

---

Desarrollo de protocolo para evaluación de la enzima metabólica glutatión-S-transferasa GSTE2 en larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762)

---

Miguel Antonio Basterrechea Magermans



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Desarrollo de protocolo para evaluación de la  
enzima metabólica glutatión-S-transferasa GSTE2 en  
larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762)**

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Miguel Antonio Basterrechea Magermans  
para optar al grado académico de Licenciado en Biotecnología  
molecular

Guatemala  
2023



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Desarrollo de protocolo para evaluación de la  
enzima metabólica glutatión-S-transferasa GSTE2 en  
larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762)**

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Miguel Antonio Basterrechea Magermans  
para optar al grado académico de Licenciado en Biotecnología  
molecular

Guatemala  
2023

Vo.Bo.:



(f) \_\_\_\_\_  
PhD. Norma Padilla

Tribunal Examinador:



(f) \_\_\_\_\_  
PhD. Norma Padilla



(f) \_\_\_\_\_  
PhD. Pamela Pennington



(f) \_\_\_\_\_  
PhD. Krisztina Rios-Gonzalez

Fecha de aprobación: Guatemala, 13 de junio de 2023.

El virus del Dengue es un flavivirus de la familia *Flaviviridae* y forma parte del ciclo urbano desde hace alrededor de 1000 años debido a su principal vector *Aedes aegypti* (Wang *et al.*, 2000). En 2010 globalmente se tasaron 390 millones de infecciones incluyendo casos leves o asintomáticos. El continente asiático concentraba 67 millones de los casos y principalmente en regiones densamente pobladas, regiones apropiadas para la transmisión de la enfermedad (Bhatt *et al.*, 2013). En Guatemala se registraron más de 5000 casos en el año 2019 siendo el año más alto desde el 2008. Afortunadamente se ha notado un decremento en los años posteriores en términos de casos (MSPAS,2021). El insecticida organofosforado (OP) Temefos se usa comúnmente para controlar los vectores en estadios inmaduros del mosquito *Ae. aegypti* dengue debido a su rentabilidad y aceptación comunitaria. Como consecuencia de su uso generalizado, la resistencia a Temefos en *Ae. aegypti* ha sido reportado en muchos países de América Latina. (Grisales *et al.*, 2013). Han aparecido informes en El Salvador (Lazcano *et al.*, 2009), Isla Martinica en las Antillas Francesas (Marcombe *et al.*, 2009), Argentina (Seccacini *et al.*, 2008), Colombia (Ocampo *et al.*, 2011) y Trinidad (Polson *et al.*, 2010). Aunque se ha demostrado resistencia al Temefos en muchas áreas del mundo, es el único larvicida organofosforado que queda con algún uso apreciable. Como tal, es una herramienta importante ante los pocos larvicidas alternativos disponibles (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2013).

Este trabajo de tesis buscó desarrollar un protocolo estandarizado para evaluar la expresión de la enzima GSTE2 asociada a la resistencia a un larvicida organofosforado de uso generalizado denominado Temefos, en poblaciones de campo de larvas de *Aedes aegypti*. Este protocolo se basó en elaborar diferentes Procedimientos Operacionales Estándar (POE) de las etapas para la evaluación de la resistencia a Temefos en las larvas de *Aedes aegypti*. La resistencia fenotípica fue estimada en una población, por medio de bioensayos. Estos bioensayos consistieron en exponer durante 24 horas larvas de tercer y cuarto instar larvario, a la dosis diagnóstica de temefos y luego preservar el ARN de aquellos individuos que presentaron resistencia. Se efectuó la extracción de ARN mediante un método optimizado con TRIzol™ en grupos de 10 larvas de tercer estadio. Posteriormente, se realizó un PCR convencional para la estimación de presencia de ADN contaminante, utilizando oligonucleótidos (“primers”) de referencia del exón 31, prueba para la mutación F1534C, relacionada a *kdr*. Después del PCR, se ejecutó tratamiento de las muestras de ARN con el kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega) con el fin de eliminar cualquier ADN contaminante. Luego del tratamiento se llevó a cabo otro PCR convencional para confirmar la ausencia de ADN contaminante y así se procedió a la síntesis de ADN complementario. El ADN complementario permitió estandarizar los primers (GSTE2F y GSTE2R) mediante una curva de eficiencia, para estandarizar las condiciones para análisis de expresión génica en futuros estudios

---

## Agradecimientos

---

Agradecer es de las fuerzas más poderosas y positivas y este trabajo de graduación, la culminación de una etapa universitaria muy difícil no hubiera sido posible sin las personas que me acompañaron durante esta jornada.

Las primeras personas a las que debo agradecer son a mis padres Miguel Basterrechea y Elizabeth Magermans que más allá del apoyo económico, me apoyaron titánicamente emocionalmente y brindaron su ayuda y amor incondicional siempre durante estos años. También a mis hermanas Inés Basterrechea e Isabel Basterrechea que me acompañaron y guiaron.

En cuanto a la ejecución y acompañamiento de la tesis debo agradecer a mis asesores Ms. Ana Cristina Benedict y PhD. Juan Carlos Lol por su paciencia, consejos y enseñanzas para completar este trabajo de investigación y en especial a la PhD Norma Padilla por ser mi asesora principal. También a la PhD. Pamela Pennington, directora de carrera, que me acompañó y procuró su ayuda para lograr la conclusión de este estudio. Sin olvidar a los técnicos y compañeros del insectario Pedro Peralta y Jorge Sincal que me brindaron ayuda a todo nivel y compañía durante esta investigación.

Esta etapa universitaria ha sido una lucha continua en la que me he enfrentado a mis mayores caídas". Curiosamente, se me han presentado personas que me han extendido la mano para volverme a levantar. Estos "faroles de luz", personas que la vida me ha colocado para seguir adelante, me han permitido terminar esta etapa gracias a su ayuda. Entre las varias personas resaltan mis amigos desde el inicio de la universidad la Lic. Analucia González y el Ing. Pablo Castillo, que me han iluminado el camino y enseñado tanto. También a mi terapeuta todos estos años PhD. Patricia Rodas que me ha guiado a nivel emocional siempre. Otros guías que me han conocido desde el principio, a mi tío Rodrigo Basterrechea y prima Daniela Basterrechea. Sin olvidar a mis compañeros y amigos de carrera la Lic. Sabrina Figueroa, Lic. Mynor López y Lic. Diego Rojas, con los que "sobrevivimos" los cursos y pasamos muchos momentos de risa y alegría. Por último pero no menos importante, a todos mis catedráticos que me educaron de la manera más amable siempre. Queda corta la palabra "gracias" para todas estas personas y para todas aquellas que no he nombrado y me acompañaron estos años. *Eskerrik asko!*

*-Vive con orgullo y la cabeza alta. No importa cómo de destrozado te puedas sentir por tu debilidad y tus miedos, solo haz que tu corazón arda. Ármate de valentía y continúa tu camino.-*

-Kyojuro Rengoku

<b>Prefacio</b>	<b>III</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>IV</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>X</b>
<b>Lista de cuadros</b>	<b>XI</b>
<b>Resumen</b>	<b>XII</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>2</b>
2.1. Objetivo general . . . . .	2
2.2. Objetivos específicos . . . . .	2
<b>3. Justificación</b>	<b>3</b>
<b>4. Marco teórico</b>	<b>4</b>
4.1. Dengue . . . . .	4
4.2. <i>Aedes aegypti</i> . . . . .	5
4.3. Temefos . . . . .	7
4.4. Resistencia a insecticidas . . . . .	9
4.5. Glutatión-S-transferasa epsilon 2 (GSTE2) . . . . .	11
<b>5. Marco metodológico</b>	<b>14</b>
5.1. Diagrama . . . . .	14
5.2. Elaboración de protocolos operacionales estándar (POE) . . . . .	15
5.3. Bioensayos de susceptibilidad (WHO,2005) . . . . .	15
5.3.1. Preparación de solución madre y dosis diagnóstica . . . . .	15
5.3.2. Separación de larvas . . . . .	15
5.3.3. Realización de bioensayo . . . . .	16
5.4. Preservación de ARN . . . . .	16
5.5. Extracción de ARN . . . . .	16
5.5.1. Proceso de extracción de ARN . . . . .	16
5.5.2. Gel de integridad de ARN total . . . . .	17
5.5.3. Tratamiento de ARN total . . . . .	17
5.6. Síntesis de ADN complementario . . . . .	17

5.7. Curva de eficiencia de primers . . . . .	17
<b>6. Resultados</b>	<b>18</b>
6.1. Redacción de POE . . . . .	18
6.2. Extracción de ARN total . . . . .	19
6.3. Gel de integridad de ARN total . . . . .	19
6.4. Gel de verificación de ADN contaminante . . . . .	20
6.5. Curvas de eficiencia de gen GSTe2 con qPCR . . . . .	21
6.5.1. Curva de amplificación . . . . .	21
6.5.2. Valores Ct, media Ct y desviación estándar. . . . .	22
<b>7. Discusión</b>	<b>24</b>
7.1. Importancia sobre estandarización de protocolos . . . . .	24
7.2. Estandarización de bioensayos y sus implicaciones . . . . .	25
7.3. Extracción de ARN total con TRIzol . . . . .	26
7.4. Curva de eficiencia y optimización . . . . .	28
<b>8. Conclusiones</b>	<b>29</b>
8.1. General . . . . .	29
8.2. Específicos . . . . .	29
<b>9. Recomendaciones</b>	<b>30</b>
9.1. Importancia sobre estandarización de protocolos . . . . .	30
9.2. Estandarización de bioensayos y sus implicaciones . . . . .	30
9.3. Extracción de ARN total con TRIzol . . . . .	30
9.4. Curva de eficiencia y optimización . . . . .	31
<b>10. Bibliografía</b>	<b>32</b>
<b>11. Anexos</b>	<b>37</b>
<b>A. Individuos de pools</b>	<b>38</b>
<b>B. POE A: Preparación de solución Temefos</b>	<b>39</b>
B.1. Introducción . . . . .	40
B.2. Objetivo . . . . .	40
B.3. Definiciones y acrónimos . . . . .	40
B.4. Responsabilidades . . . . .	40
B.5. Procedimiento de operación estándar asociados . . . . .	41
B.6. Equipo, materiales y reactivos . . . . .	41
B.7. Precauciones y seguridad . . . . .	41
B.8. Procedimiento . . . . .	42
B.8.1. Preparación de solución madre . . . . .	42
B.9. Cálculos . . . . .	43
B.10. Control de calidad . . . . .	43
B.11. Reporte de datos y documentos utilizados . . . . .	43
B.12. Referencias . . . . .	43
<b>C. POE B: Bioensayo de resistencia de larvas de Aedes aegypti a Temefos</b>	<b>44</b>
C.1. Introducción . . . . .	45
C.2. Objetivo . . . . .	45
C.3. Definiciones y acrónimos . . . . .	45
C.4. Responsabilidades . . . . .	46
C.5. Procedimiento de operación estándar asociados . . . . .	46
C.6. Equipo, materiales y reactivos . . . . .	46

C.7. Material biológico . . . . .	46
C.8. Precaución y seguridad . . . . .	47
C.9. Procedimiento . . . . .	47
C.9.1. Separación de larvas . . . . .	47
C.9.2. Realización del bioensayo . . . . .	48
C.10. Control de calidad . . . . .	49
C.11. Reporte de datos y documentos utilizados . . . . .	49
C.12. Referencias . . . . .	49
<b>D. POE C: Preservación y almacenamiento de larvas para extracción de ARN</b>	<b>50</b>
D.1. Introducción . . . . .	51
D.2. Objetivo . . . . .	51
D.3. Definiciones y acrónimos . . . . .	51
D.4. Responsabilidades . . . . .	52
D.5. Procedimiento de operación estándar asociado . . . . .	52
D.6. Equipo, materiales y reactivos . . . . .	52
D.7. Precauciones y seguridad . . . . .	53
D.8. Procedimiento . . . . .	53
D.8.1. Mosquitos utilizados en bioensayos para extraer ARN . . . . .	53
D.9. Referencias . . . . .	56
<b>E. POE D: Extracción de ARN de larvas de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> con Trizol</b>	<b>57</b>
E.1. Introducción . . . . .	58
E.2. Objetivo . . . . .	58
E.3. Definiciones y acrónimos . . . . .	58
E.4. Responsabilidades . . . . .	59
E.5. Equipo, materiales y reactivos . . . . .	59
E.5.1. Materiales . . . . .	59
E.5.2. Reactivos . . . . .	59
E.5.3. Reactivo para limpieza del área de trabajo . . . . .	59
E.5.4. Reactivos para extracción y cuantificación de ARN . . . . .	59
E.6. Equipo de laboratorio . . . . .	60
E.7. Precauciones y seguridad . . . . .	60
E.8. Procedimiento . . . . .	60
E.8.1. Preparación del área de trabajo . . . . .	60
E.8.2. Extracción de ARN . . . . .	60
E.9. Cálculos . . . . .	63
E.9.1. Cálculo 1: Preparación de solución de etanol 75 % . . . . .	63
E.10. Control de calidad . . . . .	63
E.11. Reporte de datos y documentos utilizados . . . . .	63
E.12. Referencias . . . . .	63
<b>F. POE E: Gel de integridad de ARN</b>	<b>64</b>
F.1. Introducción . . . . .	65
F.2. Objetivo . . . . .	65
F.3. Responsabilidades . . . . .	65
F.4. Equipo, materiales y reactivos . . . . .	65
F.4.1. Materiales . . . . .	65
F.4.2. Reactivos . . . . .	66
F.4.3. Equipo de laboratorio . . . . .	66
F.5. Precauciones y seguridad . . . . .	66
F.6. Procedimiento . . . . .	66
F.6.1. Preparación del gel . . . . .	66
F.6.2. Cargar la muestras y electroforesis . . . . .	67

F.7. Control de calidad . . . . .	67
F.8. Reporte de datos y documentos utilizados . . . . .	69
F.9. Referencias . . . . .	69
<b>G. POE F: Tratamiento de ARN kit RQ1 RNase-Free DNase</b>	<b>70</b>
G.1. Introducción . . . . .	70
G.2. Objetivo . . . . .	70
G.3. Definiciones y acrónimos . . . . .	70
G.4. Responsabilidades . . . . .	71
G.5. Equipo, materiales y reactivos . . . . .	71
G.5.1. Materiales . . . . .	71
G.5.2. Reactivos . . . . .	71
G.5.3. Reactivo para limpieza del área de trabajo . . . . .	71
G.5.4. Reactivos para tratamiento de ARN . . . . .	71
G.5.5. Equipo de laboratorio . . . . .	72
G.6. Precauciones y seguridad . . . . .	72
G.7. Procedimiento . . . . .	72
G.7.1. Preparación del área de trabajo . . . . .	72
G.7.2. Tratamiento ARN . . . . .	73
G.7.3. PCR de confirmación de eliminación de ADN contaminante . . . . .	73
G.8. Cálculos . . . . .	73
G.9. Control de calidad . . . . .	73
G.10. Reporte de datos y documentos utilizados . . . . .	74
G.11. Referencias . . . . .	74

---

## Lista de figuras

---

4.1. Síntomas generales del dengue . . . . .	5
4.2. Mapa global de distribución de <i>Aedes aegypti</i> . . . . .	6
4.3. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> . . . . .	6
4.4. Partes principales de morfología y morfometría de larvas de <i>Aedes aegypti</i> . . . . .	7
4.5. Estructura química de temefos . . . . .	8
4.6. Esquema de efectos de insecticidas organofosforados en la transmisión de impulsos nerviosos: A – Sinapsis señalizada con acetilcolina; B – acetilcolinesterasa detiene el proceso de señalización; C – organofosforados inhibiendo acetilcolinesterasa. . . . .	8
4.7. Diferentes mecanismos de resistencia a insecticidas en mosquitos. . . . .	11
4.8. Los mecanismos principales de resistencia a insecticidas mediada por las GST. . . . .	12
4.9. Modelo 3D de la proteína GSTE2 de cepa resistente (RecR) . . . . .	13
5.1. Procedimiento general del protocolo. . . . .	14
6.1. Gel de agarosa de integridad para verificación de pureza de ARN total con diferentes escaleras 1-Promega 25bp G452A; 2- 25pb en papel aluminio;3- Promega 100bp G695A; 4- Promega 1kb DNA ladder;5- Invitrogen E-Gel Ultra Low Ladder;6- Muestra RF.L3.1;7- Promega 100bp G695A; 8- 25pb en papel aluminio . . . . .	19
6.2. Gel de agarosa de comprobación de presencia de ADN contaminante mediante prueba PCR del exón 31 en muestras de ARN tratadas con tratamiento RQ11- Escalera Promega 1kb DNA ladder ; 2- Control positivo (Muestra ZITA 231); 3- Muestra RF.L3.1 con ARN tratado; 4- Muestra RF.L3.2 con ARN tratado. . . . .	20
6.3. Curva de amplificación de diluciones de RF.L3.2 con primers GSTE2F y GSTE2R usando SYBR®Green . . . . .	21
6.4. Curva de eficiencia de gen GSTE2 con respecto a los logaritmos de las diluciones por sus promedios Ct obtenidos. . . . .	23
B.1. Solución de temefos (Chemservice) 100 mg al 97.7% . . . . .	41
B.2. Representación general de preparación de solución de Temefos. . . . .	42
B.3. Solución madre (1000 ppm) y solución de trabajo (12 ppm) Temefos. . . . .	43
C.1. Grupos de 20 larvas de tercer estadio separadas en 5 recipientes de contención. . . . .	47
C.2. Representación general de la realización del bioensayo de resistencia de larvas. . . . .	48
D.1. Viales de 0.2mL con RNAlater® . . . . .	53
D.2. Grupo de larvas resistentes divididas en contenedores . . . . .	54
D.3. Manipulación de larva en Caja Petri con etanol y pinza entomológica . . . . .	54
D.4. Larva individual almacenado en RNAlater® en un vial de 0.2mL . . . . .	55

D.5. Gradilla con viales de larvas almacenadas. . . . .	56
E.1. División de las fases. . . . .	61
F.1. Gel de agarosa para verificar la integridad del ARN total . . . . .	68
F.2. Gel de agarosa de integridad para verificación de pureza de ARN total con diferentes escaleras 1-Promega 25bp G452A; 2- 25pb en papel aluminio;3- Promega 100bp G695A; 4- Promega 1kb DNA ladder;5- Invitrogen E-Gel Ultra Low Ladder;6- Muestra RF.L3.1;7- Promega 100bp G695A; 8- 25pb en papel aluminio . . . . .	68
G.1. Representación general de tratamiento de ARN con kit RQ1 RNase-Free DNase . . . .	72

---

## Lista de cuadros

---

5.1. Primers de enzimas metabólicas analizados en este estudio . . . . .	17
6.1. Título de POE y ubicación . . . . .	18
6.2. Cuadro de cuantificación de larvas de ARN total de la cepa Rockefeller. . . . .	19
6.3. Valores de Ct de qPCR de gen GSTE2 con diluciones de RF.L3.2 . . . . .	22
6.4. Datos de optimización de la curva de eficiencia y eficiencia obtenida . . . . .	23
A.1. Individuos de pool RF.L3.1 fotografiados en estereoscopio con cámara . . . . .	38
A.2. Individuos de pool RF.L3.2 fotografiados en estereoscopio con cámara . . . . .	38

Este trabajo de tesis buscó desarrollar un protocolo estandarizado para poder evaluar la expresión de la enzima GSTE2 asociada a la resistencia a un larvicida organofosforado de uso generalizado denominado Temefos, en poblaciones de campo de larvas de *Aedes aegypti*. Este protocolo se fundamentó en la elaboración de diferentes Procedimientos Operacionales Estándar (POE) de las etapas para la evaluación de la resistencia a Temefos en las larvas de *Ae. aegypti*. La resistencia fenotípica a los insecticidas fue estimada en una población, por medio de bioensayos. Estos bioensayos consistieron en exponer durante 24 horas larvas de tercero y/o cuarto estadio a la dosis diagnóstica de 0.012 ppm Temefos y luego se preservó el ARN de aquellos individuos que presentaron resistencia. Se efectuó la extracción de ARN mediante un método optimizado con TRIzol™ en grupos de 10 larvas de tercer estadio. Seguidamente se realizó un PCR convencional para la estimación de presencia de ADN contaminante utilizando oligonucleótidos (“primers”) de referencia del exón 31, prueba para la mutación F1534C, relacionada a *kdr*. Después del PCR, se llevó a cabo un tratamiento de las muestras de ARN con el kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega) con el fin de eliminar cualquier ADN contaminante. Luego del tratamiento se procedió a hacer otro PCR convencional para confirmar la ausencia de ADN contaminante, de manera a proceder a hacer la síntesis de ADN complementario. El ADN complementario permitió estandarizar los primers (GSTE2F y GSTE2R) mediante una curva de eficiencia, permitiendo estandarizar las condiciones para análisis de expresión génica en futuros estudios.

El virus del Dengue es un flavivirus de la familia *Flaviviridae* y forma parte del ciclo urbano desde hace alrededor de 1000 años debido a su principal vector *Aedes aegypti* (Wang *et al.*, 2000). En 2010 globalmente se tasaron 390 millones de infecciones incluyendo casos leves o asintomáticos. El continente asiático concentraba 67 millones de los casos y principalmente en regiones densamente pobladas, regiones apropiadas para la transmisión de la enfermedad (Bhatt *et al.*, 2013). En Guatemala se registraron más de 5000 casos en el año 2019 siendo el año más alto desde el 2008. Afortunadamente se ha notado un decremento en los años posteriores en términos de casos (MSPAS,2021). El insecticida organofosforado (OP) Temefos se usa comúnmente para controlar los vectores en estadios inmaduros del mosquito *Aedes aegypti* dengue debido a su rentabilidad y aceptación comunitaria. Como consecuencia de su uso generalizado, la resistencia a Temefos en *Ae. aegypti* ha sido reportado en muchos países de América Latina. (Grisales *et al.*, 2013). Han aparecido informes en El Salvador (Lazcano *et al.*, 2009), Isla Martinica en las Antillas Francesas (Marcombe *et al.*, 2009), Argentina (Seccacini *et al.*, 2008), Colombia (Ocampo *et al.*, 2011) y Trinidad (Polson *et al.*, 2010). Aunque se ha demostrado resistencia al Temefos en muchas áreas del mundo, es el único larvicida organofosforado que queda con algún uso apreciable. Como tal, es una herramienta importante ante los pocos larvicidas alternativos disponibles (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2013).

Las enzimas glutatión S-transferasas (GSTs) son enzimas involucradas en procesos de desintoxicación y el gen GSTE2 asociado a estas enzimas se ha visto sobreexpresado en cepas de larvas resistentes comparado a cepas control. Mutaciones y trabajo colaborativo con otras clase de enzimas GST son aquellas que brindan el fenotipo de resistencia a temefos de las larvas (Helvecio *et al.*, 2020). El monitoreo de resistencia a insecticidas en vectores es la principal técnica de prevención de la enfermedad para tomar la decisiones pertinentes.

### 2.1. Objetivo general

Desarrollar un protocolo para la evaluación de la expresión de la enzima metabólica glutatión-S-transferasa (GSTE2) en larvas de *Aedes aegypti*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Optimizar el método de extracción de ARN para larvas de *Aedes aegypti* utilizando el reactivo TRIzol™ (Invitrogen).
- Estandarizar mediante curva de eficiencia los primers GSTE2F y GSTE2R.
- Redactar Procedimientos Operacionales Estándar (POE) de las diferentes etapas de la evaluación de la expresión de la enzima metabólica glutatión-S-transferasa (GSTE2) en larvas de *Aedes aegypti* por medio de PCR en tiempo real

El virus del Dengue forma parte del ciclo urbano y principalmente por su vector principal *Aedes aegypti*. Esta enfermedad presenta un riesgo de salud pública importante y al no existir una cura definitiva para combatir esta, la alternativa es el control y monitoreo del vector desde su estadio larvario. Una de las principales técnicas de control y monitoreo es el uso de insecticidas para disminuir el número de individuos de una población. Debido al uso excesivo y generalizado de insecticida existe un problema creciente que es la resistencia a los insecticidas. El larvicida más utilizado para controlar los vectores en sus estadios inmaduros es el insecticida organofosforado temefos y se han reportado resistencia a este insecticida en diferentes países de América Latina. Esta resistencia se ha asociado a enzimas metabólicas entre las que destacan las glutatión S-transferasas. La caracterización de este mecanismo de resistencia a temefos es escasa en la región centroamericana. Este estudio tiene como objetivo plantear un protocolo para el análisis de resistencia a temefos en larvas de *Aedes aegypti* y asociarlo a la enzima metabólica GSTE2 de resistencia a temefos. Caracterizar a nivel molecular esta resistencia, permitirá generar información para tomar mejores decisiones de control de este vector en los diferentes países, con la relevancia de mejorar la salud pública para la población general.

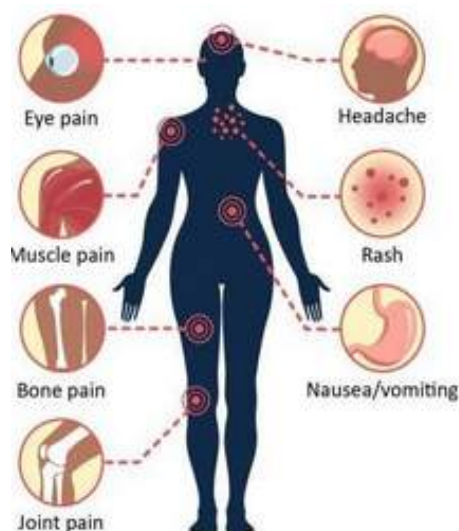
## 4.1. Dengue

La primera estimación global de infecciones total del virus del dengue se remonta hasta 1988 en la que se estimó entre 80 y 100 millones de infecciones por año (Halstead, 1988). En 2010 globalmente se tasaron 390 millones de infecciones incluyendo casos leves o asintomáticos. El continente asiático concentraba 67 millones de los casos y principalmente en regiones densamente pobladas, regiones apropiadas para la transmisión de la enfermedad (Bhatt *et al.*, 2013). En Guatemala se registraron más de 5000 en el año 2019 siendo el año más alto desde el 2008. Afortunadamente se ha notado un decremento en los años posteriores en términos de casos y los departamentos más afectados fueron Retalhuleu y Escuintla en el año 2021 (MSPAS,2021).

Los arbovirus son enfermedades transmitidas por artrópodos a anfitriones vertebrados. Es un grupo taxonómico diverso que se clasifica según sus relaciones antigénicas, morfología y mecanismo replicativo. Las familias de los arbovirus incluyen *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, y *Reoviridae* (Go, Balasuriya y Lee, 2014). El virus del Dengue es un flavivirus de la familia *Flaviviridae* y forma parte del ciclo urbano desde hace alrededor de 1000 años. Existen cuatro serotipos DENV-1-4 que evolucionaron de un ancestro común primate no humano (Wang *et al.*, 2000). Los síntomas del Dengue pueden ser fácilmente confundidos ya que abarcan desde los síntomas generales a aquellos de cualquier otra infección viral. El cuadro de síntomas se resume en dolor de cabeza, ocular, muscular, óseo, de articulaciones, vómitos y sarpullido (Figura 4.1).

Los pacientes infectados con dengue pueden tener un amplio espectro de manifestaciones clínicas, comprendiendo desde asintomáticos, pacientes febriles (DF), a dengue severo (SD), tales como dengue hemorrágico febril (DHF) y síndrome de choque de dengue (SDD) (Chaturvedi, Agarwal, Elbishbishi y Mustafa, 2000). Los síntomas de la DF son síntomas parecidos a la gripe, dolor retro-orbital, fiebre, sarpullido, dolor de cabeza intenso, dolor muscular y de articulaciones y náusea con una duración entre 2 y 7 días. El DHF se caracteriza después de 3 y 5 días de fiebre por pérdida de plasma, derrame pleural, trombocitopenia, altos niveles de eritrocitos, dolor abdominal, caídas súbitas de temperatura y vómitos. Las manifestaciones clínicas de SDD son temperaturas de 37.5 °C-38 °C, hipotensión, decremento de plaquetas que desencadenan pérdida de plasma con choque subsecuente, acumulación de fluidos con dificultades respiratorias, desangramiento crítico, deterioro de órganos y falla cardiorrespiratoria y paro cardíaco (Wang *et al.*, 2020).

Figura 4.1: Síntomas generales del dengue



(CDC,2021)

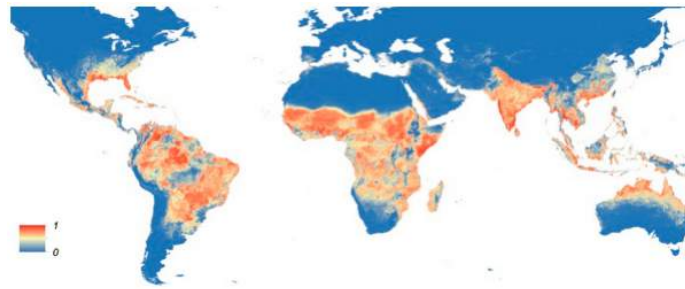
Un programa de vigilancia a través de la región oeste de sudamérica, identificó diferencias en la prevalencia de manifestaciones clínicas según el serotipo de DENV. Individuos con DENV-3 tuvieron una prevalencia de manifestaciones esqueléticas y gastrointestinales, mientras que aquellos con DENV- 4 con mayor prevalencia a manifestaciones cutáneas y respiratorias (Halsey *et al.*, 2012). En 2013, se informó co-circulación de todos los serotipos en Guatemala, Nicaragua, México, Martinica, Guadalupe, Colombia, Venezuela, Guayana Francesa, Perú, Brasil y Argentina. Es difícil la evaluación de la verdadera carga de la enfermedad en toda la región debido a un subregistro de casos (Torres *et al.*, 2017).

## 4.2. *Aedes aegypti*

El virus del dengue (DENV) y otros arbovirus tales como Zika, chikungunya y el virus de la fiebre amarilla son transmitidos por *Aedes aegypti*. Esta especie está altamente adaptada a áreas urbanas y suburbanas (Amelia-Yap, Chen, Sofian-Azirun y Low, 2018). *Aedes aegypti* se distribuye primariamente en los trópicos y subtropicos, así como en Brasil y sudeste de Asia principalmente en India. Se ha llegado a localizar en áreas menos idóneas para el mosquito como España, Grecia y áreas templadas de América del norte (Kraemer *et al.*, 2015).

La presión para llenar los hábitats desocupados conducirá inevitablemente al establecimiento de poblaciones permanentes de *Ae. aegypti* en la mayoría de las localidades donde se dan las condiciones para su supervivencia. El vector continúa expandiéndose hacia el sur a localidades en las que es capaz de completar su ciclo de vida al menos durante una temporada. Este desplazamiento hacia el sur puede ser derivado al cambio climático. Existen Las tasas de propagación modeladas globales se subestiman porque los conjuntos de datos globales de registros de *Ae. aegypti* tienen un sesgo espacio-temporal. La vertiginosa expansión de *Ae. aegypti* a latitudes sin precedentes en América del Sur alerta sobre la necesidad de implementar una vigilancia entomológica constante de mosquitos transmisores de enfermedades mucho más allá de sus supuestos límites de distribución (Kraemer *et al.*, 2019).

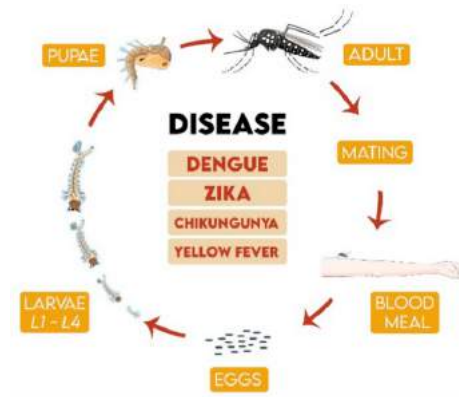
Figura 4.2: Mapa global de distribución de *Aedes aegypti*



(Kraemer *et al.*, 2015)

*Ae. aegypti* se reproduce en ambientes interiores y exteriores en una amplia variedad de recipientes de retención de agua naturales y artificiales, como tanques de plástico, hojas, jarras de almacenamiento de agua, tanques de cemento, floreros, tanques de curado, vasos, neumáticos de goma y botellas de plástico. Los hábitats de reproducción en áreas urbanas surgen principalmente de áreas abandonadas de sitios de construcción y agua estancada que pueden crear condiciones favorables para que los mosquitos se reproduzcan (Chareonviriyaphap *et al.*, 2003). Después de la hidratación y la eclosión de los huevos, comienza la etapa larvaria, que tiene cuatro pasos evolutivos. El desarrollo depende de la temperatura, disponibilidad de alimento (materia orgánica o microorganismos) y número de larvas en el criadero. En condiciones estándar el período entre la eclosión y la pupa no puede exceder los 5 días (García *et al.* 1993). En ausencia de agua los huevos pueden ser viables hasta 450 días. *Ae. aegypti* presenta una metamorfosis completa desde los estadios de huevo inmaduro, larva y pupa hasta el propio mosquito adulto. Bajo condiciones favorables, después de la eclosión del huevo, el mosquito se transforma en etapa adulta a los 10 días (Geris *et al.*, 2012).

Figura 4.3: Ciclo de vida de *Aedes aegypti*

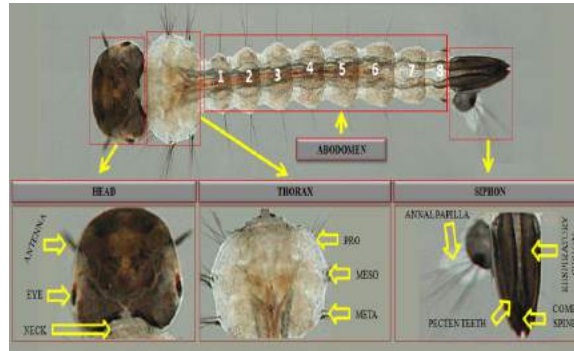


(Silvério *et al.* 2020)

La morfología de las larvas *Aedes aegypti* está adaptada al estilo de vida acuático y les permite sobrevivir y desarrollarse en cualquier cuerpo de agua. Al eclosionar, las larvas de *Ae. aegypti* recién emergidas son transparentes. A medida que crecen, se oscurecen antes de la muda y sufren variaciones morfométricas en diferentes partes. En cada estadio las larvas se vuelven transparentes inmediatamente después de la muda y antes de la siguiente muda la cutícula larvaria se oscurece. Las partes principales de las larvas que definen la morfometría de estas por varios investigadores son: la cabeza, el cuello, el tórax y el abdomen. Entre estas partes generales, más específicamente las partes más importantes son: penacho bucal, palatum, mentón, ojo, antena, cerdas laterales, sifón, pecten y papilas anales. Entre estas características morfológicas, aquellas que permiten diferenciar la especie

*aegypti* entre el género *Aedes* es la forma del cuerpo, el tamaño, el color, la cabeza, el abdomen y las partes bucales. Las larvas de *Aedes aegypti* presentan un cuerpo alargado y cilíndrico, con una cabeza puntiaguda y una cola al final. El tamaño de la larva varía dependiendo de la disponibilidad de alimentos y el estadio de desarrollo. El color de la larva varía desde un color blanco-transparente hasta un color más oscuro (pueden parecer más oscuras si han sido recientemente alimentadas). La cabeza de las larvas es relativamente grande en comparación con el cuerpo. Se caracteriza por los dos ojos negros, el par de antenas y la variedad de vellocidades. (Farnesi *et al.*, 2012).

Figura 4.4: Partes principales de morfología y morfometría de larvas de *Aedes aegypti*



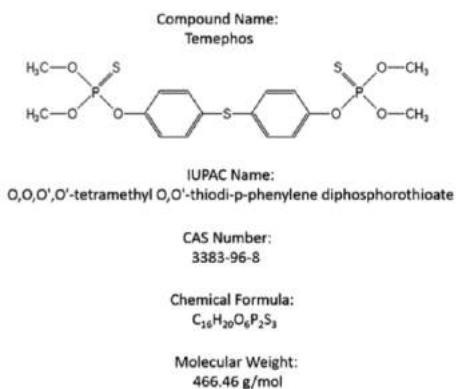
(Rao, 2020)

Las partes de la boca están adaptadas para alimentarse de materia orgánica disuelta en agua. Poseen un par de mandíbulas y un conjunto de estructuras llamadas peine. El abdomen de las larvas se compone de ocho segmentos, cada uno con espiráculos laterales utilizados para respirar. El último segmento tiene dos apéndices dorsales llamados papilas anales. El tamaño de las larvas aumenta a medida que crecen y mudan. La longitud de las larvas de *Ae. aegypti* en los estadios I, II, III y IV es de 1.745, 2.935, 4.343 y 7.202 mm respectivamente (Bar y Andrew, 2013). Existen una secuencia de eventos bioquímicos relacionados a la producción de cutícula, hasta desecho de esta durante las mudas de piel entre los estadios larvarios. Los tiempos de estadios larvarios entre mudadas secuenciales se observan monitoreando las características morfológicas antes y después de la ecdisis (Farnesi *et al.*, 2012).

### 4.3. Temefos

Para el control de los vectores del dengue uno de los métodos principales utilizados es el uso del compuesto organofosforado temefos (comercialmente conocido como Abate) como larvicida. Su uso ha sido documentado desde 1965 en todo tipo de cuerpos de agua urbanos (Sztankay-Gulyás, 1972). Temefos es la herramienta más comúnmente usada por su aplicación simple, muerte selectiva de larvas de mosquito y su efecto perdurable comparado a sus contrapartes tradicionales. Este larvicida está disponible comercialmente en preparaciones estandarizadas de emulsificantes concentrados, soluciones diluidas, polvo y gránulos. (OMS, 2011) El larvicida temefos (bis(fosforotionato) de O,O,O',O'-tetrametil-O,O'-tiodi-p-fenileno)) pertenece a la familia de pesticidas y ectoparasiticidas organofosforados utilizado para otros diferentes vectores de salud pública como moscas negras, jejenes o gusanos de Guinea. Su estructura (Fig 4) presenta un sulfuro orgánico, un sulfuro difenilo en el que el hidrógeno en la posición -para de cada uno de los grupos fenilo ha sido reemplazado por un grupo (dimetoxifosforotioil)oxi. Su rol es funcionar como inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa (EC 3.1.1.7). Está relacionado funcionalmente con un 4,4'-tiodifenol (ChEBI, 2016; Benitez-Trinidad *et al.*, 2015).

Figura 4.5: Estructura química de temefos

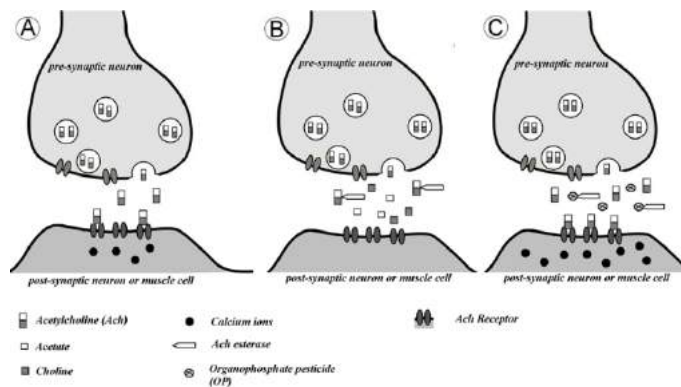


(Benitez-Trinidad *et al.*, 2015)

La agricultura es el ámbito que más utiliza los organofosforados como clase de insecticidas. El principal mecanismo de acción de los organofosforados es la interferencia en la regulación de la transmisión neuronal, ocasionando sobreactivación colinérgica llegando hasta muerte neuronal. El temefos cumple un rol de inhibidor al enlazarse al residuo de serina en el sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), dentro de la sinapsis neuronal de los insectos (Figura 5) (Marsillach *et al.*, 2013). La enzima AChE tiene un rol de anclaje de la acetilcolina (neurotransmisor que regula funciones vitales) que es responsable de transmitir las señales neuronales mediante la ruta colinérgica sináptica. Los organofosforados tienen propiedades similares de acetilcolina pero son hemi sustratos que conducen a la inhibición irreversible de la enzima. (Fournier, 2005)

La pérdida de actividad de AChE causa una acumulación de la acetilcolina que desencadena la activación de receptores nicotínicos y muscarínicos moduladores de la actividad de esta. Estos moduladores son responsables del flujo celular de calcio y debido a la sobreestimulación conllevan una desensibilización, una disrupción neurológica y últimamente la muerte al quedar siempre abiertos los canales (Hollingworth y Dong, 2008). La estructura de la AChE ha visto modificaciones, generando diferentes niveles de transformación de la enzima. Las formas modificadas de la enzima AChE difieren dentro de las especies, lo que resulta en diferentes posibilidades de resistencia cruzada. Estudios han relacionado estas alteraciones en las estructuras de la AChE con la resistencia a los compuestos organofosforados (Soderlund *et al.*, 1989).

Figura 4.6: Esquema de efectos de insecticidas organofosforados en la transmisión de impulsos nerviosos: A – Sinapsis señalizada con acetilcolina; B – acetilcolinesterasa detiene el proceso de señalización; C – organofosforados inhibiendo acetilcolinesterasa.



(Lushchak *et al.*, 2018).

Al igual que la AChE es una enzima clave para el sistema nervioso, las carboxilesterasas pertenecen a una superfamilia multifuncional carboxilesterasa/colinesterasa (CCE). La desintoxicación de insecticidas se basa en moléculas de hidrólisis en diferentes sitios, de modo a romper enlaces químicos como ésteres, carboxil-ésteres, y/o amidas de estas enzimas. Las enzimas CCE cumplen con esta función de hidrólisis y se clasifican según sus funciones bioquímicas en tres grupos: desintoxicación, procesamiento hormonal y neurodesarrollo (Lu *et al.*, 2014).

La desintoxicación por las carboxilesterasas se efectúa de tres maneras diferentes. La primera es la hidrólisis de los enlaces ésteres de los organofosforados y la segunda es el enlazamiento de las CCE a las moléculas de los organofosforados para disminuir la concentración circulante y por último evitar la fosforilación de los organofosforados al enlazar su grupo hidroxilo al sitio activo. La tercera y última función consiste en reemplazar el grupo hidroxilo de la serina en su sitio activo, formando un residuo fosforilado mucho menos potente para inhibir esterases, puesto que al separarse de la enzima que acepta el grupo hidroxilo que toma el agua como su nuevo radical acilo. Este organofosforado recién formado, ácido organofosfórico, es un inhibidor de esterasa mucho menos potente (si es que lo es) que representa un metabolito no tóxico del original. El rol activo de CCE es la transformación metabólica de los organofosforados en metabolitos inactivos no tóxicos (Jokanović, 2015).

Otro grupo de enzimas involucradas en desintoxicación son las glutatión S-transferasas (GSTs: E.C.2.5.1.18). Estas enzimas son proteínas diméricas multifuncionales cruciales en el metabolismo de fármacos, la biotransformación de xenobióticos y endobióticos, el transporte intracelular, la biosíntesis de hormonas y el metabolismo de xenobióticos. Las GSTs juegan un rol predominante en proveer protección contra electrófilos y productos de estrés oxidativo. Las GSTs de los insectos se dividen en dos clases, clase I y clase II (Ketterman *et al.*, 2011). La extracción de GSTs de los insectos resulta dificultoso por la presencia de inhibidores endógenos. Existen diferentes estrategias para purificar las GSTs de los insectos. La purificación por cromatografía de afinidad por punto isoeléctrico ha demostrado la existencia de múltiples formas de GSTs. Ha sido detallada la presencia de múltiples isoenzimas de GSTs en *Aedes aegypti* (Grant *et al.*, 1991).

Se describen estas enzimas como enzimas mayores fase II de desintoxicación. Estas metabolizan un amplio rango de compuestos hidrofóbicos como drogas, endógenos tóxicos y sobre todo insecticidas al catalizar la conjugación de glutatión y los centros hidrofílicos de los sustratos tóxicos. La consecuencia de la reacción es el aumento de la solubilidad de compuestos con el fin de promover la excreción. Las GSTs pueden enlazar también compuestos hidrofóbicos aunque no sean sus sustratos. Este enlazamiento no asociado a los sustratos se asocia a la secuestración, almacenamiento y transporte de droga, hormonas y otros metabolitos, tales como bilirrubina y ácidos grasos. Los mosquitos poseen GSTs citosólicas y microsomales. Las GSTs citosólicas constan de dos subunidades formadoras de homodímeros y heterodímeros. Cada subunidad contiene un sitio específico de glutatión (sitio G) al lado de sitio H que es sitio de unión a ligandos electrofílicos no específicos. El alto nivel de diversidad en este sitio no específico es lo que define las diferencias en las especificidades del sustrato (Lumjuan *et al.*, 2007).

#### 4.4. Resistencia a insecticidas

Los insecticidas son la herramienta principal para los programas de control de vectores. Estos son todos compuestos neurotóxicos y se dividen en cuatro categorías: carbamatos, organoclorados, piretroides y organofosforados (Ranson *et al.*, 2010). Actualmente los organofosforados son de los insecticidas más utilizados y se han desarrollado dos nuevas clases, los moduladores de receptores de acetilcolina y espinosinas. El uso intensivo y prolongado de los insecticidas ha ejercido como presión para la selección de especímenes resistentes en las poblaciones de campo (Valle *et al.*, 2015). El insecticida organofosforado (OP) temefos se usa comúnmente para controlar los inmaduros del mosquito *Aedes aegypti*, vector de dengue debido a su rentabilidad y aceptación comunitaria. Como consecuencia de su uso generalizado, la resistencia a temefos en *Ae. aegypti* ha sido reportado en

muchos países de América Latina (Grisales *et al.*, 2013). Han aparecido informes en El Salvador (Lazcano *et al.*, 2009), Isla Martinica en las Antillas Francesas (Marcombe *et al.*, 2009), Argentina (Seccacini *et al.*, 2008), India (Tikar *et al.*, 2009), Colombia (Ocampo *et al.*, 2011) y Trinidad (Polson *et al.*, 2010).

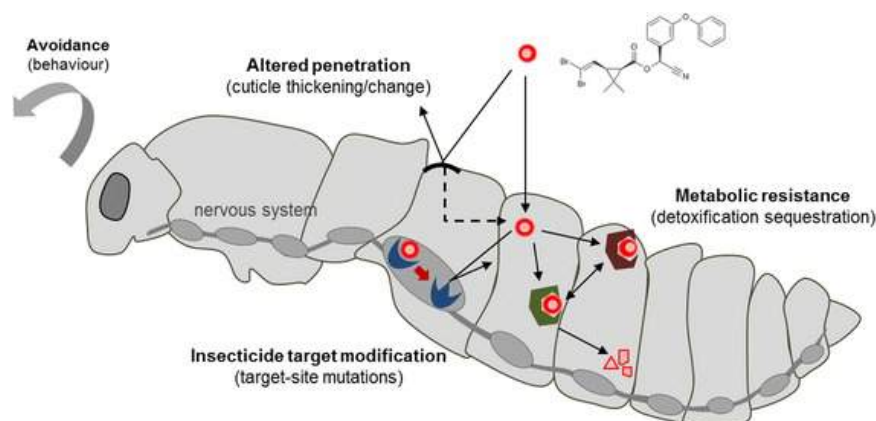
Aunque se ha demostrado resistencia al temefos en muchas áreas del mundo, es el único larvicida organofosforado que queda con algún uso apreciable. Es una herramienta importante en el manejo de la resistencia (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2013). Los insecticidas son la herramienta principal para los programas de control de vectores. Estos son todos compuestos neurotóxicos y se dividen en cuatro categorías: carbamatos, organoclorados, piretroides y organofosforados (Ranson *et al.*, 2010). Actualmente los organofosforados son de los insecticidas más utilizados y se han desarrollado dos nuevas clases, los moduladores de receptores de acetilcolina y espinosinas. El uso intensivo y prolongado de los insecticidas ha ejercido como presión para la selección de especímenes resistentes en las poblaciones de campo (Valle *et al.*, 2015).

El insecticida organofosforado (OP) temefos se usa comúnmente para controlar los inmaduros del mosquito *Aedes aegypti*, vector de dengue debido a su rentabilidad y aceptación comunitaria. Como consecuencia de su uso generalizado, la resistencia a temefos en *Ae. aegypti* ha sido reportado en muchos países de América Latina (Grisales *et al.*, 2013). Han aparecido informes en El Salvador (Lazcano *et al.*, 2009), Isla Martinica en las Antillas Francesas (Marcombe *et al.*, 2009), Argentina (Seccacini *et al.*, 2008), India (Tikar *et al.*, 2009), Colombia (Ocampo *et al.*, 2011) y Trinidad (Polson *et al.*, 2010). Aunque se ha demostrado resistencia al temefos en muchas áreas del mundo, es el único larvicida organofosforado que queda con algún uso apreciable. Es una herramienta importante en el manejo de la resistencia (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2013).

Los insecticidas son la herramienta principal para los programas de control de vectores. Estos son todos compuestos neurotóxicos y se dividen en cuatro categorías: carbamatos, organoclorados, piretroides y organofosforados (Ranson *et al.*, 2010). Actualmente los organofosforados son de los insecticidas más utilizados y se han desarrollado dos nuevas clases, los moduladores de receptores de acetilcolina y espinosinas. El uso intensivo y prolongado de los insecticidas ha ejercido como presión para la selección de especímenes resistentes en las poblaciones de campo (Valle *et al.*, 2015). El insecticida organofosforado (OP) temefos se usa comúnmente para controlar los inmaduros del mosquito *Aedes aegypti*, vector de dengue debido a su rentabilidad y aceptación comunitaria. Como consecuencia de su uso generalizado, la resistencia a temefos en *Ae. aegypti* ha sido reportado en muchos países de América Latina (Grisales *et al.*, 2013). Han aparecido informes en El Salvador (Lazcano *et al.*, 2009), Isla Martinica en las Antillas Francesas (Marcombe *et al.*, 2009), Argentina (Seccacini *et al.*, 2008), India (Tikar *et al.*, 2009), Colombia (Ocampo *et al.*, 2011) y Trinidad (Polson *et al.*, 2010). Aunque se ha demostrado resistencia al temefos en muchas áreas del mundo, es el único larvicida organofosforado que queda con algún uso apreciable. Es una herramienta importante en el manejo de la resistencia (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2013).

Existen diferentes mecanismos de resistencia al insecticida, derivados del uso extensivo de estos. Estos mecanismos dificultan la eliminación de los mosquitos y aumentan la probabilidad de transmisión de dengue. En los países centrales y occidentales de África los mosquitos *Ae. aegypti* con resistencia a piretroides y DDT involucra los mecanismos de resistencia principales de sitio blanco (kdr) y resistencia metabólica (Kamgang *et al.*, 2011). Los datos de resistencia a los insecticidas en la India revelaron una resistencia generalizada al DDT en *Ae. aegypti* en todo el país, una resistencia creciente a los organofosforados en el sur de la India, asociada tanto a kdr como a resistencia metabólica (Kushwah *et al.*, 2015). En la región de Jining, China, se ha correlacionado con el fenotipo resistente a deltametrina las mutaciones I1532T y F1534S relacionadas a la resistencia kdr (Liu *et al.*, 2020). En Florida, Estados Unidos, se demostró una relación entre al menos una de las tres enzimas metabolizantes (oxidasa, esterasa y glutatión transferasa), es decir resistencia metabólica, con resistencia a piretroides en 11 de 20 poblaciones (Schluep y Buckner, 2021).

Figura 4.7: Diferentes mecanismos de resistencia a insecticidas en mosquitos.



(Corbel *et al.*, 2017).

En términos generales la resistencia a los insecticidas, por consiguiente los mecanismos de resistencia *kdr* y metabólico, se han propagado a nivel mundial. Con el conocimiento actual a nivel global, sobre las enzimas de desintoxicación involucradas en la resistencia en mosquitos de *Aedes* ante diferentes familias de insecticidas, se han identificado una gran cantidad de genes involucrados en la resistencia metabólica. Futuras investigaciones deben concentrarse en ampliar el panel de marcadores validados de resistencia metabólica, evaluando su importancia para conferir resistencia a varios insecticidas identificando sus costos de aptitud asociados y desarrollando nuevas herramientas de diagnóstico para monitorear su dinámica en poblaciones naturales de mosquitos (Faucon *et al.*, 2015).

#### 4.5. Glutación-S-transferasa epsilon 2 (GSTE2)

Muy pocos organismos que han sido descritos no poseen un mecanismo de desintoxicación. Las glutatión-S-transferasas se describen estas enzimas como enzimas mayores fase II de desintoxicación. Estas metabolizan un amplio rango de compuestos hidrofóbicos como drogas, endógenos tóxicos y sobre todo insecticidas al catalizar la conjugación de glutatión y los centros hidrofílicos de los sustratos tóxicos. La consecuencia de la reacción es el aumento de la solubilidad de compuestos con el fin de promover la excreción. Las GSTs pueden enlazar también compuestos hidrofóbicos aunque no sean sus sustratos. Este enlazamiento no asociado a los sustratos se asocia a la secuestración, almacenamiento y transporte de droga, hormonas y otros metabolitos, tales como bilirrubina y ácidos grasos. Los mosquitos poseen GSTs citosólicas y microsomales. Las GSTs citosólicas constan de dos subunidades formadoras de homodímeros y heterodímeros. Cada subunidad contiene un sitio específico de glutatión (sitio G) al lado de sitio H que es sitio de unión a ligandos electrofílicos no específicos. El alto nivel de diversidad en este sitio no específico es lo que define las diferencias en las especificidades del sustrato. Las GSTs citosolicas se pueden clasificar en al menos seis clases: Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Theta y Zeta. Las clases delta y epsilon, específicas a los insectos, son las clases que comprenden la mayoría de las GSTs citosólicas y las implicadas en el metabolismo de xenobióticos (Lumjuan *et al.*, 2007).

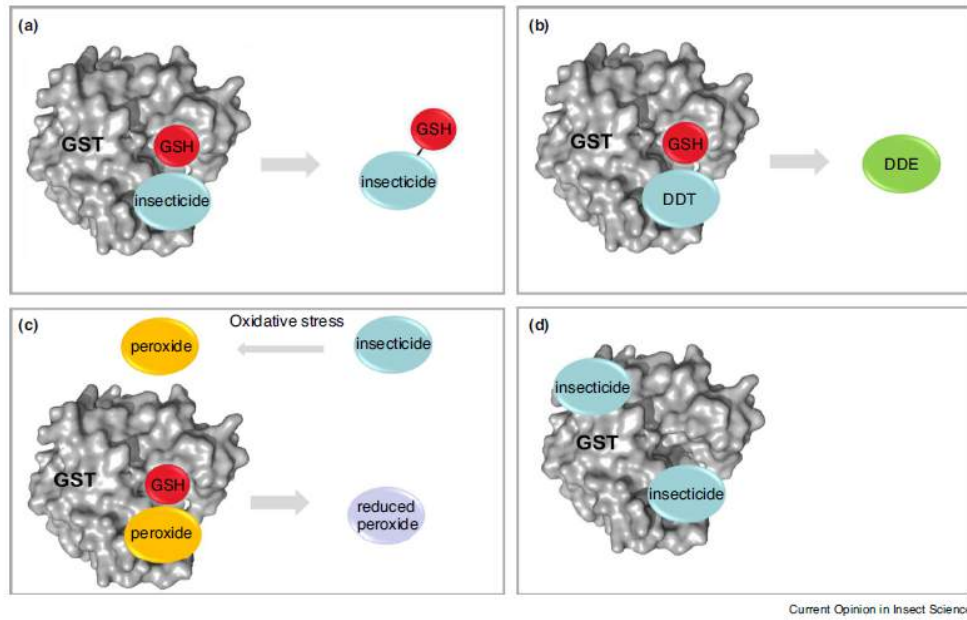
Las GSTs, enzimas involucradas en las desintoxicación de un amplio rango de insecticidas, principalmente catalizan la conjugación de los compuestos electrofílicos con el grupo tiol de la glutatión reducida (GSH). Esta catalización resulta en productos solubles en agua y excretables en comparación de sustratos a los sustratos conjugados sin GSH. Adicionalmente algunas GSTs catalizan una reacción de deshidrocloración utilizando GSH como cofactor en lugar de conjugado. Los niveles de

actividad de GST varían durante las etapas de la vida de los insectos. En *Aedes aegypti*, la actividad total medida con CDNB y DCNB incrementa durante diferentes el desarrollo larvario, llegando a su pico en la etapa pupal y descendiendo en adultos a medida que crecen. El mapeo genético de los principales loci que confieren resistencia al DDT en *A. gambiae* implica factores que actúan tanto en cis como en trans en la sobreexpresión de las GST de la clase Epsilon. Se ha detectado sobreexpresión de múltiples clases Epsilon de GSTs, en cepas de *A. gambiae* resistentes a DDT, entre las que destaca la enzima GSTe2. La resistencia a organofosforados en muchos casos, no están exentas de responsabilidad las GSTs. La conjugación de glutatión a insecticidas organofosforados resulta en dos rutas distintas de desintoxicación (Enayati *et al.*, 2005).

Los principales mecanismos de desintoxicación de insecticidas, mediados por GST puede ser directo (fase I) o por metabolización de productos secundarios generados por otras enzimas de desintoxicación como las P450s y CCEs (fase II) Las GSTs catalizan la conjugación de GSH al insecticida produciendo un conjugado menos tóxico. Un ejemplo es la implicación de GSTs en la desintoxicación del DDT al catalizarlo en DDE que no es tóxico, utilizando la GSH como cofactor. El otro mecanismo se basa en la actividad de peroxidasa de la GSTs, reduciendo el estrés oxidativo del consumo del insecticida. Por otra parte las GST pueden conferir resistencia a través de la unión pasiva no catalítica del insecticida, impidiendo que ejerza su función.(Pavliidi *et al.*, 2018).

La expresión funcional combinada con técnicas analíticas, así como estudios de estructura de proteínas, puede proporcionar evidencias para el metabolismo y agregar más información sobre las interacciones intramoleculares GST-insecticida. Si bien el número de GST identificados se está expandiendo rápidamente, los estudios que validan la participación de GST no han seguido el ritmo, y especialmente la identificación del metabolismo y/o el desentrañamiento de los mecanismos exactos. Sin embargo, una serie de estudios clave recientemente han proporcionado evidencia del metabolismo directo de ciertos insecticidas y características clave de los mecanismos involucrados. Esos estudios pueden actuar como una guía para descifrar el papel de las GST también en otros casos de resistencia en el futuro. Comprender los mecanismos en profundidad facilitará un manejo más eficiente del control de plagas (Pavliidi *et al.*, 2018).

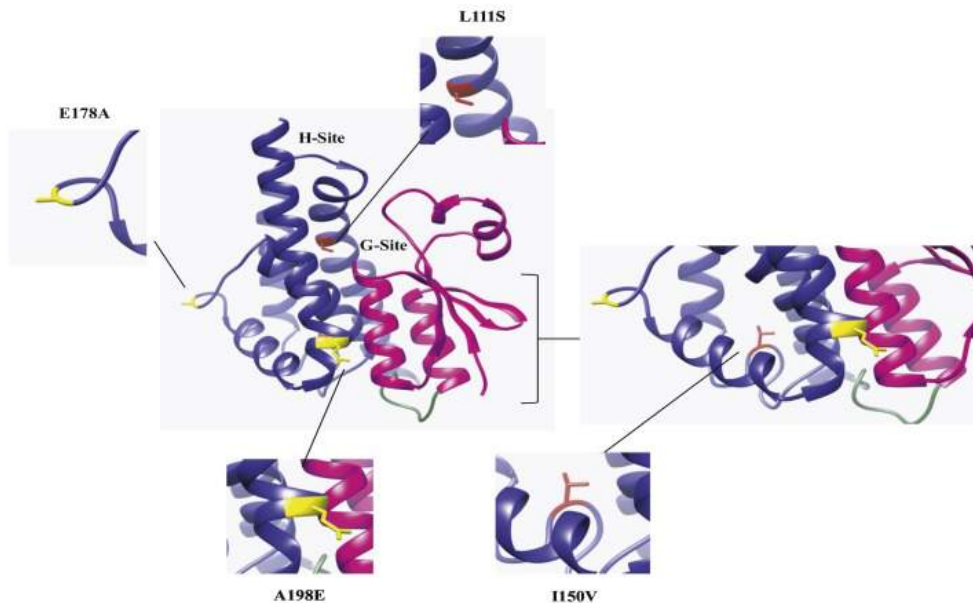
Figura 4.8: Los mecanismos principales de resistencia a insecticidas mediada por las GST.



(Pavliidi *et al.*, 2018).

La clase Epsilon GST en *Ae. aegypti* consta de un grupo de 8 genes ordenados secuencialmente que se han mapeado genéticamente en el cromosoma 2, supercontig 1.291. Previamente se ha demostrado que los homodímeros de una GST Epsilon *Ae. aegypti*, GSTe2 son muy eficientes para metabolizar el DDT y la expresión de esta enzima es elevada en una población resistente al DDT y a los piretroides de Tailandia. GSTe2 se expresó a niveles significativamente más altos en la cepa PMD-R, altamente resistente. Solo GSTe2 y GSTE5 demostraron capacidad de metabolizar DDT a DDE. La actividad DDT deshidroclorinasa de GSTe2 se expresa a niveles significativamente más altos en la cepa altamente resistente. Durante todas las etapas de vida de la cepa altamente resistente, GSTe2 se confirmó que estaban presentes en niveles muy elevados en comparación con la cepa susceptible. Con respecto a la cinética de la reacción difirió considerablemente la variante resistente que tiene una Km más baja para DDT (37,8 12,5 mM frente a 79,6 23,6 mM) pero también una Vmax más baja (104,3 5,3 frente a 418,5 26,0 nmol de formación de DDE /min/mg), demostrando su mayor eficiencia para metabolizar el insecticida (Lumjuan *et al.*, 2011).

Figura 4.9: Modelo 3D de la proteína GSTE2 de cepa resistente (RecR)

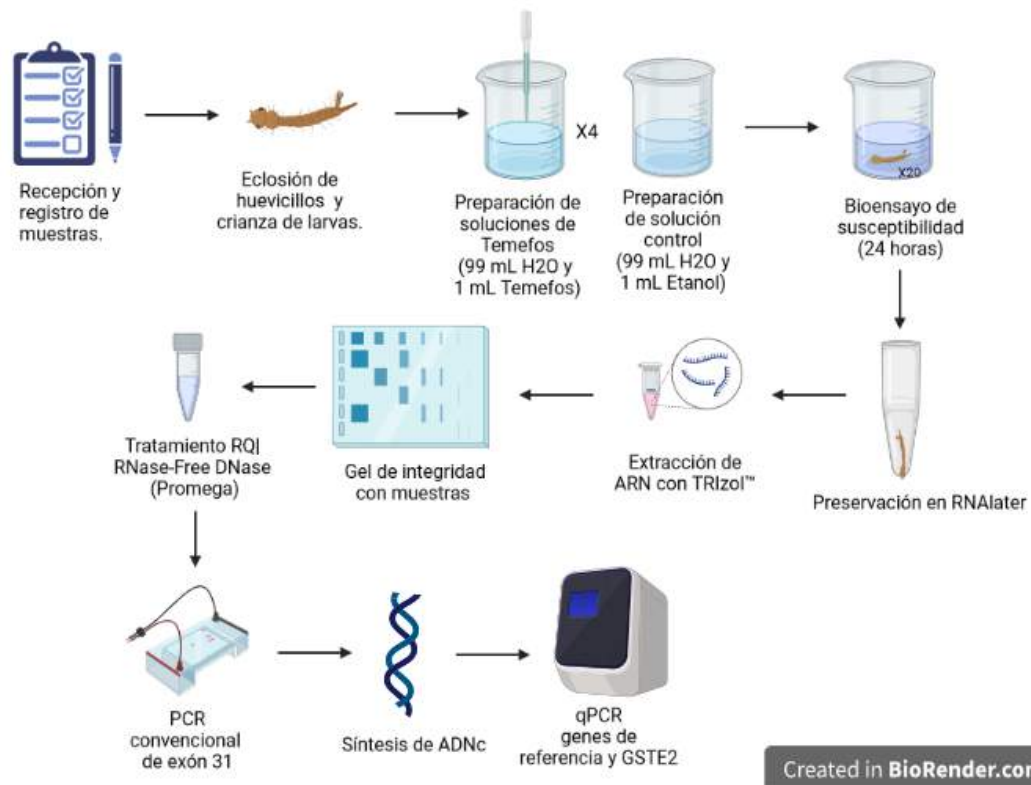


(Helvecio *et al.*, 2020).

Las estructuras principales destacadas en este modelo son las hélices alfa, las láminas beta y los bucles que se encuentran dentro de los dos dominios de la enzima. El dominio N-terminal, está coloreado en rosa claro; y el dominio C-terminal, en azul oscuro. Se indica la posición del supuesto componente de unión al DDT (sitio H) y del sitio de enlazamiento al GSH (sitio G). Los cuatro residuos específicamente mutados en el alelo RecR se muestran con los situados externamente coloreados en amarillo (E178A y A198E) mientras que los situados internamente están en rojo (L111S e I150V). La imagen ampliada de la izquierda, girada en comparación con la figura principal, resalta la posición de la sustitución I150V. En base al análisis in silico no se observaron cambios importantes en la estructura del modelo al comparar los modelos susceptibles con los resistentes de GSTE2. Sin embargo la sustitución L111S probablemente cambia la orientación en la proteína resistente del residuo adyacente, R112, implicado tanto en el enlazamiento del glutatión y del sustrato. La posición del residuo I150 concuerda con los datos aquí mostrados, indicando un posible papel en la actividad catalítica de la proteína (Helvecio *et al.*, 2020).

5.1. Diagrama

Figura 5.1: Procedimiento general del protocolo.



El procedimiento general presentado en la *Figura 5.1* describe las diferentes etapas requeridas para la evaluación de la expresión de la enzima metabólica GSTE2. Empieza por las etapas rela-

cionadas a la crianza de los individuos: la recepción y registro de los huevos de *Aedes aegypti* y la eclosión de los huevecillos así como su desarrollo a los estadios adecuados en larvas. Posteriormente se ilustran las etapas referentes a los bioensayos: la preparación de solución de Temefos para emplearla en los bioensayos, la ejecución de los bioensayos durante 24 horas y la preservación de los individuos en RNAlater resistentes y control. Seguidamente se muestran las etapas correspondientes a la extracción y tratamiento de ARN: extracción de ARN TRIzol™, gel de integridad para corroborar la pureza de las muestras de ARN, el tratamiento con RQ1 RNase-Free DNase (Promega) y un PCR convencional del exón 31 (gen de referencia kdr) para comprobar la ausencia de ADN contaminante. Por último define las etapas correspondientes a la estandarización de los primers y el qPCR: la síntesis de ADNc y el qPCR de los primers GSTE2F y GSTE2R.

## 5.2. Elaboración de protocolos operacionales estándar (POE)

Se desarrollaron protocolos operacionales estándar para los procedimientos de la evaluación de la resistencia a Temefos en larvas de *Aedes aegypti* asociada a la enzima metabólica glutatión-S-transferasa (GSTE2). Los procedimientos claves que constan el proceso general fueron: Preparación de solución de temefos, Bioensayo de resistencia de larvas de *Aedes aegypti*, Extracción de ARN de larvas de *Aedes aegypti* empleando TRIzol™, Preservación y almacenamiento de larvas para extracción de ARN, Gel de integridad y tratamiento de ARN con el kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega). El formato empleado para la redacción de los POE fue el que se utiliza en el laboratorio de Entomología Médica y Malaria del Centro de Estudios de Salud en la Universidad del Valle de Guatemala.

## 5.3. Bioensayos de susceptibilidad (WHO,2005)

### 5.3.1. Preparación de solución madre y dosis diagnóstica

Se pesaron 100 mg Temefos (al 97.7% de pureza CHEMSERVICE, lote 7143900, N-10996) y se disolvieron en 10 mL de etanol absoluto para obtener la solución madre con una concentración final de 10 000 ppm. Se agitó vigorosamente para disolver el larvicida en el solvente. Se transfirió 100 mL de etanol absoluto en otra botella, se le extrajo 12 µL y se descartó. Se tomaron 12 µL de la solución madre y se añadieron. Se mezcló vigorosamente para generar una solución de 1.2 ppm. Esta solución fue la solución utilizada para los bioensayos puesto que al momento de extraer 1 mL de esta se obtiene una concentración de 0.012 ppm, sea la dosis diagnóstica deseada. Se cubrió con papel aluminio ambas botellas de vidrio (la solución madre y solución de trabajo). Ambas fueron rotuladas debidamente con el nombre del insecticida, concentración, fecha de preparación, nombre de quien la preparó, lote, fecha de expiración y marca del larvicida. Ver el POE A, Preparación de solución madre de temefos, en Anexos.

### 5.3.2. Separación de larvas

Para la activación de la población se colocaron en agua del filtro Puramatic (ubicado en el cuarto M-106, del edificio M) los huevecillos, en su respectiva bandeja de eclosión. Esta bandeja de eclosión plástico fue suministrada con 1200 mL de agua del filtro y 2.4 g de comida de perro triturada (Pedigree). Después de la eclosión, se desarrollaron los individuos hasta llegar a un segundo estadio larvario aproximadamente, lo que equivale a casi dos días. Al tercer día, un día antes del bioensayo, se separaron las larvas de III estadio con una pipeta Pasteur plástica. Las larvas se dividieron en grupos de 150 en bandejas de plástico con un aproximado de 600 mL de agua del filtro y 0.8 g de

comida de perro triturada. Las larvas separadas se dejaron en condiciones de alrededor de 27°C ( $\pm 1$ ) y 70% ( $\pm 10$ ) de humedad relativa en el insectario hasta el momento de realizar el bioensayo con ciclos de luz 12 horas día/noche. El día del bioensayo, de entre el grupo de larvas, se seleccionaron aquellas con la apariencia entre tercer y cuarto estadio y luego se colocaron en recipientes plásticos, colocando 20 larvas por recipiente.

### 5.3.3. Realización de bioensayo

Las soluciones de trabajo preparadas con anterioridad, se sacaron de refrigeración y se colocaron a temperatura ambiente media hora antes de comenzar el ensayo. Los beakers previamente testeados con cepa de referencia New Orleans, fueron rotulados con el nombre de la localidad de cada población a evaluar. Se dispusieron en cada beaker 99 mL de agua del filtro Puramatic (ubicado en el cuarto M-106, del edificio M). Antes de trasvasar las larvas a los beakers, se descartaron las larvas que lucían más pequeñas que el promedio general, las que muestren señales de daño durante la manipulación y larvas moribundas. Se trasvasaron los lotes de 20 larvas de III estadio a cada beaker utilizando una pipeta Pasteur plástica con el menor volumen de agua posible. Al beaker control, se agregó 1mL de etanol absoluto. Se agitó suavemente con una varilla de vidrio asignada al beaker control. En el caso de los beakers para temefos, se agregó 1mL de temefos (Chemservice) para que quede a una dosis de 0.012ppm y se agitó la solución de cada beaker con una varilla de vidrio. Se aseguró de utilizar una varilla de vidrio para los beakers con el temefos, y otra para los beakers control. Se mantuvo el ensayo a 26-28 °C y en fotoperiodo de 12 horas de luz, seguido por 12 horas de oscuridad. A las 24 horas de exposición continua al insecticida se hizo la lectura del número de pupas así como las larvas vivas y muertas. Ver el POE B, Bioensayo de resistencia de larvas, en Anexos.

## 5.4. Preservación de ARN

Los individuos fueron clasificados como resistentes o susceptibles de acuerdo con el resultado del bioensayo con el larvicida Temefos. Las muestras se almacenaron en viales de 0.2 mL previamente llenados con 280  $\mu$ L de RNAlater (Thermo Fisher). Con ayuda de las pinzas entomológicas se tomaron las larvas individualmente y se sumergieron en etanol absoluto, dispuesto en una caja Petri, hasta que estas fueran totalmente impregnadas. Inmediatamente estas se secaron completamente por breves instantes en un papel absorbente y se procedió a colocarlas en los viales con RNAlater hasta el fondo. Se preservaron evitando que se formarán burbujas de aire para que se conservará lo más posible el ARN. Rotulados secuencialmente los viales, estos se colocaron durante la noche a 4°C y al día siguiente se colocaron a -20 °C para futuras extracciones de ARN y análisis moleculares de las muestras (Thermo Fisher Scientific, 2014). Ver el POE C, Preservación y almacenamiento de larvas, en Anexos .

## 5.5. Extracción de ARN

### 5.5.1. Proceso de extracción de ARN

La extracción de ARN total de larvas *Aedes aegypti* de la cepa de referencia Rockefeller, se realizó en pools de 10 larvas previamente preservadas en RNAlater, lo cual corresponde a un aproximado de 10 mg de tejido. Se procesaron tres muestras biológicas para cada cepa utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) adaptando la guía del fabricante. El ARN se cuantificó en el NanoDrop (Thermo Scientific) y se almacenó a -80°C para su posterior utilización. Ver el POE D, Extracción de ARN con Trizol, en Anexos .

### 5.5.2. Gel de integridad de ARN total

Con el fin de evaluar la integridad del ARN total extraído se corrió un gel de agarosa (1% p/v y 0.6µL de BrEt de solución) con cada muestra. Este gel se formó con 600 µL de cloro Magia Blanca en 30 mL de volumen final de agarosa. Se utilizaron alícuotas de 1µg de ARN con 1µL de buffer de carga. La electroforesis se llevó a cabo durante 35 minutos con 100 V. Ver el POE E, Gel de integridad, en Anexos .

### 5.5.3. Tratamiento de ARN total

La eliminación de ADN genómico contaminante en todas las muestras de ARN total de *Aedes aegypti* se realizó utilizando el kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega) con la siguiente modificación: se extendió el tiempo de incubación 37 °C a una hora y se adicionó RQ1 DNase Stop Solution. Para comprobar la eficiencia de la eliminación de ADN genómico, se efectuó un PCR convencional con los primers de referencia del exón 31 y la electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % con 0.02 mg/mL de bromuro de etidio. Ver el POE F, Tratamiento de ARN kit RQ1 RNase-Free DNase, en Anexos.

## 5.6. Síntesis de ADN complementario

Obtenido el ARN total sin contaminantes, de la muestra de larvas, se empleó el kit Promega GoScript™ Reverse Transcription System para la síntesis de ADN complementario (ADNc) de simple hebra. Se seleccionó entre los tres pool con mayores concentraciones, arriba de 250ng/ul, el pool con mayor concentración. El procedimiento consistió en convertir ARN total como primera hebra y sintetizar mediante PCR de transcriptasa reversa de dos pasos la hebra de ADNc. Este ADN complementario es el utilizado como plantilla para qPCR. No se hicieron modificaciones a las indicaciones del fabricante.

## 5.7. Curva de eficiencia de primers

Con el fin de calcular la eficiencia de primers se realizó una curva de eficiencia con seis puntos de la curva, cada punto con tres réplicas técnicas y dos controles negativos. Estos puntos de la curva corresponden a diluciones seriadas 1:10 de ADN complementario. Se efectuó el qPCR de estos cinco puntos según los primers evaluados registrando sus valores Ct y obteniendo imperativamente un coeficiente de determinación R<sup>2</sup> superior a 0.98 y la eficiencia se calcula utilizando la pendiente de la curva que debió encontrarse entre 90 y 110 %. Los primers evaluados están listados en Cuadro 5.1.

Cuadro 5.1: Primers de enzimas metabólicas analizados en este estudio

Gen	Nombre de primer	Secuencia
GSTE2	GSTE2F	5'-AAGATCTACGGCTGGCTGGA-3'
GSTE2	GSTE2R	5'-TCTGCGACAGGACAAACTGC-3'

(Helvecio *et al.*, 2020)

## 6.1. Redacción de POE

Se redactaron un total de seis POE detallando los pasos del procedimiento general para la evaluación de la expresión génica de la enzima metabólica glutatión-S-transferasa (GSTe2). Entre las etapas se describe la preparación de solución madre de Temefos para los bioensayos en larvas, la ejecución de los bioensayos de resistencia de larvas a Temefos, la preservación y almacenamiento de larvas para su extracción de ARN, La extracción de las larvas empleando Trizol, La elaboración de gel de integridad de ARN, Tratamiento de ARN con el kit RQ1 RNA-Free DNase.

Cuadro 6.1: Título de POE y ubicación

Título	Anexo	Páginas
Preparación de solución madre de Temefos	POE A	39 a 44
Bioensayo de resistencia de larvas de <i>Aedes aegypti</i> a Temefos	POE B	45 a 50
Preservación y almacenamiento de larvas para extracción de ARN	POE C	51 a 57
Extracción de ARN de larvas de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> con Trizol	POE D	58 a 64
Gel de integridad de ARN	POE E	65 a 69
Tratamiento de ARN kit RQ1 RNase-Free DNase	POE F	70 a 75

## 6.2. Extracción de ARN total

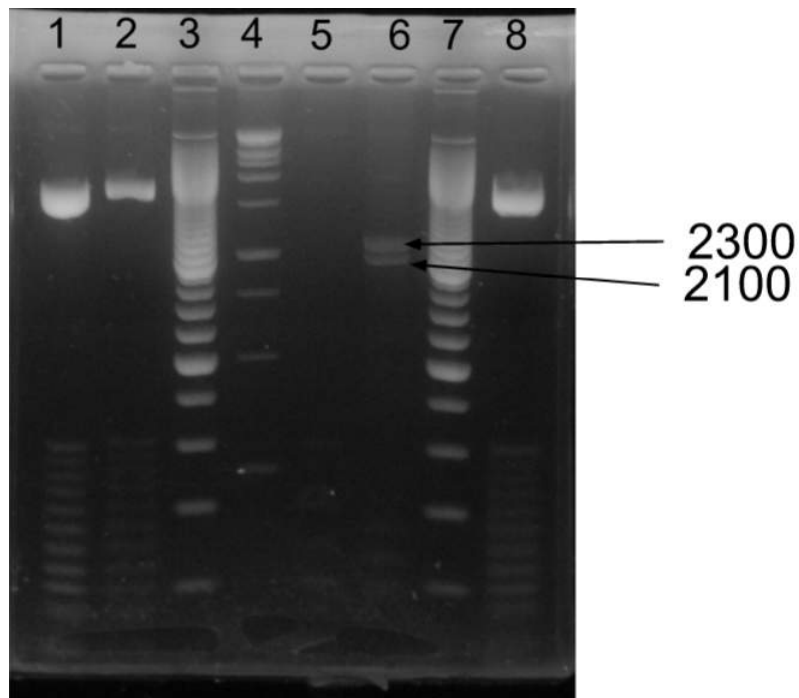
Se realizó la extracción de ARN total utilizando pools de 10 larvas de tercer estadio de la cepa Rockefeller. Se extrajeron 2 pools (RF.L3.1 Y RF.L3.2). Los datos de cuantificación de ARN se presentan en el Cuadro 2. Este cuadro presenta el ID número de identificación del pool, la concentración del ARN total [ng/ $\mu$ L], la razón de la absorbancia A260/280 y A260/230 obtenidos con el NanoDrop™ OneC (Thermofisher). Ambas muestras presentan una concentración superior a los 250 ng/ $\mu$ L, mínimo inferior requerido para la síntesis de ADNc. En cuanto a las absorbancias A260/280, la RF.L3.1 presenta una absorbancia ligeramente inferior a 2 y la RF.L3.2 es ligeramente superior a 2. El rango ideal de pureza para muestras de ARN total debe ser entre 2.0 y 2.20, rango al cual solamente la RF.L3.2 cumple estar. Una absorbancia inferior a este rango, en el caso de la RF.L3.1, permite inferir una contaminación de los reactivos de extracción como guanidina o fenol, componentes del TRIzol. Con respecto a la absorbancia A260/230 la primera muestra obtuvo un valor muy bajo de 0.26 y la segunda fue de 2.29.

Cuadro 6.2: Cuadro de cuantificación de larvas de ARN total de la cepa Rockefeller.

ID pool	[ng/ $\mu$ L]	A260/280	A260/230
RF.L3.1	292.3	1.97	0.26
RF.L3.2	300.4	2.11	2.29

## 6.3. Gel de integridad de ARN total

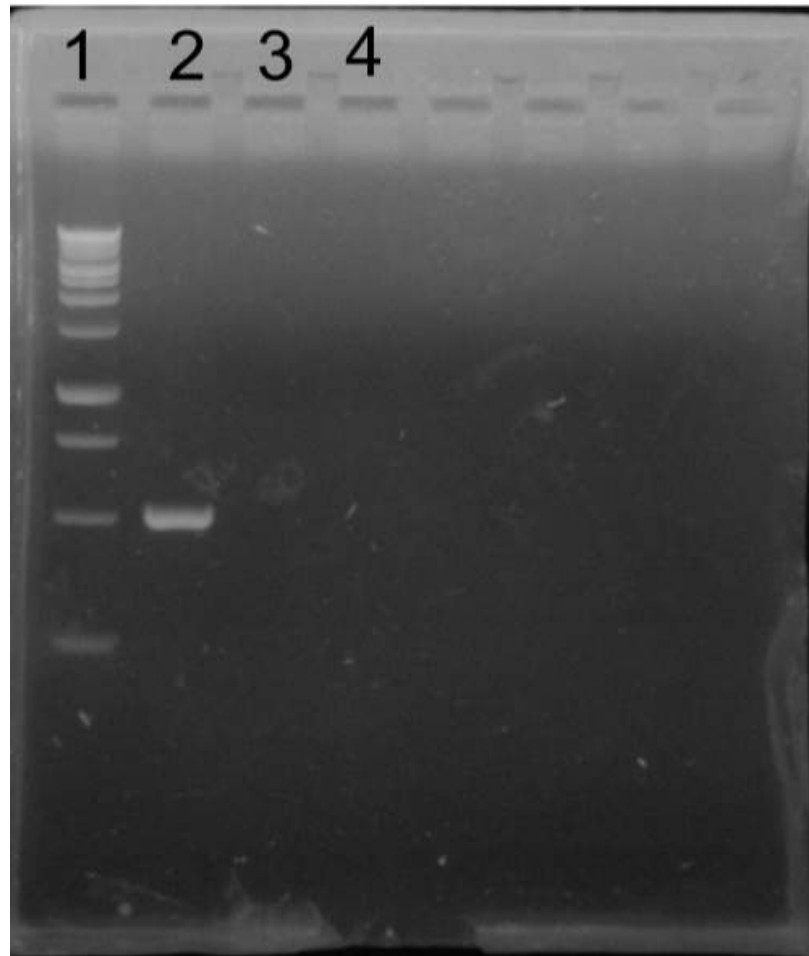
Figura 6.1: Gel de agarosa de integridad para verificación de pureza de ARN total con diferentes escaleras 1-Promega 25bp G452A; 2- 25pb en papel aluminio; 3- Promega 100bp G695A; 4- Promega 1kb DNA ladder; 5- Invitrogen E-Gel Ultra Low Ladder; 6- Muestra RF.L3.1; 7- Promega 100bp G695A; 8- 25pb en papel aluminio



El gel de agarosa de la *Figura 6.1* permitió evaluar la integridad del ARN total extraído. Este fue un gel de agarosa (1% p/v y 0.02 mg/mL de bromuro de etidio) con diferentes escaleras para evaluar en qué rango se encontraba la extracción de la muestra. La extracción de la muestra, en el pozo 6 presentó dos bandas. La banda superior de 2300 bp y otra inferior de 2100 bp. Estas bandas tienen una intensidad media, pero están bien definidas y existe una ausencia de bandas con menor peso molecular. Estos factores indican buena integridad del ARN al no haber sido degradado en bandas más pequeñas y la definición del tamaño de bandas. Estas bandas no corresponden a ningún otro tipo de ARN ribosomal por lo que es contaminación por ADN genómico.

#### 6.4. Gel de verificación de ADN contaminante

Figura 6.2: Gel de agarosa de comprobación de presencia de ADN contaminante mediante prueba PCR del exón 31 en muestras de ARN tratadas con tratamiento RQ1 1- *Escalera Promega 1kb DNA ladder* ; 2- *Control positivo (Muestra ZITA 231)*; 3- *Muestra RF.L3.1 con ARN tratado*; 4- *Muestra RF.L3.2 con ARN tratado*.



El gel de la *Figura 6.2* se efectuó para comprobar la ausencia de ADN genómico contaminante, de manera a que la pureza sea la adecuada para la síntesis ADNc. Esto se comprobó mediante un PCR del exón 31, gen de referencia. Cualquier rastro de ADN genómico se vería representado por la presencia de alguna banda, como es el caso para el control positivo que es una muestra de ADN extraída. Después del tratamiento de las muestras con el kit RQ1 RNase-Free DNase ninguna de

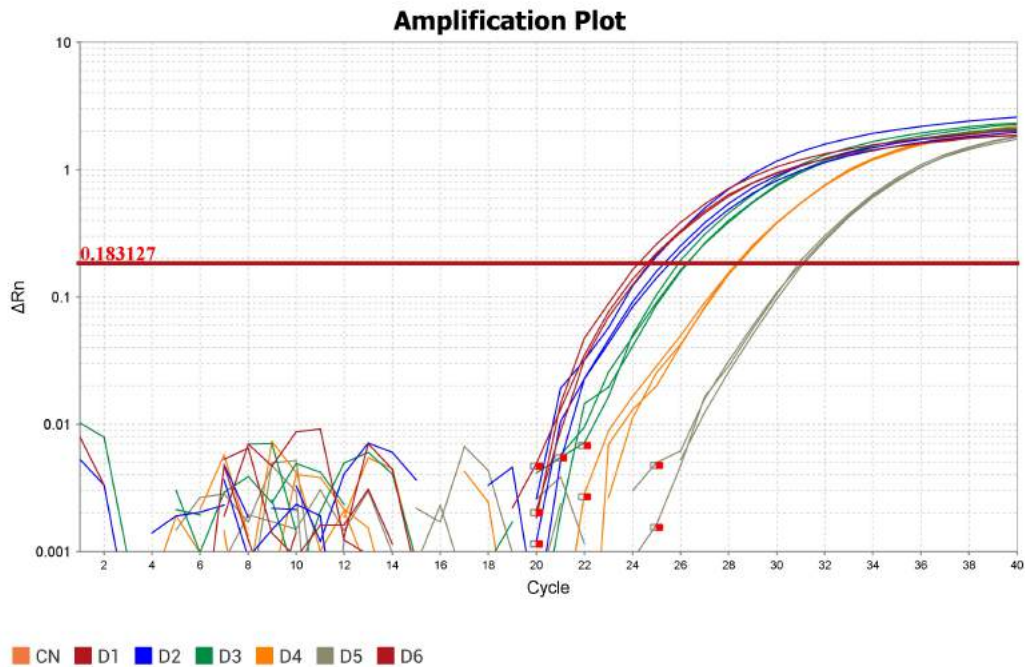
las muestras del pozo 3 (RF.L3.1) y del pozo 4 (RF.L3.2) presentaron alguna banda, indicando la ausencia de ADN contaminante en estas muestras.

## 6.5. Curvas de eficiencia de gen GSTe2 con qPCR

### 6.5.1. Curva de amplificación

Luego de sintetizar el ADN complementario de ambas muestras con kit Promega GoScript™ Reverse Transcription System se realizaron alícuotas de 5µL para la optimización de la curva de eficiencia. La curva de eficiencia se efectuó a partir de una alícuota con una concentración de [45.45 ng/µL]. La curva se construyó con 5 puntos distintos, 5 diluciones con una concentración de [10 ng/µL] (1:5), [5 ng/µL] (1:10), [2ng/µL](1:25), [0.4ng/µL] (1:125) y [0.08ng/µL] (1:625) utilizando SYBR® Green como marcador de fluorescencia.

Figura 6.3: Curva de amplificación de diluciones de RF.L3.2 con primers GSTE2F y GSTE2R usando SYBR® Green



La *Figura 6.3* presenta la curva de amplificación del gen objetivo GSTE2 con los primers GSTE2F y GSTE2R, utilizando las diluciones de la muestra L3\_2 representadas con distintos colores. Esta curva se construyó empleando tres réplicas por dilución y agua DEPC como control negativo. Las tres réplicas por dilución no presentaron diferencias significativas en cuanto al patrón de amplificación.

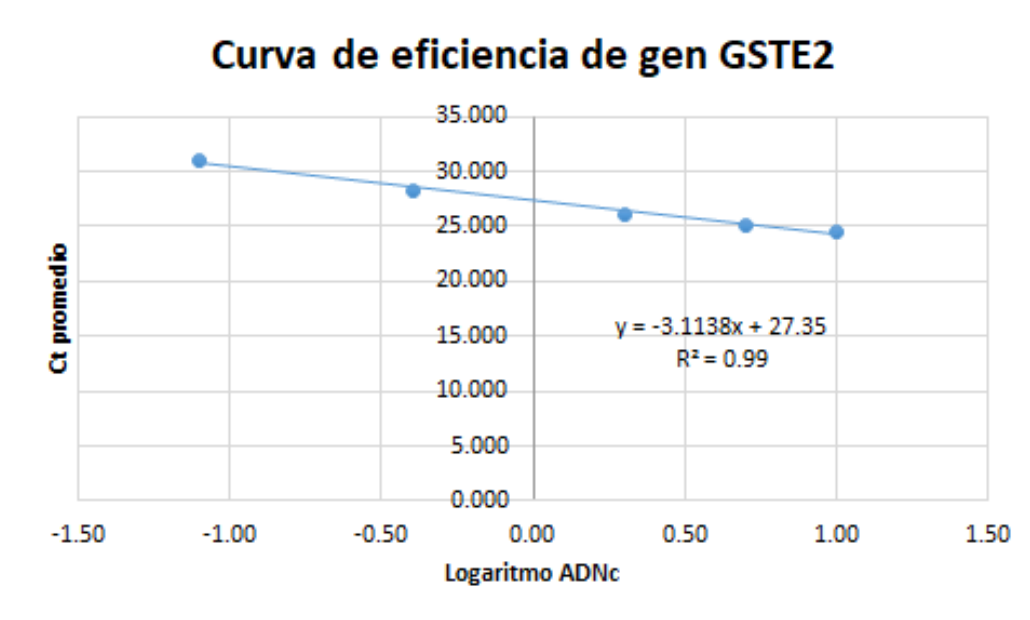
### 6.5.2. Valores Ct, media Ct y desviación estándar.

Cuadro 6.3: Valores de Ct de qPCR de gen GSTE2 con diluciones de RFL3.2

Dilución	Réplica	Ct	Media Ct	Desviación estándar
[10 ng/ $\mu$ L] (1:5)	1	24.231	24.497	0.235
	2	24.676		
	3	24.585		
[5 ng/ $\mu$ L] (1:10)	1	25.294	25.194	0.385
	2	24.768		
	3	25.519		
[2 ng/ $\mu$ L] (1:25)	1	26.239	26.125	0.201
	2	25.892		
	3	26.242		
[0.4 ng/ $\mu$ L] (1:125)	1	28.310	28.338	0.046
	2	28.392		
	3	28.313		
[0.08 ng/ $\mu$ L] (1:625)	1	31.021	31.026	0.101
	2	30.928		
	3	31.130		

El *Cuadro 6.3* muestra los valores de Ct de las tres réplicas de cada dilución con sus respectivas concentraciones. También el valor medio de Ct entre cada réplica y su desviación estándar. El valor que determina la calidad de la técnica de pipeteo es la desviación estándar. La desviación estándar menor a 1 indica una buena calidad de pipeteo, reflejado en la poca separación entre réplicas en la curva de amplificación. Esta baja desviación estándar, permite “normalizar” los datos y esto aumenta el índice de correlación  $R^2$ . Con respecto a la eficiencia de la curva, al “normalizar” la pendiente permite que la eficiencia sea de un valor adecuado entre 90 y 110.

Figura 6.4: Curva de eficiencia de gen GSTE2 con respecto a los logaritmos de las diluciones por sus promedios Ct obtenidos.



La *Figura 6.4* muestra la curva de eficiencia obtenida con los cinco puntos obtenidos de los logaritmos de las cinco diluciones que amplificaron. Se logra observar una pendiente con un -3.1138 como coeficiente y un coeficiente de correlación  $R^2$  de 0.99 indicando una correlación representativa entre las unidades de ambos ejes, lo que valida la curva de eficiencia.

Cuadro 6.4: Datos de optimización de la curva de eficiencia y eficiencia obtenida

<b>Factor de dilución</b>	5
<b>Concentración final de primers</b>	0.5 $\mu$ M
<b>Indicador</b>	SYBR® Green
<b>Pendiente</b>	-3.113793012
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9900
<b>Eficiencia (%)</b>	109.48

El *Cuadro 6.4* señala los datos de optimización que generaron la curva de eficiencia. Las condiciones principales con las que se llevó a cabo esta curva, empleando diluciones con un factor de dilución 5, una concentración de primers de 0.5 $\mu$ M y utilizando el SYBR® Green como indicador de fluorescencia. La pendiente, para una eficiencia de 100 % es de -3.32, sin embargo, se obtuvo una pendiente de -3.113 que es un valor muy cercano. El  $R^2$  de 0.99 refleja la buena linealidad de la curva siendo muy cercana al ideal 1. El porcentaje de eficiencia resultante fue de 109.48 %. Una buena reacción puede tener un porcentaje de eficiencia entre 90 % y 110 %, porcentaje que puede verse influenciado por las condiciones de la reacción entre la más destacable puede ser la presencia de inhibidores de PCR.

Esta investigación tuvo como objetivo principal, el desarrollo de un protocolo para la evaluación de la expresión de la enzima metabólica glutatión-S-transferasa (GSTe2) en larvas de *Aedes aegypti*. El principio de este protocolo fue estandarizar las diferentes etapas que conlleva el análisis de la enzima GSTe2. El primer paso consistió en estandarizar los bioensayos a la dosis diagnóstica de Temefos en las larvas, la preservación de ARN de los individuos que presenten resistencia, la extracción de ARN mediante un método optimizado con TRIzol, la estimación de presencia de ADN contaminante utilizando oligonucleótidos (“primers”) de referencia del gen *kdr* con un PCR convencional, el tratamiento de las muestras de ARN con el kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega), la confirmación de la ausencia de ADN contaminante, la síntesis de ADN complementario. El ADN complementario permitió estandarizar los primers (GSTE2F y GSTE2R) mediante una curva de eficiencia, para estandarizar las condiciones para el análisis de expresión génica en futuros estudios. Los resultados permitieron validar el protocolo para el análisis de la enzima metabólica GSTe2.

## 7.1. Importancia sobre estandarización de protocolos

Existe un aumento de datos sobre susceptibilidad a insecticidas en los mosquitos, mediante bioensayos estandarizados efectuados en laboratorio. Sin embargo, estos datos no informan sobre las diferentes estrategias de control adaptadas a las condiciones ambientales que promueven la resistencia fenotípica. Ciertamente los ensayos de resistencia son efectivos, para comparar y monitorear emergencia de resistencia a insecticidas tanto a nivel local como a nivel global. Estas comparaciones a través del espacio y el tiempo, no permiten dilucidar la eficacia de los productos de control a nivel de campo (Namias *et al.*, 2021). Por lo tanto, con el fin de asemejar lo más posible a la realidad los bioensayos y su consecuente susceptibilidad o resistencia, deben ser estandarizados en todas las ubicaciones y a través del tiempo. Esto implica que los bioensayos deben ser estandarizados a nivel local para determinar la estrategia de control más adaptada según la ubicación y su efectividad. En cuanto a apoyar en las decisiones con respecto al control de vectores, se deben siempre desarrollar y adaptar protocolos. Estos protocolos se deben adaptar en las condiciones ambientales locales, para determinar la eficacia o no de las herramientas de control. Estos protocolos para evaluar la resistencia permiten cada vez relacionar mejor los mecanismos de resistencia y la eficacia de las estrategias

a utilizar para el control (Namias *et al.*, 2021). Este estudio, el desarrollo de un protocolo, resulta de suma importancia puesto que permite estandarizar las condiciones para todo el proceso de evaluación y vincular un mecanismo de resistencia poco estudiado en Centro América.

## 7.2. Estandarización de bioensayos y sus implicaciones

Es importante para la estandarización de bioensayos, saber identificar los diferentes estadios larvarios. Como regla general se utilizan larvas de tercer estadio a cuarto estadio temprano. Primero la determinación en el estadio que se encuentran los individuos, resulta más complejo y conlleva un análisis morfométrico a detalle. La determinación del estadio actual requiere que un entomólogo experto la examine manualmente con un microscopio en el laboratorio para identificar las diferentes partes. Esto lleva mucho tiempo y llega a ser subjetivo y poco práctico. Se han propuesto otros enfoques más tecnológicos que utilizan tecnología de aprendizaje profundo y requiere una imagen digital del lugar de eclosión de la larva. Se fundamenta en segmentar la región de interés del cuerpo de la larva de la imagen del lugar de eclosión y se utiliza un modelo de conjunto, para clasificar el cuerpo de cada larva. Este modelo de conjunto se basa en la combinación de varios modelos débiles que al sumarse clasifican el estadio larvario (Hossain *et al.*, 2022).

Otro estudio propone el estudio de la morfología mediante microscopía electrónica de barrido. Los resultados demostraron que los cambios estructurales durante el desarrollo larvario son evidentes, principalmente en las partes bucales (por ejemplo en los cepillos bucales donde durante el desarrollo larvario del 1 al 4 instar, aumentan su número y se vuelven más complejos en los estadios finales). Una limitante importante es que durante los instares 3 y 4 las estructuras son similares solamente varía el número de elementos (Schaper y Hernández-Chavarria, 2006). La determinación de los estadios larvarios es de suma importancia para la realización de los bioensayos. No obstante es una tarea más compleja, puesto que requiere un estudio morfológico detallado. Este estudio morfológico, a pesar de acompañarse, facilitarse con nuevas tecnologías sigue resultando complejo. La complejidad de la clasificación radica más que todo en la subjetividad. El crecimiento larvario, al estar sujeto a múltiples condiciones entre la que destaca la disponibilidad de alimentos y la genética, resulta subjetivo al ojo del examinador. Aunque se trate de homogeneizar lo más posible las condiciones, en una misma bandeja de eclosión existen individuos en diferentes estadios larvarios. Es por esto que se recurre a nuevas tecnologías para determinar la clasificación, sin embargo llegar a un consenso común, un estándar de tamaños resulta difícil, más en los últimos estadios que son muy parecidos. Por lo anterior expuesto se fotografiaron los individuos a diferentes escalas, para tener más información sobre los estadios larvarios.

La clasificación a nivel larvario resulta determinante por el engrosamiento cuticular. El cambio entre estadios se traduce en dos mudas sucesivas en el ciclo de vida. Esta muda entre estadios es realmente un cambio en el exoesqueleto. Durante la formación del nuevo exoesqueleto, el cuerpo del insecto se hincha debido a la entrada de aire o agua hasta que el antiguo exoesqueleto se rompe. El exoesqueleto recién formado se endurece y en su superficie se depositan diferentes agentes curtientes (Singh Kaleka *et al.*, 2019). El exoesqueleto, la cutícula de las larvas sufre un engrosamiento que se ha visto asociado a resistencia a diferentes insecticidas. En comparación a la cepa susceptible, las cepas seleccionadas resistentes a deltametrina y acetamiprid presentaron un engrosamiento cuticular de casi el doble de lo normal. El engrosamiento en las larvas de *Aedes aegypti* funge como la primera línea de defensa, es una inhibición de penetración de los insecticidas. aunque se intuyen más mecanismos relacionados a la resistencia. Existe una relación innegable entre el engrosamiento cuticular de las larvas y la resistencia a insecticidas, aunque la resistencia sea un proceso multifactorial (Samal y Kumar, 2020).

Bioensayos efectuados para este protocolo (resultados no publicados por complicaciones con las muestras) sugieren que la cutícula de las larvas resultan ser un mecanismo de defensa vital ante el Temefos. La tasa de mortalidad era completa al exponer individuos en estadios más inmaduros,

posiblemente de segundo estadio, en comparación a individuos más maduros que sí presentaban resistencia. Esta tendencia de muerte completa en individuos poco desarrollados, se observó en 5 bioensayos con 100 individuos cada uno, de la población Enrique Smith de Nicaragua. Cabe añadir que individuos aún siendo expuestos al organofosforado seguían desarrollándose e incluso puparon, posiblemente brindando más protección ante el insecticida. Estas larvas que se desarrollaron en pupas, resultando ser resistentes al Temefos se observaron en 5 bioensayos con 100 individuos, de la población Enrique Smith de Nicaragua.

El engrosamiento cuticular, es igual de importante para la clasificación de los estadios larvarios, al momento de efectuar bioensayos, puesto que se deben elegir las larvas justo en el momento preciso para validar la calidad de los bioensayos y se sugiere hacer estudios que relacionen específicamente el engrosamiento cuticular con la resistencia a organofosforado y acentuar la importancia entre los estadios larvarios. Un estudio en larvas con el inhibidor de síntesis de quitina (componente principal de la cutícula de los insectos) nombrado Novaluron expone la importancia del desarrollo cuticular como defensa ante insecticidas durante los diferentes estadios larvarios. El monitoreo del desarrollo cuticular se efectuó midiendo el contenido de quitina durante el tercer y cuarto estadio, empleando marcadores de fluorescencia hematxilina, eosina y WGA-FITC. Los resultados principales demostraron que existe un incremento gradual en el contenido de quitina entre el tercer y cuarto estadio en los individuos control y aquellos expuestos al Novaluron perecieron antes de llegar a cuarto estadio, disminuyendo la emergencia de adultos. Novaluron está listado como uno de los compuestos recomendados por la OMS para el uso de agua contra el vector *Aedes aegypti*. Se deben visualizar más herramientas de control del vector en sus estadios inmaduros enfocadas en los procesos de muda y la estructura de sus exoesqueletos (Farnesi *et al.*, 2012).

De manera a estandarizar la evaluación de la resistencia a la enzima GSTE2, además de estandarizar el bioensayo se debe prever estandarizar bioensayos sinergistas para las larvas, de manera a identificar si la resistencia es de origen metabólico y descartar la intervención de cualquier otra enzima metabólica en la resistencia de la población estudiada. Los sinergistas son compuestos que inhiben o reducen la actividad de las enzimas desintoxicantes como las CYP450, Esterasas y las glutatión-S-transferasas. Los bioensayos sinergistas son un método de investigar los roles de las diferentes enzimas de metabolización. Las glutatión-S-transferasas parecen contribuir al alto nivel de resistencia a DDT por lo que resulta importante estipular futuras investigaciones utilizando el sinergista de estas enzimas llamado malonato de dietilo (DEM) (Chouaïbou *et al.*, 2014). Bioensayos sinergistas en larvas se efectúan con otros insecticidas para comprobar resistencia cruzada. Un estudio al presentar larvas de *Aedes aegypti* de Tailandia a una concentración de 1 ppm de DEM y Temefos, este inhibidor no tuvo un efecto significativo sin embargo debe seguir en investigación la implicación de las enzimas glutatión-S-transferasas gracias a este sinergista (Poupardin *et al.*, 2014). El principal sinergista utilizado en los bioensayos para las glutatión-S-transferasas es el DEM. Se han sintetizado, y descubierto una cantidad notable de inhibidores de GSTs. Los principales ejemplos de inhibidores investigados son: ácido etacrínico (EA), etacraplatino, 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio)hexanol (NBDHEX), auranofina y Piperlongumina (PL) (Allocati *et al.*, 2018).

### 7.3. Extracción de ARN total con TRIzol

La extracción de ARN total de las larvas fue efectuada utilizando el reactivo TRIzol™. El cuadro 3 presenta los valores obtenidos de los pools de 10 individuos de la cepa de Rockefeller extraídos después de la optimización con este método. Se optó por utilizar este reactivo, puesto que las larvas tienen un alto contenido de grasa (Silva *et al.*, 2020). El contenido de grasa es un factor importante del desarrollo del mosquito. El almacenaje de proteínas, principalmente hexamerinas, se intensifica en las fases finales del estado larvario (Totten *et al.*, 2012). Este alto contenido de grasas presenta la dificultad en la extracción de ARN también con otros métodos. Existen tres técnicas de extracción de ARN más comunes: extracción orgánica (TRIzol™), tecnología basada en columnas de rotación

con membranas de sílica y tecnología con partículas paramagnéticas. Existen diferentes kits de extracción basado en columnas: AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep (Axygen®), RNeasy® Mini (QIAGEN), EasySpin RNA extraction kit (Boca Scientific Inc), Illustra™ RNAspin Mini RNA Isolation (GE) o SV Total RNA Isolation System (Promega) (Tavares *et al.*, 2011).

En comparación con otros métodos el TRIzol™ tiene un alto rendimiento de ARN extraído al ser un reactivo orgánico permite separar en fases, lo que resulta beneficioso para este tipo de muestra. También en comparación con métodos de columna como el kit SV Total RNA Isolation System (Promega), usualmente utilizado en el laboratorio, el TRIzol™ permite obtener una calidad de ARN buena. El principal inconveniente del método por TRIzol™ es su composición, puesto que presenta las mayores cantidades de ADN genómico contaminante, lo que dificulta los estudio de expresión génica al presentar una sobreestimación en la cantidad de transcritos, así como falsos positivos en el momento durante el qPCR (Schagat *et al.*, 2008). De manera a eliminar el ADN genómico es necesario efectuar un tratamiento con DNasas. Este tratamiento de remoción de ADN contaminante consiste en exponer la muestra de ARN a una digestión con DNasas. Esta digestión reside en añadir sales y proteínas para degradar el ADN. Luego un paso más de purificación al inactivar los componentes exponiendo la mezcla al calor, para no afectar la síntesis de ADNc y el qPCR (Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa, 2008).

El TRIzol™ es una solución monofásica que contiene guanidina isotiocianatos y fenol, que solubiliza el material biológico y desnaturaliza las proteínas simultáneamente. Al agregar cloroformo se forman las fases de separación en las que el ARN se queda en la fase acuosa. (Rio *et al.*, 2010) El exceso de guanidina, repercute directamente en la calidad del ARN. La calidad del ARN es determinante para los estudios de expresión génica por lo que cualquier error o contaminación con la extracción de cualquier remanente de las otras fases resulta perjudicial para el análisis. Es necesario la implementación de tratamiento por DNasas para reducir la contaminación de ADN génico o en caso el pipeteo involuntario de cualquier remanente de la fase de ADN, cuya separación no es tan visible. Este tratamiento por DNasas aumenta inevitablemente los costos y limita el análisis a un grupo más pequeño de muestras. Para este estudio se utilizó como tratamiento de DNasas el RQ1 RNase-Free DNase de Promega. Este tratamiento con DNasas utiliza la endonucleasa DNase I que degrada ADN de hebra simple o de doble hebra para producir oligonucleótidos 3'-hidroxilo. Para finalizar la digestión se agregó el reactivo DNase Stop Solution (sales) según el procedimiento. En este caso se le añadió un paso de inactivación de la enzima al exponer la mezcla al calor por 10 minutos a 65 °C para asegurar la inactivación completa de la digestión, evitando así cualquier degradación del ARN. El kit tiene un costo de alrededor 100 dólares para un número de reacciones limitado, dependiendo del volumen de muestra obtenido (Promega, 2018).

Otro factor importante a considerar es que el fenol y cloroformo son reactivos altamente tóxicos, por lo que requieren de un desecho especializado. Considerando estos factores negativos sería oportuno considerar una alternativa como el kit SV Total RNA Isolation System (Promega), más seguro a nivel de reactivos y con menores pasos (TESENA *et al.*, 2017). En términos generales el método de extracción de ARN con TRIzol™ y su tratamiento posterior, resultó efectivo para optimizar la evaluación de la enzima GSTE2, al permitir un alto rendimiento de ARN y una calidad buena, como muestra la figura 6.2 en la que se comprobó la ausencia de ADN contaminante. Sin embargo este método, que necesita de un tratamiento para eliminar el ADN genómico, utiliza reactivos tóxicos, promueve optar por una alternativa más segura y menos costosa. La opción predilecta es optimizar la extracción de ARN con el kit SV Total RNA Isolation System (Promega). La principal dificultad para este método es el contenido graso que atasca la membrana, por lo que una solución sería añadir un paso de centrifugación a una baja temperatura y al inicio como el método de TRIzol™

## 7.4. Curva de eficiencia y optimización

Parte de la implementación de un ensayo de PCR en tiempo real ideal implica la optimización para garantizar que todos los parámetros de la reacción se ajusten con precisión para obtener resultados exactos. Esto podría implicar el ajuste de las concentraciones de primers, las temperaturas y los tiempos de termociclado y, a continuación, la confirmación de los parámetros mediante una evaluación de la curva estándar. Más allá del diseño de primers, es primordial eliminar el ADN para evitar amplificaciones en la reacción de qPCR. El tratamiento de DNasa de la muestra es un método necesario, de manera a controlar desde la fuente, la muestra a examinar. La eficiencia ideal para una curva de eficiencia debe estar dentro del rango de 90 % y 110 %, si la eficiencia supera este rango o es inferior, indica una inhibición del PCR (Life technologies,2012) En este protocolo se obtuvo una eficiencia de 109 % lo cual es un valor muy cercano al valor superior, lo que indica una inhibición en cierta medida, sin embargo se encuentra dentro del rango. Esta inhibición generalmente se debe a la calidad del ADNc, mas este demostró ser de alta calidad y libre de ADN contaminante por el tratamiento con la enzima, lo que descarta este factor.

Otro factor a descartar es la nula amplificación del control negativo, que comprueba que no hubo contaminación durante la ejecución y las bajas desviaciones estándar confirman que la manipulación fue efectiva. Resulta complejo y costoso cambiar las condiciones de la reacción con el fin de obtener una eficiencia del 100 % , entre las condiciones están las concentraciones de los reactivos. El único factor que permitiría mejorar la eficiencia al 100 % sería cambiar las condiciones de la reacción, como puede ser aumentar la concentración de los primers del 0.5  $\mu$ M, disminuir la cantidad de SYBR® green o incluso la cantidad de agua DEPC. No obstante la curva cumple con los criterios para evaluar el gen, demostrado por su eficiencia dentro del rango y su  $R^2$  de 0.99.

### 8.1. General

- El protocolo para la evaluación de la expresión de la enzima metabólica glutatión-S-transferasa (GSTE2) en larvas de *Aedes aegypti* fue desarrollado y estandarizado exitosamente en todas sus etapas.

### 8.2. Específicos

- La extracción de ARN para larvas de *Aedes aegypti* con el reactivo TRIzol™ (Invitrogen) fue exitosa resultando en ARN de alta calidad y purificado posteriormente.
- La curva de eficiencia de los primers GSTE2F y GSTE2R fue estandarizada con una concentración de 0.5  $\mu$ M dando como resultado una eficiencia de 109.48 % y un  $R^2$  de 0.99.
- Se redactaron los Procedimientos Operacionales Estándar (POE) de las diferentes etapas de la evaluación de la expresión de la enzima metabólica glutatión-S-transferasa (GSTE2) en larvas de *Aedes aegypti* por medio de PCR en tiempo real.

### 9.1. Importancia sobre estandarización de protocolos

- Con el fin de asemejar lo más posible a la realidad los bioensayos y su consecuente susceptibilidad o resistencia, deben ser estandarizados a nivel local y a través del tiempo.

### 9.2. Estandarización de bioensayos y sus implicaciones

- En cuanto a los bioensayos resulta primordial establecer una métrica estándar sobre los estadios larvarios, esto acompañado de nuevas tecnologías que faciliten un estudio de morfología más efectivo.
- Las condiciones climáticas del insectario no son reguladas, lo que influye estrictamente en los resultados. Resulta necesario el monitoreo y regulación rigurosa de las condiciones climáticas de manera a validar los datos con las condiciones ambientales de campo.
- Otro mecanismo de resistencia a analizar en futuros estudios es el engrosamiento cuticular en las larvas con diferentes insecticidas, entre los cuales es prioridad los organofosforados.
- Resulta necesario complementar los estudios de resistencia al temefos al efectuar bioensayos sinergistas y comprobar resistencia cruzada con diferentes insecticidas. Se ha comprobado la contribución de las glutatión-S-transferasas con el alto nivel de resistencia a DDT y con diversos sinergistas entre destaca el malonato de dietilo (DEM), ácido etacrínico (EA), etacraplatino, 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio)hexanol (NBDHEX), auranofina y piperlongumina (PL).

### 9.3. Extracción de ARN total con TRIzol

- Es importante evitar cualquier contaminación durante la extracción de ARN total con TRIzol en larvas y procurar hacer los lavados correspondientes con etanol. Para eliminar cualquier tipo de contaminación es necesario la implementación de tratamiento por DNasas para reducir la contaminación de ADN génico y evitar cualquier pipeteo involuntario de cualquier remanente de la fase de ADN, cuya separación no es tan visible

- A pesar de resultar efectiva la extracción de ARN total con TRIzol en larvas, debido a que implica reactivos tóxicos y un tratamiento consecuente para ADN genómico, se debe visualizar optimizar el método de extracción con métodos alternativos como pueden ser las columnas.

## 9.4. Curva de eficiencia y optimización

- La optimización permite garantizar que todos los parámetros de la reacción se ajusten con precisión para obtener resultados exactos. Los parámetros implican el ajuste de las concentraciones de primers, las temperaturas y los tiempos de termociclado y, a continuación, la confirmación de los parámetros mediante una evaluación de la curva estándar.
- Es primordial eliminar el ADN para evitar amplificaciones en la reacción de qPCR. El tratamiento de DNasa de la muestra es un método necesario, de manera a controlar desde la fuente, la muestra a examinar.
- En este protocolo se obtuvo una eficiencia de 109 % lo cual es un valor muy cercano al valor superior 110 %, lo que indica una inhibición en cierta medida, sin embargo se encuentra dentro del rango. Esta inhibición generalmente se debe a la calidad del ADNc, por lo que se debe procurar la buena síntesis de ADNc libre de ADN contaminante.

## Bibliografía

- 
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., & Federici, L. (2018). Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>
  - Bar, A., & Andrew, J. (2013). Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Larvae. *Annual Research & Review in Biology*, 3(1), 1-21.
  - Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., Wint, G. R. W., Simmons, C. P., Scott, T. W., Farrar, J., & Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
  - Bisset-Lazcano, J., Rodríguez, M., San Martín, J., Romero, J., & Montoya, R. (2009). Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Revista Panamericana De Salud Pública*, 26(3), 229–234.
  - Benitez-Trinidad, A. B., Herrera-Moreno, J. F., Vázquez-Estrada, G., Verdín-Betancourt, F. A., Sordo, M., Ostrosky-Wegman, P., Bernal-Hernández, Y. Y., Medina-Díaz, I. M., Barrón-Vivanco, B. S., Robledo-Marengo, M. L., Salazar, A. M., & Rojas-García, A. E. (2015). Cytostatic and genotoxic effect of Temephos in human lymphocytes and hepg2 cells. *Toxicology in Vitro*, 29(4), 779–786. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.008>
  - Corbel, V., Fonseca, D. M., Weetman, D., Pinto, J., Achee, N. L., Chandre, F., Coulibaly, M. B., Dufour, I., Grieco, J., Juntarajumnong, W., Lenhart, A., Martins, A. J., Moyes, C., Ng, L. C., Raghavendra, K., Vatandoost, H., Vontas, J., Muller, P., Kasai, S., . . . David, J.-P. (2017). International Workshop on insecticide resistance in vectors of arboviruses, December 2016, Rio de Janeiro, Brazil. *Parasites & Vectors*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2224-3>
  - Chareonviriyaphap, T., Akrotanakul, P., Nettanomsak, S., & Huntamai, S. (2003). Larval habitats and distribution patterns of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse), in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 34(3), 529–535. DOI: 10.1038/s41389-017-0025-3

- Chaturvedi, U., Agarwal, R., Elbishbishi, E., & Mustafa, A. (2000). Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 28(3), 183-188. doi: 10.1111/j.1574-695x.2000.tb01474.x
- CHEBI (2016). *temephos* (CHEBI:38954). <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:38954>
- Chouaïbou, M., Zivanovic, G. B., Knox, T. B., Jamet, H. P., & Bonfoh, B. (2014). Synergist bioassays: A simple method for initial metabolic resistance investigation of field *Anopheles gambiae* s.l. populations. *Acta Tropica*, 130, 108–111. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.10.020>.
- Enayati, A. A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14(1), 3–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x>
- Farnesi, L., Brito, J., Linss, J., Pelajo-Machado, M., Valle, D., & Rezende, G. (2012). Physiological and Morphological Aspects of *Aedes aegypti* Developing Larvae: Effects of the Chitin Synthesis Inhibitor Novaluron. *PLOS ONE*, 7(1), e30363. doi: 10.1371/journal.pone.0030363
- Faucon, F., Dusfour, I., Gaude, T., Navratil, V., Boyer, F., Chandre, F., Sirisopa, P., Thanispong, K., Juntarajumnong, W., Poupardin, R., Chareonviriyaphap, T., Girod, R., Corbel, V., Reynaud, S., & David, J.-P. (2015). Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. *Genome Research*, 25(9), 1347–1359. <https://doi.org/10.1101/gr.189225.115>
- Fournier, D. (2005). Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chemico-Biological Interactions*, 157-158, 257–261. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.040>
- García, I., Camargo, M., Elías, M., & Elias, C. (1993). CICLO EVOLUTIVO DE *Aedes* (STEGOMYIA) *AEGYPTI* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA, *CULICIDAE*). *Revista De Patología Tropical*, 22(1). doi: [doi.org/10.5216/rpt.v22i1.20069](https://doi.org/10.5216/rpt.v22i1.20069)
- Geris, R., Ribeiro, P., Da Silva Brandão, M., Da Silva, H., & Da Silva, I. (2012). Bioactive Natural Products as Potential Candidates to Control *Aedes aegypti*, the Vector of Dengue. *Studies In Natural Products Chemistry*, 37, 277-376. doi: 10.1016/b978-0-444-59514-0.00010-9
- Grant, D., Dietze, E., & Hammock, B. (1991). Glutathione S-transferases isoenzymes in: purification, characterisation and isoenzyme-specific regulation. *Insect Biochemistry*, 21(4), 421–433. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(91\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0020-1790(91)90009-4)
- Grisales, N., Poupardin, R., Gomez, S., Fonseca-Gonzalez, I., Ranson, H., & Lenhart, A. (2013). Temephos Resistance in *Aedes aegypti* in Colombia Compromises Dengue Vector Control. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 7(9), e2438. doi: 10.1371/journal.pntd.0002438
- Go, Y., Balasuriya, U., & Lee, C. (2014). Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical And Experimental Vaccine Research*, 3(1), 58. doi: 10.7774/cevr.2014.3.1.58
- Gottshall, S., Tekin, S., & Hansen, P. (2008). Extraction and Purification of Total RNA using Trizol or Tri Reagent. *University Of Florida*.
- Halsey, E., Marks, M., Gotuzzo, E., Fiestas, V., Suarez, L., & Vargas, J. et al. (2012). Correlation of Serotype-Specific Dengue Virus Infection with Clinical Manifestations. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6(5), e1638. doi: 10.1371/journal.pntd.0001638
- Halstead, S. (1988). Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. *Science*, 239 (4839), 476-481. doi:10.1126/science.3277268

- Helvecio, E., Romão, T. P., de Carvalho-Leandro, D., de Oliveira, I. F., Cavalcanti, A. E., Reimer, L., de Paiva Cavalcanti, M., de Oliveira, A. P., Paiva, P. M., Napoleão, T. H., Wallau, G. L., de Melo Neto, O. P., Melo-Santos, M. A., & Ayres, C. F. (2020). Polymorphisms in GSTE2 is associated with Temephos resistance in *Aedes aegypti* aegypti. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *165*, 104464. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.10.002>
- Hollingworth, R. M., Dong, K., Whalon, M. E., & Mota-Sánchez, D. (2008). The biochemical and molecular genetic basis of resistance to pesticides in arthropods. *CABI eBooks* (pp. 40–89). <https://doi.org/10.1079/9781845933531.0040>
- Hossain, M. S., Raihan, M. E., Hossain, M. S., Syeed, M. M., Rashid, H., & Reza, M. S. (2022). *Aedes aegypti* larva detection using ensemble learning to prevent dengue endemic. *BioMedInformatics*, *2*(3), 405–423. <https://doi.org/10.3390/biomedinformatics2030026>
- Invitrogen.(2016). TRIzol™ Reagent User Guide. *ThermoFisher Scientific*
- Jokanović, M. (2015). Biotransformation of warfare nerve agents. In *Elsevier eBooks* (pp. 883–894). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800159-2.00059-2>
- Kamgang, B., Marcombe, S., Chandre, F., Nchoutpouen, E., Nwane, P., Etang, J., Corbel, V., & Paupy, C. (2011). Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasites & Vectors*, *4*(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-79>
- Ketterman, A. J., Saisawang, C., & Wongsantichon, J. (2011). Insect glutathione transferases. *Drug Metabolism Reviews*, *43*(2), 253–265. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.552911>
- Kraemer, M., Sinka, M., Duda, K., Mylne, A., Shearer, F., & Barker, C. *et al.* (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*, *4*. doi: 10.7554/elife.08347
- Kraemer, M., Reiner, R., Brady, O., Messina, J., Gilbert, M., & Pigott, D. *et al.* (2019). Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nature Microbiology*, *4*(5), 854–863. doi: 10.1038/s41564-019-0376-y
- Kushwah, R. B. S., Mallick, P. K., Ravikumar, H., Dev, V., Kapoor, N., Adak, T., & Singh, O. P. (2015). Status of DDT and pyrethroid resistance in Indian *Aedes albopictus* and absence of knockdown resistance (kdr) mutation. *DOAJ (DOAJ:Directory of Open Access Journals)*, *52*(1), 95–98. <https://doaj.org/article/aa1311c5e95744169a848acdab5c262c>
- Life technologies. (2012). *Real-Time PCR Handbook*. Life technologies
- Liu, H., Liu, L., Cheng, P., Yang, L., Chen, J., Lu, Y., Wang, H., Chen, X.-G., & Gong, M. (2020). Bionomics and insecticide resistance of *Aedes albopictus* in Shandong, a high latitude and high-risk dengue transmission area in China. *Parasites & Vectors*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3880-2>
- Lushchak, V. I., Matviishyn, T. M., Husak, V. V., Storey, J. M., & Storey, K. B. (2018). Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *PubMed*, *17*, 1101–1136. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1710>
- Lu, F., Fu, K., Li, Q., Guo, W., Ahmat, T., & Li, G. (2014). Identification of carboxylesterase genes and their expression profiles in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* treated with fipronil and cyhalothrin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *122*, 86–95. <https://doi.org/doi:10.1016/j.pestbp.2014.12.015>
- Lumjuan, N., Stevenson, B. J., Prapanthadara, L.-aied, Somboon, P., Brophy, P. M., Loftus, B. J., Severson, D. W., & Ranson, H. (2007). The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *37*(10), 1026–1035. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.05.018>

- Lumjuan, N., Rajatileka, S., Changsom, D., Wicheer, J., Leelapat, P., Prapanthadara, L.-aied, Somboon, P., Lycett, G., & Ranson, H. (2011). The role of the *Aedes aegypti* epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *41*(3), 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.12.005>
- Marcombe, S., Poupardin, R., Darriet, F., Reynaud, S., Bonnet, J., Strode, C., Brengues, C., Yébakima, A., Ranson, H., Corbel, V., & David, J. (2009). Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-494>
- Marsillach, J., Costa, L. G., & Furlong, C. E. (2013). Protein adducts as biomarkers of exposure to organophosphorus compounds. *Toxicology*, *307*, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.12.007>
- MSPAS. (2021). *Situación Epidemiológica de las Arbovirosis en Guatemala*. Descargado de: <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/2021/salas-situacionales/arbovirosis/ARB-SE-13-2021.pdf>
- Namias, A., Jobe, N. B., Paaijmans, K. P., & Huijben, S. (2021). The need for practical insecticide-resistance guidelines to effectively inform mosquito-borne disease control programs. *eLife*, *10*. <https://doi.org/10.7554/elife.65655>
- Ocampo, C. B., Salazar-Terreros, M. J., Mina, N. J., McAllister, J., & Brogdon, W. G. (2011). Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Tropica*, *118*(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.01.007>
- OMS (2011). *Comprehensive Guideline for Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever*. New Delhi, India: SEARSO.
- Pavlidi, N., Vontas, J., & Van Leeuwen, T. (2018). The role of glutathione S-transferases (gsts) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. *Current Opinion in Insect Science*, *27*, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.007>
- Promega (2014). *Promega SV Total RNA Isolation System Technical Manual TM048 Z3100*. Promega.
- Polson, K., Rawlins, S. C., Brogdon, W. G., & Chadee, D. D. (2010). Organophosphate Resistance in Trinidad and Tobago Strains of *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *26*(4), 403–410. <https://doi.org/10.2987/10-6019.1>
- Ranson, H., Burhani, J., Lumjuan, N., & Black, W. (2010). Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA*, *1*(1).
- Rao, R. K. (2020). Lethal efficacy of phytochemicals formulations derived from the leaf extracts of Indian medicinal plants control Dengue and Zika vector. *International Research Journal of Environmental Sciences*, *9*(2), 1–9.
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (tri reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, *2010*(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>
- Saavedra-Rodriguez, K., Strode, C., Flores, A., Garcia-Luna, S., Reyes-Solis, G., & Ranson, H. *et al.* (2013). Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes after temephos selection. *Insect Molecular Biology*, *23*(2), 199–215. doi: 10.1111/imb.12073
- Samal, R. R., & Kumar, S. (2020). Cuticular thickening associated with insecticide resistance in dengue vector, *Aedes aegypti* L. *International Journal of Tropical Insect Science*, *41*(1), 809–820. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00271-z>

- Schaper, S., & Hernández-Chavarria, F. (2006). Scanning electron microscopy of the four larval instars of the Dengue fever vector *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). *Revista de Biología Tropical*, 54(3).
- Schluep, S. M., & Buckner, E. A. (2021). Metabolic resistance in permethrin-resistant Florida *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). *Insects*, 12(10), 866. <https://doi.org/10.3390/insects12100866>
- Seccacini, E. A., Lucía, A., Zerba, E., Licastro, S. M., & Masuh, H. M. (2008). *Aedes aegypti* Resistance to Temephos in Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 24(4), 608–609. <https://doi.org/10.2987/5738.1>
- Kaleka, A. S., Kaur, N., & Bali, G. K. (2019). Larval development and molting. *In IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85530>
- Silvério, M., Espindola, L., Lopes, N., & Vieira, P. (2020). Plant Natural Products for the Control of *Aedes aegypti*: The Main Vector of Important Arboviruses. *Molecules*, 25(15), 3484. doi: 10.3390/molecules25153484
- Soderlund, D. M., Bloomquist, J. R., Wong, F., Payne, L. L., & Knipple, D. C. (1989). Molecular neurobiology: Implications for insecticide action and resistance. *Pesticide Science*, 26(4), 359–374. <https://doi.org/10.1002/ps.2780260404>
- Sztankay-Gulyás, M. (1972). Mosquito control with integrated method. *Wiadomosci Parazytologiczne*, 18, 629–633. <https://doi.org/PMID: 4122220>
- Tesena, P., Korchunjit, W., Taylor, J., & Wongtawan, T. (2017). Comparison of commercial RNA extraction kits and qPCR master mixes for studying gene expression in small biopsy tissue samples from the equine gastric epithelium. *Journal of Equine Science*, 28(4), 135–141. <https://doi.org/10.1294/jes.28.135>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2014) *RNAlater® Tissue Collection: RNA Stabilization Solution User Guide*. Thermo Fisher Scientific Inc
- Torres, J., Orduna, T., Piña-Pozas, M., Vázquez-Vega, D., & Sarti, E. (2017). Epidemiological Characteristics of Dengue Disease in Latin America and in the Caribbean: A Systematic Review of the Literature. *Journal Of Tropical Medicine*, 2017, 1-18. doi: 10.1155/2017/8045435
- Totten, D. C., Vuong, M., Litvinova, O. V., Jinwal, U. K., Gulia-Nuss, M., Harrell, R. A., & Beneš, H. (2012). Targeting gene expression to the female larval fat body of transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Molecular Biology*, 22(1), 18–30. <https://doi.org/10.1111/imb.12005>
- Valle, D., Pimenta, D. N., & Cunha, R. V. (2015). *Dengue: Teorias e práticas*. FIOCRUZ. <https://doi.org/10.7476/9788575415528>
- Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A., Watowich, S., Gubler, D., & Weaver, S. (2000). Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. *Journal Of Virology*, 74(7), 3227-3234. doi: 10.1128/jvi.74.7.3227-3234.2000
- Wang, W., Urbina, A., Chang, M., Assavalapsakul, W., Lu, P., Chen, Y., & Wang, S. (2020). Dengue hemorrhagic fever – A systemic literature review of current perspectives on pathogenesis, prevention and control. *Journal Of Microbiology, Immunology And Infection*, 53(6), 963-978. doi: 10.1016/j.jmii.2020.03.007
- World Health Organization. *Communicable Disease Control, Prevention and Eradication WHO pesticide evaluation scheme*. Guidelines for laboratory and field testing of mosquitoes larvicides, (2005.13).
- World Health Organization. Division of Vector Biology and Control. (1981) *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. Geneva: World Health Organization. 6 p. p

# CAPÍTULO 11











---

Anexos











---

Individuos de pools

Cuadro A.1: Individuos de pool RF.L3.1 fotografiados en estereoscopio con cámara

Pool	Individuos				
RF.L3.1					
	Individuo 21	Individuo 22	Individuo 23	Individuo 24	Individuo 25
					
	Individuo 26	Individuo 27	Individuo 28	Individuo 29	Individuo 30

Cuadro A.2: Individuos de pool RF.L3.2 fotografiados en estereoscopio con cámara


Pool	Individuos				
RF.L3.2					
	Individuo 31	Individuo 32	Individuo 33	Individuo 34	Individuo 35
					
	Individuo 36	Individuo 37	Individuo 38	Individuo 39	Individuo 40

## CAPÍTULO B

---

POE A: Preparación de solución Temefos

---

	<p style="text-align: center;">Procedimiento de Operación Estándar Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG Preparación de solución madre temefos</p>	<p style="text-align: center;">POE A</p>
---	---	--

Preparado por: Miguel Basterrechea      Fecha: 20 de agosto de 2022

Revisado por: Ana Cristina Benedict      Fecha: 13 de marzo de 2023

## B.1. Introducción

Temefos es un larvicida organofosforado que se ha utilizado durante años en varios países en programas de salud pública como el plaguicida de elección para el control del *Aedes aegypti*, entre otras especies. El Temefos comercialmente también se conoce como Larvafos, Larvate, Abate, Abathion entre otros. Usualmente los programas de control suelen distribuir bolsas plásticas conteniendo Temefos granulados en cuerpos de agua como pilas de agua y tinacos. Entre las ventajas de este insecticida está su bajo potencial de toxicidad aguda en humanos, por lo que no representa un riesgo para la población. Resultados muestran que el temefos no es un compuesto citotóxico a concentraciones menores a 10  $\mu\text{M}$ , sin embargo si posee potencial citostático a concentraciones superiores a 10  $\mu\text{M}$  (Herrera-Moreno *et al.*, 2013). Se ha demostrado resistencia al temefos por su uso generalizado en muchas áreas del mundo, sin embargo, es el único larvicida organofosforado que queda con algún uso apreciable. Como tal, es una herramienta importante en el manejo de la resistencia a los pocos larvicidas alternativos disponibles (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2013).

## B.2. Objetivo

Estandarizar los pasos a seguir para preparar la solución madre de temefos y su dilución para obtener la dosis diagnóstica de mortalidad en larvas.

## B.3. Definiciones y acrónimos

- POE: Procedimiento de Operación Estándar.
- Temefos: Insecticida organofosforado.

## B.4. Responsabilidades

El coordinador del insectario es responsable de garantizar que los miembros entiendan el procedimiento operacional estándar a seguir, su propósito y otras actividades conexas para la preparación de este larvicida. Es responsabilidad del personal que va a realizar este procedimiento entender este POE antes de realizar las operaciones descritas por su seguridad al manipular este insecticida. Si tiene alguna pregunta debe contactar al autor del documento o al encargado del insectario. Es responsabilidad del encargado del área asegurarse que los miembros firmen que han leído y entendido el POE estándar y aclarar cualquier duda al respecto.

Figura B.1: Solución de temefos (Chemservice) 100 mg al 97.7%



## B.5. Procedimiento de operación estándar asociados

- POEB- Bioensayo de resistencia de larvas de *Aedes aegypti* a temefos.

## B.6. Equipo, materiales y reactivos

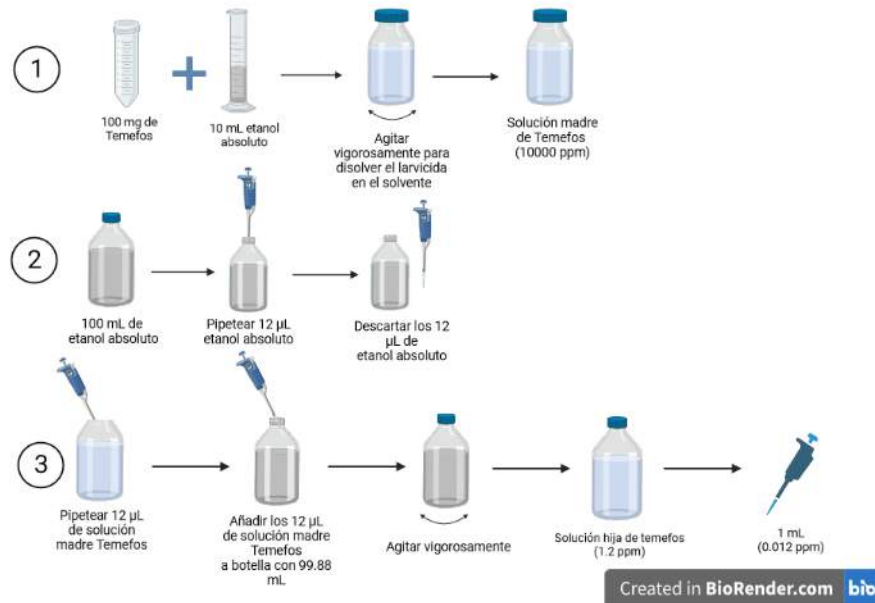
- Solución temefos en forma sólida 100 mg (Chemservice)
- Micropipeta de 1000  $\mu$ L y 100  $\mu$ L
- Puntas con filtro de 1000 $\mu$ L y 100  $\mu$ L
- Botella de vidrio esterilizada
- Probeta de vidrio 100 mL
- Marcador permanente de punta ultra fina (marca Sharpie)
- Cinta adhesiva (masking tape)
- Etanol absoluto (95 %)

## B.7. Precauciones y seguridad

- Limpiar las superficies de trabajo con etanol al 70 % antes y después de trabajar.
- Utilizar guantes de nitrilo y bata de laboratorio durante la manipulación del insecticida.
- Descartar los guantes de nitrilo y el papel absorbente usado para limpiar el área en una bolsa especial para desechos biopeligrosos y los desechos químicos según indique la ficha de seguridad.

## B.8. Procedimiento

Figura B.2: Representación general de preparación de solución de Temefos.



### B.8.1. Preparación de solución madre

- Pesar 100 mg de Temefos (Chemservice al 97.7% de pureza) y disolver en 10 mL de etanol absoluto para obtener una solución madre con una concentración final de 10 000 ppm. Agitar vigorosamente para disolver el larvicida en el solvente.
- Para preparar una solución de Temefos de 1.2ppm: Transferir 100 mL de etanol absoluto en otra botella, pipetear 12 µL y descartarlos en una bolsa roja. Tomar 12 µL de la solución madre de Temefos a 10,000ppm y añadirlos a la botella conteniendo 99.88mL de etanol absoluto. Mezclar vigorosamente.
- Esta solución de 1.2ppm de Temefos será utilizada para los bioensayos donde se utilizará una solución de 0.012ppm.
- Al finalizar de preparar ambas soluciones, rotular los frascos de vidrio adecuadamente, con el nombre del insecticida, concentración, fecha de preparación, nombre de quien la preparó, lote, fecha de expiración y marca del larvicida. Posteriormente, cubrir con papel aluminio ambas botellas de vidrio (la solución madre y solución de trabajo) y rotular nuevamente. Es importante cubrir las soluciones con aluminio debido a que los insecticidas son fotosensibles.

Figura B.3: Solución madre (1000 ppm) y solución de trabajo (12 ppm) Temefos.



## B.9. Cálculos

Cálculo 1: Concentración de solución madre 10000 ppm

$$\frac{100\text{mg de temefos (97.7\%)}}{(0.01\text{L de etanol})} = 10000\text{ppm} \quad (\text{B.1})$$

Cálculo 2: Concentración de solución de trabajo para obtener dosis diagnóstica en 100 mL

$$C1V1 = C2V2 = C1 = \frac{(0.012\text{ppm})(100\text{mL})}{(1\text{mL})} = 1.2\text{ppm} \quad (\text{B.2})$$

Cálculo 3: Preparación de solución de 12ppm de Temefos a partir de solución madre de 10,000 ppm.

$$C1V1 = C2V2 = V1 = \frac{(1.2\text{ppm})(100\text{mL})}{(10000\text{ppm})} = 0.012\text{mL} \quad (\text{B.3})$$

## B.10. Control de calidad

Comprobar mortalidad y calidad de insecticida según resultados de bioensayos.

## B.11. Reporte de datos y documentos utilizados

Registrar la información en los formularios correspondientes

## B.12. Referencias


- Herrera-Moreno J., Robledo-Marengo M., Medina-Díaz I., Barrón-Vivanco B., Bernal-Hernández Y., Benítez-Trinidad A., Vázquez-Estrada G., Verdín-Betancourt F., Rojas-García A. (2013). Temefos, ¿un compuesto inofensivo?. Nuevo Vallarta, Nayarit México. *Revista Bio Ciencias* 2(4) Supl 2: 143
- Saavedra-Rodriguez, K., Strode, C., Flores, A., Garcia-Luna, S., Reyes-Solis, G., & Ranson, H. *et al.* (2013). Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes after temephos selection. *Insect Molecular Biology*, 23(2), 199-215. doi: 10.1111/imb.12073

## CAPÍTULO C

---

POE B: Bioensayo de resistencia de larvas de *Aedes aegypti* a Temefos

---

	Procedimiento de Operación Estándar Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG Bioensayo de resistencia de larvas de <i>Aedes aegypti</i> a Temefos	POE B
---	---	----------

Preparado por: Miguel Basterrechea      Fecha: 23 de junio de 2022  
 Revisado por: Juan Carlos Lol            Fecha: 8 de agosto de 2022  
 Revisado por: Ana Cristina Benedict      Fecha: 3 de marzo de 2023

## C.1. Introducción

Para evaluar la actividad biológica o tóxica de un larvicida de mosquitos, las larvas de la población de interés se exponen por un periodo de 24 horas y la mortalidad es determinada a las 24-72 horas post-exposición dependiendo del compuesto. Para este tipo de bioensayos se utilizan larvas del tercer estadio y cuarto estadio temprano. Es importante notar que no se le añade comida cuando los bioensayos son de 24 horas. Estos bioensayos se pueden utilizar para calcular una dosis letal media utilizando diferentes concentraciones del compuesto de interés o para determinar si una población es resistente o susceptible utilizando una dosis diagnóstica. Una dosis diagnóstica es una dosis fija del insecticida, utilizada para discriminar las proporciones de fenotipos susceptibles y resistentes en una población de mosquito. El procedimiento detallado a continuación es para determinar la susceptibilidad al larvicida temefos en larvas de mosquitos Aedes, y para este se utilizará una dosis diagnóstica de 0.012 ppm. Este Procedimiento de Operación Estándar (POE) describe la metodología para realizar bioensayos de larvas mediante la metodología de la OMS la cual es aplicable para cualquier población de mosquitos en fase larval (WHO,2005).

## C.2. Objetivo

Estandarizar los pasos a seguir para efectuar bioensayos de larvas con temefos utilizando la metodología de la OMS, la cual es aplicable para cualquier cepa o población de mosquitos en fase larval.

## C.3. Definiciones y acrónimos

- POE: Procedimiento de Operación Estándar.
- Temefos: Insecticida organofosforado.
- Susceptible: Este término se utiliza para definir a una larva que que después del tiempo de exposición de 24 horas puede no puede desplazarse, que nada de forma irregular o que pereció en el fondo del beaker de prueba.
- Resistentes: Término empleado para definir una larva que después del tiempo de exposición de 24 horas puede desplazarse naturalmente por el beaker de prueba.
- Tiempo cero: Es el inicio del bioensayo, cuando estos llevan 0 minutos en el beaker.
- Beakers testeados: Beakers que han sido lavados y presentan 0% de incapacitación al colocar larvas de una cepa susceptible en agua filtrada dentro de los beakers por 24 horas.

## C.4. Responsabilidades

El coordinador del insectario es responsable de garantizar que los miembros comprendan el procedimiento operacional estándar a seguir, su propósito y otras actividades conexas para el desarrollo satisfactorio de esta actividad. Es responsabilidad del personal que va a realizar este procedimiento leer y comprender este POE antes de realizar las operaciones descritas. Si tiene alguna pregunta debe contactar al autor del documento o al encargado del insectario. Es responsabilidad del encargado del área asegurarse que los miembros firmen que han leído y entendido el POE estándar y aclarar cualquier duda al respecto.

## C.5. Procedimiento de operación estándar asociados

- POEB- Bioensayo de resistencia de larvas de *Aedes aegypti* a Temefos.

## C.6. Equipo, materiales y reactivos

- Beakers de vidrio de 150 mL testeados
- Micropipeta de 1000  $\mu$ L y 100  $\mu$ L
- Puntas con filtro de 1000 $\mu$ L y 100  $\mu$ L
- Varillas de vidrio
- Cronómetro
- Marcador permanente de punta ultra fina (marca Sharpie)
- Cinta adhesiva (masking tape)
- Pipeta Pasteur de plástico
- Etanol absoluto (95 %)
- Solución de temefos (0.012 ppm)

## C.7. Material biológico

El bioensayo de resistencia al larvicida temefos se debe realizar con larvas de tercer estadio y cuarto estadio temprano del género *Aedes*. El total de larvas requeridas para el bioensayo es de 100, divididas en grupos de 20. Un grupo se utiliza para el beaker control al cual se le adiciona 1mL de etanol absoluto y cuatro grupos para beakers a los cuales se les adiciona 1 mL del larvicida. Las características del material biológico a utilizar pueden ser las siguientes: Larvas de tercer estadio, alimentadas únicamente con comida de perro, procedentes de huevos obtenidos en el insectario de hembras de colectas en el campo, o de una cepa de laboratorio, o larvas colectadas en el campo, o huevos colectados en campo utilizando ovitrampas.

## C.8. Precaución y seguridad

- Limpiar las superficies de trabajo con etanol al 70 % y papel absorbente antes y después de trabajar.
- Utilizar guantes de nitrilo y bata de laboratorio durante la realización del bioensayo.
- Descartar los desechos biológicos, los guantes de nitrilo y el papel absorbente para limpiar el área en una bolsa especial para desechos biopeligrosos y los desechos químicos en envases contaminados. Estos envases deben vaciarse de forma óptima, pudiendo eliminarlos posteriormente mediante incineración.

## C.9. Procedimiento

### C.9.1. Separación de larvas

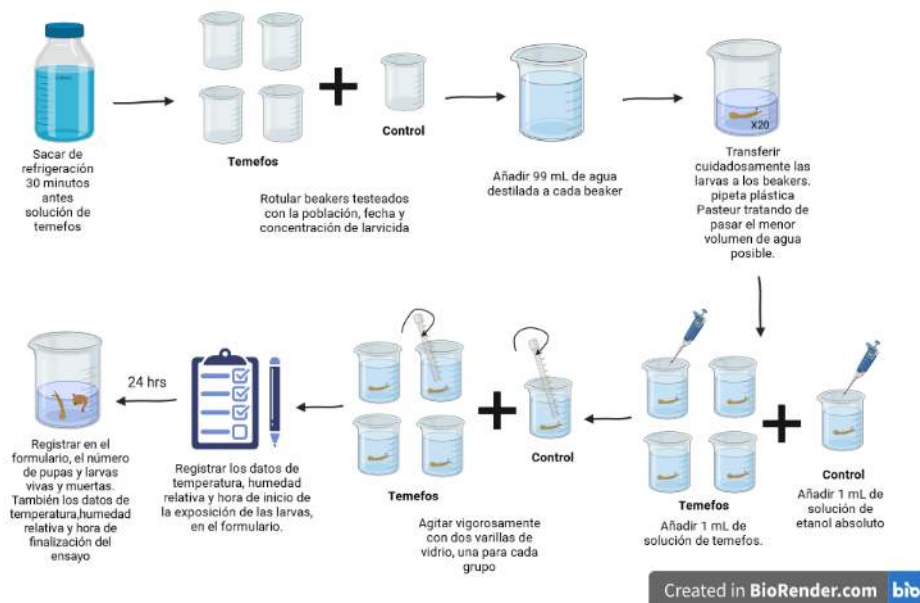
Figura C.1: Grupos de 20 larvas de tercer estadio separadas en 5 recipientes de contención.



- Un día antes del bioensayo, se separan las larvas de tercer estadio con una pipeta Pasteur plástica. Estas se colocarán en 5 recipientes plásticos, colocando 20 larvas por recipiente.
- Las larvas separadas se dejarán en condiciones de alrededor  $27^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1$ ) y 70 % ( $\pm 10$ ) de humedad relativa en el insectario hasta el momento de realizar el bioensayo al día siguiente.

## C.9.2. Realización del bioensayo

Figura C.2: Representación general de la realización del bioensayo de resistencia de larvas.



(WHO 2005).

- Si las soluciones de trabajo fueron preparadas con anterioridad, sacar de refrigeración y colocarlas a temperatura ambiente media hora antes de comenzar el ensayo.
- Rotular beakers previamente testeados con larvas de una cepa de referencia expuestas a agua del filtro durante 24 horas (POE X). Los rótulos deben contar con el nombre de la población a evaluar, número de beaker, concentración del insecticida, fecha del bioensayo, y nombre de la persona que realizará el bioensayo.
- Colocar en cada beaker 99mL de agua del filtro Puramatic (ubicado en el cuarto M-106, del edificio M).
- Antes de trasvasar las larvas a los beakers, descartar las larvas que luzcan más pequeñas que el promedio general, las que muestren señales de daño durante la manipulación y/o larvas moribundas.
- Trasvasar los lotes de 20 larvas de tercer o cuarto estadio temprano a cada beaker utilizando una pipeta Pasteur plástica con el menor volumen de agua posible.
- Al beaker control, agregar 1mL de etanol absoluto. Agitar suavemente con una varilla de vidrio asignada al beaker control.
- En el caso de los beakers para temefos, agregar 1mL de temefos (Chemservice) para que quede a una dosis de 0.012ppm y agitar la solución de cada beaker con una varilla de vidrio. Asegurarse de utilizar una varilla de vidrio para los beakers con el temefos, y otra para los beakers control.
- Llenar el formulario de registro de datos: “FORMULARIO Z. REGISTRO BIOENSAYO TEMEFOS”

- Mantener las condiciones del ensayo a 26-28 °C y en fotoperiodo de 12 horas de luz, seguido por 12 horas de oscuridad.
- A las 24 horas de exposición continua, registrar en el formulario, el número de pupas así como las larvas vivas y muertas. La mortalidad larval se registra de acuerdo con los varios criterios. Según los criterios de la OMS (WHO,2005), se consideran larvas muertas cuando:
  - Son larvas moribundas.
  - Larvas que no presentan movilidad al ser estimuladas con una varilla de vidrio.Larvas que no logran nadar a la superficie
- Registrar los datos de temperatura, humedad relativa y hora de finalización del ensayo en Formulario Z.
- Si necesita preservar las larvas por fenotipo ya sea para extracción de ADN o ARN, revisar el POE D.
- Si no es necesario preservar las larvas, eliminar las larvas vivas y muertas matándolas con agua hirviendo en un colador y descartarlas en el contenedor de desechos biopeligrosos.
- Descartar el agua conteniendo etanol y/o larvicida por el lavadero con el chorro abierto para diluir la solución, y proceder a lavar los beakers. El lavado de beakers consiste en enjuagar a fondo con agua jabonosa caliente tres veces y luego colocar en el horno hasta que estén completamente secos.
- Ingresar los datos del formulario a una hoja de Excel, para calcular el porcentaje de larvas que puparon, y porcentaje de mortalidad de larvas en los controles, así como el porcentaje de mortalidad de las larvas al temefos. El bioensayo se rechaza de acuerdo a los siguientes criterios:
  - Si el porcentaje de larvas que puparon en el control es mayor al 10
  - Si el porcentaje de mortalidad de larvas en el control es mayor al 20
  - Si el porcentaje de mortalidad control está entre el 5 y 20 %, corregir la mortalidad de larvas con la Fórmula de Abbott:

## C.10. Control de calidad

Criterio de mortalidad de grupo control como indica la sección de arriba.

## C.11. Reporte de datos y documentos utilizados

Registrar la información en los formularios correspondientes: “FORMULARIO Z. REGISTRO BIOENSAYO LARVICIDA” y “FORMULARIO Z. PRESERVACIÓN DE LARVAS DE BIOENSAYOS”

## C.12. Referencias


World Health Organization. *Communicable Disease Control, Prevention and Eradication WHO pesticide evaluation scheme*. Guidelines for laboratory and field testing of mosquitoes larvicides, (2005.13).

## CAPÍTULO D

---

POE C: Preservación y almacenamiento de larvas para extracción de ARN

---

	Procedimiento de Operación Estándar Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG Preservación y almacenamiento de larvas para extracción de ARN	POE C
---	---	----------

Preparado por: Juan Carlos Lol      Fecha: 3 de febrero de 2020  
 Modificado por: Miguel Basterrechea      Fecha: 08 de enero de 2023  
 Revisado por: Ana Cristina Benedict      Fecha: 27 de febrero de 2023

## D.1. Introducción

El almacenamiento del material biológico, como individuos adultos para mosquitos del género *Anopheles* y *Aedes*, para el análisis molecular posterior es un paso de vital importancia. El almacenaje adecuado o inadecuado puede hacer la diferencia en obtener resultados óptimos y ácidos nucleicos (ADN y ARN) de integridad. Los ácidos nucleicos permiten determinar si existen mutaciones en sitios blancos de insecticidas, o genes detoxificantes de insecticidas en el mosquito. Esto consecuentemente ayuda a dilucidar que está confiriendo la resistencia a insecticidas. El ADN, por su estructura química, es más estable y por lo tanto permite un periodo de almacenamiento mayor al igual que puede ser manipulado con mayor facilidad. El ARN es una molécula menos estable por lo que se requiere de más precauciones para mantener su integridad. Las larvas de mosquitos que se utilizan para extraer ARN normalmente se almacenan con nitrógeno líquido, hielo seco o inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El RNAlater® es una solución química, no tóxica, que permeabiliza rápidamente el tejido y estabiliza y protege el ARN en individuos no congelados. Este habitualmente se utiliza en condiciones poco ideales o de campo, en donde el acceso a nitrógeno líquido es más restringido. El RNAlater® permite preservar y almacenar los individuos y mantener su la integridad del ARN durante más tiempo con las condiciones que se tiene en el laboratorio para su posterior análisis molecular (Torres *et al.*, 2019). Este protocolo se basa en el de preservación de adultos sin embargo está adaptado para la preservación de larvas. Las modificaciones consistieron sobre todo con la particularidad de que las larvas flotan y deben hundirse hasta el fondo, la manipulación con la pinza entomológica que debe ser más cuidadosa y notas explicativas del procedimiento.

## D.2. Objetivo

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

## D.3. Definiciones y acrónimos

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

## D.4. Responsabilidades

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

## D.5. Procedimiento de operación estándar asociado

- POE B: Bioensayo de resistencia de larvas de *Aedes aegypti* a Temefos

## D.6. Equipo, materiales y reactivos

- Caja Petri
- Recipientes de contención (plástico)
- Pipeta Pasteur
- Etanol absoluto
- RNAlater®
- Tubos de 0.2
- Gradillas para tubos de 0.2
- Bolsas con cierre hermético de (16.5 cm x 14.9 cm)
- Masking tape
- Marcador permanente de punta ultra fina.
- Micropipeta de 1000 µL
- Puntas bloqueadas y estériles de 1000 µL
- Pinzas entomológicas
- Papel absorbente
- Guantes
- Refrigeradora a 4°C
- Congelador a -20°C

## D.7. Precauciones y seguridad

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

## D.8. Procedimiento

### D.8.1. Mosquitos utilizados en bioensayos para extraer ARN

- Es importante colocar el estatus de las larvas almacenadas: sobrevivientes, control o susceptibles.
- Agregar 280  $\mu$ L de RNAlater al vial de 0.2 mL (D.1).

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

Figura D.1: Viales de 0.2mL con RNAlater®



(Lol,2020).

- Colocar 20 mL etanol absoluto en una caja Petri, utilizada para sumergir las larvas, asegúrese de mantener un nivel adecuado de etanol absoluto para este propósito.

*NOTA: EL etanol permite aumentar la permeación de la cutícula del insecto con el fin de que el RNAlater penetre el tejido y se preserve de mejor manera el ARN.*

- Al terminar el bioensayo, a las 24 horas, pipetear con el menor volumen de agua las larvas sobrevivientes y colocarlos en un recipiente de contención previamente rotulado. (D.2).

Figura D.2: Grupo de larvas resistentes divididas en contenedores



- Tomar delicadamente la larva con la pinza entomológica y colocarla sobre la caja Petri con etanol absoluto del paso anterior (Figura 3), tratando de que la larva quede totalmente sumergida.

Figura D.3: Manipulación de larva en Caja Petri con etanol y pinza entomológica



- Utilizar la pinza entomológica para remover la larva de la caja Petri y eliminar el exceso de etanol presionando suavemente sin comprometer la integridad de la larva sobre papel absorbente.
- Colocar la larva en un vial de 0.2 mL con RNAlater, asegurando que la larva quede lo más sumergida posible en la solución. Las larvas tienden a flotar por su alto contenido graso (D.4).

Al finalizar el experimento se recomienda revisar que todas las larvas estén bien sumergidas en el RNAlater, en caso haya una que esté flotando mucho, utilizar pinzas para hundirla nuevamente.

Figura D.4: Larva individual almacenado en RNAlater® en un vial de 0.2mL



- Coloque el vial en una gradilla para viales de 0.2mL.
- Rotular esta gradilla con la información del bioensayo (fecha y población) y si las larvas son sobrevivientes, control o susceptibles.
- Rotular cada tubo con un marcador permanente con punta ultra fina con la información de la larva (resistente, susceptible y control) y según el código de bioensayo.

*NOTA: Se suele codificar según la población y fecha del bioensayo. Dependiendo del estado de la larva, se coloca la inicial R para resistentes, S para susceptible y C para control, más la numeración correspondiente de manera a producir su identificador único (ID) correspondiente. Un ejemplo: ES16R5 que indica la población Enrique Smith, bioensayo 16 (fecha asociada según formulario) y el individuo resistente 5.*

- Limpie la pinza con papel absorbente y etanol 70 % entre cada individuo y repita el procedimiento para todos los individuos
- Al terminar, colocar la gradilla con los tubos en una refrigeradora (4°C) por una noche (10 horas) (D.5).

Figura D.5: Gradilla con viales de larvas almacenadas.



- Al día siguiente, colocar los mosquitos en una bolsa de cierre hermético de 16.9 cm x 14.9 cm, rotulada con el código del bioensayo. De igual manera colocar un rótulo con la información del bioensayo escrito con papel y lápiz y colocarlo dentro de la bolsa. Colocar esta bolsa en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- En el caso de las larvas en el beaker control, preservarlas de la misma forma como se indica en este procedimiento, en RNALater.
- Las larvas pueden almacenarse en estas condiciones hasta por un año sin mostrar degradación del ARN. Se debe asegurar de cerrar correctamente los viales para evitar el congelamiento de los individuos dentro.

## D.9. Referencias


- Lol J. (2020). POE: BIO14. Preservación y almacenamiento de mosquitos. Universidad del Valle de Guatemala
- Pinto, J., Palomino, M., Mendoza-Uribe, L., Sinti, C., Liebman, K. A., & Lenhart, A. (2019). Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in three populations of *Aedes aegypti* from Peru. *Parasites & Vectors*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3739-6>
- Martins, W. F. S., Wilding, C. S., Isaacs, A. T., Rippon, E. J., Mégy, K., & Donnelly, M. J. (2019). Transcriptomic analysis of insecticide resistance in the lymphatic filariasis vector *Culex quinquefasciatus*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47850-w>
- Thermo Fisher Scientific Inc. 2014. *RNALater® Tissue Collection: RNA Stabilization Solution User Guide*. Thermo Fisher Scientific Inc
- Torres, M. G., Weakley, A. M., Hibbert, J., Kirstein, O. D., Lanzaro, G. C., & Y, L. (2019). Ethanol as a potential mosquito sample storage medium for RNA preservation. *F1000Research*, 8, 1431. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20162.1>

## CAPÍTULO E

---

POE D: Extracción de ARN de larvas de mosquitos *Ae. aegypti* con Trizol

---

	Procedimiento de Operación Estándar Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG Extracción de ARN de larvas de mosquito de <i>Aedes aegypti</i> con TRIzol	POE D
---	---	----------

Preparado por: <u>Miguel Basterrechea y Sheryl Ruiz</u>	Fecha: <u>23 de junio de 2022</u>
Revisado por: <u>Juan Carlos Lol</u>	Fecha: <u>27 de junio de 2022</u>
Modificado por: <u>Miguel Basterrechea</u>	Fecha: <u>16 de enero de 2023</u>
Revisado por: <u>Ana Cristina Benedict</u>	Fecha: <u>06 de marzo de 2023</u>

## E.1. Introducción

La extracción de ARN es una técnica esencial para el estudio de expresión de genes. Es de gran importancia la extracción de alta calidad de ARN, puesto que es esencial en diversos métodos cuantitativos. Un ARN de baja calidad repercute en gran medida en los resultados experimentales. Recientemente se han introducido kits comerciales que han simplificado y mejorado los procedimientos de aislamiento del ARN, sin embargo su alto costo y su limitada disponibilidad conlleva a recurrir a métodos alternativos. El TRIzol es un método alternativo que aísla el ARN en un solo paso, basado en la interacción de fenol y guanidina con compuestos celulares. Estudios han comprobado que el TRIzol es una alternativa conveniente para muestras compuestas en gran abundancia por ARNasas. La versatilidad del TRIzol para extraer diferentes tipos de moléculas de ARN incrementan su aplicación en investigaciones moleculares (Heidary & Pahlevan Kakhki, 2014). Este procedimiento operacional estándar fue desarrollado por los diversos investigadores: Sheryl Ruiz, Miguel Basterrechea, Juan Carlos Lol y Ana Cristina Benedict. Las principales modificaciones se fueron generando conforme las observaciones de las extracciones realizadas. Las modificaciones fueron: recalcar la importancia de las centrifugaciones a bajas temperaturas, añadir dos pasos de lavado con etanol, se cambiaron las proporciones del volumen de TRIzol™, para que sea menos volumen al principio y sea más fácil la maceración del pool y ayudas durante la división de fases, de manera a extraer solamente la fase acuosa y asegurar el éxito de la extracción.

## E.2. Objetivo

Extraer ARN total de larvas con TRIzol (Invitrogen).

## E.3. Definiciones y acrónimos

- ARN: Ácido ribonucleico.
- ARNasas: Ribonucleasas cuya función es catalizar la degradación de ARN en componentes más pequeños.
- TRIzol: Solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina, y otros compuestos que facilitan el aislamiento del ARN.

## **E.4. Responsabilidades**

Es responsabilidad del laboratorista comprender este procedimiento operacional estándar a seguir. Cualquier pregunta contactar al encargado del área. Es responsabilidad del encargado del área asegurarse que los miembros firmen que han leído y entendido el POE estándar y aclarar cualquier duda al respecto.

## **E.5. Equipo, materiales y reactivos**

### **E.5.1. Materiales**

- Tubos cónicos de 1.5 o 1.7 mL estériles
- Marcador indeleble punta ultrafina
- Micropipetas de 100-1000  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L, 0.5-10  $\mu$ L
- Puntas con filtro 100-1000  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L, 0.5- 10  $\mu$ L
- Papel toalla
- Gradillas para tubos de 1.5 o 2 mL
- Hielera pequeña con hielo
- Pinza entomológica
- Recipiente de descarte
- Bolsa para descarte
- Pistilos estériles
- Beaker para pistilos sucios

### **E.5.2. Reactivos**

### **E.5.3. Reactivo para limpieza del área de trabajo**

- Etanol al 70
- RNaseZap (Thermofisher)

### **E.5.4. Reactivos para extracción y cuantificación de ARN**

- Isopropanol, grado reactivo
- Etanol al 75 %, a partir de etanol grado reactivo (solución fresca, no más de una semana)
- Agua libre de ARNasas o DEPC
- Cloroformo, grado reactivo
- TRIzol™ (Thermofisher)

## E.6. Equipo de laboratorio

- Bloque térmico
- Homogeneizador eléctrico
- NanoDrop (Thermo)
- Centrifuga de baja temperatura

## E.7. Precauciones y seguridad

- Utilizar guantes de nitrilo y bata de laboratorio durante todo el proceso.
- Limpiar meticulosamente las superficies de trabajo, los equipos y reactivos con etanol al 70 % y RNaseZap antes y después de trabajar.
- Descartar los desechos biológicos e insumos plásticos no reusables, los guantes de nitrilo y el papel absorbente para limpiar el área en una bolsa especial para desechos biopeligrosos y los desechos químicos según indique la ficha de seguridad.

## E.8. Procedimiento

### E.8.1. Preparación del área de trabajo

- Ponerse guantes de nitrilo y bata de laboratorio.
- Limpiar el área donde se va a trabajar con etanol al 70 % y RNaseZap®.
- Limpiar las gradillas, micropipetas y cajas de puntas que va a utilizar con etanol 70 % y RNaseZap.
- Rotular beaker de 500 mL para descarte de puntas, colocar una bolsa de desechos de bioseguridad en otro recipiente para descarte general.
- Rotular beaker para colocar los pistilos sucios.
- Asegurarse de tener hielo listo en la hielera para la extracción de ARN, el cual debe estar listo al momento de ir a traer las muestras.

### E.8.2. Extracción de ARN

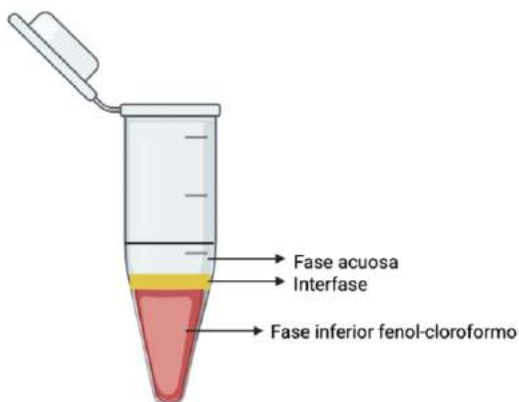
- Conectar y encender la centrifugadora.
- Pulsar el botón fast temp para colocar la temperatura entre 4 °C.
- En un tubo cónico de 1.5 mL o 1.7 mL pipetear 200 µL de TRIzol™ a 4 °C. Este tubo debe ser rotulado con la información pertinente a la población: nombre de la población de mosquitos, fecha, nombre de investigador que hace la extracción.
- Seleccionar 10 larvas previamente preservadas en RNAlater.

- Limpiar la pinza entomológica con un papel absorbente y etanol 70%. Con la pinza entomológica limpia, remover ejerciendo un poco de presión los cristales formados por el RNAlater de cada larva, de la manera más rápida posible (cuidado de preservar las puntas de la pinza). El tubo con las larvas siempre deben permanecer en hielo.
- Colocar la larva en papel toalla para eliminar el excedente de RNAlater y colocarla dentro dentro del tubo que contiene el TRIzol™. Realizar esto hasta tener 10 larvas en el tubo de 1.7mL con TRIzol™.
- Macerar el pool de 10 larvas con el macerador eléctrico dentro del tubo hasta no observar ninguna parte reconocible de las larvas. Esta maceración debe mantenerse en frío y no debe tomar más de un minuto.
- Al terminar la maceración, agregar otros 800uL de TRIzol™ a la muestra pipeteando sobre el pistilo y hacia el tubo para lavar cualquier resto de tejido del pistilo.
- Centrifugar los tubos por 5 minutos a 12,000g a 4-10°C, esto se debe de hacer en frío debido a que las larvas presentan un alto contenido de tejido graso
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo utilizando una pipeta y una punta de 1000mL, pipetear de 500mL en 500mL teniendo cuidado de no tocar los restos celulares .
- Incubar el tubo con el sobrenadante por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas.
- Pasado el tiempo de incubación, agregar 200  $\mu$ L de cloroformo.
- Mezclar por inversión 5 veces.
- Incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar la muestra por 15 minutos a 12,000g a 4°C.

*NOTA: En este paso se formarán 3 fases; una fase inferior color rojo fenol-cloroformo, una fase intermedia o interfase y una fase acuosa superior incolora.*

*NOTA: Es recomendable apoyar la punta de la micropipeta con la pared del tubo con el fin de evitar transferir cualquier remanente de la interfase*

Figura E.1: División de las fases.



(Elaborado en Biorender)

- Transferir a un tubo estéril la fase acuosa que contiene el ARN, con ayuda de una micropipeta de 100  $\mu$ L.

**Evitar tocar ni transferir cualquier remanente de la interfase o fase orgánica.**

*NOTA: La interfase y la fase orgánica se puede almacenar, si se quiere extraer ADN o proteínas. Apoyar la punta de la micropipeta contra la pared para mayor estabilidad.*

- Agregar 500 $\mu$ L de isopropanol a la fase acuosa.
- Mezclar por inversión 5 veces.
- Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Conectar y encender el bloque térmico a 60 °C durante los 10 minutos.
- Centrifugar la muestra por 10 minutos a 12,000g a 4°C.
- Luego de la centrifugación, se formará un pellet transparente con apariencia gelatinosa. Este pellet la aglomeración del ARN Descartar el sobrenadante con ayuda de una micropipeta en el descarte de Trizol™. Usar una pipeta de 1000  $\mu$ L con un volumen de 500 $\mu$ L para eliminar la mayor parte del isopropanol. Posteriormente utilizar una pipeta de 10 o 20  $\mu$ L para eliminar la mayor cantidad de isopropanol del pellet.

*NOTA: Es posible no observar pellet, pero seguir procedimiento asumiendo que se formó*

- Resuspender el pellet en 1mL de etanol al 75 % (preparado a partir de etanol absoluto grado reactivo). Agregar el etanol utilizando una pipeta de 1000  $\mu$ L y pipetear 500  $\mu$ L al tubo y luego los últimos 500  $\mu$ L. Se agrega el etanol de esta forma ya que si se pipetea los 1000  $\mu$ L de etanol en un solo paso tiende a mojarse el filtro de la punta.
- Colocar la muestra en el vórtex brevemente y centrifugar por 5 minutos a 7,500g a 4°C.
- Remover el etanol 75 % de la muestra al invertir cuidadosamente el tubo descartando el etanol en la bolsa roja.
- Agregar 1mL de etanol 75 % para realizar un segundo lavado del pellet. Agregar el etanol utilizando una pipeta de 1000  $\mu$ L y pipetear 500  $\mu$ L al tubo y luego los últimos 500 $\mu$ L. Se agrega el etanol de esta forma ya que si se pipetea los 1000  $\mu$ L de etanol en un solo paso tiende a mojarse el filtro de la punta.
- Después de agregar el etanol colocar en el vórtex la muestra brevemente.
- Centrifugar por 5 minutos a 7,600g a 4°C.
- Descartar el sobrenadante utilizando una micropipeta de 1000 $\mu$ L sacando 500  $\mu$ L a la vez.
- Colocar el tubo en una minicentrífugadora y eliminar la mayor cantidad posible de etanol con ayuda de micropipeta de 10  $\mu$ L o de 20  $\mu$ L.
- Secar al aire el pellet por 10 minutos a temperatura ambiente. Para esto colocar un pedazo de mayordomo limpio sobre el área de trabajo, abrir el tubo y colocarlo de forma invertida sobre el mayordomo. Es importante no dejar que el pellet se seque completamente ya que esto disminuirá su solubilidad.
- Resuspender el pellet seco dentro del tubo, en 50  $\mu$ L de agua libre de ARNasas o agua DEPC y mezclar por pipeteo.
- Incubar la muestra por 10 min a 60°C para terminar de solubilizar el pellet.
- Al terminar la incubación, colocar la muestra en hielo.
- Cuantificar el ARN usando el NanoDrop, anotar la concentración al igual que las razones A260/280, A260/230.
- Almacenar a -70°C, asegurando que el tubo esté bien rotulado e identificado.

## E.9. Cálculos

### E.9.1. Cálculo 1: Preparación de solución de etanol 75 %

$$V_1 = \frac{(75\%)(4mL)}{(100\%)} = 3mL \text{ de etanol absoluto} + 1mL \text{ de agua DEPC} \quad (\text{E.1})$$

## E.10. Control de calidad

Una concentración de ARN mínima de 250 ng/uL, y valores de pureza de 260/280 de alrededor de 2 y valor 260/230 entre el rango 2.0 - 2.2.

## E.11. Reporte de datos y documentos utilizados

Registrar la información en el cuaderno de laboratorio

## E.12. Referencias


- Gottshall, S., Tekin, S., & Hansen, P. (2008). *Extraction and Purification of Total RNA using Trizol or Tri Reagent*. University Of Florida.
- Heidary, M., & Pahlevan Kakhki, M. (2014). TRIzol-based RNA Extraction: A Reliable Method for Gene Expression Studies. *Journal Of Sciences, Islamic Republic Of Iran*, 25(1), 13-17.
- Invitrogen.(2016). *TRIZol™ Reagent User Guide*. ThermoFisher Scientific

## CAPÍTULO F

---

POE E: Gel de integridad de ARN

---

	Procedimiento de Operación Estándar Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG Gel de integridad ARN	POE E
---	--	----------

Preparado por: Miguel Basterrechea    Fecha: 22 de marzo de 2023

Revisado por: Ana Cristina Benedict    Fecha: 23 de marzo de 2023

## F.1. Introducción

El ARN se ve afectado por muchos factores químicos, físicos y biológicos. Debido a su naturaleza y a las consecuencias que un ARN de baja calidad puede causar en los análisis posteriores, es necesario asegurar su calidad e integridad. Los métodos más conocidos y convencionales para determinar son costosos o largos, complejos e involucran químicos tóxicos como gel de formaldehído. Una opción alternativa sencilla, barata y con reactivos fácilmente disponibles es realizar un gel de integridad para ARN. Este gel de ARN consiste en agregar proporciones de cloro comercial a un gel de agarosa con buffer TAE antes de la electroforesis. Ante la presencia de bajas concentraciones de cloro, la estructura secundaria del ARN se desnaturaliza y ARNasas contaminantes son desintegradas. Derivado en este acercamiento el gel de integridad de ARN es un enfoque funcional para evaluar la integridad del ARN (Aranda *et al.*, 2012).

## F.2. Objetivo

Observar la calidad e integridad del ARN extraído.

## F.3. Responsabilidades

Es responsabilidad del laboratorista comprender este procedimiento operacional estándar a seguir. Cualquier pregunta contactar al encargado del área. Es responsabilidad del encargado del área asegurarse que los miembros firmen que han leído y entendido el POE estándar y aclarar cualquier duda al respecto.

## F.4. Equipo, materiales y reactivos

### F.4.1. Materiales

- Papel toalla
- Gradillas para tubos de 1.5 o 2 mL
- Recipiente de descarte
- Bolsa para descarte

### F.4.2. Reactivos

- Etanol al 70
- Cloro comercial Magia Blanca® (4.25 %)
- Agarosa
- Buffer TBE 1X
- Bromuro de etidio
- Transiluminador
- Micropipetas de 100-1000 µL, 20-200 µL, 0.5-10 µL
- Puntas con filtro 100-1000 µL, 20-200 µL, 0.5- 10 µL

### F.4.3. Equipo de laboratorio

- Microondas
- Equipo de electroforesis

## F.5. Precauciones y seguridad

- Utilizar guantes de nitrilo y bata de laboratorio durante todo el proceso.
- Limpiar meticulosamente las superficies de trabajo, los equipos y reactivos con etanol al 70 % y RNaseZap antes y después de trabajar.
- Descartar los desechos biológicos, los guantes de nitrilo y el papel absorbente para limpiar el área en una bolsa especial para desechos biopeligrosos y los desechos químicos según indique la ficha de seguridad.

## F.6. Procedimiento

### F.6.1. Preparación del gel

- Para realizar un gel de agarosa 1 % (peso/volumen) con buffer TBE 1X
- Se pesaron 0.3 g de agarosa y se mezcló con 30 mL de Buffer TBE 1X
- Se agregó cloro comercial al 2 % (volumen/volumen)
- Agregar 600 µL de cloro Magia Blanca® (4.25 %) en 30 mL de volumen final de agarosa.

*NOTA: El cloro comercial que utilizaron Aranda et al., es Clorox®. Este tiene una concentración de 6 % de hipoclorito de sodio. El cloro comercial disponible en el laboratorio es Magia blanca® y tiene entre 3 a 4.25 % de hipoclorito de sodio. Asumiendo que el cloro Magia Blanca® tenga un 3 % (lo mínimo), tendríamos que usar el doble de cloro comercial. En general, en los laboratorios se usa una concentración de 1 % (volumen/volumen), es decir 500 µL en 50 mL.*

- Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, agitando la mezcla ocasionalmente.

- Se calienta la mezcla de agarosa hasta obtener una solución homogénea  
Se calienta 1 minuto en el microondas Samsung blanco, agitándolo cada 15 segundos. Se pausa el microondas y se revuelve suavemente con la mano el erlenmeyer, utilizando guante protector para el calor.
- Se agrega bromuro de etidio según las condiciones que usamos en el laboratorio:  $0.6\mu\text{L}$  de BrEt de solución. Se revuelve suavemente el Erlenmeyer asegurando que esté homogénea la solución.
- Se vierte en el molde de geles para 8 pozos y se deja solidificar por 25 minutos.

### F.6.2. Cargar la muestras y electroforesis

- De las muestras de ARN concentradas hacer alícuotas de  $1\mu\text{g}$  de ARN.
- Mezclar las muestras de ARN con  $1\mu\text{L}$  de loading buffer 6X.
- Cargar las muestras en el gel de agarosa una pipeta con puntas de  $10\mu\text{L}$ .
- Correr el gel de electroforesis a 100 V por 35 minutos y visualizar en el transiluminador.

*Nota: El gel de integridad permite verificar la integridad de la muestra de ARN extraído. La integridad, permite discernir si la muestra de ARN extraída está contaminada con ADN contaminante.*

- Utilizar la escalera de Perfect DNA 50pb Ladder Novagen 70538 y 1Kb DNA Ladder Promega G57711 : DNA ladder de Merck.

*Nota: Estas escalera tienen un tamaño considerable que permite la estimación de las bandas del ARN. Cabe considerar que el ARN y el ADN presentan una variación en la migración. En geles de agarosa baja densidad, el ARN tiende a migrar más lentamente que ADN del mismo tamaño molecular. En geles de agarosa de alta densidad, el ARN tiende a migrar más rápidamente que ADN del mismo tamaño molecular.*

- Es necesario que las muestras tengan una concentración alta para poder interpretar el gel de integridad.

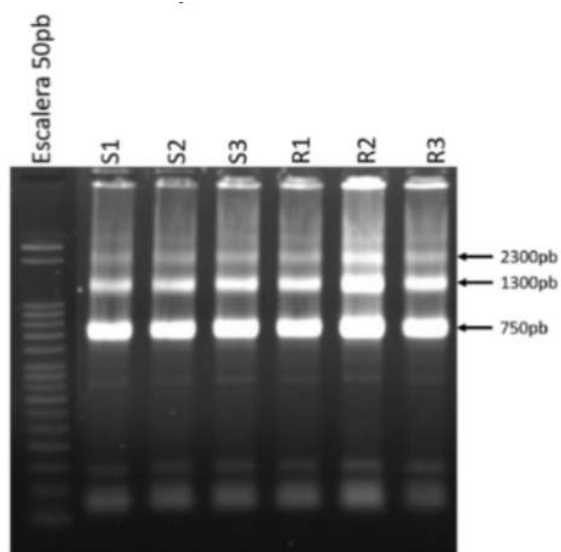
*Nota: Muestras concentradas con speedvac muestran buenos resultados al obtener bandas fuertes y marcadas de 28S y 18S. Esto indica que el ARN no está degradado.*

*Nota: Muestras con baja concentración, sin concentración con speedvac, no se logran cargar, no llegan a tener suficiente densidad y flotan sobre el gel.*

## F.7. Control de calidad

Ejemplo 1:

Figura F.1: Gel de agarosa para verificar la integridad del ARN total

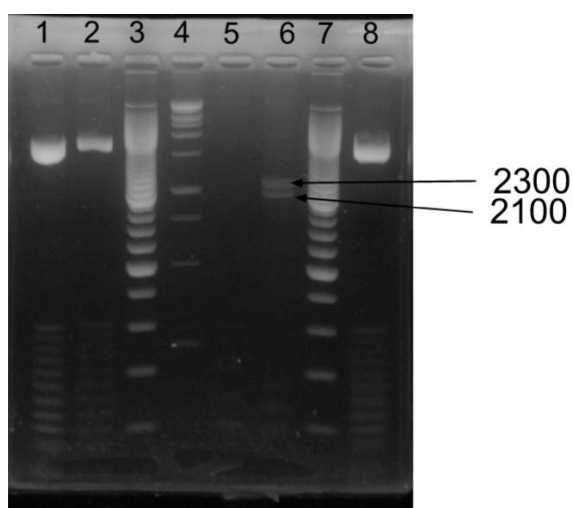


(Benedict,2018)

Las bandas intensas de 2300 bp,1300bp y 750 bp. Estas bandas intensas y la ausencia de barrido indica que el ARN se encuentra intacto. Las bandas de 1300 bp y 750 bp corresponden a las subunidades de ARN ribosomal (ARNr) 28 S y 18 S, respectivamente. La banda de 2300 bp corresponden a contaminación del ADN genómico. Las bandas tenues de menor tamaño corresponden a una mínima cantidad de ADN genómico y ARN total degradado (Benedict,2018).

#### Ejemplo 2:

Figura F.2: Gel de agarosa de integridad para verificación de pureza de ARN total con diferentes escaleras 1-Promega 25bp G452A; 2- 25pb en papel aluminio;3- Promega 100bp G695A; 4- Promega 1kb DNA ladder;5- Invitrogen E-Gel Ultra Low Ladder;6- Muestra RF.L3.1;7- Promega 100bp G695A; 8- 25pb en papel aluminio



El gel de agarosa de la figura F.2 permitió evaluar la integridad del ARN total extraído. Este fue un gel de agarosa (1% p/v y 0.02 mg/mL de bromuro de etidio) con diferentes escaleras para

evaluar en qué rango se encontraba la amplificación de la muestra. La amplificación de la muestra, en el pozo 6 presentó dos bandas. La banda superior de 2300 bp y otra inferior de 2100 bp. Estas bandas tienen una intensidad media, pero están bien definidas y la ausencia de bandas con menor peso molecular. Estos factores indican buena integridad del ARN al no haber sido degradado en bandas más pequeñas y la definición del tamaño de bandas. Estas bandas no corresponden a ningún otro tipo de ARN ribosomal por lo que es contaminación por ADN genómico

## F.8. Reporte de datos y documentos utilizados

Registrar la información en el cuaderno de laboratorio y adjuntar la foto del gel de agarosa.

## F.9. Referencias

- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA Quality. *ELECTROPHORESIS*, 33(2), 366–369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Benedict, A. (2018). *Análisis de expresión génica de la familia de citocromo P450 CYP6 en cepas de laboratorio de Anopheles albimanus (Wiedmann) con resistencia o susceptibilidad a deltametrina*. Universidad del Valle de Guatemala .

---

POE F: Tratamiento de ARN kit RQ1 RNase-Free DNase

---

## G.1. Introducción


La precisión de la evaluación de la expresión génica está influenciada por la concentración y la calidad del ARN. La pureza y la integridad del ARN son elementos críticos para el éxito general de los análisis basados en ARN. Comenzar con un ARN de baja calidad puede comprometer los resultados de las aplicaciones posteriores que a menudo requieren reactivos costosos. La integridad del ARN total utilizado debe examinarse antes de su uso en RT-PCR cuantitativa, microarrays y cualquier aplicación basada en arrays como análisis genómicos comparativos de hibridación por ejemplo. Para garantizar una calidad de ARN total aceptable, el procedimiento de extracción de ARN debe cumplir una serie de requisitos entre el que destaca que esté libre de ADN genómico. Las reacciones de transcriptasa inversa y PCR dependen en gran medida de los métodos de purificación y limpieza, así como de la presencia de contaminantes exógenos (Tavares *et al.*, 2011).

## G.2. Objetivo

Purificar el ARN total de larvas extraído con Trizol (Invitrogen), al eliminar ADN genómico contaminante.

## G.3. Definiciones y acrónimos

- TRIZol: Solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina, y otros compuestos que facilitan el aislamiento del ARN.
- RQ1 RNase-Free DNase: Preparación de desoxirribonucleasa (DNasa) que degrada ADN de hebra simple o de doble hebra para producir oligonucleótidos 3'-hidroxilo.

	Procedimiento de Operación Estándar Unidad de Entomología Médica y Malaria-CES/UVG Tratamiento de ARN kit RQ1 RNase-Free DNase	POE F
---	--	----------

Preparado por: Miguel Basterrechea      Fecha: 16 de enero de 2023

Revisado por: Ana Cristina Benedict      Fecha: 13 de marzo de 2023

## G.4. Responsabilidades

Es responsabilidad del laboratorista comprender este procedimiento operacional estándar a seguir. Cualquier pregunta contactar al encargado del área. Es responsabilidad del encargado del área asegurarse que los miembros firmen que han leído y entendido el POE estándar y aclarar cualquier duda al respecto.

## G.5. Equipo, materiales y reactivos

### G.5.1. Materiales

- Tubos cónicos estériles de PCR de 0.2mL
- Sharpie punta ultrafina
- Micropipetas de 100-1000  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L, 0.5-10  $\mu$ L
- Puntas con filtro 100-1000  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L, 0.5- 10  $\mu$ L
- Papel toalla
- Gradillas para tubos de 0.2mL
- Recipiente de descarte
- Bolsa para descarte

### G.5.2. Reactivos

#### G.5.3. Reactivo para limpieza del área de trabajo

- Etanol al 70
- RNaseZap (Thermofisher)

#### G.5.4. Reactivos para tratamiento de ARN

- RQ1 RNase-Free DNase (Promega)
- RQ1 DNase 10X Reaction Buffer (Promega)
- RQ1 DNase Stop Solution (Promega)
- Agua DEPC

### G.5.5. Equipo de laboratorio

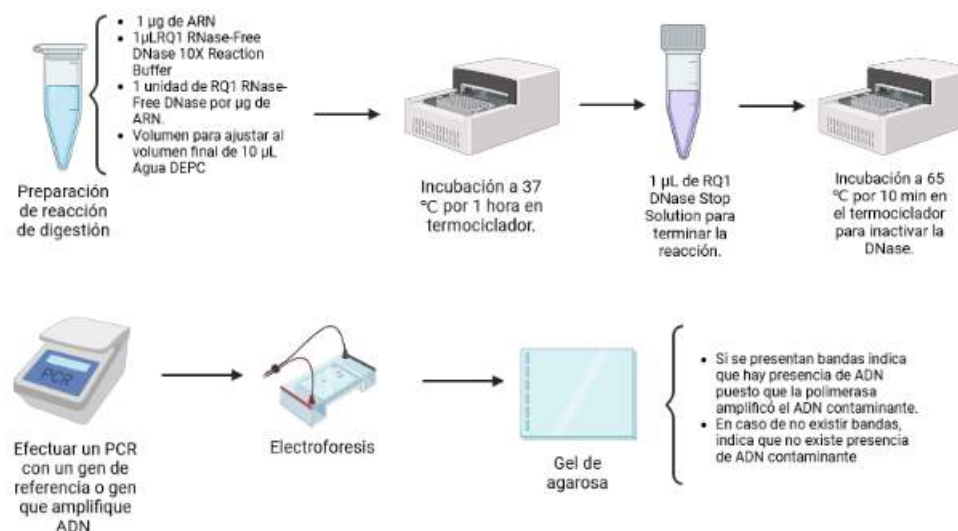
- Termociclador
- NanoDrop (Thermo)

### G.6. Precauciones y seguridad

- Utilizar guantes de nitrilo y bata de laboratorio durante todo el proceso.
- Limpiar meticulosamente las superficies de trabajo, los equipos y reactivos con etanol al 70 % y RNaseZap antes y después de trabajar.
- Descartar los desechos biológicos, los guantes de nitrilo y el papel absorbente utilizado para limpiar el área en una bolsa especial para desechos biopeligrosos y descartar los desechos químicos según indique la ficha de seguridad.

### G.7. Procedimiento

Figura G.1: Representación general de tratamiento de ARN con kit RQ1 RNase-Free DNase



#### G.7.1. Preparación del área de trabajo

- Colocarse guantes de nitrilo y bata de laboratorio.

- Limpiar área de trabajo con etanol al 70 % y RNaseZap.
- Limpiar gradillas, micropipetas y cajas de puntas a utilizar con etanol 70 % y RNaseZap.
- Rotular beaker de 500 mL para descarte de puntas.

### G.7.2. Tratamiento ARN

- Preparar la reacción de digestión en un tubo estéril de 0.2 mL añadiendo los reactivos de la siguiente forma:

Reactivos	1X
ARN	Volumen para 1 µg
RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer	1µL
RQ1 RNase-Free DNase*	1µL
Agua DEPC	Volumen para ajustar al volumen final de 10 µL
Volumen final	10 µL

*NOTA: Se utiliza 1 unidad de RQ1 RNase-Free DNase por µg de ARN.*

- Incubar a 37 °C por 1 hora en termociclador.
- Añadir 1 µL de RQ1 DNase Stop Solution para terminar la reacción.
- Incubar a 65 °C por 10 min en el termociclador para inactivar la DNase.

### G.7.3. PCR de confirmación de eliminación de ADN contaminante

- Efectuar un PCR con un gen de referencia o gen que amplifique ADN y su gel de agarosa.
- Si se presentan bandas indica que hay presencia de ADN puesto que la polimerasa amplificó el ADN contaminante.
- En caso de no existir bandas, indica que no existe presencia de ADN contaminante

## G.8. Cálculos

Cálculo 1: Determinación de 1 µg de ARN total

Concentración [ng/µL]: 1271.6 ng/µL

$$\frac{1000ng}{1271.6ng/\mu L} \quad (G.1)$$

0.79 µL de ARN a 1271.6 ng/µL

## G.9. Control de calidad

El gel de agarosa después de electroforesis no presenta bandas, indicando ausencia de ADN contaminante.

## G.10. Reporte de datos y documentos utilizados

Registrar la información en el cuaderno de laboratorio y adjuntar la foto del gel de agarosa.

## G.11. Referencias

- Benedict, A. (2018). *Análisis de expresión génica de la familia de citocromo P450 CYP6 en cepas de laboratorio de Anopheles albimanus (Wiedmann) con resistencia o susceptibilidad a deltametrina*. Universidad del Valle de Guatemala .
- Promega (2018). *RQ1 RNase-Free DNase (Cat.# M6101)*. Promega.
- Tavares, L., Alves, P. M., Ferreira, R. B., & Santos, C. N. (2011). Comparison of different methods for DNA-free RNA isolation from SK-N-MC neuroblastoma. *BMC Research Notes*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-3>