltametrina (SDT), los grupos bacterianos dominantes fueron *Ralstonia* ($47.61\% \pm 0.28$), seguido de *Burkholderia - Paraburkholderia* ($24.76\% \pm 0.17$) y por último *Acinetobacter* ($14.01\% \pm 0.09$). A simple vista, el gráfico de abundancia relativa mostró que la microbiota bacteriana de las cepas de laboratorio estudiadas, poseen una estructura similar entre individuos de la misma cepa y entre las cepas. Sin embargo, tras aplicar la prueba estadística no paramétrica Mann-Whitney, se determinó una diferencia significativa en cuanto a la abundancia relativa de *Burkholderia - Paraburkholderia* ($p = 0.043$) y *Ralstonia* ($p = 0.023$) entre la cepa resistente y la cepa susceptible a deltametrina. Diferencia que puede ser atribuida a la prevalencia de *Burkholderia - Paraburkholderia* y *Ralstonia* en la cepa resistente a deltametrina y en la cepa susceptible a deltametrina, correspondientemente.

En cuanto a las muestras de campo, se pudo observar una tendencia predominante de *Elizabethkingia* ($53.50\% \pm 0.47$) en la mayor parte de los ejemplares, seguido de *Asaia* ($13.72\% \pm 0.27$). Pese a que dichos géneros fueron los sobresalientes, *Ralstonia* ($6.78\% \pm 0.14$), *Acinetobacter* ($6.28\% \pm 0.14$) y *Burkholderia - Paraburkholderia* ($8.55\% \pm 0.12$) también tuvieron representatividad dentro de la microbiota bacteriana de las muestras de campo. Gráficamente la proporción relativa de los géneros bacterianos mencionados, muestra una clara diferencia visual entre la estructura de la microbiota de las muestras de campo y la estructura de la microbiota de las muestras de laboratorio. Para evaluar la significancia de la diferencia observada, se ejecutó la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis, la cual comprobó que existe una diferencia significativa en la abundancia relativa de *Elizabethkingia* ($p=0.014$), *Ralstonia* ($p=0.001$) y *Burkholderia - Paraburkholderia* ($p=0.001$) observada en las cepas de laboratorio y observada en las muestras de campo.

Referente a los géneros bacterianos que fueron comunes en los tres grupos de estudio: muestras de campo, cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina, se encuentran *Klebsiella* (muestras de campo: $2.85\% \pm 0.10$ | cepa resistente a deltametrina: $3.48\% \pm 0.02$ | cepa susceptible a deltametrina: $1.50\% \pm 0.01$), *Pseudomonas* ($3.44\% \pm 0.05$ | $2.28\% \pm 0.02$ | $2.01\% \pm 0.01$) *Methylobacterium* ($0.18\% \pm 0$ | $1.09\% \pm 0.01$ | $1.01\% \pm 0.01$) y *Sphingomonas* ($0.59\% \pm 0.01$ | $1.26\% \pm 0.01$ | $2.35\% \pm 0.02$).

Figura 30. Abundancia relativa de los géneros bacterianos que constituyen la microbiota del tracto digestivo de una muestra de campo (WDT) y dos cepas de laboratorio: una susceptible (SDT) y una resistente a deltametrina (RDT), de hembras *An. albimanus* adultas.



A fin de establecer aplicaciones y posible capacidad degradadora de insecticidas y otros agentes químicos complejos entre los géneros bacterianos más representativos encontrados en los tres grupos de muestras evaluados, se realizó una búsqueda de antecedentes. Lo documentado en el Cuadro 9 muestra que, en la mayor parte de géneros bacterianos, se ha reportado su capacidad de utilizar como fuente de carbono insecticidas organofosforados, piretroides o cualquier otro compuesto complejo. A excepción de *Elizabethkingia* y *Asaia* que, a pesar de que no son capaces de metabolizar insecticidas o compuestos complejos, son reportadas como candidatas para desarrollar paratransgenesis. Únicamente *Pantoea* y *Serratia* presentaron capacidad degradadora y potencial para su aplicación en paratransgenesis.

Los géneros bacterianos que fueron encontrados en los tres grupos de estudio evaluados fueron *Shingomonas*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Elizabethkingia*, *Delftia*, *Asaia* y *Acinetobacter*. En donde la mayor parte de los géneros mencionados, ha sido identificado en el intestino medio de adultos *Anopheles* spp. Obsérvese que las bacterias que se reportaron como degradadoras de insecticidas, no solo se han identificado en el intestino medio de adultos *Anopheles* spp, sino también en aguas y suelos contaminados con dichos compuestos y en la microbiota intestinal de plagas agrícolas que se encuentran constantemente expuestas a concentraciones variadas de insecticidas.

Vale mencionar que se tomó como géneros bacterianos representativos, aquellos que presentaron una abundancia relativa mayor al 1% en, al menos, dos de los grupos evaluados.

Cuadro 9. Antecedentes de los géneros bacterianos representativos que fueron identificados como parte de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus* de campo, resistentes a deltametrina y susceptibles a deltametrina.

Género bacteriano	Importancia	Ambientes donde ha sido identificados	Referencia
<i>Acinetobacter</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Degradación de organofosforados: <ul style="list-style-type: none"> - Metil paratión - Malatión - Diazinon - Fenitrotión - Clorpirifos ● Degradación de piretroides: <ul style="list-style-type: none"> - β- cipermetrina - Cipermetrina - Fenpropatrina - Fenvalerato - Deltametrina ● Parte de la microbiota núcleo de anofelinos. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Suelos contaminados. ● Aguas residuales. ● Intestino medio de larvas y adultos <i>Anopheles</i> spp. 	(Boissière <i>et al.</i> , 2012; Jin <i>et al.</i> , 2014; Longkumer <i>et al.</i> , 2014; Azamy <i>et al.</i> , 2015; Dada <i>et al.</i> , 2018)
<i>Asaia</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● Parte de la microbiota núcleo de <i>Anopheles</i> spp. 	En todos los estadios del ciclo de vida de <i>Anopheles</i> spp: huevos, estadios	(Favia <i>et al.</i> , 2008)

Género bacteriano	Importancia	Ambientes donde ha sido identificados	Referencia
	<ul style="list-style-type: none"> • Es ampliamente distribuida en todos los estadios del ciclo de vida de los anofelinos (transestadial). Por dichas características, es aplicada en paratransgenesis. 	larvales 1ro al 4to, pupa y adulto.	
<i>Bradyrhizobium</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Forman una relación simbiótica con las leguminosas, ya que son capaces de fijar nitrógeno. • Capaz de degradar compuestos fosforados complejos, como insecticidas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Suelos contaminados. • Raíces de leguminosas. 	(Abd-Alla, 1994)
<i>Burkholderia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Degradación de organofosforados: - Fenitrotión • Degradación de Piretroides. 	<ul style="list-style-type: none"> • Suelos contaminados. • Intestino medio de <i>Plutella xylostella</i> (plaga agrícola). • Intestino medio de <i>Cavelerius saccharivorus</i> (plaga agrícola). • Intestino medio de adultos <i>Anopheles</i> spp. 	(Shrivastava <i>et al.</i> , 2011; Boissière <i>et al.</i> , 2012; Xia <i>et al.</i> , 2013)
<i>Cloacibacterium</i>	Degradación de hidrocarburos aromáticos.	<ul style="list-style-type: none"> • Cuerpos de agua contaminado. • Intestino medio de adultos <i>Anopheles</i> spp. 	(Jurelevicius <i>et al.</i> , 2013; Villegas y Pimenta, 2014)
<i>Delftia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Degradación de organofosforados. • Parte de la microbiota nucleó de anofelinos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Intestino medio de <i>Spodoptera frugiperda</i> (plaga agrícola). • Intestino medio de adultos <i>Anopheles</i> spp. 	(Chavshin <i>et al.</i> , 2014b; Almeida <i>et al.</i> , 2017)
<i>Elizabethkingia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Transestadial • Se aplica para paratransgenesis. 	<ul style="list-style-type: none"> • Intestino medio de adultos <i>Anopheles</i> spp. • Suelos 	(Ngwa <i>et al.</i> , 2013)

Género bacteriano	Importancia	Ambientes donde ha sido identificados	Referencia
	<ul style="list-style-type: none"> • Posee actividades antimicrobianas y antiplasmodiales. • Parte de la microbiota núcleo de anofelinos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ríos • Reservorios acuíferos 	
<i>Klebsiella</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Degradación de Organofosforados: <ul style="list-style-type: none"> - Endosulfan - Fenitrotión - Fensulfotión • Degradación de DDT. • Parte de la microbiota nucleó de anofelinos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Intestino medio de adultos <i>Anopheles</i> spp. • Suelos 	(Engesser y Fischer, 1991; Kwon <i>et al.</i> , 2005; Dada <i>et al.</i> , 2018)
<i>Methylobacterium</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Degradación de Piretroides: <ul style="list-style-type: none"> - Cipermetrina 	<ul style="list-style-type: none"> • Intestino medio de adultos <i>Anopheles</i> spp. • Glándulas salivales de adultos anofelinos. • Suelos 	(Diegelmann <i>et al.</i> , 2015; Tchioffo <i>et al.</i> , 2016)
<i>Pantoea</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Degradación de organofosforados: <ul style="list-style-type: none"> - Acefato • Parte de la microbiota nucleó de anofelinos. • Simbionte de anofelinos, por lo que se aplica para paratransgenesis. 	<ul style="list-style-type: none"> • Microbiota intestinal de <i>Plutella xylostella</i> (plaga agrícola). • Intestino medio de adultos <i>Anopheles</i> spp. 	(Djadid, 2011; Shrivastava <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pseudomonas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Parte de la microbiota núcleo de anofelinos. • Degradación de organofosforados: <ul style="list-style-type: none"> - Dimetoato - Paratión - Metil Paratión - Clorpirifós - Malatión • Degradación de piretroides: <ul style="list-style-type: none"> - Permetrina - Fenpropatrin 	<ul style="list-style-type: none"> • Suelos contaminados. • Aguas contaminadas. • Intestino medio de adultos <i>Anopheles</i> spp. 	(Zuo <i>et al.</i> , 2010; Supriyati <i>et al.</i> , 2015)

Género bacteriano	Importancia	Ambientes donde ha sido identificados	Referencia
	- Cipermetrina - Deltametrina		
<i>Ralstonia</i>	Capaz de degradar contaminantes xenobióticos como tolueno y tricloroetileno.	<ul style="list-style-type: none"> Suelos contaminados. Aguas contaminadas. Intestino medio de adultos <i>Anopheles</i> spp. 	(Ryan <i>et al.</i> , 2007; Boissière <i>et al.</i> , 2012)
<i>Sphingomonas</i>	<ul style="list-style-type: none"> Cataboliza compuestos aromáticos. Parte de la microbiota nucleó de anofelinos. 	<ul style="list-style-type: none"> Agua contaminada. Suelos contaminados. Intestino medio de adultos <i>Anopheles</i> spp. 	(Boissière <i>et al.</i> , 2012; Villegas y Pimenta, 2014; Zhao <i>et al.</i> , 2017)

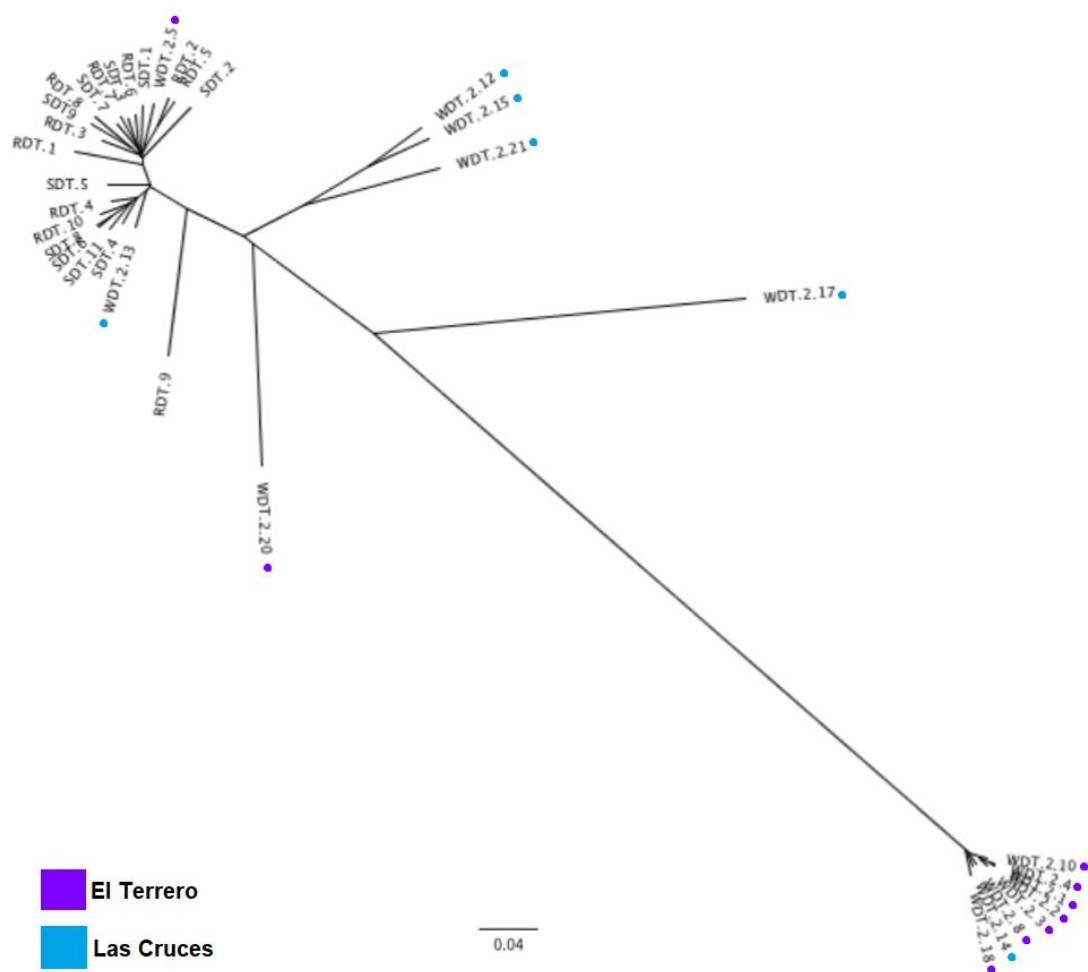
D. Análisis ecológicos

1. Agrupación UPGMA. Según las diferencias observadas entre la composición de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de los ejemplares hembras adultas *An. albimanus* de campo (WDT), ejemplares resistentes a deltametrina (RDT) y ejemplares susceptibles a deltametrina (SDT); se procedió a realizar un agrupamiento UPGMA de las muestras, en base a las matrices Unifrac repesadas construidas durante los análisis de diversidad beta. Al representar gráficamente el agrupamiento UPGMA, Figura 31, fue evidente que las dos cepas de laboratorio estudiadas, cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina, se agruparon en un solo dendograma. Mostrando una tendencia hacia que la microbiota de las cepas de laboratorio presentan una composición análoga. Tendencia que igualmente fue observada en el gráfico de abundancias relativas.

Los ejemplares de campo, por otra parte, mostraron un agrupamiento que se vio influenciado por el sitio de colecta, Figura 31. Aquellas muestras provenientes de El Terrero, la mayor parte (7 de 9 muestras), se agruparon en un dendograma con remarcada distancia (aproximadamente 0.68) del dendograma formado por las cepas de laboratorio. A excepción de las muestras WDT.2.5 y WDT.2.20 que fueron agrupadas dentro y cercano al clúster de las cepas de laboratorio, correspondientemente. En lo que concierne con las muestras colectadas en la localidad Las Cruces, la topología del agrupamiento UPGMA observada revela una menor distancia (aproximadamente 0.20) al clúster de las muestras de laboratorio. Dichos resultados, visualmente, sugieren que la discrepancia entre la estructura del microbioma bacteriano de las cepas de laboratorio y las muestras de campo provenientes de Las Cruces es menor que la estructura del microbioma bacteriano entre las cepas de laboratorio y las muestras de campo provenientes de El Terrero.

Es claro que el agrupamiento mostrado gráficamente por el método UPGMA, evidencia una fuerte influencia del sitio de crianza en la composición de la microbiota bacteriana del tracto digestivo. Las cepas de laboratorio, criadas bajo los mismos parámetros y bajo la misma dieta, fueron agrupadas en un solo dendograma. En cambio, las muestras de campo al ser recolectadas de dos sitios diferentes, se agruparon según el lugar de colecta.

Figura 31. Agrupación UPGMA en base a similitudes en y entre las comunidades bacterianas de la microbiota del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus* de campo (WDT), resistente a deltametrina (RDT) y susceptible a deltametrina (SDT).



2. **Diversidad alfa.** Al observar la diversidad filogenética, la muestra resistente a deltametrina (2.39 ± 0.25) presento el valor más representativo, seguido de la cepa susceptible a deltametrina (2.17 ± 0.28) y por último las muestras de campo (0.71 ± 0.57), indicando mayor diversidad de especies dentro de las cepas de laboratorio. Sin embargo, a pesar de las discrepancias, no existe una diferencia significativa ($p = 0.051$) entre la diversidad filogenética de los tres grupos evaluados. Para respaldar lo observado en la diversidad filogenética, se determinó el número de ZOTUs observados por muestra evaluada. Como era de esperar, la cepa resistente a deltametrina presento un mayor número de ZOTUs (30 ± 2.28) por muestra, seguido de la cepa susceptible a deltametrina (28 ± 4.81) y por último, las muestras de campo (22 ± 0.57). No se observó una diferencia significativa ($p = 0.190$) entre los tres grupos evaluados, por lo que la diversidad filogenética como ZOTUS observados no difieren entre la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus* de campo, cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina.

En cuanto a la medición de la riqueza (Shannon) y uniformidad de especies (Simpson), se determinó que la cepa resistente a deltametrina presento la mayor riqueza (3.27 ± 0.65) y uniformidad de especies (0.79 ± 0.14), seguida de las muestras de campo (riqueza: 2.70 ± 0.63 , uniformidad: 0.76 ± 0.11) y por último la cepa susceptible a deltametrina (riqueza: 2.66 ± 1.09 , uniformidad: 0.66 ± 0.26). No se observó una diferencia significativa (Shannon $p = 0.163$ y Simpson $p = 0.242$) entre los tres grupos evaluados, por lo que riqueza y uniformidad de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*, no difiere entre las muestras de campo, cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina.

Cuadro 10. Medidores de diversidad alfa determinados para la microbiota bacteriana del tracto digestivo de los tres grupos de hembras adultas An. albimanus evaluados.

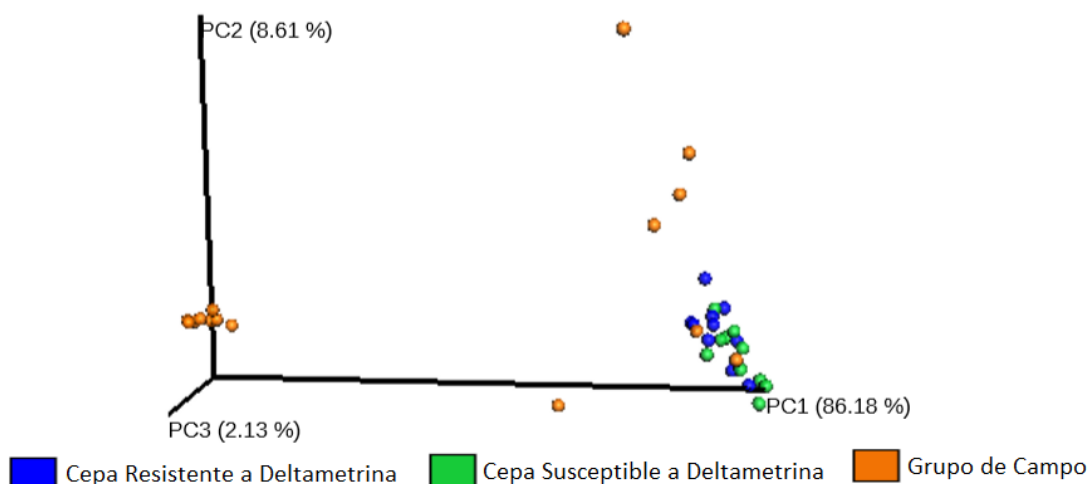
Grupo de muestra	Diversidad filogenética	ZOTUs observados	Índice de Simpson	Índice de Shannon
Cepa resistente a deltametrina	2.39 ± 0.25	30 ± 2.28	0.79 ± 0.14	3.27 ± 0.65
Cepa susceptible a deltametrina	2.17 ± 0.28	28 ± 4.81	0.66 ± 0.26	2.66 ± 1.09
Muestras de campo	1.71 ± 0.57	22 ± 8.96	0.76 ± 0.11	2.70 ± 0.63

3. **Diversidad beta.** Las mediciones de la diversidad beta fueron representados por una gráfica PCoA UniFrac repesado. El resultado gráfico evidenció que el 86.18% de la variación del conjunto de datos analizados esta mayormente representado a lo largo del eje x. Está claro que la composición de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de las dos cepas de laboratorio evaluadas: una resistente a deltametrina y una susceptible a deltametrina son similares, debido a la proximidad observada entre los ejemplares de cada cepa.

En las muestras de campo se pueden observar dos interpretaciones. La primera interpretación para tomar en cuenta es la marcada diferencia en la composición de la microbiota bacteriana del tracto

digestivo de muestras provenientes de campo y muestras provenientes de un ambiente controlado, como lo son las condiciones de laboratorio, respaldando lo observado en el gráfico UPGMA. La segunda interpretación que se puede obtener con base en la distribución de la varianza de ciertas muestras de campo, es la similitud que existe entre la composición de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de muestras de campo y muestras de laboratorio. Demostrando así que, la composición de la microbiota de ejemplares de laboratorio, no es totalmente ajena a la microbiota proveniente de ejemplares de campo.

Figura 32. Gráfica PCoA UniFrac repesado comparando la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus* de ejemplares de campo, ejemplares resistentes a deltametrina y ejemplares susceptibles a deltametrina.



Para determinar la significancia de la variación observada en el gráfico PCoA, en cuanto a la composición de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de los tres grupos de muestras evaluados, se aplicó una prueba estadística no paramétrica ADONIS. El valor- p de 0.001 obtenido, demostró que al comparar los tres grupos de muestras evaluados, el agrupamiento de las muestras por ejemplar es estadísticamente significativo y, por tanto, la variación observada entre las muestras de campo, cepa de laboratorio resistente a deltametrina y cepa de laboratorio susceptible a deltametrina es significativa. Igualmente, la prueba lanzó un valor R^2 de 0.45, que indica que el 45% de la variación en los datos es explicado por el tipo de muestra. Es decir, el 45% de la variación en la composición de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*, se debe al grupo de muestra evaluado: campo, cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina. En particular por las diferencias significativas entre las muestras de laboratorio y las muestras de campo.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Desde la evidencia del surgimiento de mecanismo de resistencia en las poblaciones de vectores de malaria, mosquitos del género *Anopheles* pp., los esfuerzos para el control del vector se han dirigido al estudio y comprensión de los mecanismos de resistencia y factores que propician su establecimiento (WHO, 2016b). Se ha visto, principalmente en plagas agrícolas, que la microbiota bacteriana del tracto digestivo de insectos cambia cuando se encuentran en un ambiente donde la exposición a insecticidas es constantemente y se encuentran bacterias capaces de metabolizar el insecticida en el tracto digestivo. Demostrando, por tanto, que la microbiota bacteriana del tracto digestivo tiene una relación con el surgimiento de resistencia a insecticidas (Kikuchi *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2017). Siguiendo la línea de dichos descubrimientos, ha surgido la hipótesis que la microbiota bacteriana del tracto digestivo de *Anopheles* spp. puede tener un rol en el establecimiento de resistencia.

Actualmente solo existe un estudio en *An. albimanus* que comprueba la presencia de bacterias capaces de metabolizar el insecticida (Dada *et al.*, 2018). Mostrando la necesidad de la ejecución de más estudios que posean como enfoque determinar el comportamiento, desde un planteamiento ecológico, y rol de la microbiota bacteriana en el surgimiento de resistencia. Particularmente en vectores de países endémico en vías de desarrollo, como Guatemala. Por tanto, el presente estudio identificó y evaluó la diversidad de la microbiota bacteriana del tracto digestivo en y entre muestras de campo y dos cepas de laboratorio: una susceptible y una resistente a deltametrina, de hembras adultas *An. albimanus*.

Para cumplir con el objetivo, se propuso una metodología que implicaba la secuenciación de amplicones de la región hipervariable V3-V4 del gen 16S ARNr, utilizando secuenciación de última generación, Illumina®. Gracias al uso de esta técnica innovadora y aplicación de herramientas bioinformáticas, fue posible comparar y explorar los cambios en la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*, de tres grupos de muestra: cepa susceptible a deltametrina, cepa resistente a deltametrina y muestras de campo. Los resultados mostraron una variación dentro y entre los grupos evaluados. Comprobando que, en efecto, las condiciones ambientales en las que se desarrolle el mosquito, tienen un impacto directo en la composición y diversidad de su microbioma.

A. Optimización del método de extracción de ADN genómico

Como primer paso en la investigación, fue necesario optimizar el método de extracción que se empleó para aislar el ADN genómico de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An.*

albimanus. Por lo que se implementaron dos ensayos piloto en la cepa susceptible a deltametrina (Sanarate), que variaron en la etapa de lisis y precipitación del ADN. Según los resultados mostrados en el Cuadro 8, el segundo ensayo fue el que obtuvo el mayor rendimiento, al duplicar las concentraciones de ADN obtenidas en el primer ensayo. En el proceso de extracción del primer ensayo, fue posible comprobar que si era viable empelar DNAzol® para el aislamiento del ADN genómico de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*, puesto que se obtuvieron concentraciones mayores a 1ng/μL. Ya que en principio, la guanidina promueve la lisis de las células, al desestabilizar las fuerzas moleculares que forman la estructura de las proteínas; y promueve la precipitación de ADN en el medio de reacción, al reducir la asociación de los ácidos nucleicos con el agua (Tang *et al.*, 2006).

A pesar que en el primer ensayo se logró el aislamiento del ADN genómico de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*, las concentraciones de ADN obtenidas no eran las esperadas, por lo que se procedió a la optimización del método. Para esto se ejecutó un segundo ensayo, en el cual se adaptó el procedimiento para que las muestras fueran tratadas con proteinasa K y Co-Precipitant Pink/ poliacrilamida lineal.

La proteinasa K es una proteasa que presenta una amplia especificidad de escisión hacia los enlaces peptídicos adyacentes al grupo carboxilo de aminoácidos aromáticos y alifáticos. Ayudando así, a la digestión de las proteínas presentes en muestras biológicas (Promega Corporation, 2018). Por lo tanto, el uso de la proteinasa K en el segundo ensayo ayudo optimizar la lisis del tracto digestivo y a digerir las proteínas contaminantes resultantes del proceso, como nucleasas. Aumentando las concentraciones de ADN genómico liberado al medio de reacción y disminuyendo las probabilidades que este fuera degradado por ADNasas. Marcando el primer punto de mejora.

Como segundo punto de mejora, en la etapa de precipitación del ADN se agregó Co-Precipitant Pink. Dicho co-precipitante es una poliacrilamida lineal que permite capturar el ADN del medio de reacción, por principios de polaridad, reteniéndolo en una matriz gelatinosa (Bioline, 2016). Gracias a este principio, la adición de dicho reactivo al ensayo dos, permitió la formación de un pellet de ADN visible (rosado) que no perdía fácilmente su integridad. Lo cual ayudo a que, durante los lavados, este pudiera ser manipulado con facilidad y no fuera desechado por accidente. Disminuyendo las probabilidades de pérdidas de material genético y asegurando, en los lavados, eficiencia en la eliminación de compuestos contaminantes del producto final, ADN genómico.

Fue evidente que la adición de proteinasa K y Co-Precipitant Pink en el segundo ensayo, fueron los pasos de optimización que ayudaron a mejorar el rendimiento, en cuanto a la concentración final de ADN obtenida. No obstante, al medir la integridad del ADN, ambos ensayos presentaron una razón A260/A230 menor a 2.0, Cuadro 8. Indicando la presencia de un compuesto que absorbía una longitud de onda de ~230nm, es decir la guanidina que no logro ser eliminada del producto final. En consecuencia, se recomienda que para evitar que contaminantes interfirieran con las mediciones del producto de extracción,

se purifique la muestra previo a ser medida por espectrofotometría (NanoDrop™). En cuanto a la razón A260/A280 en ambos ensayos, esta fue mayor a ~1.8, indicando ausencia de etanol en las muestras.

Para corregir los puntos que afectaron con la integridad del ADN, se recomienda que se utilice un método de extracción que garantice que la mayor parte de los contaminantes del medio de reacción sean eliminados, sin afectar el rendimiento final. Como por ejemplo el uso de perlas magnéticas para la extracción de ADN que, gracias a su alta afinidad al ADN y su propiedad magnética, permite separar el material genético (en presencia de un imán) del medio de reacción sin el uso de soluciones precipitantes o centrifugación (Saiyed *et al.*, 2006). Igualmente, se recomienda usar kits diseñados para extraer ADN a partir de pequeñas cantidades de tejido material, con el fin de maximizar la recuperación del ADN genómico y aumentar el rendimiento final.

B. Composición de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus* de campo, resistentes a deltametrina y susceptibles a deltametrina

En general, los datos sugieren que la cepa resistente a deltametrina y la cepa susceptible a deltametrina, provenientes de un ambiente controlado (laboratorio), poseen una microbiota similar. Mientras que el grupo de campo muestra una microbiota que difiere en composición de las muestras de laboratorio y que se encuentra fuertemente influenciada por el ambiente (criadero) en el que se desarrolla el mosquito. Esto corrobora lo mostrado en previos estudios, donde evidencian que la diversidad de la microbiota bacteriana que conforma el intestino medio de mosquitos, cambia de campo a laboratorio cuando estos son criados bajo condiciones controladas. Indicando la importancia de las condiciones ambientales, en el moldeo de la microbiota bacteriana del vector (Boissière *et al.*, 2012; Akorli *et al.*, 2016).

Como se observa en la Figura 30, los géneros *Acinetobacter*, *Burkholderia* – *Paraburkholderia* y *Ralstonia* fueron los predominantes, con más del 20% de proporción relativa, en las cepas de laboratorio: cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina. En proporción, visualmente fue evidente que *Acinetobacter* y *Burkholderia* – *Paraburkholderia* predominaron en la microbiota intestinal de la cepa resistente a deltametrina. Para ambos géneros se ha reportado capacidad degradadora de insecticidas de la familia de organofosforados y piretroides, Cuadro 9 (Boissière *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2014; Longkumer *et al.*, 2014; Azamy *et al.*, 2015; Dada *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2013; Shrivastava *et al.*, 2011). En *Burkholderia* se ha demostrado que su capacidad degradadora de fenitrotión, ha conferido resistencia a insecticidas en plagas agrícolas (Kikuchi *et al.*, 2012). Mientras que en *Acinetobacter* ha sido asociada a la degradación microbiana xenobiótica de una cepa *An. albimanus* resistente a fenitrotión (Dada *et al.*, 2018). Sugiriendo la posibilidad de que la predominancia de dichos géneros en la cepa resistente a deltametrina se deba a su rol simbiótico en la degradación de deltametrina y por ende al establecimiento de resistencia. En especial *Burkholderia* – *Paraburkholderia* que mostro una diferencia estadísticamente significativa, en proporción relativa, entre la cepa resistente y la cepa susceptible a deltametrina.

Siguiendo la misma lógica de asociación entre la representatividad de un género bacteriano y su capacidad degradadora de insecticidas y/o compuestos complejos, se puede interpretar la tendencia hacia un aumento en abundancia relativa, en referencia a la cepa susceptible, de *Klebsiella*, *Cloacibacterium* y *Delftia* en la cepa resistente a deltametrina; por su posible rol simbiótico en la degradación de insecticidas. Esto es sustentado en base a la literatura reportada, ya que los tres géneros han sido asociados a degradación de hidrocarburos/insecticidas, Cuadro 9. Siendo *Klebsiellas* el único género que se ha vinculado a resistencia a organofosforados en *An. albimanus*, (Dada *et al.*, 2018). Sin embargo, a pesar de lo reportado en otros estudios, es necesario que las especulaciones realizadas en cuanto a la predominancia de *Acinetobacter*, *Burkholderia* – *Paraburkholderia*, *Klebsiella*, *Cloacibacterium* y *Delftia* en la microbiota de la cepa resistente, sean comprobada *in vitro* implementando medios selectivos con deltametrina. Ya que estadísticamente no se pudo determinar una diferencia significativa en la abundancia relativa de dichos géneros, entre la cepa resistente y cepa susceptible a deltametrina.

Se sabe que, durante la metamorfosis de larva a mosquito adulto, la mayor parte de la microbiota adquirida en el estadio larval no perdura al estadio adulto. Dado que, durante la pupación todo el contenido intestinal adquirido durante el estadio larval es purgado como medida para evitar la perpetuación de bacterias patógenas al estadio adulto. Por ende, parte de la microbiota que predomina en el estadio adulto proviene de aquellas bacterias presentes en el criadero, debido que al eclosionar el adulto ingiere parte del agua en la que la pupa se desarrolló (Moll *et al.*, 2001). Las cepas de laboratorio fueron alimentadas con NESTUM 5 cereales, que posee como probiótico bacterias del género *Bifidobacterium* (Nestlé, 2018). Se esperaba que dicho género bacteriano fuera identificado dentro de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de las cepas de laboratorio, dado a que se encontraba en el agua donde fueron criadas. No obstante, no fue observado dentro de la microbiota de las dos cepas evaluadas. Esto indica dos posibilidades, la primera que *Bifidobacterium* pudo ser adquirido durante el estadio larval, pero purgado durante la metamorfosis. Y como segunda posibilidad que los otros géneros observados, Figura 30, dominaron sobre *Bifidobacterium*. Posiblemente debido a una relación simbiótica, de mayor importancia, con *An. albimanus*.

Si los géneros bacterianos más predominantes encontrados en las cepas de laboratorio no provinieron directamente de la alimentación brindada en el laboratorio, surge la posibilidad de que estos hayan provenido de campo y permanecido dentro de la microbiota del tracto digestivo de las cepas de laboratorio durante generaciones. Este argumento se respalda al observar que ciertos ejemplares de campo (5, 8, 9 y 11), Figura 30, presentaron una composición de su microbioma similar a la reportada en las cepas de laboratorio. En el caso de *Ralstonia*, se sabe que es un patógeno transmitido por el suelo que naturalmente infecta las raíces de diversas plantas, en especial solanáceas (Salanoubat *et al.*, 2002). Probablemente la predominancia de *Ralstonia* en las cepas de laboratorio se deba a que en el criadero en el que se recolectaron los mosquitos que darían inicio a la colonia RDelta (resistente a deltametrina) y Sanarate (susceptible a deltametrina), había plantas infectadas con *Ralstonia*. Conduciendo a que estuviera también presente en los cuerpos de agua donde se desarrollaron los mosquitos, a una

concentración suficiente para influenciar sobre la microbiota de los anofelinos y perdurar en condiciones de laboratorio.

Aunque los argumentos mencionados anteriormente expliquen la presencia de *Ralstonia* en la microbiota bacteriana de la cepa resistente y cepa susceptible a deltametrina, no es posible explicar la predominancia de ciertas bacterias según datos cuantitativos de la ecología del sitio de colecta. Representando una limitación en el análisis de los datos obtenidos. En general en este estudio, no se aplicó una metodología que incluyera la toma y registro de variables ambientales que accedieran a describir la ecología de los criaderos. Por ende, la composición de la microbiota bacteriana observada en el tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus* evaluados, solo puede ser explicada con base en características cualitativas que logran ser deducidas del registro fotográfico general que se tiene de los criaderos muestreados. Más en concreto, el enfoque ecológico solo puede ser abordado en las muestras de campo, puesto que para las cepas de laboratorio: cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina, no se tiene registro de ningún tipo del sitio de colecta donde fueron tomados los anofelinos que dieron origen a estas dos colonias.

En las muestras de campo, la composición de la microbiota bacteriana del tracto digestivo mostró diferentes resultados a los observados en las capas de laboratorio, Figura 30. La microbiota de la mayor parte de ejemplares se vio predominada por *Elizabethkingia*, seguido de *Asaia*. Lo cual concuerda con la ya reportado con anterioridad en diferentes especies de anofelinos (Wang *et al.*, 2011; Ricci *et al.*, 2012; Manguin *et al.*, 2013; Villegas y Pimenta, 2014; Tchioffo *et al.*, 2016). Esto se debe a que, tanto *Asaia* como *Elizabethkingia*, poseen transmisión transestadial. Característica que les permite permanecer en la microbiota en todo el desarrollo del vector y, por tanto, ser de los géneros bacterianos que con regularidad se reportan como predominantes (Damiani *et al.*, 2010; Damiani *et al.*, 2008; Ngwa *et al.*, 2013). Algo a remarcar, según los resultados observados, es la representatividad de más del 90% de *Elizabethkingia* y *Asaia* en la microbiota bacteriana del tracto digestivo de más de la mitad de los ejemplares de campo, en particular para *Elizabethkingia*, bacteria ubicua. Posiblemente la predominancia de ambos géneros se deba a sus propiedades bactericidas y anti – parasitarias que les brinda una ventaja de competitividad simbiótica (Manguin *et al.*, 2013; Ngwa *et al.*, 2013). La cual pudo ser observada en los resultados y que posiblemente justifica la usencia de *Wolbachia* y baja representatividad de *Pantoea* en el grupo de campo. Géneros bacterianos reportados con regularidad como parte de la microbiota de anofelinos (Rani *et al.*, 2009; Kambris *et al.*, 2010; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011; Lindh *et al.*, 2008).

Cabe mencionar que, entre los tres grupos evaluados, fueron evidentes géneros compartidos, como *Acinetobacter*, *Burkholderia* – *Paraburkholderia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Ralstonia*. Planteando la posibilidad que dichos géneros bacterianos conformen la microbiota núcleo de *An. albimanus*. Sin embargo, es necesario que la deducción realizada sea validada cuantitativamente mediante principios estadísticos y matemáticos aplicados en algoritmos de programación. Pues microbiota núcleo únicamente puede ser definida por aquellos géneros bacterianos en los que se comprueba su presencia en, al menos, 50% de las muestras (Caporaso *et al.*, 2010).

A pesar de que la presencia de los géneros mencionados no pueden ser explicados cuantitativamente, desde un enfoque ecológico es posible argumentar el por qué estos géneros se comparten en los tres grupos estudiados. Evaluando la ecología del sitio de colecta en el que se muestrearon los ejemplares de campo, Figura 20, se puede observar que el cuerpo de agua (noria) donde se obtuvieron las larvas y pupas, estaba rodeado de vegetación con ciertas zonas áridas y lodosas. Es decir, materia orgánica que puede ser transformado en nutrientes, brindando el ecosistema ideal para que bacterias que son capaces de metabolizar los compuestos disponibles en suelos, agua y tejido vegetal, se reproduzcan y distribuyan fácilmente en ambiente. Lo cual es el caso de los saprófitos *Acinetobacter*, *Burkholderia* – *Paraburkholderia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Ralstonia*, para los cuales se han reportado en diversos estudios, que forman parte de la rizosfera (Baumann, 1968; Izard *et al.*, 1981; Salles *et al.*, 2004; Jansson y Hofmockel, 2018).

En tanto, es factible suponer que en el sitio de colecta existe un ecosistema de interacción dinámica entre raíces de plantas y microorganismos, como *Acinetobacter*, *Burkholderia* – *Paraburkholderia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Ralstonia*, que permite que la presencia de dichos géneros en el ambiente sea representativa. A tal punto que colonizo los cuerpos de agua próximos, en este caso norias, logrando ser observada en la microbiota intestinal de los ejemplares de campo estudiados. Además cabe remarcar que debido a que *Acinetobacter*, *Burkholderia* – *Paraburkholderia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Ralstonia* fueron identificados como parte de la microbiota intestinal de los tres grupos de *An. albimanus* evaluados, es posible presuponer que la rizosfera microbiana establecida en el sitio de colecta donde se obtuvieron los anofelinos que dieron origen a la cepa resistente y cepa susceptible a deltametrina, presentó en su momento un microbioma similar al que posiblemente existe en el criadero en el que se recolectaron los ejemplares de campo. No obstante, a pesar de la deducción realizada con base en los resultados obtenidos y la literatura reportada, es necesario que lo que se menciona sea comprobado a través de un método científico. Por lo que se recomienda que, para sustentar el análisis ecológico, se muestre el suelo, agua y vegetación del sitio de colecta. Con el objetivo de identificar si realmente las suposiciones realizadas en este estudio son válidas.

En general, en el presente estudio, todos los géneros representativos reportados como parte de la microbiota del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*, ya habían sido con anterioridad descritos en la microbiota intestinal de anofelinos (Djadid *et al.*, 2011; Chavshin *et al.*, 2012; 2014a; Villegas y Pimenta, 2014; Dada *et al.*, 2018). Sin embargo, *Burkholderia-Paraburkholderia*, *Cloacibacterium*, *Delftia*, *Elizabethkingia*, *Methylobacterium*, *Ralstonia* y *Sphingomonas* son por primera vez reportados como parte de la microbiota de *An. albimanus*. Donde todas, a excepción de *Elizabethkingia*, han sido reportadas como degradadoras de insecticidas y/o compuestos orgánicos complejos.

Es claro que los resultados mostrados en el presente estudio, de carácter exploratorio, dejan una puerta abierta para el planteamiento de investigaciones que permitan concretar el rol de cada género bacteriano dentro de la microbiota del intestino medio de *An. albimanus* y posibles aplicaciones en el

control del vector y manejo de resistencia a insecticidas. Particularmente en aquellas bacterias que mostraron un grado de representatividad en los tres grupos evaluados y que se ven vinculadas con degradación de insecticidas y/o compuestos complejos.

C. Diversidad microbiana en y entre la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus* de campo, resistentes a deltametrina y susceptibles a deltametrina

Desde el análisis de abundancia relativa, fue evidente que la composición de la microbiota bacteriana del tracto digestivo de las muestras de campo divergía de la composición observada en las cepas de laboratorio: cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina. Con el fin de visualizar gráficamente lo mostrado en el análisis de abundancia relativa, se procedió a realizar un agrupamiento UPGMA de las muestras, basándose en las similitudes encontradas entre las comunidades bacterianas asociadas a la microbiota de cada grupo analizado. Al observar la topología de la gráfica, se pudo ver que la cepa resistente a deltametrina y la cepa susceptible se agruparon en un mismo clúster, mientras que las cepas de campo formo un clúster evidentemente distante de las cepas de laboratorio. Demostrando que, en efecto, las cepas de laboratorio presentan una microbiota similar y que divergen en composición con las muestras de campo.

Se sabe que la mayor parte de la microbiota en anofelinos adultos, está constituida por bacterias que el mosquito adquiere del entorno acuático al que se expone al eclosionar. Puesto que como se mencionó anteriormente, la mayor parte de la microbiota bacteriana intestinal que es adquirida en el estadio larval, se pierde en el proceso de pupación (Wotton, 1997). Por ende, el sitio de crianza tiene una influencia directa en el moldeamiento de la microbiota intestinal de los anofelinos. Si esto se toma en cuenta, era de esperar que la microbiota de las muestras de campo variaran con respecto a las de laboratorio. Acreditando las diferencias observadas al efecto que las condiciones de crianza, a las que fueron sometidas las muestras de campo (variantes) y cepas de laboratorio (controladas), ejercieron en el modelamiento de la composición de la microbiota intestinal de mosquitos (Boissière *et al.*, 2012; Krajacich *et al.*, 2018).

Cabe notar que, cuando se evaluó la distribución de las cepas de campo por criadero en el gráfico UPGMA (Figura 31), fue evidente una correlación entre la composición de la microbiota y el sitio de colecta. Donde los ejemplares provenientes de Las Cruces muestran una microbiota similar a la microbiota de las muestras de laboratorio. Analizando lo encontrado es posible deducir que, como ya se ha mencionado, parte de la microbiota adquirida en campo es aún conservada de generación en generación en las cepas de laboratorio. Posiblemente por una fuerte relación simbiótica que permite el adecuado desarrollo del mosquito. Mostrando que, en cuanto a microbiomas bacterianos, las cepas de laboratorio no son completamente ajenas a las condiciones observadas en campo.

Si bien la composición de la microbiota bacteriana mostrada a través de gráficos permitió ver las similitudes y diferencias entre los grupos estudiados, lo observado quería ser interpretado a través de índices ecológicos de diversidad alfa y diversidad beta. De los análisis de diversidad alfa, se esperaba que los resultados indicaran que la diversidad de las muestras de campo predominara sobre la observada en las muestras de laboratorio. Debido a que los individuos de campo se encontraron, durante su desarrollo, expuestos a un microbioma bacteriano variante (Yadav *et al.*, 2016). Sin embargo, los resultados mostraron que los individuos de campo se caracterizaron por presentar una microbiota rica y uniforme, pero con una diversidad menor a la que mostraron los individuos de laboratorio, Cuadro 10. Presumiblemente esto se deba a que, en más de la mitad de las muestras evaluadas, era evidente la predominancia de un solo género bacteriano. Aludiendo la posibilidad que, en campo, las bacterias que conforman la microbiota intestinal compiten por la adquisición de nutrientes. Debido a las limitaciones que naturalmente suceden en un ambiente aleatorio (Hibbing *et al.*, 2010). Bajo este argumento, el resultado obtenido en los análisis de diversidad alfa toma un sentido lógico, que puede ser explicado por la falta de competitividad entre los individuos que conforman la microbiota del tracto digestivo de las cepas de laboratorio. Máxime, porque uno de los factores principales que induce la competitividad: limitación de nutrientes, es poco recurrente cuando se crían mosquitos en condiciones controladas, como los son las de laboratorio.

Es claro que los índices de diversidad alfa evaluados mostraron valores que variaron entre las muestras de campo, cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina. No obstante, tras un análisis estadístico, se comprobó que la microbiota bacteriana del tracto digestivo de los tres grupos estudiados no difieren en cuanto diversidad alfa. Comparando lo obtenido con lo reportado en la literatura, hasta el momento, se observaron discrepancias. En estudios, al comparar la diversidad alfa entre grupos de campo y grupos de laboratorio, es posible ver una diferencia significativa (Chavshin *et al.*, 2012; Krajacich *et al.*, 2018). En *An. gambiae*, encontraron que la composición bacteriana difería drásticamente entre aquellos individuos que fueron criados en laboratorio, de individuos que provenían de campo. Con mayor diversidad encontrada en los individuos de campo, que los individuos criados en condiciones controladas. Mostrando una diferencia significativa en los índices de diversidad alfa, no solo entre los ejemplares de campo y laboratorio, sino también entre los ejemplares que provenían de los diferentes puntos de colecta (Boissière *et al.*, 2012).

La razón por la que los índices de diversidad alfa no fueron capaces de demostrar una variación significativa en la diversidad del microbioma bacteriano entre las muestras de laboratorio y las muestras de campo, recae en el concepto ecológico en el cual este tipo de diversidad fue creado. La diversidad alfa se basa en medir la riqueza y/o abundancia de especies, como número de taxones, en una comunidad en específico (Jost, 2007b; Wetzel *et al.*, 2012; Thukral, 2017). Los principios matemáticos y estadísticos en los que se basó la formulación de las ecuaciones no toman en cuenta si existe diferencias entre los taxones de una comunidad a otra, únicamente considera en base a diferentes criterios, el número de especies presentes. Si en los ecosistemas hay un número similar de especies, es probable que los índices

de diversidad alfa indiquen que no hay diferencia significativa, a pesar de que posiblemente la composición del microbioma sea diferente (Beck y Schwanghart, 2010; Morris *et al.*, 2014).

Claramente en el análisis de abundancia relativa, Figura 30, se observa que tanto las muestras de campo como las cepas de laboratorio, presentan una riqueza similar en cuanto a géneros bacterianos que conforman la microbiota del tracto digestivo. Observación que se respalda y justifica por los resultados obtenidos en el análisis de diversidad alfa. No obstante, dichos resultados no forzosamente indica que la composición del microbioma bacteriano entre las cepas de laboratorio y las muestras de campo es similar. Tras un análisis de diversidad beta, por el método UniFrac repesado, se mostró que el 45% de la variación de los datos se debía a la composición del microbioma bacteriano de las muestras de campo, cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina. Es decir que, la diferencia en la composición de la microbiota bacteriana fue significativa hasta que se evaluó el grado de recambio de especies bacterianas entre las muestras de campo, cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina. Permitiendo establecer, en base a un parámetro filogenético, el grado de diferenciación entre comunidades biológicas.

Los análisis ecológicos permitieron detectar que las disimilitudes entre los grupos bajo estudio se debían principalmente a la composición del microbioma bacteriano y no a un factor de riqueza y/o abundancia. El gráfico PCoA, Figura 32, evidenció que el ambiente en el cual se criaron los anofelinos, fue el principal factor que influyó en moldeamiento del microbioma bacteriano. En tanto, la variación observada en los análisis de diversidad beta puede ser justificada por el ambiente de crianza donde los mosquitos se desarrollaron. Si se toma en cuenta que las cepas de laboratorio, cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina, fueron criadas bajo el mismo ambiente controlado; mientras que las muestras de campo se criaron bajo un reflejo de la aleatoriedad encontrada en campo, era de esperar que la composición de la microbiota bacteriana entre las cepas de laboratorio fuera bastante similar y diferente de la composición observada en los ejemplares de campo.

Implementar una metodología que permitiera evaluar la diversidad en y entre muestras de laboratorio y muestras de campo, permitió mostrar como el sitio de crianza, y los factores de estrés presentes, influye en la composición de la microbiota del intestino medio de mosquitos adultos. No obstante, con el alcance del presente estudio, no fue posible explicar de manera concreta y con datos cuantitativos los resultados obtenidos según la ecología de la fuente acuática nativa de cada uno de los grupos evaluados. Por lo que, para complementar los argumentos discutidos, es necesario que se investigue y formulen metodologías que faculten la medición de indicadores ambientales que brinden una descripción de los sitios de colecta.

IX. CONCLUSIONES

A. General

La composición del microbioma bacteriano entre las muestras de campo y las cepas de laboratorio no mostraron una variación significativa a nivel de diversidad alfa. Sin embargo, mediante el método UniFrac repesado, se identificó que el 45% de la variación significativa se debía al grado de recambio filogenético entre los géneros bacterianos presentes en la microbiota de las muestras de campo y los géneros bacterianos presentes en la microbiota de las cepas de laboratorio, cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina. En específico, por la dominancia de *Elizabethkingia* en la microbiota de los ejemplares de campo recolectados en El Terrero. Señalando la influencia directa del sitio de crianza en el moldeamiento del microbioma bacteriano del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*.

B. Específicas

1. El proceso de extracción de ADN genómico logró ser optimizado al tratar las muestras con proteinasa K y Co-Precipitant Pink/ poliacrilamida lineal.
2. Los géneros bacterianos *Acinetobacter*, *Burkholderia* – *Paraburkholderia* y *Ralstonia* fueron los más representativos, con más del 20% de proporción relativa, en la cepa resistente a deltametrina (RDelta) y la cepa susceptible a deltametrina (Sanarate).
3. Se demostró mediante la prueba Mann-Whitney que la predominancia, en abundancia relativa, de *Burkholderia* – *Paraburkholderia* en la cepa resistente a deltametrina, es estadísticamente significativa. Sugiriendo la posibilidad de que la predominancia de dicho género en la cepa resistente se deba a su rol simbiótico en la degradación de deltametrina y por ende al establecimiento de resistencia.
4. Los géneros bacterianos *Elizabethkingia* y *Asaia* fueron los más representativos dentro de las muestras de campo, representatividad de más del 90%, gracias a que se transmiten transestadialmente y poseen características bactericidas y antiparasitarias.
5. En base al agrupamiento UPGMA se demostró visualmente que, en efecto, las cepas resistentes a deltametrina y las cepas susceptibles a deltametrina presentan una microbiota similar y que diverge en composición con las muestras de campo provenientes de la localidad El Terrero. En cambio, para las muestras de campo provenientes de la localidad Las Cruces, se encontraron ejemplares que se agruparon dentro del clúster de las cepas de laboratorio. Demostrando que la microbiota bacteriana del tracto digestivo de individuos de laboratorio, no está totalmente aislada de la que caracteriza la microbiota del tracto digestivo de anofelinos de campo.

6. Entre los tres grupos evaluados, fue evidente la presencia de *Acinetobacter*, *Burkholderia* – *Paraburkholderia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Ralstonia*. Aludiendo a que la rizosfera microbiana establecida en el sitio de colecta donde se obtuvieron los anofelinos que dieron origen a la cepa resistente y cepa sucesible a deltametrina, presento en su momento un microbioma similar al que posiblemente existe en el criadero en el que se recolectaron los ejemplares de campo.
7. En este estudio, fueron reportados por primera vez *Burkholderia-Paraburkholderia*, *Cloacibacterium*, *Delftia*, *Elizabethkingia*, *Methylobacterium*, *Ralstonia* y *Sphingomonas* como parte de la microbiota del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*. Donde todos los géneros, a excepción de *Elizabethkingia*, han sido reportadas como degradadoras de insecticidas y/o compuestos orgánicos complejos.
8. Los análisis ecológicos permitieron detectar que las disimilitudes entre las muestras de campo y cepas de laboratorio, cepa resistente a deltametrina y cepa susceptible a deltametrina, se debían a discrepancias en la configuración del microbioma y no a un factor de riqueza y/o abundancia. Recalcando la importancia del ecosistema del sitio de crianza en el establecimiento del microbioma bacteriano del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*.

X. RECOMENDACIONES

1. Corroborar, mediante un ensayo *in vitro*, implementando medios mínimos, si los géneros bacterianos identificados como potenciales degradadores de insecticidas en la microbiota del tracto digestivo de la cepa resistente a deltametrina, son capaces de utilizar deltametrina como única fuente de carbono.
2. Realizar una búsqueda de resistencia a otros insecticidas en las muestras de campo, en vista que dentro de la microbiota bacteriana de dicho grupo, se identificaron géneros bacterianos que son capaces de degradar insecticidas de la familia de organofosforados, insecticidas de uso agrícola.
3. Debido a la influencia directa del sitio de crianza en el moldeamiento del microbioma bacteriano de hembras adultas *An. albimanus*, se recomienda estudiar a mayor detalle, mediante metodologías que permita registrar parámetros bióticos y abióticos, la ecología de los criaderos ubicados en Las Cruces y El Terrero.
4. Caracterizar, al igual que se realizó con la microbiota bacteriana, la microbiota fúngica que coloniza el tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus* de campo y laboratorio. Con el fin de complementar y ampliar los resultados obtenidos en el presente estudio.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Abd-Alla, M.H. 1994. <<Phosphodiesterase and phosphotriesterase in Rhizobium and Bradyrhizobium strains and their roles in the degradation of organophosphorus pesticides>>. *Lett. Appl. Microbiol.* 19 (4): 240–243. Wiley/Blackwell (10.1111). <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1994.tb00953.x>.

Abdul-Ghani, R.; A.M. Al-Mekhlafi y M.S. Alabsi. 2012. <<Microbial control of malaria: Biological warfare against the parasite and its vector>>. *Acta Trop.* <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.11.001>.

Akorli, J.; M. Gendrin; N.A.P. Pels; D. Yeboah-Manu; G.K. Christophides y M.D. Wilson. 2016. <<Seasonality and locality affect the diversity of Anopheles gambiae and Anopheles coluzzii midgut microbiota from Ghana>>. *PLoS One* 11 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157529>.

Almeida, L.G. de; L.A.B. de Moraes; J.R. Trigo; C. Omoto y F.L. Cônsoli. 2017. <<The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation>>. *PLoS One* 12 (3): e0174754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174754>.

Alout, H.; A. Berthomieu; A. Hadjivassilis y M. Weill. 2007. <<A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to Culex pipiens mosquitoes from Cyprus>>. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37 (1): 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.10.001>.

Alout, H.; P. Labbé; A. Berthomieu; N. Pasteur y M. Weill. 2009. <<Multiple duplications of the rare ace-1 mutation F290V in Culex pipiens natural populations>>. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39 (12): 884–891. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.10.005>.

Alves, S.N.; J.E. Serrão y A.L. Melo. 2010. <<Alterations in the fat body and midgut of Culex quinquefasciatus larvae following exposure to different insecticides>>. *Micron* 41 (6): 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.04.004>.

Apinjoh, T.O.; J.K. Anchang-Kimbi; R.N. Mugri; D.A. Tangoh; R. V Nyingchu; H.F. Chi; R.B. Tata; C. Njumkeng; C. Njua-Yafi y E.A. Achidi. 2015. <<The Effect of Insecticide Treated Nets (ITNs) on Plasmodium falciparum Infection in Rural and Semi-Urban Communities in the South West Region of Cameroon>>. *PLoS One* 10 (2): e0116300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116300>.

Apprill, A.; S. McNally; R. Parsons y L. Weber. 2015. <<Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton>>. *Aquat. Microb. Ecol.* 75 (2): 129–137. <https://doi.org/10.3354/ame01753>.

Arrow, K.J.; C. Panosian y H. Gelband. 2004. *Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance*. *Inst. Med. Comm. Econ. Antimalar. Drugs*. Washington, D.C.: National Academies Press (US). <https://doi.org/ISBN-10: 0-309-09218-3>.

Awolola, T.S.; O.A. Oduola; C. Strode; L.L. Koekemoer; B. Brooke y H. Ranson. 2009. <<Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector Anopheles gambiae sensu stricto from Nigeria>>. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103 (11): 1139–1145. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.08.021>.

Azamy, A.; A. Saafan; T. Essam; M. Amin y S. Ahmed. 2015. <<Biodegradation of Malathion by Acinetobacter baumannii Strain AFA Isolated from Domestic Sewage in Egypt>>. *Int. J. Bioeng. Life Sci.* 9 (1): 55–65. <https://doi.org/scholar.waset.org/1307-6892/10000483>.

Bahrndorff, S.; N. de Jonge; H. Skovgård y J.L. Nielsen. 2017. <<Bacterial Communities Associated with Houseflies (*Musca domestica* L.) Sampled within and between Farms>>. *PLoS One* 12 (1): e0169753. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169753>.

Bass, C.; D. Nikou; M.J. Donnelly; M.S. Williamson; H. Ranson; A. Ball; J. Vontas y L.M. Field. 2007. <<Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods.>>. *Malar. J.* 6 (1): 111. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-111>.

Baumann, P. 1968. <<Isolation of *Acinetobacter* from soil and water.>>. *J. Bacteriol.* 96 (1): 39–42. American Society for Microbiology (ASM). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4874313> (15 de julio, 2018).

Behar, A.; B. Yuval y E. Jurkevitch. 2008. <<Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and their impact on host longevity>>. *J. Insect Physiol.* 54 (9): 1377–1383. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.011>.

Beier, J.C.; J. Keating; J.I. Githure; M.B. Macdonald; D.E. Impoinvil y R.J. Novak. 2008. <<Integrated vector management for malaria control>>. *Malar. J.* 7 (Suppl 1): S4. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-S1-S4>.

Bioline. 2016. <<Co-Precipitant, Pink>>. Inglaterra: Bioline Reagents Ltd. <http://www.bioline.com/us/co-precipitant-pink.html>.

Blanford, S.; B.H.K. Chan; N. Jenkins; D. Sim; R.J. Turner; A.F. Read y M.B. Thomas. 2005. <<Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission.>>. *Science* 308 (5728): 1638–1641. <https://doi.org/10.1126/science.1108423>.

Bledsoe, J.W.; B.C. Peterson; K.S. Swanson y B.C. Small. 2016. <<Ontogenetic Characterization of the Intestinal Microbiota of Channel Catfish through 16S rRNA Gene Sequencing Reveals Insights on Temporal Shifts and the Influence of Environmental Microbes>>. *PLoS One* 11 (11): e0166379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166379>.

Boissière, A.; M.T. Tchioffo; D. Bachar; L. Abate; A. Marie; S.E. Nsango; H.R. Shahbazkia; P.H. Awono-Ambene; E.A. Levashina; R. Christen y I. Morlais. 2012. <<Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection>>. *PLoS Pathog.* 8 (5): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002742>.

Bou, G.; A. Fernández-Olmos; C. García; J.A. Sáez-Nieto y S. Valdezate. 2011. <<Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología>>. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29 (8): 601–608. Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>.

Budka, A.; A. Łacka y K. Szoszkiewicz. 2018. <<Estimation of river ecosystem biodiversity based on the Chao estimator>>. *Biodivers. Conserv.* 27 (1): 205–216. <https://doi.org/10.1007/s10531-017-1429-2>.

Busvine, J.R. 1951. <<Mechanism of resistance to insecticide in Houseflies>>. *Nature* 168 (4266): 193–195. <https://doi.org/10.1038/168193a0>.

Buttigieg, P.L. y A. Ramette. 2014. <<A guide to statistical analysis in microbial ecology: a community-focused, living review of multivariate data analyses>>. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90 (3): 543–550. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12437>.

Caporaso, G.; J. Kuczynski; J. Stombaugh; K. Bittinger; F.D. Bushman; E.K. Costello; N. Fierer; A.G. Peña; J.K. Goodrich; J.I. Gordon; G.A. Huttley; S.T. Kelley; D. Knights; J.E. Koenig; R.E. Ley; C.A. Lozupone; D. McDonald; B.D. Muegge; M. Pirrung; J. Reeder; J.R. Sevinsky; P.J. Turnbaugh; W.A. Walters; J. Widmann; T. Yatsunenko; J. Zaneveld y R. Knight. 2010. <<QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data>>. *Nat. Methods* 7 (5): 335–336. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.

Caporaso, J.G.; C.L. Lauber; E.K. Costello; D. Berg-Lyons; A. Gonzalez; J. Stombaugh; D. Knights; P. Gajer; J. Ravel; N. Fierer; J.I. Gordon y R. Knight. 2011. <<Moving pictures of the human microbiome>>. *Genome Biol.* 12 (5): R50. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-r50>.

Caporaso, J.G.; C.L. Lauber; W.A. Walters; D. Berg-Lyons; J. Huntley; N. Fierer; S.M. Owens; J. Betley; L. Fraser; M. Bauer; N. Gormley; J.A. Gilbert; G. Smith y R. Knight. 2012. <<Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms>>. *ISME J.* 6 (8): 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>.

Caporaso, J.G.; C.L. Lauber; W.A. Walters; D. Berg-Lyons; C.A. Lozupone; P.J. Turnbaugh; N. Fierer y R. Knight. 2011. <<Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample>>. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (Supplement_1): 4516–4522. National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>.

CDC - Centers for Disease Control. 2016. <<CDC - Malaria - About Malaria - Biology>>. <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html> (11 de marzo, 2017).

Chakravorty, S.; D. Helb; M. Burday; N. Connell y D. Alland. 2007. <<A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria>>. *J. Microbiol. Methods* 69 (2): 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>.

Chandel, K.; M.J. Mendki; R.Y. Parikh; G. Kulkarni; S.N. Tikar; D. Sukumaran; S. Prakash; B.D. Parashar; Y.S. Shouche y V. Veer. 2013. <<Midgut Microbial Community of Culex quinquefasciatus Mosquito Populations from India>>. *PLoS One* 8 (11): e80453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080453>.

Chavshin, A.; M. Oshaghi; H. Vatandoost; M. Pourmand; A. Raeisi y O. Terenius. 2014a. <<Isolation and identification of culturable bacteria from wild Anopheles culicifacies, a first step in a paratransgenesis approach>>. *Parasit. Vectors* 7 (1): 419. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-419>.

_____. 2014b. <<Isolation and identification of culturable bacteria from wild Anopheles culicifacies, a first step in a paratransgenesis approach>>. *Parasit. Vectors* 7 (1): 419. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-419>.

Chavshin, A.R.; M.A. Oshaghi; H. Vatandoost; M.R. Pourmand; A. Raeisi; A.A. Enayati; N. Mardani y S. Ghoorchian. 2012. <<Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught Anopheles stephensi: A step toward finding suitable paratransgenesis candidates>>. *Acta Trop.* 121 (2): 129–134. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.015>.

Chen, L. 2012. *Characterization of the Intestinal Microbiome and Lactobacilli Community : Influence of Dietary and Environmental Factors By.* PhD thesis. University of Illinois at Urbana-Champaign. https://www.ideals.illinois.edu/bitstream/handle/2142/42397/Long_Chen.pdf?sequence=1 (5 de marzo, 2017).

Cho, I. y M.J. Blaser. 2012. <<The human microbiome: at the interface of health and disease>>. *Nat. Rev. Genet.* <https://doi.org/10.1038/nrg3182>.

Choi, J.-S. y D.M. Soderlund. 2006. <<Structure–activity relationships for the action of 11 pyrethroid insecticides on rat Nav1.8 sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes>>. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211 (3): 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.06.022>.

Choudhuri, S. 2014. *Bioinformatics for Beginners*. Mary: Elsevier Inc.

Cibulskis, R.E.; P. Alonso; J. Aponte; M. Aregawi; A. Barrette; L. Bergeron; C.A. Fergus; T. Knox; M. Lynch; E. Patouillard; S. Schwarte; S. Stewart y R. Williams. 2016. <<Malaria: Global progress 2000 – 2015 and future challenges>>. *Infect. Dis. Poverty* 5 (1): 61. <https://doi.org/10.1186/s40249-016-0151-8>.

Cirimotich, C.M.; Y. Dong; A.M. Clayton; S.L. Sandiford; J.A. Souza-Neto; M. Mulenga y G. Dimopoulos. 2011. <<Natural Microbe-Mediated Refractoriness to Plasmodium Infection in *Anopheles gambiae*>>. *Science* (80-.). 332 (6031): 855–858. <https://doi.org/10.1126/science.1201618>.

Colovic, M.B.; D.Z. Krstic; T.D. Lazarevic-Pasti; A.M. Bondzic y V.M. Vasic. 2013. <<Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology>>. *Curr. Neuropharmacol.* 11 (3): 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>.

Coon, K.L.; K.J. Vogel; M.R. Brown y M.R. Strand. 2014. <<Mosquitoes rely on their gut microbiota for development>>. *Mol. Ecol.* 23 (11): 2727–2739. <https://doi.org/10.1111/mec.12771>.

Coosemans, M. y P. Carnevale. 1995. <<Malaria vector control : a critical review on chemical methods and insecticides>>. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* (1920). 75 (1): 13–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.09.004>.

Corbel, V. y R. N 'guessan. 2013. <<Distribution, mechanisms, impact and management of insecticide resistance in malaria vectors : a pragmatic review>>. <https://doi.org/10.5772/56117>.

Crowder, D.W.; P.C. Ellsworth; B.E. Tabashnik y Y. Carrière. 2008. <<Effects of Operational and Environmental Factors on Evolution of Resistance to Pyriproxyfen in the Sweetpotato Whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae)>>. *Environ. Entomol.* 37 (6): 1514–1524. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-37.6.1514>.

Cruz, L.R.; T. Spangenberg; M.V. Lacerda y T.N. Wells. 2013. <<Malaria in South America: a drug discovery perspective>>. *Malar. J.* 12 (1): 168. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-168>.

Cutler, D.J. y J.D. Jensen. 2010. <<To Pool, or Not to Pool?>>. *Genetics* 186 (1): 41–43. Genetics Society of America. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.121012>.

Dada, N.; M. Sheth; K. Liebman; J. Pinto y A. Lenhart. 2018. <<Whole metagenome sequencing reveals links between mosquito microbiota and insecticide resistance in malaria vectors>>. *Sci. Rep.* 8 (1): 2084. Springer US. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20367-4>.

Damiani, C.; I. Ricci; E. Crotti; P. Rossi; A. Rizzi; P. Scuppa; A. Capone; U. Ulissi; S. Epis; M. Genchi; N. Sagnon; I. Faye; A. Kang; B. Chouaia; C. Whitehorn; G.W. Moussa; M. Mandrioli; F. Esposito; L. Sacchi; C. Bandi; D. Daffonchio y G. Favia. 2010. <<Mosquito-Bacteria Symbiosis: The Case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*>>. *Microb. Ecol.* 60 (3): 644–654. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9704-8>.

David, J.-P.; H.M. Ismail; A. Chandor-Proust y M.J.I. Paine. 2013. <<Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth>>. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **368** (1612): 20120429–20120429. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0429>.

Dickson, R.P.; J.R. Erb-Downward; H.C. Prescott; F.J. Martinez; J.L. Curtis; V.N. Lama y G.B. Huffnagle. 2014. <<Analysis of Culture-Dependent versus Culture-Independent Techniques for Identification of Bacteria in Clinically Obtained Bronchoalveolar Lavage Fluid>>. *J. Clin. Microbiol.* **52** (10): 3605–3613. <https://doi.org/10.1128/JCM.01028-14>.

Diegelmann, C.; J. Weber; R. Heinzel-Wieland y M. Kemme. 2015. <<Characterization of a cypermethrin-degrading *Methylobacterium* sp. strain A-1 and molecular cloning of its carboxylesterase gene>>. *J. Basic Microbiol.* **55** (11): 1245–1254. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500186>.

Djadid, N.; H. Jazayeri; A. Raz; G. Favia; I. Ricci y S. Zakeri. 2011. <<Identification of the midgut microbiota of *An. stephensi* and *c. maculipennis* for their application as a paratransgenic tool against malaria>>. *PLoS One* **6** (12): 6–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028484>.

Djouaka, R.F.; A.A. Bakare; O.N. Coulibaly; M.C. Akogbeto; H. Ranson; J. Hemingway y C. Strode. 2008. <<Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria>>. *BMC Genomics* **9** (1): 538. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-538>.

Downes, G.B. y M. Granato. 2004. <<Acetylcholinesterase function is dispensable for sensory neurite growth but is critical for neuromuscular synapse stability>>. *Dev. Biol.* **270** (1): 232–245. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.02.027>.

Edgar, R.C. 2013. <<UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads>>. *Nat. Methods* **10** (10): 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>.

Elliott, M. 1989. <<The pyrethroids: Early discovery, recent advances and the future>>. *Pestic. Sci.* **27** (4): 337–351. <https://doi.org/10.1002/ps.2780270403>.

Engesser, K. y P. Fischer. 1991. <<Degradation of Haloaromatic Compounds>>. En *Biodegrad. Nat. Synth. Mater.* editado por W Betts. New York, NY: Springer London, 238. <https://books.google.com.gt/books?id=O0DhBwAAQBAJ&pg=PA21&lpg=PA21&dq=Klebsiella+%2B+DDT&source=bl&ots=XWdGUH1FNC&sig=9XW79a0VPbTcPIraU0h46rtZnu0&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiwhbGei5DbAhUowFkKHepqClOQ6AEITzAE#v=onepage&q=Klebsiella%2BDDT&f=false> (18 de mayo, 2018).

Faith, D.P. y A.M. Baker. 2006. <<Phylogenetic Diversity (PD) and Biodiversity Conservation: Some Bioinformatics Challenges>>. *Evol. Bioinforma.* **2**: 117693430600200. SAGE Publications. <https://doi.org/10.1177/117693430600200007>.

Farrelly, V.; F. Rainey y E. Stackebrandt. 1995. <<Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species>>. *Appl. Envir. Microbiol.* **61** (7): 2798–2801. <http://aem.asm.org/cgi/content/short/61/7/2798> (28 de febrero, 2017).

Favia, G.; I. Ricci; M. Marzorati; I. Negri; A. Alma; L. Sacchi; C. Bandi y D. Daffonchio. 2008. <<Bacteria of the Genus *Asaia*: A Potential Paratransgenic Weapon Against Malaria>>. En *Transgenes. Manag. Vector-Borne Dis.* New York, NY: Springer New York, 49–59. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78225-6_4.

Feng, X.; C. Yang; Y. Yang; J. Li; K. Lin; M. Li y X. Qiu. 2015. <<Distribution and frequency of G119S mutation in ace-1 gene within Anopheles sinensis populations from Guangxi, China>>. *Malar. J.* **14** (1): 470. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-1000-0>.

Feyereisen, R. 2006. <<Evolution of insect P450>>. *Biochem. Soc. Trans.* **34** (6): 1252–1255. <https://doi.org/10.1042/BST0341252>.

Garcia, L.S. 2010. *Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd Edition*. Santa Monica: American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555817435>.

Georghiou, G.P. y C.E. Taylor. 1977. <<Genetic and Biological Influences in the Evolution of Insecticide Resistance>>. *J. Econ. Entomol.* **70** (3): 319–323. <https://doi.org/10.1093/jee/70.3.319>.

Gimonneau, G.; M.T. Tchioffo; L. Abate; A. Boissière; P.H. Awono-Ambéné; S.E. Nsango; R. Christen y I. Morlais. 2014. <<Composition of Anopheles coluzzii and Anopheles gambiae microbiota from larval to adult stages>>. *Infect. Genet. Evol.* **28**: 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.09.029>.

Gonzalez-Ceron, L.; F. Santillan; M.H. Rodriguez; D. Mendez y J.E. Hernandez-Avila. 2003. <<Bacteria in midguts of field-collected Anopheles albimanus block Plasmodium vivax sporogonic development>>. *J Med Entomol* **40** (3): 371–374. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.3.371>.

Gregory, R.; A.C. Darby; H. Irving; M.B. Coulibaly; M. Hughes; L.L. Koekemoer; M. Coetzee; H. Ranson; J. Hemingway; N. Hall y C.S. Wondji. 2011. <<A De Novo Expression Profiling of Anopheles funestus, Malaria Vector in Africa, Using 454 Pyrosequencing>>. *PLoS One* **6** (2): e17418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017418>.

Groves, C. 2018. <<Biogeographic region>>. *Encycl. Br. inc.* <https://www.britannica.com/science/biogeographic-region/Components-of-species-diversity-species-richness-and-relative-abundance#ref588342> (23 de marzo, 2018).

Ben Guerrero, E.; M. Soria; R. Salvador; J.A. Ceja-Navarro; E. Campos; E.L. Brodie y P. Talia. 2016. <<Effect of Different Lignocellulosic Diets on Bacterial Microbiota and Hydrolytic Enzyme Activities in the Gut of the Cotton Boll Weevil (Anthonomus grandis)>>. *Front. Microbiol.* **07** (DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02093>.

Hamady, M.; J.J. Walker; J.K. Harris; N.J. Gold y R. Knight. 2008. <<Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex>>. *Nat. Methods* **5** (3): 235–237. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1184>.

Hayes, W.J. y E.R. Laws. 2010. *Summary for Policymakers. Clim. Chang. 2013 - Phys. Sci. Basis*. Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

Hemingway, J. y S.P. Karunaratne. 1998. <<Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism>>. *Med. Vet. Entomol.* **12** (1): 1–12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00082.x>.

Hemingway, J. y H. Ranson. 2000. <<Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease>>. *Annu. Rev. Entomol.* **45** (1): 371–391. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.371>.

Herbold, C.W.; C. Pelikan; O. Kuzyk; B. Hausmann; R. Angel; D. Berry y A. Loy. 2015. <<A flexible and economical barcoding approach for highly multiplexed amplicon sequencing of diverse target genes>>. *Front. Microbiol.* **6**: 731. Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00731>.

Hibbing, M.E.; C. Fuqua; M.R. Parsek y S.B. Peterson. 2010. <<Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle>>. *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (1): 15–25. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>.

Hien, A.S.; D.D. Soma; O. Hema; B. Bayili; M. Namountougou; O. Gnankiné; T. Baldet; A. Diabaté y K.R. Dabiré. 2017. <<Evidence that agricultural use of pesticides selects pyrethroid resistance within *Anopheles gambiae* s.l. populations from cotton growing areas in Burkina Faso, West Africa>>. *PLoS One* 12 (3): e0173098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173098>.

Hiergeist, A.; J. Gläsner; U. Reischl y A. Gessner. 2015. <<Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing: Figure 1>>. *ILAR J.* 56 (2): 228–240. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv017>.

Hugerth, L.W.; H.A. Wefer; S. Lundin; H.E. Jakobsson; M. Lindberg; S. Rodin; L. Engstrand y A.F. Andersson. 2014. <<DegePrime, a Program for Degenerate Primer Design for Broad-Taxonomic-Range PCR in Microbial Ecology Studies>>. *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (16): 5116–5123. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AEM.01403-14>.

Ilias, A.; J. Vontas y A. Tsagkarakou. 2014. <<Global distribution and origin of target site insecticide resistance mutations in *Tetranychus urticae*>>. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 48 (1): 17–28. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.02.006>.

Illumina. 2018a. <<DNA Sequencing | Understanding the genetic code with NGS>>. *Corporación Illumina*. <https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing.html> (11 de marzo, 2018).

_____. 2018b. <<Amplicon Sequencing Solutions>>. *Corporación Illumina*. <https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/amplicon-sequencing.html> (11 de marzo, 2018).

_____. 2018c. <<Technology | Key Illumina technology overviews>>. *Corporación Illumina*. <https://www.illumina.com/science/technology.html> (13 de marzo, 2018).

Invitrogen. 2016. <<Qubit 3.0 Fluorometer>>. *Thermo Fish*. Massachusetts: Thermo Fisher Scientific Inc. https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/Laboratory Instruments/Files/1014/MAN0010866_Qubit 3.0_RevA_UG_22Sep2014.pdf (1 de enero, 2018).

Iturbe-Ormaetxe, I.; T. Walker y S.L. O' Neill. 2011. <<Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease>>. *EMBO Rep.* 12 (6): 508–518. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.84>.

Izard, D.; C. Ferragut; F. Gavini; K. Kersters; J.D.E. Ley y H. Leclerc. 1981. <<Klebsiella terrigena, a New Species from Soil and Water>>. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 7755 (24): 116–127. <https://doi.org/10.1099/00207713-31-2-116>.

Janda, J.M. y S.L. Abbott. 2007. <<16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls>>. *J. Clin. Microbiol.* 45 (9): 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>.

Jansson, J.K. y K.S. Hofmockel. 2018. <<The soil microbiome — from metagenomics to metaphenomics>>. *Curr. Opin. Microbiol.* 43: 162–168. The Authors. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.01.013>.

Jany, J.-L. y G. Barbier. 2008. <<Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese>>. *Food Microbiol.* 25 (7): 839–848. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.003>.

Jin, Z.; Q. Guo; Z. Zhang y T. Yan. 2014. <<Biodegradation of type II pyrethroids and major degraded products by a newly isolated *Acinetobacter* sp. strain JN8>>. *Can. J. Microbiol.* **60** (8): 541–545. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0104>.

Jost, L. 2007. <<PARTITIONING DIVERSITY INTO INDEPENDENT ALPHA AND BETA COMPONENTS>>. *Ecology* **88** (10): 2427–2439. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1890/06-1736.1>.

Jovel, J.; J. Patterson; W. Wang; N. Hotte; S. O’Keefe; T. Mitchel; T. Perry; D. Kao; A.L. Mason; K.L. Madsen y G.K.S. Wong. 2016. <<Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics>>. *Front. Microbiol.* **7** (APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00459>.

Juárez, J. 2013. <<Paradigmas de control de la malaria en Guatemala, siglos XX y XXI, de la erradicación a la eliminación>>. *Rev. Cuba. Salud Publica* **39** (2): 346–353. <http://scielo.sld.cu> (29 de julio, 2017).

Jurelevicius, D.; V.M. Alvarez; J.M. Marques; L.R.F. de S. Lima; F. de A. Dias y L. Seldin. 2013. <<Bacterial community response to petroleum hydrocarbon amendments in freshwater, marine, and hypersaline water-containing microcosms>>. *Appl. Environ. Microbiol.* **79** (19): 5927–5935. <https://doi.org/10.1128/AEM.02251-13>.

Kamareddine, L. 2012. <<The biological control of the malaria vector>>. *Toxins (Basel)*. **4** (9): 748–767. <https://doi.org/10.3390/toxins4090748>.

Kambris, Z.; A.M. Blagborough; S.B. Pinto; M.S.C. Blagrove; H.C.J. Godfray; R.E. Sinden y S.P. Sinkins. 2010. <<Wolbachia Stimulates Immune Gene Expression and Inhibits Plasmodium Development in *Anopheles gambiae*>>. *PLoS Pathog.* **6** (10): e1001143. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001143>.

Karunamoorthi, K. y S. Sabesan. 2013. <<Insecticide Resistance in Insect Vectors of Disease with Special Reference to Mosquitoes: A Potential Threat to Global Public Health>>. *Heal. Scope* **2** (1): 4–18. <https://doi.org/10.5812/jhs.9840>.

Karunaratne, S.H.P.P. y J. Hemingway. 2001. <<Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka>>. *Bull. World Health Organ.* **79** (11): 1060–1064. <https://doi.org/10.1590/S0042-96862001001100010>.

Kasai, S.; O. Komagata; K. Itokawa; T. Shono; L.C. Ng; M. Kobayashi y T. Tomita. 2014. <<Mechanisms of Pyrethroid Resistance in the Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti*: Target Site Insensitivity, Penetration, and Metabolism>>. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8** (6): e2948. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002948>.

Keiser, J.; B.H. Singer y J. Utzinger. 2005. <<Reducing the burden of malaria in different eco-epidemiological settings with environmental management: a systematic review>>. *Lancet Infect. Dis.* **5** (11): 695–708. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70268-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70268-1).

Kikuchi, Y.; M. Hayatsu; T. Hosokawa; A. Nagayama; K. Tago y T. Fukatsu. 2012. <<Symbiont-mediated insecticide resistance.>>. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109** (22): 8618–8622. <https://doi.org/10.1073/Pnas.1200231109>.

Kokwaro, G. 2009. <<Ongoing challenges in the management of malaria.>>. *Malar. J.* **8** Suppl 1 (Suppl 1): S2. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-S1-S2>.

Kootallur, B.; M. Mani y C. Thangavelu. 2011. <<Bacterial identification in the diagnostic laboratory: How much is enough?>>. *Indian J. Med. Microbiol.* 29 (4): 336. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.90156>.

Krajacich, B.J.; D.L. Huestis; A. Dao; A.S. Yaro; M. Diallo; A. Krishna; J. Xu y T. Lehmann. 2018. <<Investigation of the seasonal microbiome of Anopheles coluzzii mosquitoes in Mali>>. *PLoS One* 13 (3): e0194899. Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194899>.

Kuczynski, J.; J. Stombaugh; W.A. Walters; A. González; J.G. Caporaso y R. Knight. 2011. <<Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities.>>. *Curr. Protoc. Bioinforma. Chapter 10*: Unit 10.7. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1007s36>.

Kwon, G.-S.; H.-Y. Sohn; K.-S. Shin; E. Kim y B.-I. Seo. 2005. <<Biodegradation of the organochlorine insecticide, endosulfan, and the toxic metabolite, endosulfan sulfate, by Klebsiella oxytoca KE-8>>. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67 (6): 845–850. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1879-9>.

Lapointe, F.-J.; J. Kirsch y R. Bleiweiss. 1994. <<Jackknifing of Weighted Trees: Validation of Phylogenies Reconstructed from Distance Matrices>>. *Mol. Phylogenet. Evol.* 3 (3): 256–267. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/mpev.1994.1028>.

Laveran, A.. 2000. <<Malaria>>. *Nat. Biotechnol.* 18 (Industry Trends-10s): IT21-IT23. <https://doi.org/10.1038/80056>.

Lehane, M.J. 1991. *Biology of blood-sucking insects*. Londres: Chapman & Hall. <http://www.springer.com/gp/book/9780412742200> (6 de marzo, 2018).

Life Technologies. 2001. <<DNA Zol Protocol>>. California, Estados Unidos: ThermoFisher. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/10503.pdf> (25 de abril, 2017).

Lindh, J.M.; A.-K. Borg-Karlson y I. Faye. 2008. <<Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae) and oviposition response to bacteria-containing water>>. *Acta Trop.* 107 (3): 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.008>.

Lindsay, S.; M. Kirby; E. Baris y R. Bos. 2004. <<ENVIRONMENTAL MANAGEMENT FOR MALARIA CONTROL IN THE EAST ASIA AND PACIFIC (EAP) REGION>>. Washington, D.C. http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/whowbmalariacontrol.pdf (18 de marzo, 2017).

Lol, J.C.; M.E. Castellanos; K.A. Liebman; A. Lenhart; P.M. Pennington y N.R. Padilla. 2013. <<Molecular evidence for historical presence of knock-down resistance in Anopheles albimanus, a key malaria vector in Latin America>>. *Parasit. Vectors* 6 (1): 268. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-268>.

Lol, J.C.; D. Da'Costa; Z. Monroy; L. Vizcaino; A. Lenhart y N.R. Padilla. 2017. <<Insecticide susceptibility profile of the main malaria vectors from Guatemala: 2011 - 2017>>. Guatemala.

Longkumer, T.; S. Parthasarathy; S.G. Vemuri y D. Siddavattam. 2014. <<OxyR-dependent expression of a novel glutathione S-transferase (Abgst01) gene in Acinetobacter baumannii DS002 and its role in biotransformation of organophosphate insecticides>>. *Microbiol. (United Kingdom)* 160 (PART 1): 102–112. <https://doi.org/10.1099/mic.0.070664-0>.

Lopez, Y. 2016. *Noria Las Cruces*. Guatemala, Guatemala: Centro de Estudios en Salud, Universidad del Valle de Guatemala.

Lozupone, C.; M.E. Lladser; D. Knights; J. Stombaugh y R. Knight. 2011. <<UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison>>. *ISME J.* 5 (2): 169–172. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>.

Lyimo, I.N. y H.M. Ferguson. 2009. <<Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors>>. *Trends Parasitol.* 25 (4): 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.01.005>.

Mabaso, M.L.H.; B. Sharp y C. Lengeler. 2004. <<Historical review of malarial control in southern African with emphasis on the use of indoor residual house-spraying>>. *Trop. Med. Int. Heal.* 9 (8): 846–856. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01263.x>.

Manguin, S.; C. Ngo y K. Tainchum. 2013. <<Bacterial Biodiversity in Midguts of Anopheles Mosquitoes, Malaria Vectors in Southeast Asia>>. En *Anopheles mosquitoes - New insights into Malar. vectors* editado por Sylvie Manguin. Francia: InTech, 28. <https://doi.org/43829>.

Martins, A.J.; C.D. e M. Ribeiro; D.F. Bellinato; A.A. Peixoto; D. Valle y J.B.P. Lima. 2012. <<Effect of Insecticide Resistance on Development, Longevity and Reproduction of Field or Laboratory Selected Aedes aegypti Populations>>. *PLoS One* 7 (3): e31889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031889>.

McDonald, J. 2014. *Handbook of Biological Statistics: Introduction*. Maryland: SPARKY HOUSE PUBLISHING. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

Mitchell, S.N.; D.J. Rigden; A.J. Dowd; F. Lu; C.S. Wilding; D. Weetman; S. Dadzie; A.M. Jenkins; K. Regna; P. Boko; L. Djogbenou; M.A.T. Muskavitch; H. Ranson; M.J.I. Paine; O. Mayans y M.J. Donnelly. 2014. <<Metabolic and Target-Site Mechanisms Combine to Confer Strong DDT Resistance in Anopheles gambiae>>. *PLoS One* 9 (3): e92662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092662>.

Mitchell, S.N.; B.J. Stevenson; P. Muller; C.S. Wilding; A. Egyir-Yawson; S.G. Field; J. Hemingway; M.J.I. Paine; H. Ranson y M.J. Donnelly. 2012. <<Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in Anopheles gambiae from Ghana>>. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (16): 6147–6152. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203452109>.

Moll, R.M.; W.S. Romoser; M.C. Modrakowski; A.C. Moncayo y K. Lerdthusnee. 2001. <<Meconial Peritrophic Membranes and the Fate of Midgut Bacteria During Mosquito (Diptera: Culicidae) Metamorphosis>>. *J. Med. Entomol.* 38 (1): 29–32. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.1.29>.

Moorefield, H. 1951. <<Sexual Dimorphism in Mosquito Pupae>>. *Malar. J.* 11 (3): 175–177.

Morgan, X.C. y C. Huttenhower. 2012. <<Chapter 12: Human Microbiome Analysis>>. *PLoS Comput. Biol.* 8 (12): e1002808. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002808>.

Morgan, X.C.; N. Segata y C. Huttenhower. 2013. <<Biodiversity and functional genomics in the human microbiome>>. *Trends Genet.* 29 (1): 51–58. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.09.005>.

Müller, P.; E. Warr; B.J. Stevenson; P.M. Pignatelli; J.C. Morgan; A. Steven; A.E. Yawson; S.N. Mitchell; H. Ranson; J. Hemingway; M.J.I. Paine y M.J. Donnelly. 2008. <<Field-Caught Permethrin-Resistant Anopheles gambiae Overexpress CYP6P3, a P450 That Metabolises Pyrethroids>>. *PLoS Genet.* 4 (11): e1000286. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000286>.

Nardini, L.; R.N. Christian; N. Coetzer y L.L. Koekemoer. 2013. <<DDT and pyrethroid resistance in Anopheles arabiensis from South Africa>>. *Parasit. Vectors* 6 (1): 229. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-229>.

Nestlé. 2018. <<Papilla de cereales NESTLÉ 5 cereales>>. *Papillas Cereal*. <https://www.nestlebebe.es/productos-infantiles/papillas-de-cereales/papillas-nestle/5-cereales> (20 de mayo, 2018).

Ngo, C.T.; F. Aujoulat; F. Veas; E. Jumas-Bilak y S. Manguin. 2015. <<Bacterial Diversity Associated with Wild Caught Anopheles Mosquitoes from Dak Nong Province, Vietnam Using Culture and DNA Fingerprint>>. *PLoS One* 10 (3): e0118634. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118634>.

Nguyen, N.-P.; T. Warnow; M. Pop y B. White. 2016. <<A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity>>. *npj Biofilms Microbiomes* 2 (6): 16004. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.4>.

Ngwa, C.J.; V. Glöckner; U.R. Abdelmohsen; M. Scheuermayer; R. Fischer; U. Hentschel y G. Pradel. 2013. <<16S rRNA Gene-Based Identification of *Elizabethkingia meningoseptica* (Flavobacteriales: Flavobacteriaceae) as a Dominant Midgut Bacterium of the Asian Malaria Vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) With Antimicrobial Activities>>. *J. Med. Entomol.* 50 (2): 404–414. Entomological Society of America. <https://doi.org/10.1603/ME12180>.

Nkya, T.E.; I. Akhouayri; W. Kisinza y J.-P. David. 2013. <<Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects>>. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43 (4): 407–416. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.10.006>.

Nkya, T.E.; R. Poupardin; F. Laporte; I. Akhouayri; F. Mosha; S. Magesa; W. Kisinza y J.-P. David. 2014. <<Impact of agriculture on the selection of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a multigenerational study in controlled conditions>>. *Parasit. Vectors* 7 (1): 480. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0480-z>.

O'Reilly, A.O.; B.P.S. Khambay; M.S. Williamson; L.M. Field; B.A. Wallace y T.G.E. Davies. 2006. <<Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel>>. *Biochem. J.* 396 (2): 255–263. <https://doi.org/10.1042/BJ20051925>.

O'Malley, C. 1995. <<Seven Ways to a Successful Dipping Career>>. *Wing Beats* 6 (4): 23–24. <http://vectorbio.rutgers.edu/outreach/dipping.htm> (18 de marzo, 2018).

Olé Sangba, M.L.; T. Deketramete; S.P. Wango; M. Kazanji; M. Akogbeto y M.O. Ndiath. 2016. <<Insecticide resistance status of the *Anopheles funestus* population in Central African Republic: a challenge in the war>>. *Parasit. Vectors* 9 (1): 230. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1510-9>.

Organización Panamericana de la Salud. 2014. <<Informe de la Situación de la Malaria en las Américas>>. Washington, D.C.

_____. 2017a. *Informe de la situación de la Malaria en las Américas, 2014. Us1.1*. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud. <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/33881>.

_____. 2017b. <<Análisis de Situación: Malaria>>. *Of. Sanit. Panam.* http://www.paho.org/gut/index.php?option=com_content&view=article&id=523&Itemid=405 (29 de julio, 2017).

Ortiz-Pérez, M.D.; A. Torres-Dosal; L.E. Batres; O.D. López-Guzmán; M. Grimaldo; C. Carranza; I.N. Pérez-Maldonado; F. Martínez; J. Pérez-Urizar y F. Díaz-Barriga. 2005. <<Environmental health assessment of deltamethrin in a malarious area of Mexico: Environmental persistence, toxicokinetics, and genotoxicity in exposed children>>. *Environ. Health Perspect.* 113 (6): 782–786. <https://doi.org/10.1289/ehp.7652>.

Osei-Poku, J.; C.M. Mbogo; W.J. Palmer y F.M. Jiggins. 2012. <<Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya>>. *Mol. Ecol.* 21 (20): 5138–5150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05759.x>.

Osta, M.A.; Z.J. Rizk; P. Labbé; M. Weill y K. Knio. 2012. <<Insecticide resistance to organophosphates in *Culex pipiens* complex from Lebanon.>>. *Parasit. Vectors* 5 (1): 132. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-132>.

Padilla, N.R. 2018. <<Situación de Malaria en Guatemala>>. Guatemala.

Parada, A.E.; D.M. Needham y J.A. Fuhrman. 2016. <<Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples>>. *Environ. Microbiol.* 18 (5): 1403–1414. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>.

Pidiyar, V.; K. Jangid; M. Patole y Y. Shouche. 2004. <<Studies on cultured and uncultured micro biota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16 s ribosomal RNA gene analysis>>. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70 (6): 597–603. <https://doi.org/10.1093/ajtmh/70.6.597> [pii] ET - 2004/06/24 LA - eng.

Poretzky, R.; L.M. Rodriguez-R; C. Luo; D. Tsementzi y K.T. Konstantinidis. 2014. <<Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics>>. *PLoS One* 9 (4): e93827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093827>.

Promega Corporation. 2018. <<Proteinase K Protocol>>. *Instr. Use Prod.* <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/n/proteinase-k-protocol/> (8 de abril, 2018).

Pumpuni, C.B.; J. Demaio; M. Kent; J.R. Davis y J.C. Beier. 1996. <<Bacterial population dynamics in three anopheline species: The impact on Plasmodium sporogonic development>>. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54 (2): 214–218.

Raghavendra, K.; T.K. Barik; B.P.N. Reddy; P. Sharma y A.P. Dash. 2011. <<Malaria vector control: From past to future>>. *Parasitol. Res.* 108 (4): 757–779. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2232-0>.

Randell, H.F.; K.L. Dickinson; E.H. Shayo; L.E.G. Mboera y R.A. Kramer. 2010. <<Environmental Management for Malaria Control: Knowledge and Practices in Mvomero, Tanzania>>. *Ecohealth* 7 (4): 507–516. <https://doi.org/10.1007/s10393-010-0343-9>.

Rani, A.; A. Sharma; R. Rajagopal; T. Adak y R.K. Bhatnagar. 2009. <<Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut micro-flora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector>>. *BMC Microbiol.* 9 (1): 96. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-96>.

Ricci, I.; C. Damiani; A. Capone; C. DeFreece; P. Rossi y G. Favia. 2012. <<Mosquito/microbiota interactions: from complex relationships to biotechnological perspectives>>. *Curr. Opin. Microbiol.* 15 (3): 278–284. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.03.004>.

Riveron, J.M.; C. Yunta; S.S. Ibrahim; R. Djouaka; H. Irving; B.D. Menze; H.M. Ismail; J. Hemingway; H. Ranson; A. Albert y C.S. Wondji. 2014. <<A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector>>. *Genome Biol.* 15 (2): R27. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r27>.

Rodicio, M.D.R. y M.D.C. Mendoza. 2004. <<Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica>>. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22 (4): 238–245. <https://doi.org/10.1157/13059055>.

Romoli, O. y M. Gendrin. 2018. <<The tripartite interactions between the mosquito , its microbiota and Plasmodium>>. *Parasit. Vectors* 11 (200): 1–8. Parasites & Vectors.

Rozendaal, J.A. 1997. *Vector Control, Methods for Use by Individual and Communities*. WHO, Geneva. Geneva: World Health Organization press.

Russell, T.L.; N.J. Govella; S. Azizi; C.J. Drakeley; S.P. Kachur y G.F. Killeen. 2011. <<Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania>>. *Malar. J.* 10 (1): 80. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-80>.

Ryan, M.P.; J.T. Pembroke y C.C. Adley. 2007. <<Ralstonia pickettii in environmental biotechnology: potential and applications>>. *J. Appl. Microbiol.* 103 (4): 754–764. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03361.x>.

Sadasivaiah, S.; Y. Tozan y J.G. Breman. 2007. <<Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) for indoor residual spraying in Africa: How can it be used for malaria control?>>. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77 (SUPPL. 6): 249–263. https://doi.org/77/6_Suppl/249 [pii].

Saiyed, Z.M.; C. Bochiwal; H. Gorasia; S.D. Telang y C.N. Ramchand. 2006. <<Application of magnetic particles (Fe₃O₄) for isolation of genomic DNA from mammalian cells>>. *Anal. Biochem.* 356 (2): 306–308. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.06.027>.

Salanoubat, M.; S. Genin; F. Artiguenave; J. Gouzy; S. Mangenot; M. Arlat; A. Billault; P. Brottier; J.C. Camus; L. Cattolico; M. Chandler; N. Choisne; C. Claudel-Renard; S. Cunnac; N. Demange; C. Gaspin; M. Lavie; A. Moisan; C. Robert; W. Saurin; T. Schiex; P. Siguier; P. Thébault; M. Whalen; P. Wincker; M. Levy; J. Weissenbach y C.A. Boucher. 2002. <<Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*>>. *Nature* 415 (6871): 497–502. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/415497a>.

Salles, J.F.; J.A. Van Veen; D. Van Elsas; J. Falca y J.D. Van Elsas. 2004. <<Multivariate Analyses of Burkholderia Species in Soil : Effect of Crop and Land Use History>>. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (7): 4012–4020. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4012>.

Schloss, P.D. y S.L. Westcott. 2011. <<Assessing and Improving Methods Used in Operational Taxonomic Unit-Based Approaches for 16S rRNA Gene Sequence Analysis>>. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (10): 3219–3226. <https://doi.org/10.1128/AEM.02810-10>.

Shane, B. 2002. <<Malaria Basics: Global Impact and Actions>>. *Popul. Ref. Bur.* <http://www.prb.org/Publications/Articles/2002/MalariaBasicsGlobalImpactandActions.aspx> (29 de julio, 2017).

Sheehan, D.; G. Meade; V.M. Foley y C.A. Dowd. 2001. <<Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily>>. *Biochem. J.* 360 (1): 1. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600001>.

Sherman, I.W. 1998. *Malaria : parasite biology, pathogenesis, and protection*. Washington, DC: ASM Press. <http://www.worldcat.org/title/malaria-parasite-biology-pathogenesis-and-protection/oclc/39229599>.

- Shreiner, A.B.; J.Y. Kao y V.B. Young. 2015. <<The gut microbiome in health and in disease>>. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 31 (1): 69–75. <https://doi.org/10.1097/MOG.000000000000139>.
- Shrivastava, B.; A. Shrivastava; A. Kumar; J. Bhatt; S. Bajpai; S. Parihar Surendra y V. Bhatnagar. 2011. <<Impact of deltamethrin on environment, use as an insecticide and its bacterial degradation – A preliminary study>>. *Int. J. Environ. Sci.* 1 (5): 977–985. <http://www.ipublishing.co.in/jesvol1no12010/EIJES2051.pdf> (18 de mayo, 2018).
- Sievers, F.; A. Wilm; D. Dineen; T.J. Gibson; K. Karplus; W. Li; R. Lopez; H. McWilliam; M. Remmert; J. Soding; J.D. Thompson y D.G. Higgins. 2014. <<Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega>>. *Mol. Syst. Biol.* 7 (1): 539–539. EMBO Press. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- Silva, A.P.B.; J.M.M. Santos y A.J. Martins. 2014. <<Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids – a review>>. *Parasit. Vectors* 7 (1): 450. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-450>.
- Singh, O.P.; C.L. Dykes; M. Lather; O.P. Agrawal y T. Adak. 2011. <<Knockdown resistance (kdr)-like mutations in the voltage-gated sodium channel of a malaria vector *Anopheles stephensi* and PCR assays for their detection.>>. *Malar. J.* 10 (1): 59. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-59>.
- Smissaert, H.R. 1964. <<Cholinesterase Inhibition in Spider Mites Susceptible and Resistant to Organophosphate>>. *Science* (80-.). 143 (3602): 129–131. <https://doi.org/10.1126/science.143.3602.129>.
- Soderlund, D.M. y D.C. Knipple. 2003. <<The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides>>. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33 (6): 563–577. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00023-7).
- Sokhna, C.; M.O. Ndiath y C. Rogier. 2013. <<The changes in mosquito vector behaviour and the emerging resistance to insecticides will challenge the decline of malaria>>. *Clin. Microbiol. Infect.* 19 (10): 902–907. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12314>.
- Sokhna, C.; M.O. Ndiath y C. Rogier. 2013. <<The changes in mosquito vector behaviour and the emerging resistance to insecticides will challenge the decline of malaria>>. *Clin. Microbiol. Infect.* 19 (10): 902–907. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12314>.
- Sommer, M.O. 2015. <<Advancing gut microbiome research using cultivation>>. *Curr. Opin. Microbiol.* 27 (1): 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.08.004>.
- Supriyati, D. 2015. <<Pengaruh Sumber N terhadap Degradasi Deltametrin dan Produksi IAA oleh *Pseudomonas* sp. PIV-8-2>>. *J. Biol. Indones.* 11 (1). <https://doi.org/10.14203/JBI.V11I1.2166>.
- Tanaseichuk, O.; J. Borneman y T. Jiang. 2014. <<Phylogeny-based classification of microbial communities>>. *Bioinformatics* 30 (4): 449–456. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt700>.
- Tang, X.-W.; C. Liao; Y. Li; X.-M. Xie y Y.-L. Huang. 2006. <<[Modified guanidine hydrochloride method for DNA extraction from cord blood used in HLA genotyping].>>. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* 14 (2): 363–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16638216> (9 de abril, 2018).

Tchioffo, M.T.; A. Boissière; L. Abate; S.E. Nsango; A.N. Bayibéki; P.H. Awono-Ambéné; R. Christen; G. Gimonneau y I. Morlais. 2016. <<Dynamics of Bacterial Community Composition in the Malaria Mosquito's Epithelia>>. *Front. Microbiol.* 6 (JAN): 1500. Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01500>.

Thomas, T.; J. Gilbert y F. Meyer. 2012. <<Metagenomics - a guide from sampling to data analysis>>. *Microb. Inform. Exp.* 2 (1): 3. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>.

Tisgratog, R.; C. Tananchai; M.J. Bangs; K. Tainchum; W. Juntarajumnong; A. Prabaripai; K.R. Chauhan; J. Pothikasikorn y T. Chareonviriyaphap. 2011. <<Chemically induced behavioral responses in *Anopheles minimus* and *Anopheles harrisoni* in Thailand>>. *J. Vector Ecol.* 36 (2): 321–331. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00172.x>.

Turner, J.A.; C.N.E. Ruscoe y T.R. Perrior. 2016. <<Discovery to Development: Insecticides for Malaria Vector Control>>. *Chim. Int. J. Chem.* 70 (10): 684–693. <https://doi.org/10.2533/chimia.2016.684>.

Ugurlu, S. 2012. <<Insecticide Resistance>>. En *Insectic. - Adv. Integr. Pest Manag.* editado por Farzana Perveen (Ed.). Slavka Krautzeka: InTech, 469–478. <https://doi.org/10.5772/28086>.

Unicef. 2000. <<The global malaria burden MALARIA PREVENTION AND TREATMENT>>. *Prescriber* (18): 16. https://www.unicef.org/prescriber/eng_p18.pdf (11 de marzo, 2017).

Vais, H.; M.S. Williamson; A.L. Devonshire y P.N. Usherwood. 2001. <<The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels>>. *Pest Manag. Sci.* 57 (10): 877–888. <https://doi.org/10.1002/ps.392>.

Vais, H.; M.S. Williamson; A.L. Devonshire y P.N. Usherwood. 2001. <<The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels>>. *Pest Manag. Sci.* 57 (10): 877–888. <https://doi.org/10.1002/ps.392>.

Vartoukian, S.R.; R.M. Palmer y W.G. Wade. 2010. <<Strategies for culture of 'unculturable' bacteria>>. *FEMS Microbiol. Lett.* 309 (1): no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02000.x>.

Vásquez, E. 2016. << Situación de malaria semana epidemiológica 1 a la 26 del 2016>>. Guatemala. [http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones_2016/Salas_Situacionales/Situación de malaria semana epidemiológica 1 a la 26 del 2016.pdf](http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones_2016/Salas_Situacionales/Situación_de_malaria_semana_epidemiológica_1_a_la_26_del_2016.pdf).

Veech, J.A. 2018. <<Measuring Biodiversity>>. En *Encycl. Anthr.* Elsevier, 287–295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809665-9.10296-4>.

Villegas, L.M. y P.F.P. Pimenta. 2014. <<Metagenomics, paratransgenesis and the *Anopheles* microbiome: a portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa>>. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109 (5): 672–684. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140194>.

Vontas, J.G.; G.J. Small y J. Hemingway. 2001. <<Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*>>. *Biochem. J.* 357 (1): 65. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570065>.

Walters, W.; E.R. Hyde; D. Berg-Lyons; G. Ackermann; G. Humphrey; A. Parada; J.A. Gilbert; J.K. Jansson; J.G. Caporaso; J.A. Fuhrman; A. Apprill y R. Knight. 2016. <<Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys>>. *mSystems* 1 (1): e00009-15. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00009-15>.

Wang, D. 1986. <<Use of statistics in Ecology>>. *Bull. Ecol. Soc. Am.* 67 (1): 10–12.

Wang, Y.; T.M. Gilbreath; P. Kukutla; G. Yan y J. Xu. 2011. <<Dynamic Gut Microbiome across Life History of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya>>. *PLoS One* 6 (9): e24767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024767>.

Wang, Y.; T.M. Gilbreath; P. Kukutla; G. Yan y J. Xu. 2011. <<Dynamic Gut Microbiome across Life History of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya>>. *PLoS One* 6 (9): e24767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024767>.

Weill, M.; C. Malcolm; F. Chandre; K. Mogensen; A. Berthomieu; M. Marquine y M. Raymond. 2004. <<The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors>>. *Insect Mol. Biol.* 13 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00452.x>.

Weiß, M. y M. Göker. 2011. <<Molecular Phylogenetic Reconstruction>>. En *The Yeasts*. San Diego: Elsevier, 159–174. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00012-4>.

Welch, K. y M. Fuster. 2012. <<Barriers in access to insecticide-treated bednets for malaria prevention: an analysis of Cambodian DHS data.>>. *J. Vector Borne Dis.* 49 (1): 1–7. <http://www.mrcindia.org/journal/issues/491001.pdf> (20 de abril, 2017).

Whittaker, R.H. 1960. <<Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California>>. *Ecol. Monogr.* 30 (3): 279–338. <https://doi.org/10.2307/1943563>.

Whitten, M.M.A.; S.H. Shiao y E.A. Levashina. 2006. <<Mosquito midguts and malaria: cell biology, compartmentalization and immunology>>. *Parasite Immunol.* 28 (4): 121–130. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00804.x>.

WHO global malaria program. 2012. *Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors*. *World Heal. Organ. Press*. Francia: World Health Organization press. http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html (29 de julio, 2017).

WHO, W.H.O. 2016a. <<World Malaria Report>>. Suiza. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/252038/1/9789241511711-eng.pdf> (5 de marzo, 2017).

_____. 2016b. <<WHO | Malaria>>. *WHO*. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/> (11 de marzo, 2017).

Woo, P.C.Y.; S.K.P. Lau; J.L.L. Teng; H. Tse y K.Y. Yuen. 2008. <<Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories>>. *Clin. Microbiol. Infect.* <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>.

World Health Organization. 2011. *The use of DDT in malaria vector control WHO position statement*. *Environ. Heal.* World Health Organization press. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010033>.

_____. 2013. *Test Procedures*. Suiza: World Health Organization press. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-10565-4>.

_____. 2015a. <<WHO | Core vector control methods>>. *Malar. J.* World Health Organization. http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/core_methods/en/ (19 de abril, 2017).

_____. 2015b. <<World Malaria Report 2015>>. *World Health.* Francia. [https://doi.org/ISBN 978 92 4 1564403](https://doi.org/ISBN%20978%2092%204%201564403).

_____. 2015c. <<IMPLICATIONS OF INSECTICIDE RESISTANCE ON MALARIA VECTOR CONTROL Implications of Insecticide Resistance on Malaria Vector Control Project>>. <http://www.who.int/malaria/news/2016/iir-malaria-vector-control-evaluation-nov2016.pdf> (5 de marzo, 2017).

_____. 2016. *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes.* *World Heal. Organ. Tech. Rep. Ser.* Suiz: World Health Organization.

World Health Organization - WHO. 2003. *Space spray application of insecticides for vector and public health pest control.* *World Heal. Organ. - WHO.* Geneva: World Health Organization. <https://doi.org/WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2003.5>.

_____. 2011. <<World Malaria Report 2011>>. *World.* Geneva.

Wotton, R.; D. Chaloner; C. Yardley y R. Merritt. 1997. <<Growth of Anopheles mosquito larvae on dietary microbiota in aquatic surface microlayers>>. *Med. Vet. Entomol.* **11** (1): 65–70. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1997.tb00291.x>.

Xia, X.; D. Zheng; H. Zhong; B. Qin; G.M. Gurr; L. Vasseur; H. Lin; J. Bai; W. He y M. You. 2013. <<DNA Sequencing Reveals the Midgut Microbiota of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.) and a Possible Relationship with Insecticide Resistance>>. *PLoS One* **8** (7): 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068852>.

Yadav, K.K.; A. Bora; S. Datta; K. Chandel; H.K. Gogoi; G.B.K.S. Prasad y V. Veer. 2015. <<Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India>>. *Parasit. Vectors* **8** (1): 641. Parasites & Vectors. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1252-0>.

Yadav, K.K.; S. Datta; A. Naglot; A. Bora; V. Hmuaka; S. Bhagyawant; H.K. Gogoi; V. Veer y P.S. Raju. 2016. <<Diversity of Cultivable Midgut Microbiota at Different Stages of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* from Tezpur, India>>. *PLoS One* **11** (12): e0167409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167409>.

Yang, B.; Y. Wang y P.-Y. Qian. 2016. <<Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis>>. *BMC Bioinformatics* **17** (1): 135. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>.

Yarza, P.; P. Yilmaz; E. Pruesse; F.O. Glöckner; W. Ludwig; K.-H. Schleifer; W.B. Whitman; J. Euzéby; R. Amann y R. Rosselló-Móra. 2014. <<Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences>>. *Nat. Rev. Microbiol.* **12** (9): 635–645. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>.

Zanger, U.M. y M. Schwab. 2013. <<Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation>>. *Pharmacol. Ther.* **138** (1): 103–141. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>.

Zhao, Q.; S. Yue; M. Bilal; H. Hu; W. Wang y X. Zhang. 2017. <<Comparative genomic analysis of 26 *Sphingomonas* and *Sphingobium* strains: Dissemination of bioremediation capabilities, biodegradation potential and horizontal gene transfer>>. *Sci. Total Environ.* 609: 1238–1247. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.249>.

Zuo, G.; Z. Xu; H. Yu y B. Hao. 2010. <<Jackknife and Bootstrap Tests of the Composition Vector Trees>>. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* 8 (4): 262–267. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(10\)60028-9](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(10)60028-9).

Zuur, A.; E. Ieno y G. Smith. 2007. <<Principal coordinate analysis and non-metric multidimensional scaling>>. En *Anal. Ecol. Data*. New York, NY: Springer New York, 259–264. https://doi.org/10.1007/978-0-387-45972-1_15.

XII. ANEXOS

A. Procedimiento para elaboración de soluciones desinfectantes y buffer PBS 1X

1. Preparación solución de etanol al 75%. Esta solución fue preparada cada vez que se realizó el proceso de disección. Es decir que, no fue utilizada más de una vez. Toda la cristalería implementada fue previamente autoclaveada, para asegurar que el procedimiento se llevara bajo condiciones estériles.

En un tubo Falcon estéril, se diluyo 15mL de etanol absoluto, en 5mL de agua destilada estéril. El tubo se invirtió 6 veces, para homogenizar. La solución fue rotulada con la concentración, fecha y nombre del investigador responsable.

2. Preparación de solución hipoclorito de sodio al 5%. Esta solución fue preparada cada vez que se realizó el proceso de disección. Es decir que, no fue utilizada más de una vez. Toda la cristalería implementada fue previamente autoclaveada, para asegurar que el procedimiento se llevara bajo condiciones estériles.

En un tubo Falcon estéril, se diluyo 1mL de hipoclorito de sodio, en 19mL de agua destilada estéril. El tubo fue invertido 6 veces, para homogenizar. La solución fue rotulada con la concentración, fecha y nombre del investigador responsable.

3. Preparación buffer PBS 1X. Para la preparación de 1L de buffer PBS 1X, se siguieron las indicaciones del Cuadro 11. Las sales fueron agregadas en un beaker de 1L, que contenía 800mL de agua destilada. Posteriormente las sales fueron diluidas con ayuda de un agitador magnético. Una vez las sales se disolvieron, se procedió a ajustar el pH de la solución a 7.4, utilizando una solución de HCl 1M y NaOH 1M.

Cuadro 11. Gramos de sales que se requieren para realizar 1L de solución buffer PBS1X.

Reactivo	Cantidad	Con. final 1X
NaCl	8.00g	137mM
KCl	0.20g	2.7mM
Na ₂ HPO ₄	1.44g	10mM
KH ₂ PO ₄	0.24g	1.8mM

Cuando el pH se estabilizó a 7.4, la solución fue transferida a una botella con tapadera de 1L. El volumen fue ajustado a 1L y se procedió a esterilizar en autoclave, a una temperatura de 121°C por 20 minutos. El buffer se dejó enfriar y se distribuyó en alícuotas de 50mL. Las cuales fueron rotuladas y almacenadas a 4°C, hasta su uso.

B. Amplificación de los dominios hipervariables V3 - V4 del gen 16S ARNr y preparación de biblioteca de secuenciación

Los procedimientos que se detallan a continuación fueron realizados en el Laboratorio Nacional de Lawrence Berkeley (California, Estados Unidos), en la división de Earth Sciences, Ecology Department. En específico por el grupo de investigación bajo la dirección de Javier Ceja Navarro -PhD.

Cabe remarcar que, aunque el procedimiento no se llevó a cabo directamente por mi persona, la metodología que se utilizó para trabajar las muestras fue aplicada durante una pasantía realizada en septiembre del 2017, adjunto carta de invitación.

Figura 33. Carta de invitación para pasantía en el Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley.



Berkeley, California, August 7, 2017

Dear Andrea Cuadra Granados,
Undergraduate Student of Biochemistry and Microbiology
Centro de Estudios en Biotecnología
Universidad del Valle de Guatemala

This letter is to invite you to visit the Laboratory of Metazoan-Microbiome-Environment Interactions at the Climate and Ecosystems Sciences Division of the Lawrence Berkeley National Laboratory, during the week of September 11th to September 15th of 2017. During this visit, we will demonstrate some of our most commonly used laboratory techniques that include: 1. DNA extraction from environmental samples, 2. Preparation PCR amplifications for sequencing, 3. Analysis of sequences obtained by Sanger and Illumina technologies.

Berkeley Lab is a member of the national laboratory system supported by the U.S. Department of Energy through its Office of Science. It is managed by the University of California (UC) and is charged with conducting unclassified research across a wide range of scientific disciplines. In specific, our *Laboratory of Metazoan-Microbiome-Environment Interactions* studies host-microbiome interactions in non-model arthropod systems and the multi-trophic interactions that mediate environmental processes such as carbon nutrient cycling.

I am sure that the proposed visit will provide you with a sound basis for your scientific development and allow you to expose yourself to the spirit of scientific collaboration that characterizes the Berkeley Lab.

Warm regards,

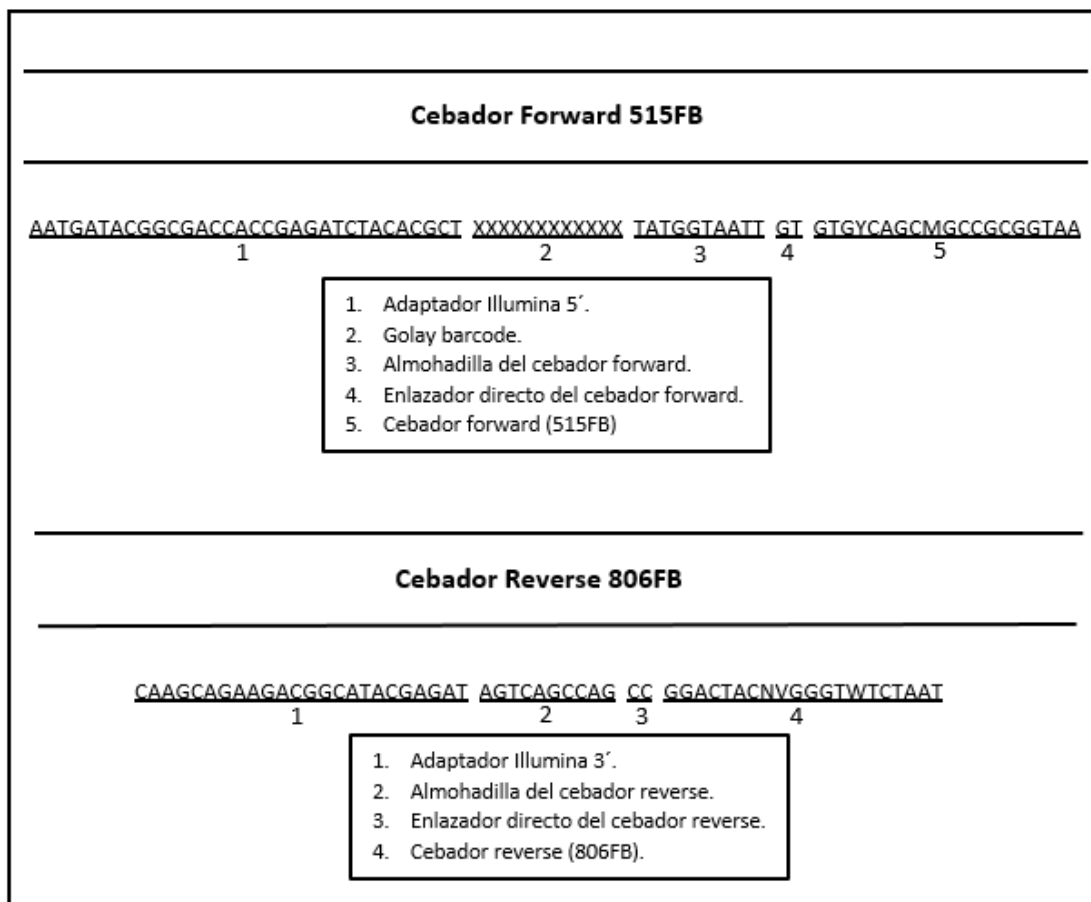
Dr. Javier A. Ceja-Navarro
Research Scientist
Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL)
Earth Sciences Division, Ecology Department
1 Cyclotron Rd., MS 70A 3317
Berkeley, CA 94720
Phone: 510-486-7709
E-Mail: JCNavarro@lbl.gov

Ernest Orlando Lawrence Berkeley National Laboratory | One Cyclotron Road | Berkeley, California 94720

1. Metabarcoding y amplificación, por la PCR, de los dominios hipervariables V3 - V4 del gen 16S ARN ribosomal. Previo al inicio del proceso de metabarcoding y amplificación, las muestras de ADN recibidas fueron purificadas mediante perlas magnéticas (como indica la sección dos de este segmento anexo) y cuantificadas mediante el fluorómetro Qubit™ (ThermoFisher Scientific, número de catálogo: Q33226), siguiendo las indicaciones del manual técnico (Invitrogen, 2016).

Una vez purificadas y cuantificadas, se siguió con el procedimiento de metabarcoding y amplificación. El proceso fue realizado bajo un enfoque de barcoding de dos etapas (Herbold *et al.*, 2015). En la primera etapa, los dominios hipervariables V3 - V4 del gen 16S ARNr (~390pb) fueron amplificados por la PCR, mediante la adición de los cebadores modificados 515FB y 806RB (Caporaso *et al.*, 2011; Apprill *et al.*, 2015; Parada *et al.*, 2016). Los cuales poseían adaptadores compatibles con códigos de barras únicos, requeridos para llevar a cabo un proceso de secuenciación en la plataforma Illumina®. A continuación, se muestra una figura con la secuencia de los cebadores y sus respectivos adaptadores.

Figura 34. Secuencia de los cebadores 515FB y 806FB, listados en orientación 5'→3'.



La amplificación de los dominios hipervariables V3 - V4, se realizó en los primeros 25 ciclos de un programa de PCR de 30 ciclos. La segunda etapa del enfoque dio inicio, cuando en el ciclo 25 se pausó el programa y las muestras fueron removidas del termociclador. Una vez el plato fue removido, se agregó a cada reacción 5µL de los cebadores (5µM) que contenían los códigos de barras. Cada código de barra consistió en 16pb, los cuales poseían al final del extremo 5' un código de barra de 8pb, la cual fue diseñada por Javier Ceja-Navarro. Tomando como base lo reportado en Hamady y colaboradores (Hamady *et al.*, 2008).

El plato de la PCR fue retornado al termociclador para completar los 30 ciclos estandarizados. Cada reacción de PCR fue realizada con un volumen inicial de 45µL en la primera etapa, finalizando con un volumen de 50µL en la segunda etapa. Las reacciones de la PCR en la primera etapa fueron montadas utilizando Titanium® Taq PCR polimerasa (CLONTECH, número de catálogo: 639209), como se muestra a continuación.

Cuadro 12. Receta para el montaje de la reacción en cadena de la polimerasa empleada para la amplificación de los dominios hipervariables V3 - V4.

Reactivo	Concentración final	Volumen requerido para una reacción (μL)
Agua DPC	-	30
Titanium® Taq buffer	10X	5
dNTP's mix	0.2mM	1
Cebador 515FB	0.2 μM	1
Cebador 806RB	0.2 μM	1
Albumina de suero bovino	0.1mg/mL ⁻¹	1
Titanium Taq® polimerasa	1U	1
ADN	5ng	5

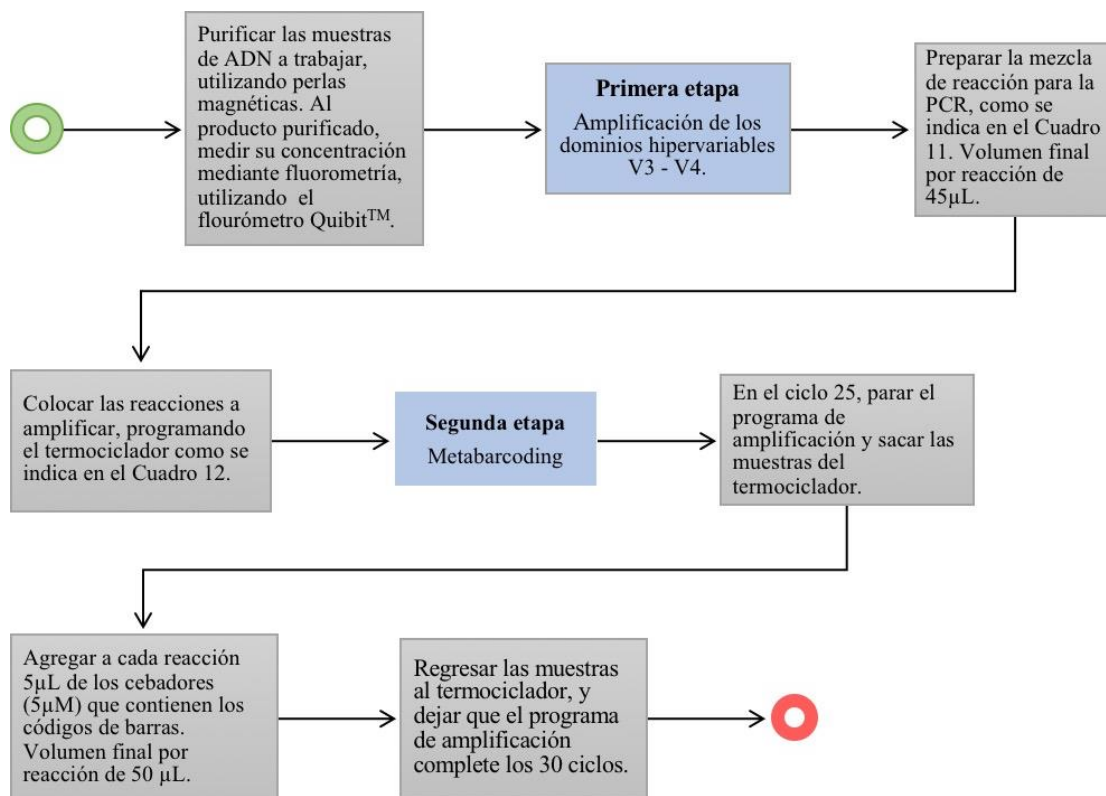
Las condiciones completas del programa de la PCR, se muestran a continuación.

Cuadro 13. Parámetros para el programa de la PCR, para la amplificación de los dominios hipervariables V3 - V4.

Primera etapa	
Temperatura	Tiempo
95°C	1 min
95°C	15 seg
68°C	1 min
20°C	1 min
Segunda etapa	
95°C	15 seg
68°C	1 min
68°C	3 min
4°C	Hold

Para mayor claridad del flujo de trabajo a continuación se presenta un diagrama con los puntos importantes.

Figura 35. Parámetros para el programa de la PCR, para la amplificación de los dominios hipervariables V3 - V4.



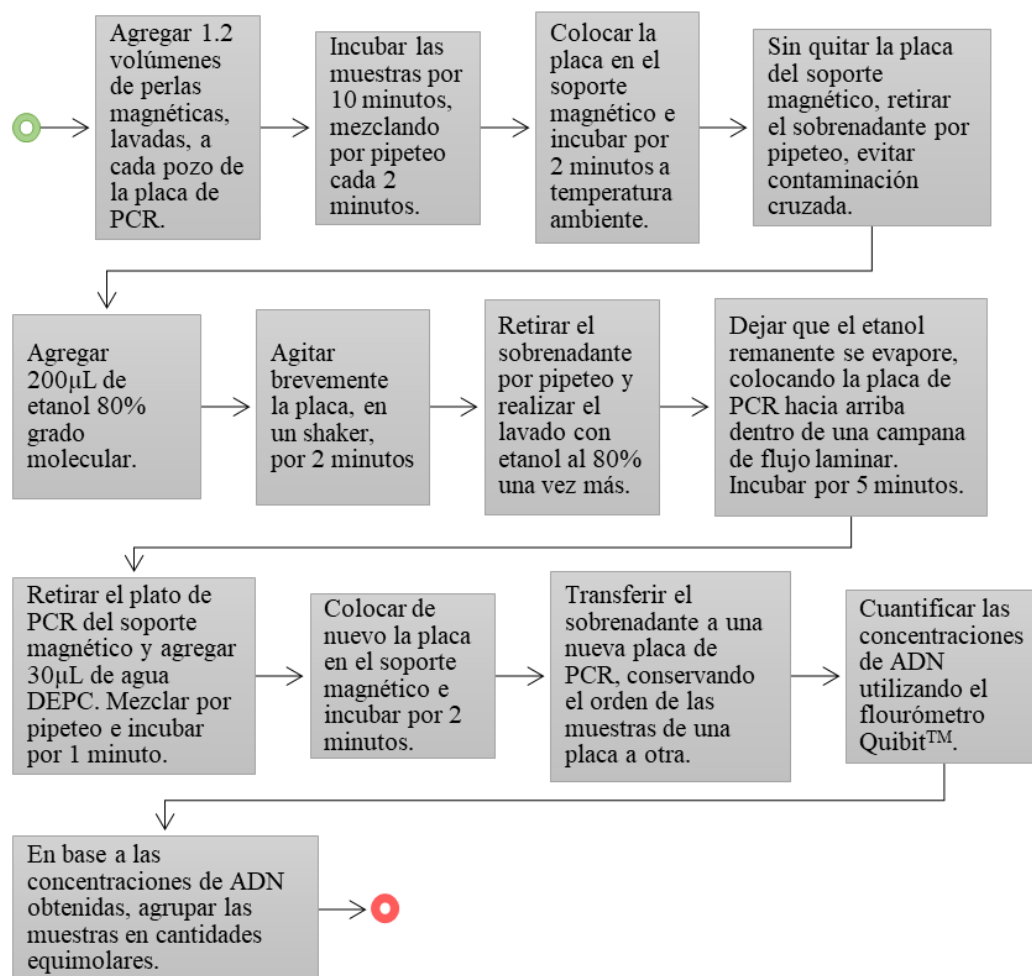
2. Purificación, con perlas magnéticas, de los amplicones V3 - V4 del gen 16S ARN ribosomal. Los amplicones V3 - V4 resultantes del proceso de amplificación por la PCR, fueron purificados con perlas magnéticas (Sigma – Aldrich, número de catálogo: GE17152104010150) de la siguiente manera: 1.2 volúmenes de perlas magnéticas lavadas fueron agregadas a cada pozo del plato de la PCR. Posteriormente, las muestras fueron incubadas por 10 minutos, mezclando por pipeteo cada 2 minutos. Una vez realizado esto, la placa fue colocada en un soporte magnético e incubada a temperatura ambiente por 2 minutos. El sobrenadante resultante fue removido por pipeteo. Por último, las muestras fueron lavadas con etanol 80% grado molecular dos veces, manteniendo la placa en el soporte magnético.

Posterior al último lavado, las muestras se dejaron abiertas por 5 minutos, con el fin de evaporar el etanol remanente. Una vez evaporado el etanol, sin dejar que el pellet se seque por completo, el plato fue retirado del soporte magnético. Se añadió 30µL de agua DEPC, mezclando por pipeteo. Las muestras se dejaron incubando por 1 minuto y luego fueron colocadas de nuevo en el soporte magnético, para completar el último período de incubación de 2 minutos.

Las perlas magnéticas fueron separadas de la solución de ADN, transfiriendo el sobrenadante a una nueva placa de la PCR. Las concentraciones resultantes de dicho procedimiento fueron determinadas mediante fluorometría, utilizando Quibit™ (ThermoFisher Scientific, número de catálogo: Q33226). En

base a los resultados, cantidades equimolares de los productos de la PCR fueron agrupados y mandados a secuenciación. La biblioteca de secuenciación estaba constituida por un pool normalizado a una concentración final de 2ng por muestra, presentando una concentración final de 10ng/ μ L. El control de calidad se llevó a cabo por la empresa que realizó la secuenciación: GENWIZ. Para mayor claridad del flujo de trabajo a continuación se presenta un diagrama con los puntos importantes.

Figura 36. Procedimiento purificación, con perlas magnéticas, de los amplicones resultantes de la amplificación de la región hipervariable V3 - V4 del gen 16S ARN ribosomal.



C. Cuantificación de la concentración de ADN genómico resultante del proceso de extracción, previo y posterior a un tratamiento de purificación con perlas magnéticas

La cuantificación de la concentración de ADN genómico previo y posterior al proceso de purificación con perlas magnéticas, permitió verificar si los contaminantes que no lograron ser eliminados en el proceso de extracción, fueron removidos con éxito. Los resultados mostraron una disminución de, por lo menos, dos decenas con respecto al punto decimal. Indicando que, en efecto, el proceso de purificación fue eficiente para aislar el ADN genómico de contaminantes del proceso de

extracción (ej. guanidina). Asegurando pureza y por ende, su aplicación en procesos demandantes, como lo es la secuenciación por Illumina®.

Cabe recalcar que la cuantificación de la concentración de ADN genómico, previo al proceso de purificación, fue realizada con NanoDrop™ One (espectrofotometría). Mientras que la cuantificación de la concentración de ADN genómico, posterior al proceso de purificación, fue realizada Quibit™ (fluorometría).

Cuadro 14. Concentración de ADN genómico, extraído del tracto digestivo de hembras adultas An. albimanus, previo y posterior a tratamiento de purificación con perlas magénticas.

Grupo de muestra trabajada	Identificación de la muestra	Concentración ADN genómico (ng/μL)	
		Previo a purificación	Posterior a purificación
Cepa susceptible (Sanarate)	SDT_1	29.30	1.39
	SDT_2	32.60	1.93
	SDT_3	40.50	1.14
	SDT_4	23.20	0.88
	SDT_5	27.30	1.28
	SDT_6	27.40	1.31
	SDT_7	32.80	1.22
	SDT_8	22.10	0.70
	SDT_9	28.40	2.84
	SDT_11	36.30	2.00
	C-	6.30	<0.02
Cepa resistente (RDelta)	RDT_1	33.90	2.14
	RDT_2	35.30	2.06
	RDT_3	27.30	1.35
	RDT_4	31.90	2.20
	RDT_5	28.80	1.49
	RDT_6	32.10	1.47
	RDT_7	38.80	1.83
	RDT_8	30.30	1.54
	RDT_9	27.40	1.19
	RDT_10	22.60	1.58
	C-	11.50	<0.02
Muestras de campo	WDT_1.3	6.50	0.79
	WDT_1.4	3.30	0.33
	WDT_1.5	12.00	1.08
	WDT_1.7	4.30	0.43
	WDT_1.8	4.20	0.26
	WDT_1.9	7.20	1.10
	WDT_1.10	10.40	0.82
	WDT_1.11	5.00	0.48
	WDT_1.12	5.10	0.22
	WDT_1.22	5.70	0.48
	WDT_2.1	32.80	0.68
	WDT_2.2	33.10	0.78

Grupo de muestra trabajada	Identificación de la muestra	Concentración ADN genómico (ng/μL)	
		Previo a purificación	Posterior a purificación
	WDT_2.3	31.00	0.99
	WDT_2.4	38.70	0.83
	WDT_2.5	27.50	0.79
	WDT_2.8	49.00	0.48
	WDT_2.10	39.20	1.25
	WDT_2.12	20.60	0.31
	WDT_2.13	29.60	0.64
	WDT_2.14	21.90	0.35
	WDT_2.15	21.20	0.57
	WDT_2.17	22.10	0.30
	WDT_2.18	28.30	1.17
	WDT_2.20	41.40	1.36
	WDT_2.21	31.80	1.09
	C-	11.00	<0.02

D. Cuantificación de la concentración de amplicones, región hipervariable V3-V4 del gen 16S ARNr, resultantes del proceso de amplificación y metabarcoding

La concentración de los amplicones con los códigos de barras, fue cuantificada empleando Quibit™, posterior a un proceso de purificación con perlas magnéticas. Removiendo cebadores, dNTP's en exceso, enzimas y buffers. Las mediciones de la cepa susceptible y cepa resistente a deltametrina, fueron realizadas empleando un volumen de 1μL por muestra. En el caso de la muestra de campo, las mediciones fueron realizadas empleando un volumen de 5μL. Los valores obtenidos ayudaron a determinar cuánto volumen de cada muestra era necesario agregar a la biblioteca de secuenciación, para alcanzar una concentración final normalizada de 2ng/μL por muestra.

Cuadro 15. Concentración de amplicones, región hipervariable V3-V4 del gen 16S ARNr, resultantes del proceso de amplificación y metabarcoding.

Grupo de muestra trabajada	Identificación de la muestra	Concentración amplicones (ng/μL)
Cepa susceptible (Sanarate)	SDT_1	1.53
	SDT_2	1.19
	SDT_3	1.37
	SDT_4	1.04
	SDT_5	1.68
	SDT_6	5.82
	SDT_7	1.52
	SDT_8	1.17
	SDT_9	0.90
	SDT_11	2.68
	C-	0.61

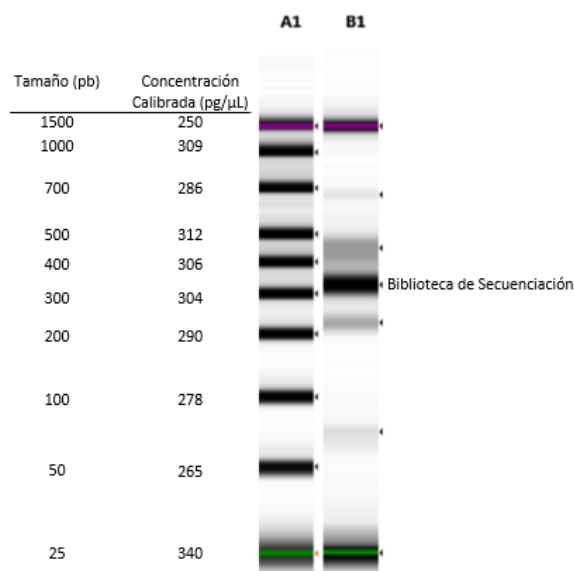
Grupo de muestra trabajada	Identificación de la muestra	Concentración amplicones (ng/ μ L)
Cepa resistente (RDelta)	RDT_1	1.05
	RDT_2	0.80
	RDT_3	0.78
	RDT_4	0.95
	RDT_5	0.82
	RDT_6	1.00
	RDT_7	1.03
	RDT_8	0.91
	RDT_9	1.09
	RDT_10	0.83
	C-	1.01
Muestras de campo	WDT_1.3	0.73
	WDT_1.4	1.17
	WDT_1.5	1.18
	WDT_1.7	0.84
	WDT_1.8	1.37
	WDT_1.9	0.73
	WDT_1.10	0.87
	WDT_1.11	0.83
	WDT_1.12	0.92
	WDT_1.22	0.98
	WDT_2.1	0.68
	WDT_2.2	0.78
	WDT_2.3	0.99
	WDT_2.4	0.83
	WDT_2.5	0.79
	WDT_2.8	0.48
	WDT_2.10	1.25
	WDT_2.12	0.31
	WDT_2.13	0.64
	WDT_2.14	0.35
	WDT_2.15	0.57
	WDT_2.17	0.30
WDT_2.18	1.17	
WDT_2.20	1.36	
WDT_2.21	1.09	
C-	<0.02	

E. Control de calidad biblioteca de secuenciación

Como primer parámetro de control de calidad, se realizó un gel de electroforesis por capilaridad, empujando el sistema High Sensitivity D1000 ScreenTape. La columna (A1) retribuye a la escalera electrónica y columna (B1) a la biblioteca de secuenciación. La banda más intensa y con mejor resolución corresponde a los amplicones que conforman en mayor parte la biblioteca, señalada en la Figura 37. En referencia a la escalera calibrada, la biblioteca está constituida mayormente por amplicones que poseen

un tamaño aproximado de 350pb, presentando una diferencia de 40pb de lo esperado (~390pb). En cuanto a la concentración, se estimó que esta era aproximadamente de 305pg.

Figura 37. Gel de electroforesis, empleando sistema High Sensitivity D1000 ScreenTape®, de la biblioteca de secuenciación.



Para respaldar los resultados observados en el gel de electroforesis por capilaridad, se procedió a generar el electroferograma. Las señales mostradas, cinco en total, correspondieron con el número de bandas observadas. Donde las unidades de fluorescencia captadas por el equipo, corresponden con la intensidad y resolución de las bandas observadas en el gel. Las señales rotuladas como lower y upper, son los marcadores electrónicos colocados automáticamente por el equipo High Sensitivity D1000 ScreenTape, por lo que no corresponden a señales emitidas por la biblioteca de secuenciación.

La señal con mayor fluorescencia, que corresponde a la banda más intensa observada en el gel, muestra un tamaño de 327pb y una concentración de 407pg/μL. Al integrar el área bajo la curva, realizado por el equipo, se obtuvo una molaridad de 1910pmol/L, Figura 38. Ratificando de nuevo, que la mayor parte de los amplicones que constituyen la biblioteca de secuenciación, poseen alrededor de 327pb y una concentración de 407pg/μL. Unido a la base de dicha curva, se pueden observar dos señales a 227pb y 449pb, que corresponden a las bandas tenues que fueron observadas cerca de la banda de mayor intensidad. Debido a la proximidad de las señales con la curva con mayor fluorescencia, ambas señales se consideraron como parte de la biblioteca de secuenciación. Por lo que se procedió a realizar una integración del área bajo la curva de las tres señales juntas, para determinar la concentración, molaridad y tamaño total de la biblioteca.

Respecto a las señales emitidas a 670pb y 75pb, de una concentración - molaridad de 11.2pg/μL – 25.6pmol/L y 13.1pg/μL – 270pmol/L, respectivamente, corresponden a la primera y última banda (de arriba hacia abajo) observadas en el gel de electroforesis, Figura 38. La señal a 670pb también fue incluida en la integración del área bajo la curva, para determinar la concentración, molaridad y tamaño

total de la biblioteca de secuenciación. Con el fin de tomar en cuenta todos los amplicones generados en la preparación de la biblioteca.

Al integrar el área bajo la curva, Figura 39, del área comprendida entre 178pb y 873pb, se obtuvo que la biblioteca de secuenciación posee un tamaño promedio de 354pb, una concentración promedio de 367pg/ μ L y una molaridad promedio de 2950pmol/L. Mostrando un buen perfil que concuerda con lo esperado y que satisface los parámetros de secuenciación: concentración de \sim 340pg/ μ L, molaridad igual o mayor a 1.8pmol/L y amplicones de menos de 400pb. Ayudando a confirmar y validar que la biblioteca era apta para proceder a ser secuenciada en la plataforma MiniSeq de Illumina®.

Figura 38. Electroferograma High Sensitivity D1000 ScreenTape®, para control de calidad de biblioteca de secuenciación.

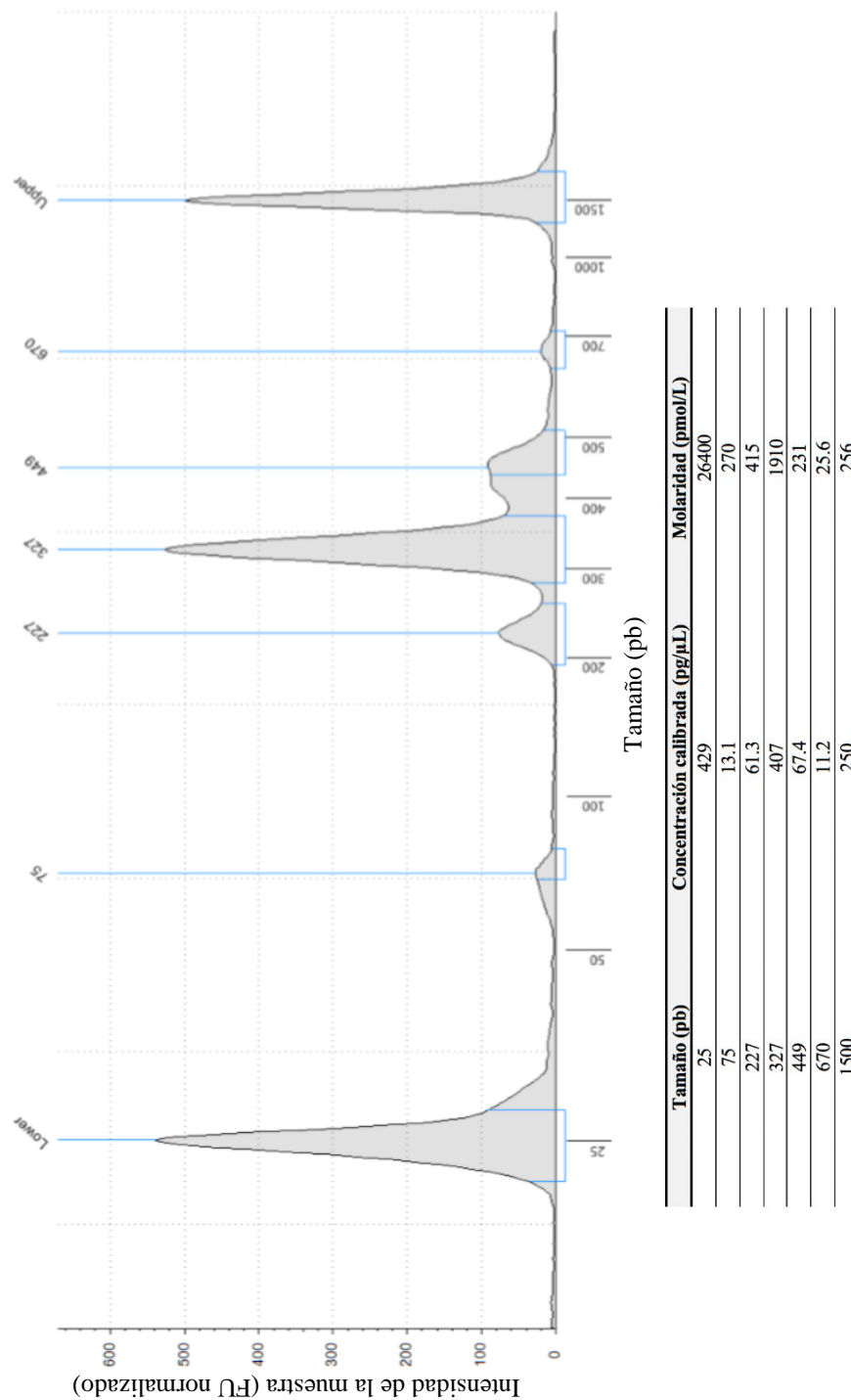
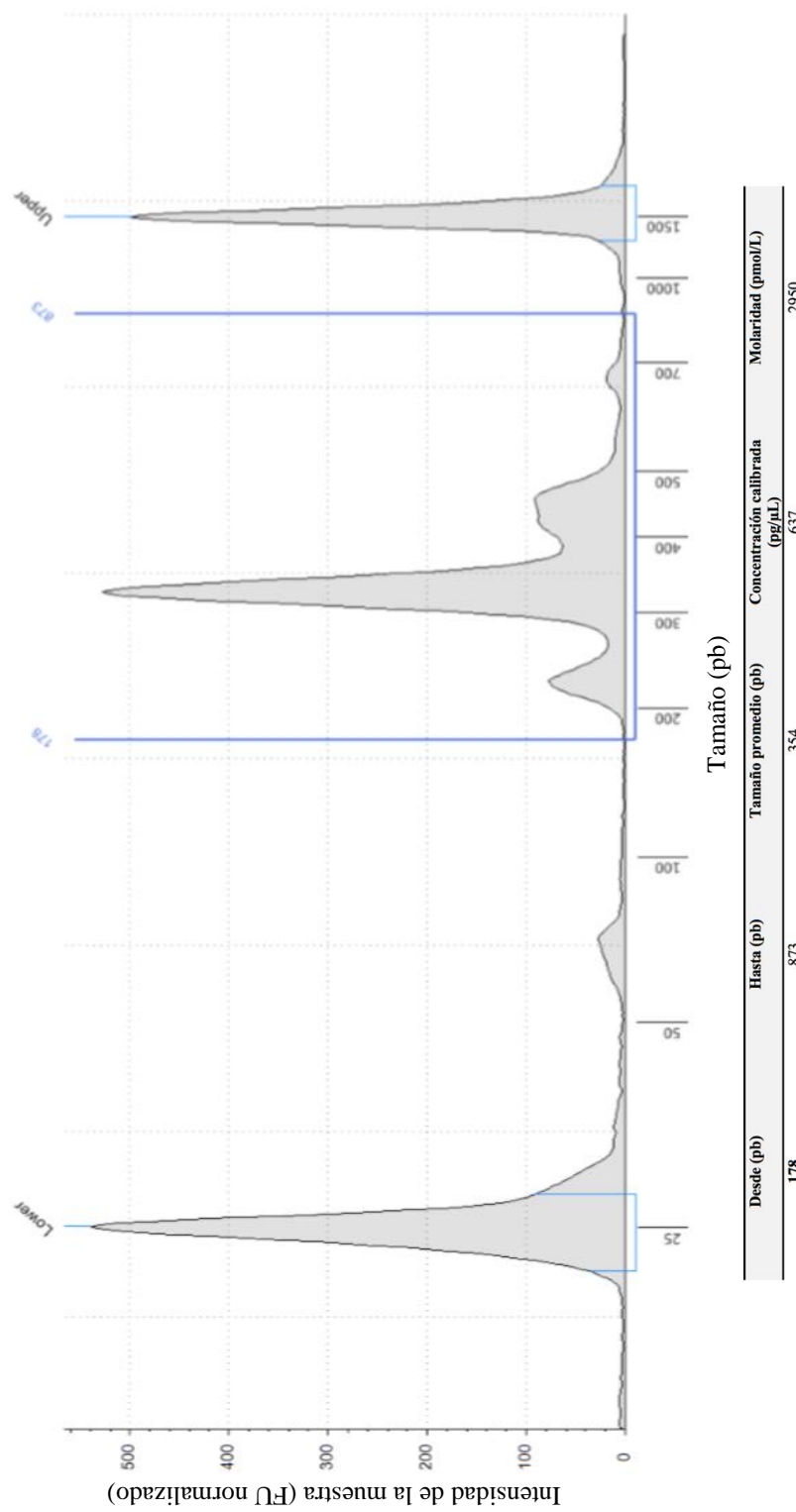


Figura 39. Determinación del tamaño promedio, concentración y molaridad de la biblioteca de secuenciación, a través del análisis de la señal emitida por el pico comprendido entre los 178 y 837 pares de bases (pb).



F. Metadatos gráfico abundancia relativa

El gráfico de abundancia relativa representa la proporción relativa de cada género bacteriano encontrados en el tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*, en base al total de la microbiota bacteriana identificada. Visualmente la representación de las proporciones en el gráfico, Figura 30, no permiten determinar con exactitud la abundancia relativa de los géneros bacterianos encontrados. En especial, cuando los géneros tienen menos del 1% de representatividad. Por ende, a continuación, se presenta los metadatos utilizados para generar la Figura 30, que consisten en los porcentajes de proporción relativa de cada uno de los géneros identificados en los tres grupos de estudio evaluados, Cuadro 16. Ayudando así, a la comprensión e interpretación de los resultados descritos en la sección de Resultados – Composición de la microbiota bacteriana.

Aquellos géneros bacterianos que tuvieron menos del 1% de representatividad en los tres grupos evaluados, se consideraron no determinantes para describir la microbiota bacteriana del tracto digestivo de hembras adultas *An. albimanus*. Por lo que, a lo largo del estudio, no fueron avocados.

Cuadro 16. Abundancia relativa, en porcentaje, de los géneros bacterianos identificados como parte de la microbiota del tracto digestivo de ejemplares hembras adultas *An. albimanus* de campo, ejemplares susceptibles a deltametrina y ejemplares resistentes a deltametrina.

Género bacteriano	Cepa resistente (RDelta)	Cepa susceptible (susceptible)	Muestras de campo
<i>Acinetobacter</i>	20.40% ± 0.18	14.01% ± 0.09	6.28% ± 0.12
<i>Asaia</i>	0.25% ± 0.00	0.60% ± 0.01	13.72% ± 0.27
<i>Bradyrhizobium</i>	1.05% ± 0.01	1.11% ± 0.01	0.07% ± 0.00
<i>Burkholderia-Paraburkholderia</i>	42.73% ± 0.18	24.76% ± 0.17	8.55% ± 0.14
<i>Chitinophagaceae</i>	0.10% ± 0.00	0.55% ± 0.01	0.08% ± 0.00
<i>Cloacibacterium</i>	1.21% ± 0.01	0.13% ± 0.00	0.11% ± 0.00
<i>Corynebacterium</i>	1.14% ± 0.01	0.09% ± 0.00	0.06% ± 0.00
<i>Delftia</i>	1.28% ± 0.01	0.65% ± 0.01	0.23% ± 0.00
<i>Elizabethkingia</i>	0.78% ± 0.00	0.86% ± 0.00	53.50% ± 0.47
<i>Klebsiella</i>	3.48% ± 0.02	1.50% ± 0.01	2.85% ± 0.10
<i>Lawsonella</i>	1.15% ± 0.01	0.10% ± 0.00	0.03% ± 0.00
<i>Leuconostoc</i>	0.03% ± 0.00	0.04% ± 0.00	0.06% ± 0.00
<i>Methylobacterium</i>	1.09% ± 0.01	1.01% ± 0.01	0.18% ± 0.00
<i>Micrococcus</i>	0.13% ± 0.00	0.10% ± 0.00	0.03% ± 0.00
<i>Pantoea</i>	0.08% ± 0.00	0.08% ± 0.00	1.08% ± 0.02
<i>Prevotella</i>	0.16% ± 0.00	0.10% ± 0.00	0.16% ± 0.00
<i>Pseudomonas</i>	2.28% ± 0.02	2.01% ± 0.01	3.44% ± 0.05
<i>Ralstonia</i>	19.44% ± 0.22	47.61% ± 0.28	6.78% ± 0.14
<i>Rhizobium</i>	0.25% ± 0.01	0.05% ± 0.00	0.02% ± 0.00
<i>Serratia</i>	0.11% ± 0.00	0.05% ± 0.00	1.87% ± 0.06
<i>Sphingobacterium</i>	0.00%	0.58% ± 0.02	0.13% ± 0.06
<i>Sphingobium</i>	0.90% ± 0.02	0.25% ± 0.00	0.06% ± 0.00
<i>Sphingomonas</i>	1.26% ± 0.01	2.35% ± 0.02	0.59% ± 0.01
<i>Staphylococcus</i>	0.69% ± 0.01	0.66% ± 0.01	0.14% ± 0.00