

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Distribución espacial de la frecuencia de mutaciones del gen en el canal de sodio dependiente de voltaje (*kdr*), asociadas a la resistencia a insecticidas en mosquitos *Aedes aegypti* de Guatemala

Trabajo de graduación presentado por Fátima de León Nowell
para optar al grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala,

2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Distribución espacial de la frecuencia de mutaciones del gen en el canal de sodio dependiente de voltaje (*kdr*), asociadas a la resistencia a insecticidas en mosquitos *Aedes aegypti* de Guatemala

Trabajo de graduación presentado por Fátima de León Nowell
para optar al grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala,

2024

Vo. Bo. Asesor Principal



Dra. Norma Padilla

Tribunal examinador



Dra. Norma Padilla



Dra. Alejandra Zamora



MSc. Gabriela Alfaro

Guatemala, 31 de mayo de 2023

PREFACIO

Este trabajo significa la culminación de una etapa importante en mi vida. Quiero empezar agradeciendo a Dios, quien me ha fortalecido en los momentos más difíciles y me da la oportunidad de lograr esta meta. Quiero agradecer especialmente a Fundación Educación, ya que sin ellos no hubiera podido dar siquiera el primer paso en mis estudios. Agradezco a mis padres, Jaime de León y Eunice Nowell, quienes me han apoyado sin dudar, y a mi hermana, Sofía de León, que me motiva a nunca rendirme y siempre tiene un abrazo para mí. Agradezco a mis abuelos, Arturo Nowell y Edna Pineda, por siempre creer en mis sueños y aspiraciones.

Agradezco en especial a toda la Unidad de Entomología Médica y Malaria del Centro de Estudios en Salud, que financió este trabajo y me formó en diversas técnicas. Agradezco a la doctora Norma Padilla, por considerarme como candidata para realizar la tesis. También agradezco a mi amiga y compañera M.Sc. Ana Cristina Benedict, por compartir conmigo todos sus conocimientos y llevarme de la mano en técnicas nuevas. Quiero agradecer a M.Sc. Juan Carlos Lol, quien me introdujo al mundo de los vectores y despertó mi amor por ellos.

Agradezco a mis compañeros de campana y conteo de huevos, Miguel Basterrechea y Cecilia Urizar, por siempre animarme. Además, extiendo un agradecimiento a Pedro Peralta, por todos los consejos que me ha dado y por compartir sus experiencias conmigo, y a Jorge Sincal y Alfredo Camey, por toda la ayuda y comprensión que han tenido en estos meses.

Quiero agradecer a mis catedráticos Ph.D. Alejandra Zamora y Zabdi López, quienes nunca dudaron de mi capacidad y me impulsaron a crecer, también a Priscila Juarez quien siempre estuvo dispuesta a ayudarme y darme de su tiempo.

Agradezco a mis amigos, Adriana Jiménez, Juan Carlos Molina, Mariana Rivas, Chloe Mazariegos, María Pira, Karla Diaz y Bessie Zibara, por acompañarme a lo largo de la carrera y apoyarme en todo momento.

Por último, quisiera agradecer al departamento de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala. Agradezco a mi directora M.Sc. Gabriela Alfaro y a Ericka Santos, quienes, a lo largo de la carrera, estuvieron presentes para resolver cualquier duda.

CONTENIDO

Prefacio	V
Lista de cuadros	VIII
Lista de figuras	IX
Sinopsis	X
Abstract	XI
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
3. Justificación	9
4. Objetivos	11
5. Hipótesis	12
6. Marco teórico	13
7. Metodología	21
8. Resultados	28
9. Análisis de resultados	31
10. Conclusiones	35
11. Recomendaciones	36
12. Referencias	38
13. Anexos	44

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. <i>Porcentaje de incapacitación en dosis diagnósticas para la colonia Tikal, Guatemala con los insecticidas DDT, deltametrina y permetrina.</i>	5
Cuadro 2. <i>Porcentaje de incapacitación en Bioensayo con sinergistas PBO, DEF y DM para la colonia Tikal, Guatemala con los insecticidas DDT, deltametrina y permetrina.</i>	6
Cuadro 3. <i>Frecuencias genotípicas y alélicas de las mutaciones kdr V1016I y F1534C en poblaciones de Aedes aegypti de la colonia Tikal, San Benito, Guatemala.</i>	28
Cuadro 4. <i>Frecuencias genotípicas de resistencia kdr en poblaciones de Aedes aegypti de la colonia Tikal, San Benito, Guatemala.</i>	29
Cuadro 5. <i>Resultados de las muestras de manzana 1, San Benito, colonia Tikal, Guatemala.</i>	63
Cuadro 6. <i>Resultados de las muestras de manzana 4, San Benito, colonia Tikal, Guatemala.</i>	64
Cuadro 7. <i>Resultados de las muestras de manzana 7, San Benito, colonia Tikal, Guatemala.</i>	65
Cuadro 8. <i>Muestras evaluadas por PCR convencional para uso como controles positivos en qPCR.</i>	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Funcionamiento normal de los canales de sodio y funcionamiento con piretroides.</i>	18
Figura 2. <i>Topología transmembranal del canal de sodio activado por voltaje.</i>	19
Figura 3. <i>Mapa de colonia Tikal, San Benito, Petén, Guatemala.</i>	21
Figura 4. <i>Mapa de la distribución de la frecuencia alélica de Aedes aegypti en las mutaciones F1534C y V1016I en colonia Tikal, San Benito, Petén, Guatemala.</i>	30
Figura 5. <i>Diagrama de la metodología para realizar controles positivos para utilizar el qPCR y evaluar las muestras.</i>	43
Figura 6. <i>Diagrama de la metodología para la evaluación de los alelos en qPCR.</i>	44
Figura 7. <i>Diagrama de la metodología para la realización de un PCR convencional.</i>	44

Figura 8. *Gel de electroforesis de muestras con posibles mutaciones.* 66

Fig. 9. *Gel de electroforesis de muestras que indicaban una posible heterocigosidad en curvas de qPCR.* 66

SINOPSIS

Los mosquitos hembra de la especie *Aedes aegypti* son vectores de diferentes virus, como dengue, zika, chikungunya y fiebre amarilla, enfermedades con altos índices de mortalidad a nivel centroamericano. Debido a sus implicaciones en la salud pública, se realizan esfuerzos para la eliminación sostenible de estos virus y sus vectores. Las estrategias actuales para controlar los brotes de arbovirus abarcan desde la eliminación de los sitios de reproducción de larvas, hasta tratamientos con insecticidas contra larvas y mosquitos adultos. Estos esfuerzos contra adultos se centran en el control químico, utilizando en la mayoría de las veces insecticidas piretroides. Esta eliminación de uso extenso y prolongado con insecticidas ha provocado una resistencia al derribo en las poblaciones de esta especie. Por lo tanto, el control con insecticidas se ha convertido en un gran desafío. Esta resistencia es mediada muchas veces por una mutación de nucleótidos, alterando la secuencia de los aminoácidos en las proteínas que confieren a la especie *Aedes aegypti* un efecto de resistencia por noqueo (*kdr* por sus siglas en inglés, "knockdown resistance") a los insecticidas piretroides y DDT. En el presente estudio, se identificó el patrón de distribución espacial de la frecuencia de resistencia *kdr* en poblaciones de *Aedes aegypti* de la colonia Tikal, Petén, Guatemala. Esto se realizó correlacionando las frecuencias alélicas de las mutaciones V410L, V1016I y F1534C. De esta forma, se pudo evaluar el sitio donde se encuentra el mayor foco de resistencia. Conocer la distribución heterogénea de las mutaciones de *kdr* en *Aedes aegypti* es de vital importancia para el control de esta especie, ya que permite la evaluación de la eficacia de los insecticidas y el desarrollo de estrategias de control efectivas. De esta forma, se proporciona, por primera vez, un conocimiento genómico sobre esta población con el objetivo de otorgar una herramienta para el manejo de la resistencia a insecticidas de este vector de arbovirosis en dicha región de Guatemala.

ABSTRACT

The female mosquitoes of the species *Aedes aegypti* are vectors of various viruses such as dengue, Zika, chikungunya, and yellow fever, causing diseases with high mortality rates in Central America. Efforts are made for sustainable elimination of these viruses and their vectors due to their significant impact on public health. Current strategies to control arbovirus outbreaks range from eliminating larval breeding sites to insecticide treatments against larvae and adult mosquitoes. Chemical control against adults primarily involves the use of pyrethroid insecticides. However, extensive, and prolonged insecticide use has led to resistance in *Aedes aegypti* populations. Controlling this species with insecticides has become a major challenge due to the rapid increase in insecticide resistance, particularly to pyrethroid insecticides. This resistance is often mediated by nucleotide mutations altering amino acid sequences in proteins, conferring knockdown resistance (kdr) to pyrethroid and DDT insecticides in *Aedes aegypti*. This study identified the spatial distribution pattern of kdr resistance frequency in *Aedes aegypti* populations in the Tikal colony, Petén, Guatemala. By correlating the allelic frequencies of mutations V410L, V1016I, and F1534C, the study aimed to pinpoint the location with the highest resistance focus. Understanding the heterogeneous distribution of kdr mutations in *Aedes aegypti* is crucial for species control, assessing insecticide efficacy, and developing effective control strategies. This genomic insight provides a valuable tool for managing insecticide resistance in this arbovirus vector population in Guatemala, offering a novel approach to address this public health challenge.

Keywords: *Aedes aegypti*, kdr, insecticide resistance, Guatemala.

1. INTRODUCCIÓN

Los arbovirus, por su definición en inglés, (Arthropod-Borne viruses) usan artrópodos vectores como el medio principal de transmisión. Entre ellos, los mosquitos, garrapatas y flebótomos (Cleton et al., 2012). Dentro de la amplia variedad de arbovirus, en América Latina, son tres virus transmitidos por vectores los que más problemas causan. Entre estos se encuentra el Dengue (DENV), el virus Zika (ZIKV) y el virus Chikungunya (CHIKV). Estos virus son transmitidos por culícidos, pertenecientes al género *Aedes*, como lo son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Powell, 2018). Debido a la ausencia de un medicamento efectivo o vacunas para el control del dengue, las infecciones por dengue, chikungunya y Zika seguirán emergiendo si no se logra controlar a los vectores que las transmiten, este caso *Aedes aegypti* (Morrison et al., 2008).

Los mosquitos están muy relacionados con el hábitat humano, esto debido a que las etapas inmaduras se encuentran en contenedores de agua y en ambientes domésticos, así como las hembras, que se alimentan de sangre humana y reposan en el interior de las viviendas. *Aedes aegypti* pertenece a las regiones tropicales y subtropicales del globo, como lo es Guatemala (García et al., 2012). En el país, a lo largo del año 2022, diez áreas de salud han presentado tasas de infección elevadas con contagios de dengue grave debido a estos vectores. Entre las áreas con tasas de infección elevadas se encuentran en El Petén, que ha presentado el mayor número de brotes de dengue desde el 2014. Lastimosamente la precaria situación en que se encuentra el sistema de salud, la poca investigación y las cortas campañas para la eliminación de estos vectores favorecen al incremento de brotes (MSPAS, 2022). Las principales campañas para la eliminación de vectores en Guatemala se basan en la eliminación de contenedores y el uso de insecticidas por medio de fumigaciones espaciales, utilizando en especial insecticidas de la familia de los piretroides (MSPAS,

2015). A pesar de la enorme ventaja que confieren los piretroides a las poblaciones para un control de vectores, el uso seguido, no estandarizado y prolongado de estos insecticidas puede llegar a causar una presión selectiva sobre los vectores, en este caso *Aedes aegypti*, lo cual lleva a crear un aumento en la incidencia de individuos resistentes (WHO, 1981).

La resistencia a los insecticidas es causada por una amplia variedad de cambios fisiológicos en los mosquitos, que incluye, alteración estructural en el sitio blanco del insecticida, incrementado en la actividad de las enzimas que están asociadas con la desintoxicación que causa el insecticida, así como cambios en la cutícula. Una sustitución no sinónima, en el canal de sodio activado por voltaje en la proteína transmembranal (para) puede provocar una resistencia de noqueo (*kdr*), la cual afecta la función de los piretroides y otros insecticidas al reducir la unión en los sitios objetivos (Saavedra-Rodriguez et al., 2007; Martins et al., 2009; Dong et al., 2014).

Esta es una mutación de nucleótidos que altera la secuencia de los aminoácidos en las proteínas, existen muchos puntos de mutación que permiten un efecto *kdr* en la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*. En América, se conocen sustituciones de codones en el canal de sodio activado por voltaje, que están fuertemente relacionadas con la resistencia a piretroides y DDT. Las sustituciones más comunes son en los codones 1016 (V1016I), 410 (V410L) y 1534 (F1534C) (Saavedra-Rodriguez et al., 2007; Harris et al., 2010 & Hu et al., 2011). Estas sustituciones han sido bien estudiadas y recientemente se ha sugerido que existe una co-evolución de estos dos marcadores (Vera et al., 2015) pero aún no se aclara el impacto que este fenotipo pueda causar en la resistencia. En la región Centroamericana el uso desmedido de insecticidas piretroides resulta alarmante, por lo que es necesario evaluar los mecanismos de resistencia para este vector. Con esto nos aseguramos de la efectividad de los insecticidas utilizados, evitando el generar un mayor número de poblaciones resistentes. En años anteriores (2017-2018) el Laboratorio de Entomología Médica y Malaria del Centro de Estudios en Salud (CES) de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG), se encargó de realizar uno de los pocos estudios para determinar mutaciones en la región. En este estudio observaron la co-ocurrencia de las mutaciones F1534C y V1016I en poblaciones de Guatemala (Escuintla, Mixco, Génova, y Coatepeque), Honduras (La Ceiba), Nicaragua (Managua), Costa Rica (Puntarenas y

Limón), y Panamá (Chorrera, Panamá, David, and Santiago). Estas muestras no fueron genotipadas por falta de individuos, pero son fuente primaria que evidencia la presencia de las mutaciones F1534C y V1016I en cada una de las regiones. Esto permitió tomar decisiones sobre investigaciones a mayor profundidad en la región, como lo es el caso de Costa Rica (Zardkoohi, et al., 2019). El determinar la distribución espacial de las mutaciones V1016I, V410L y F1534C en *Aedes aegypti* para la región de Petén en Guatemala, es de principal importancia para poder ejecutar un plan de acción de control de este vector que sea efectivo para la región.

En este estudio se determinó la distribución espacial de tres cuadrantes elegidas aleatoriamente de la colonia Tikal, San Benito, Petén. Las cuales fueron sometidas a pruebas de resistencia a piretroides por medio de bioensayos de botella de CDC. Se eligieron 30 muestras aleatorias de cada manzana, dando un total de 90 individuos. Estos individuos fueron analizados mediante PCR's en tiempo real para cada mutación para determinar si poseen las mutaciones F1534C, V1016I y V410L. Luego de esto se obtuvieron datos de frecuencias alélicas y genotípicas por cuadrantes. Los resultados obtenidos serán de gran utilidad para establecer estrategias para el control del vector *Aedes aegypti*, evitando así futuros brotes de dengue en la región.

2. ANTECEDENTES

2.1. Perfil de resistencia de Colonia Tikal

Como parte de los estudios de la Red de Entomología de Centroamérica y República Dominicana (ENTONET), a esta colonia se le realizaron ensayos biológicos de la botella de CDC con diferentes insecticidas incluyendo: DDT, permetrina, deltametrina y bendiocarb. Estos bioensayos son utilizados para evaluar el nivel de resistencia a insecticidas en mosquitos y otros insectos. Se realizaron bioensayos con la dosis diagnóstica, ensayos con sinergistas para permetrina y deltametrina y ensayos de intensidad con DDT, permetrina y deltametrina. Los bioensayos con sinergistas dan un indicio de la presencia de resistencia metabólica y las enzimas involucradas. Los bioensayos de dosis diagnóstica son aquellos que utilizan una dosis que es capaz de matar al 100% de mosquitos susceptibles en un periodo determinado de tiempo. El cuadro 1 indica los resultados de los bioensayos de dosis diagnóstica para *Aedes aegypti*, colectados en la colonia Tikal, de la generación filial. En este ensayo se utilizó una concentración diagnóstica para cada insecticida, según los criterios de la OMS para clasificarlos, en un periodo de 45 minutos para DDT (75 µg/botella) y de 30 minutos para deltametrina y permetrina (10 y 15 µg/botella respectivamente). Se obtuvo un porcentaje de incapacitación de 0% para DDT 57.34% para deltametrina y de tan solo 7.21% para permetrina. Estos resultados indican una fuerte resistencia para DDT y permetrina.

En este mismo estudio se realizaron ensayos con sinergistas (cuadro 2), con las concentraciones y tiempo anteriormente reportado para cada insecticida y con las siguientes dosis para los sinergistas: DM con 80 µg/botella, PBO con 400 µg/botella y DEF con 125 µg/botella. En los resultados sinergistas se encontró que en DDT con EtOH obtuvo un 5% de incapacidad, PBO un 9.01% y DM un 62,35%. En permetrina, el EtOH posee 6% de

incapacitación, DEF de 22.95%, PBO de 18.45% y el DM de 11.26%. Por último, se evaluó en deltametrina y se obtuvo resultados mayores, en EtOH de 75.73%, en DEF del 51.23%, PBO con 86.25% y DM con el 88.61% de incapacidad. Siguiendo el criterio de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017), se considera que el mecanismo metabólico está involucrado en la resistencia a insecticidas si el porcentaje de incapacitación es mayor o igual al 98%. En este caso, no se encontró un mecanismo metabólico involucrado. Por otro lado, un mecanismo no está involucrado si el porcentaje de incapacitación por sinergistas es menor al porcentaje de incapacitación con etanol absoluto, como lo es en el caso de deltametrina + DEF.

En todas las otras muestras, al ser los porcentajes mayores en los sinergistas que en los del etanol absoluto, podemos deducir que estas muestras poseen un mecanismo metabólico asociado a la resistencia de los insecticidas expuestos. (Datos no publicados VIMoRi, 2023)

Cuadro 1. *Porcentaje de incapacitación en dosis diagnósticas para la colonia Tikal, Guatemala, con los insecticidas DDT, deltametrina y permetrina.*

Insecticida	% de incapacitación
DDT	11.53
Deltametrina	57.34
Permetrina	7.21

Nota: Elaboración propia. El porcentaje de incapacitación se refiere a la cantidad de individuos derribados por insecticida, por lo que, a menor porcentaje de incapacitación, mayor será la resistencia al insecticida.

Cuadro 2. Porcentaje de incapacitación en bioensayo con sinergistas PBO, DEF y DM para la colonia Tikal, Guatemala con los insecticidas DDT, deltametrina y permetrina.

Insecticida+ sinergista	% de incapacitación
Permetrina+EtOH	6
Permetrina+DEF	22.95
Permetrina+PBO	18.45
Permetrina+DM	11.26
Deltametrina+EtOH	75.73
Deltametrina+DEF	51.23
Deltametrina+PBO	86.25
Deltametrina+DM	88.61

Nota: Elaboración propia. Porcentaje de incapacitación se refiere a la cantidad de individuos derribados por insecticida y sinergista, por lo que; a menor porcentaje de incapacitación, mayor será la resistencia al insecticida y se puede observar si la resistencia es conferida por enzimas o mutaciones en el sitio blanco.

2.2. Estudios de mutaciones del canal de sodio dependiente al voltaje KDR

En el estudio "Co-occurrence of kdr Mutations V1016I and F1534C and Its Association With Phenotypic Resistance to Pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations From Costa Rica", se analizaron las poblaciones de *Ae. aegypti* de las provincias de Puntarenas y Limón, Costa Rica, para determinar la presencia de

mutaciones en el gen del canal de sodio regulado por voltaje (VGSC) que están asociadas con la resistencia a insecticidas. Los resultados mostraron que ambas poblaciones eran resistentes a permethrin y deltamethrin. Además, se encontró que las mutaciones V1016I y F1534C estaban co-ocurriendo en las poblaciones resistentes a permethrin y deltamethrin, y que el alelo 1534C se había fijado en la población de Puntarenas (Zardkoohi, Castañeda, Lol, Castillo, Lopez, Rodriguez, y Padilla, 2019).

En un estudio realizado en poblaciones naturales de mosquitos *Aedes aegypti* en Venezuela, se investigó la presencia de las mutaciones V1016I y F1534C en el gen del canal de sodio regulado por voltaje, asociadas con resistencia a piretroides y DDT. Se observó que las frecuencias de las mutaciones variaban entre las poblaciones naturales, con valores de 0.01 a 0.37 para I1016 y de 0.35 a 1.0 para C1534. En una cepa seleccionada con deltametrina, la frecuencia de I1016 aumentó significativamente, mientras que la mutación C1534 se fijó rápidamente. Estos hallazgos resaltan una mayor prevalencia de la mutación C1534 y su rápida selección bajo presión de deltametrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* en Venezuela (Álvarez, Ponce, Saavedra-Rodriguez, López & Flores, 2014).

En la ciudad de Tapachula, México, los programas de control de mosquitos cambiaron de piretroides a organofosforados para la fumigación espacial en 2013, y el esquema de fumigación pasó de cobertura total a control focalizado. Cinco años después de implementada esta estrategia, se evaluó el estado y la variabilidad de la resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti* recolectados en 26 sitios de Tapachula. A pesar de que habían pasado 5 años desde la eliminación de los piretroides de los programas de control, *Ae. aegypti* seguía siendo altamente resistente a permetrina y deltametrina. Además, después de 5 años de uso de clorpirifós, los mosquitos en 15 de los 26 sitios mostraron resistencia moderada. Las frecuencias de las mutaciones V1016I y F1534C, que confieren resistencia a piretroides, variaron entre los sitios, con la mutación C1534 acercándose a la fijación en 23 sitios. Los perfiles de resistencia y las frecuencias alélicas de *kdr* variaron entre los sitios de Tapachula, sin un patrón espacial asociado (Solis-Santoyo, Rodriguez, Penilla, Saavedra-Rodriguez, Dzul-Manzanilla, Che-Mendoza, & Manrique-Saide, 2021)

El estudio "Fine-scale spatial and temporal dynamics of *kdr* haplotypes in *Aedes aegypti* from Mexico" realizado por Grossman, M. K., Rodriguez, J., Medina Barreiro, A.,

Lenhart, A., Manrique-Saide, P., & Vazquez-Prokopec, G. M. (2019) aborda la importancia de monitorear la susceptibilidad de las poblaciones de *Aedes aegypti* ante el aumento de la resistencia a insecticidas. Se evaluaron patrones de resistencia a nivel comunitario de cuatro haplotipos de resistencia al knockdown (*kdr*) en *Ae. aegypti* en 24 manzanas de una ciudad en el estado de Yucatán, México, durante dos años y en ambas estaciones. Los resultados mostraron que la selección de alelos *kdr* ocurre a escalas espaciales finas, destacando la necesidad de considerar este nivel para comprender mejor los procesos evolutivos de resistencia en poblaciones naturales.

3. JUSTIFICACIÓN

Los arbovirus que causan enfermedades, como el dengue, Zika y chikungunya, forman parte de un riesgo para la salud pública de los pobladores guatemaltecos en las áreas urbanas y rurales. Según la OMS (2016), el Dengue representa a una enfermedad de grave impacto epidemiológico, social y económico para la salud pública mundial. Laporta et., al, (2023) indica que según modelos de predicción de cambio climático se espera un cambio en la distribución de *Aedes aegypti* en diferentes maneras alrededor del mundo. En el hemisferio norte se ampliarán las distribuciones, mientras que en el sur ocurrirá lo contrario. Al no existir una cura definitiva para poder combatir estas enfermedades, la alternativa más segura es el control y el monitoreo de los vectores. En este caso, *Aedes aegypti* cumple como papel de vector para los tres virus ya mencionados. Lastimosamente, debido al poco interés y presupuesto otorgado por parte de los gobiernos y poblaciones, se ha utilizado excesivamente los insecticidas de la familia de los piretroides.

La deltametrina, un piretroide, es un químico de los más utilizados en toda América latina desde 1990 (Bisset, et al., 2009). Este uso sin control y generalizado, se traduce muchas veces en una resistencia a los piretroides. Lo cual implica una presión de selección que le confiere ventaja a las poblaciones con genes resistentes. En países de Latinoamérica se han reportado mutaciones conocidas como resistencia por noqueo (*kdr*). Estas mutaciones permiten la supervivencia a los mosquitos a pesar de ser sometidos a aplicaciones con insecticidas. Existen más de 50 mutaciones asociadas al canal de sodio controlado por voltaje en diferentes especies de mosquitos, pero las de mayor prevalencia en el género *Aedes* son las mutaciones F1534C, V1016I y V410L. Estas mutaciones están estrechamente ligadas a resistencias a ciertos piretroides, F1534C (permetrina), V1016I (deltametrina y permetrina) y V410L (deltaetrina y permetrina) (Saavedra et al., 2007;

Khalid et al., 2017; Dong, et al., 2014). En este caso, se evaluaron los genes de tres cuadrantes aleatorios dentro de la colonia San Benito, Tikal para determinar las muestras con mayor presencia de mutaciones *kdr*, observando la distribución espacial de las mismas. Se evaluaron un total de 30 muestras por cuadrante, en las tres mutaciones mencionadas con anterioridad. El estudio de la distribución espacial de mutaciones *kdr* se ha hecho en países como Colombia (Maestre-Serrano et al., 2022), Brasil (Souza, Lima, Galardo, et al., 2023), Costa Rica (Zardkoohi et al., 2020) y datos no publicados de Guatemala, en donde la distribución espacial es amplia y se enfocan en puntos muy separados. Este tipo de estudios, con una distribución reducida, solamente se ha realizado en Latinoamérica en países como México, en el cual se realizó un estudio a la distribución espacial a pequeña escala de las mutaciones *kdr*. Esto es de suma importancia, ya que la detección temprana de estas mutaciones contribuirá al mejoramiento y desarrollo de nuevas estrategias para controlar al vector *Aedes aegypti* en Guatemala.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- 4.1.1 Determinar la distribución espacial de la frecuencia alélica de mutaciones del gen del canal de sodio dependiente de voltaje (*kdr*) asociadas a la resistencia a insecticidas en mosquitos *Aedes aegypti* de Guatemala.

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1 Determinar el equilibrio de Hardy Weinberg de las mutaciones V1016I y F1534C en las poblaciones de la colonia Tikal, San Benito, Petén, Guatemala.
- 4.2.2 Determinar la frecuencia de las mutaciones que confieren resistencia por noqueo en la población de la colonia Tikal, San Benito, Petén, Guatemala.
- 4.2.3 Determinar la distribución espacial de las mutaciones encontradas en las muestras de la colonia Tikal, San Benito, Petén, Guatemala.

5. HIPÓTESIS

5.1 Hipótesis nula

La resistencia a insecticidas mediada por *kdr* en *Aedes aegypti*, se distribuye uniformemente a través de toda el área de estudio en la colonia Tikal, San Benito, Petén, Guatemala.

5.2 Hipótesis alternativa

La resistencia a insecticidas mediada por *kdr* en *Aedes aegypti*, no se distribuye uniformemente a través del área de estudio en la colonia Tikal, San Benito, Petén, Guatemala.

6. MARCO TEÓRICO

6.1. Arbovirus

Los arbovirus, por su definición en inglés, (ARthropod-Borne viruses) usan artrópodos vectores como el medio principal de transmisión. Entre ellos, los mosquitos, garrapatas y flebótomos (Cleton et al., 2012). Dentro de la amplia variedad de arbovirus, en América Latina, son tres virus transmitidos por vector los que más problemas causan; el Dengue (DENV), el virus Zika (ZIKV) y el virus Chikungunya (CHIKV). Estos virus son transmitidos por culícidos, pertenecientes al género *Aedes*, como lo son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Powell, 2018).

El Dengue es un Flavivirus de la familia Flaviviridae, del cual existen cuatro serotipos, transmitidos a primates no humanos (forma selvática) y a humanos (forma humana). Estos serotipos comparten hasta el 65% de su genoma y son transmitidos principalmente por mosquitos del género *Aedes*. El dengue es una de las enfermedades reemergentes con mayor importancia hoy en día, ya que es causante de entre 50 a 100 millones de casos anuales en más de 100 países (OPS, 2016). Este se presenta con un cuadro gripal o febril indiferenciado (dengue clásico) y en algunos casos como fiebre por dengue hemorrágico, el cual posee clasificaciones I y II o con síndrome de shock por dengue en la clasificación III y IV (OMS, 2009) Se estima que este virus es causante de hasta 24 mil muertes al año, siendo una gran parte de estos niños. En 1981, se dio la primera epidemia de dengue hemorrágico en América, específicamente en Cuba (OPS, 1997). En la actualidad, es la enfermedad más importante que reemerge periódicamente en toda América (Fajardo et al., 2012).

La Chinkungunya por otro lado, es una enfermedad relativamente nueva, que desde el 2004 ha causado enormes epidemias. Este es un virus ARN que pertenece al género *Alphavirus* de la familia Tofaviridae y está constituido por una hebra positiva de

ARN. El virus chikungunya provoca cambios intraestructurales inducidos dentro de las células afectadas. Existen tres genotipos: el oeste de África, este/sur/centro africano y los epidémicos asiáticos (Uribarren, 2015). Los vectores adquieren el virus a partir de un huésped virémico y luego de diez días, el mosquito es capaz de transmitir el virus. La transmisión puede darse por picadura y por vía transplacentaria, de madre virémica al recién nacido, también se sospecha que provoca abortos si ocurre en el primer trimestre del embarazo (Martínez et al., 2015).

El virus Zika es un arbovirus de la familia Flaviviridae que contiene una sola cadena de ARN. Se han identificado dos linajes (asiático y africano). Aunque cuatro de cinco pacientes son asintomáticos, aparte de los síntomas comunes como la fiebre y artritis, se han descrito casos con complicaciones neurológicas e inmunitarias, así como malformaciones congénitas y puede ser transmitido sexualmente (Ioos et al., 2014).

Debido a la ausencia de un medicamento efectivo o vacunas para el control del dengue, las infecciones por dengue, chikungunya y Zika seguirán emergiendo si no se logra controlar a los vectores que las transmiten, este caso *Aedes aegypti* (Morrison et al., 2008).

6.2. *Aedes aegypti*

Aedes aegypti pertenece a las regiones tropicales y subtropicales del globo (entre 35° latitud norte y 35° latitud sur). Los mosquitos están muy relacionados con el hábitat humano, esto debido a que las etapas inmaduras se encuentran en contenedores de agua y en ambientes domésticos, así como las hembras, que se alimentan y descansan en interiores (García et al., 2012). *Aedes aegypti* posee un ciclo de vida que va desde el huevo, cuatro estadios larvales, un estadio de pupa y el adulto. El huevo mide un aproximado de 1mm de longitud y posee forma alargada (Boyce, 1911). Al momento de la ovipostura, los huevos poseen un color blanco, pero rápidamente se tornan negro brillante. Estos huevos son fecundados durante la postura y el desarrollo embrionario se completa de 48 horas (condiciones adecuadas) a 5 días (temperaturas bajas) (De Buck, 1938). Luego de este periodo embrionario, los huevos son capaces de resistir periodos de desecación de hasta un año. Al ser humedecidos, la acción bacteriana de la materia contenida en el agua ayuda a disminuir la tensión del oxígeno y proporciona un estímulo para la eclosión. Esta resistencia

a la desecación en los huevos es uno de los principales obstáculos para el control de estos organismos (Nelson, 1986 & Christophers, 1960). Las larvas y pupas son exclusivamente acuáticas, en donde se da el periodo de alimentación y crecimiento. Las larvas poseen una cabeza, tórax ovoide y abdomen de 9 segmentos. El segmento posterior y anal poseen cuatro branquias lobuladas para regulación osmótica y un sifón o tubo de aire para la respiración en la superficie del agua. Las características más distintivas de las larvas son las dos prominentes espinas laterales a cada lado del tórax y la hilera de 7 a 12 escamas del peine en el octavo segmento abdominal (Nelson, 1986).

La duración del estadio larval depende de la temperatura, el alimento y la densidad de larvas. En condiciones óptimas, el periodo larval desde la eclosión a la pupación es de 5 días, pero lo normal va de 7 a 14 días. Al llegar el periodo de pupa, estos no se alimentan y solamente ocurre la metamorfosis del estado larval al adulto. Las pupas de los mosquitos tienden a reaccionar a estímulos externos, como vibraciones y se desplazan por el recipiente. Este estadio dura de 2 a 3 días. El mosquito adulto, posee palpos cortos y adopta una posición horizontal durante el reposo. Poseen un abdomen agudo y no poseen cerdas espiraculares (Christophers, 1960). Posee bandas blancas en las bases de los segmentos tarsales y el cuerpo oscuro, así como un diseño en forma de lira en el mesonoto. Al crecer el diseño de lira puede desaparecer, pero posee las escamas blancas en cípeo y en palpos, lo cual se puede utilizar para la identificación. El macho posee antenas plumosas y palpos más largos. Para aparearse los mosquitos utilizan las 24 horas después de la metamorfosis. Las hembras se alimentan de sangre y muchas veces los machos aprovechan estos momentos para aparearse (Nelson, 1986).

Las hembras se alimentan de sangre de vertebrados, con una predilección por el humano. Los machos no poseen partes bucales para chupar sangre, por lo que consumen néctar de plantas para suplir los requerimientos energéticos. El valor del rango de vuelo es entre el máximo valor de vuelo de 160 metros y el valor promedio de 56 metros según Muir & Kay, 1998. Poseen una longevidad de meses en el laboratorio, pero de unas pocas semanas en la naturaleza o hasta 5 a 9 días (Milan et al., 1995 & Nelson, 1986).

6.3. Control de vectores

La especie *Aedes aegypti* es el principal vector urbano de dengue, chikungunya y Zika (Gubler, 2004) y ya que los mosquitos implican un riesgo enorme para las comunidades, se implementan acciones para la reducción y eliminación de estos (Cruz, 2002). La mayoría de las acciones que se toman para la reducción de los vectores incluye una educación comunitaria, modificaciones al ambiente (como el manejo de los sitios larvales) y principalmente, el uso de insecticidas químicos (Achee et al., 2019) el cual se debería de implementar en conjunto con un manejo de vectores integral (IVM por sus siglas en inglés) (WHO, 2012). Para seguir el IVM se recomienda identificar los sitios larvales y el hábitat de las hembras adultas. El larvicida, como parte del manejo ambiental, se debe aplicar utilizando un rociador con presión, polvo o disolver las fórmulas sólidas. Por otro lado, para el control de adultos, se recomienda utilizar tratamientos de rociado intradomiciliario o aplicaciones espaciales, donde solamente se recomienda el primero para situaciones especiales y el segundo es de uso más común y con efecto en adultos y larvas (WHO, 2012).

La OMS tiene aprobadas cuatro clases de insecticidas para uso en exteriores, entre ellos se encuentran los piretroides, organofosforados, neonicotinoides y carbamatos. El control de *Aedes aegypti* con estos insecticidas mencionados, es una combinación de métodos, entre ellos: el ultra bajo volumen (ULV, por sus siglas en inglés), fumigación espacial de interiores (ISS), rociado intradomiciliario (IRS por sus siglas en inglés), reducción de fuentes y uso larvicidas (Achee et al., 2019). El método de ultra bajo volumen (UVL) se ha utilizado ampliamente en los últimos años con piretroides y organofosforados. Esto se traduce a un uso generalizado y continuo de un pequeño número de insecticidas, lo que resulta en la aparición de poblaciones con resistencia a estos compuestos. Lastimosamente, las regiones que más han sido afectadas con resistencia son regiones de Latinoamérica debido al mal uso de insecticidas. Según el programa de monitoreo entomológico, reporta que esta frecuencia de resistencia se expande globalmente y el UVL sigue como el método preferido (Moyes et al., 2017; Gubler & Clark, 1995). El DDT y

piretroides presentan resistencia en al menos la mitad de los países muestreados por la OMS en 2018 para vectores de malaria.

6.4. Insecticidas

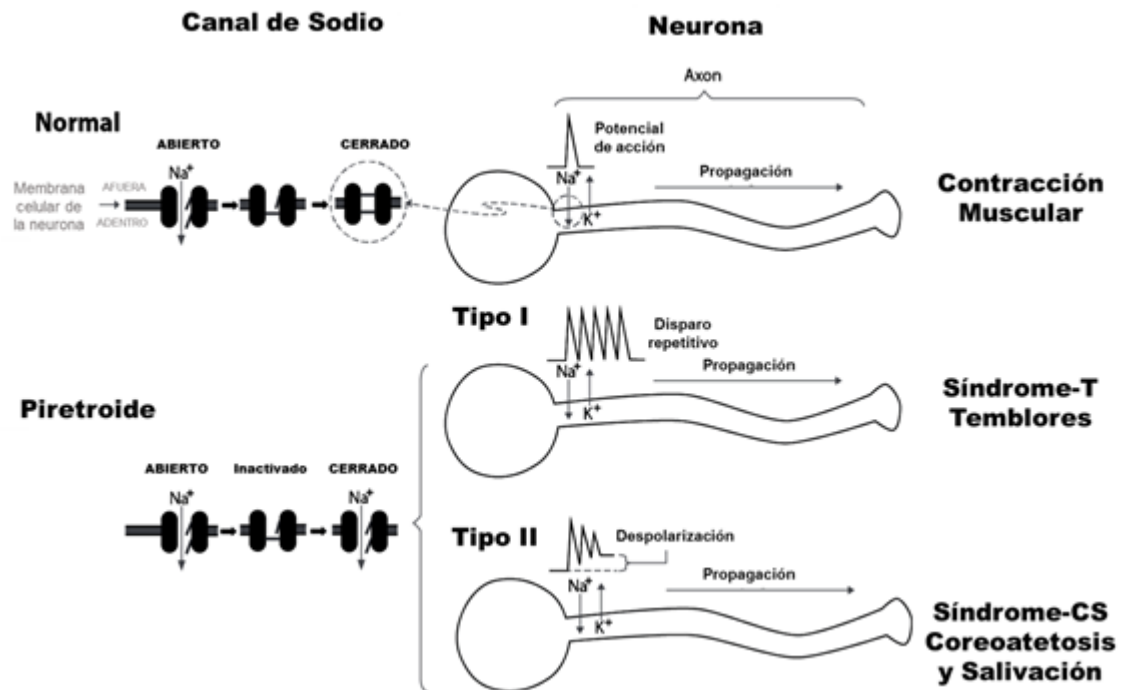
Los piretroides del tipo I, son compuestos tóxicos para los insectos y peces, pero poseen la ventaja de no ser tóxico para los mamíferos (IPCS, 1990). Son derivados de las piretrinas, que son compuestos químicos de plantas, pero modificados químicamente al eliminar un grupo ciano. Esta modificación química, los hace más estables a la luz solar y el calor. Son relativamente biodegradables en la naturaleza. Entre los piretroides más famosos se encuentra la aletrina, que provoca parálisis en insectos antes de matarlos (Casida et al., 1983).

La permetrina, que induce al sistema nervioso central a ser altamente sensible al estímulo por órganos sensoriales, en donde la permetrina bloquea el movimiento de los iones de sodio desde fuera hacia adentro de las células nerviosas (Casida et al., 1983). Por otro lado, los piretroides tipo II, con un α -Ciano extra, posee insecticidas como la deltametrina, cuyo modo de acción es sobre el sistema nervioso central. Y donde la muerte del insecto ocurre por daño irreversible del sistema nervioso (He, 1989).

El mecanismo de acción de los piretroides funciona de la misma manera en mamíferos que en insectos, con una interrupción en la bomba de sodio de las neuronas (Narahashi, 1996; Ray, 2000). Esto provoca una interferencia en el envío de impulsos a nivel neuronal. Se unen a las subunidades α de los canales de sodio dependientes de voltaje y provocan lentitud en la activación y en la tasa de inactivación de los canales de sodio, esto provoca un estado de hiperexcitación (Ensley, 2007; Valentine, 1990).

Los piretroides de tipo II provocan un cambio en el retraso de inactivación de los canales de hasta 10 minutos más que los piretroides de tipo I (Ray & Fry, 2006).

Figura 1. *Funcionamiento normal de los canales de sodio y funcionamiento con piretroides.*



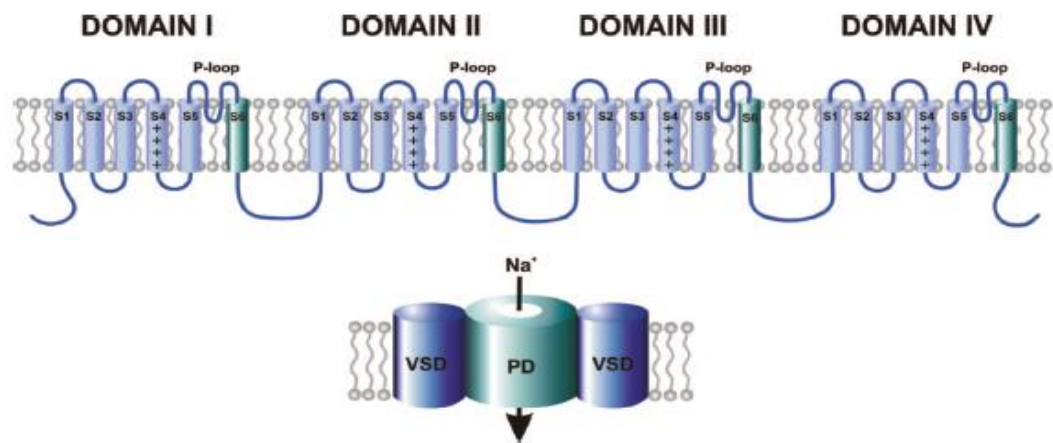
Nota: Adaptada de Hénault-Ethier (2015). El sodio pasa en el normal y se cierra luego del potencial de acción. Al estar expuesto, la función incorrecta lleva a permanecer abierto el canal de sodio, en donde ocurre un disparo repetitivo (piretroides I) o una despolarización (Piretroides II) llevando a temblores o movimientos involuntarios.

6.5. Resistencia a insecticidas y mecanismos

La resistencia a los insecticidas es causada por una amplia variedad de cambios fisiológicos en los mosquitos, que incluye, alteración estructural en el sitio blanco del insecticida, incrementando así la actividad de las enzimas que están asociadas con la desintoxicación que causa el insecticida, así como cambios en la cutícula. Una sustitución no sinónima, en el canal de sodio activado por voltaje en la proteína transmembranal (para) puede provocar una resistencia de noqueo (*kdr*), la cual afecta la función de los piretroides y otros insecticidas al reducir la unión en los sitios objetivos (Saavedra-Rodriguez et al.,

2007; Martins et al., 2009; Dong et al., 2014). El “para” del canal de sodio activado por voltaje (Nav) del sistema nervioso del insecto, deriva su nombre de la locación dentro del locus de parálisis en *Drosophila* dentro del cromosoma X. Se encontró una estructura y función homóloga con la subunidad de los canales Nav de los mamíferos. Esta consta de 4 dominios internos homólogos (I-IV) conectados con enlaces intracelulares a cada dominio, con lo que resultan en 6 segmentos que atraviesan la membrana (S1-S6) que están unidos por bucles (Fig. 2)

Figura 2. Topología transmembranal del canal de sodio activado por voltaje



Nota: Adaptada de Davies et al, (2007). La subunidad formadora de poros posee una sola cadena polipeptídica con cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno posee seis hélices transmembranales (S1-S6). Las hélices son responsables de la sensibilidad al voltaje del canal y se ensamblan para formar cuatro dominios independientes de detección de voltaje (VSD).

Esta es una mutación de nucleótidos que altera la secuencia de los aminoácidos en las proteínas. Existen muchos puntos de mutación que permiten un efecto *kdr* en la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*. En América, se conocen sustituciones de codones en el canal de sodio activado por voltaje, fuertemente relacionadas con la resistencia a piretroides y DDT. Las sustituciones más comunes son en los codones 1016 (V1016I) y 1534 (F1534C) en los dominios II y III, en donde se cambia la valina por

isoleucina (V1016I) y una felalanina por cisteína (F1534C) (Savaaedra-Rodriguez et al., 2007; Harris et al., 2010 & Hu et al., 2011). Estas sustituciones han sido estudiadas; recientemente, se ha sugerido que existe una co-evolución de estos dos marcadores (Vera et al., 2015), pero se aclara el impacto que este fenotipo pueda causar.

6.6. Distribución de espacial de genes “*kdr*”.

En 2015, Saavedra-Rodríguez et al. realizaron una investigación con la evolución local de la resistencia a insecticidas, observando el flujo genético entre colecciones de *Aedes aegypti* en Yucatán, México. El resultado de la investigación sugiere un modelo general para el movimiento de los genes *kdr* en Yucatán. Observaron altas tasas de flujo genético de poblaciones en un rango de 150 km. El flujo de genes dio a conocer los mismos patrones que aquellas áreas donde se aplica insecticida no regulado, por lo que llegaron a la conclusión de que la frecuencia de alelos de resistencia se eleva, al aumentar el uso de insecticidas. Esto indica que la susceptibilidad de piretroides puede persistir localmente, incluso con un alto flujo genético de por medio y altas frecuencias generalizadas de alelos a los piretroides. De esta forma, se comprueba la existencia de “islas” críticas de susceptibilidad a los piretroides, las cuales podrían poseer una fuente de alelos susceptibles que permitan un mejor control de estos vectores.

7. METODOLOGÍA

7.1. Población Tikal, San Benito, Petén, Guatemala

Las muestras trabajadas son de la colonia Tikal (figura 3), la cual es una zona urbanizada y rodeada de comercios y casas particulares, así como escuelas y una cancha polideportiva. Esta colonia posee una distribución de diez manzanas, en donde se recolectaron huevos. La selección del sitio de estudio se realizó por la Unidad de Entomología Médica, CES-UVG en 2021 (datos no publicados), esta se basó en el índice de infestación de viviendas por *Aedes spp.*, control de vectores basado en insecticidas, presencia de resistencia a insecticidas, accesibilidad y seguridad del sitio. Se seleccionó un área de aproximadamente 6.8 km² (2.6km x 2.6km) el cual se basa en el área mínima en la que se ha encontrado una variación espacial significativa en las frecuencias alélicas de mutaciones *kdr* en *Ae. aegypti* (Grossman et al., 2019). Por último, se seleccionaron tres manzanas al azar para realizar el estudio de las dos mutaciones seleccionadas, se utilizaron tres manzanas debido al reducido espacio en el cual se realizó el estudio.

Figura 3. Mapa de la colonia Tikal, San Benito, Petén, Guatemala y la ubicación de las trampas



Nota: Elaboración propia.

7.2. Colecta de material biológico

La colecta de material biológico se realizó como parte del proyecto de Vigilancia Molecular de la Resistencia en Centro América y República Dominicana, ViMoRi. Seleccionaron 11 manzanas de la colonia Tikal, en Guatemala. Se realizó una colecta de *Aedes aegypti*. Se colocaron de 4 a 8 ovitrampas (recipientes cilíndricos de color negro con 11cm de diámetro y 14cm de altura) por manzana, material recolectado por el personal de entomología del programa de control de vectores de la dirección de áreas de Petén norte como parte de su sistema de vigilancia. Estas ovitrampas estaban recubiertas en la parte interna por un sustrato (papel de germinación) el cual permitió la colecta de huevos de mosquitos del género *Aedes*. El periodo de colecta fue por cuatro semanas consecutivas entre el mes de abril y mayo del 2021, periodo que pertenece al final de la época seca, permitiendo la detección de resistencia a insecticidas (Grossman et al., 2019; Matowo et al., 2019). Durante las cuatro semanas se visitó cada cuatro días las ovitrampas y en cada visita se removió el papel de germinación y se colocó uno nuevo.

Estos huevos colectados se trasladaron a las instalaciones de la Unidad de Entomología Médica, CES y fueron criados hasta adultos. Estos sirvieron para la creación de una generación filial F1, por medio de ovipostura, para un posterior estudio con bioensayos. Posteriormente, las F0 se guardaron en RNAlater, se almacenaron a 4°C por 24 horas y se congelaron a -20°C. Estas muestras F0 almacenadas son las utilizadas en este estudio. De estas 11 manzanas colectadas, se seleccionaron 3 elegidas aleatoriamente y 30 muestras individuales de cada manzana para realizar la extracción de ADN (hembras y machos). Tomando como base Hale, et al., 2014, donde se indica que un tamaño mínimo de muestra de 25-30 individuos es representativo, ya que arriba de este número la diferencia de información perdida no es significativa.

7.3. Extracción de ADN genómico en mosquitos *Aedes aegypti*

ADN genómico fue extraído de todos los mosquitos elegidos al azar, con un total de 67 hembras y 23 machos, seleccionados de manera individual. Los mosquitos fueron individualizados en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se realizó un lavado con 1 ml de agua DEPC para retirar restos de ARNLater, a cada individuo se le agregó 100 μ L de DNAzol y fue macerado con un pistilo de plástico estéril hasta no ver partes reconocibles.

Se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 10,400 rpm (Centrífuga Hettich Mikro 120) a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante de cada muestra a un nuevo tubo de 1.5 mL estéril rotulado con el número de muestra (ID) del mosquito, fecha y las siglas ADN. El pellet del macerado fue almacenado a -20°C para posteriores extracciones. Se agregaron 500 μ L de etanol absoluto a cada tubo que contenía el sobrenadante y fue mezclado por inversión 8 veces. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 3 minutos y luego se centrifugó a 6,600 rpm (Centrífuga Hettich Mikro 120) por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante de cada muestra fue removido y se lavó el pellet con 800 μ L de etanol 70%.

Posteriormente fue mezclado por inversión 6 veces y centrifugado a 6,600 rpm (Centrífuga Hettich Mikro 120) por 5 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente se removió el sobrenadante de cada muestra, y el pellet fue lavado con 800 μ L de etanol 70%, se mezcló por inversión 6 veces y se centrifugó a 6,600 rpm (Centrífuga Hettich Mikro 120) por 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez más fue removido el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente, invirtiendo el tubo abierto boca abajo sobre una toalla de papel dentro de una campana de flujo laminar hasta que se encontró totalmente seco por 30 a 45 minutos. Posteriormente se re- suspendió el pellet en 50 μ L de agua DEPC (AMBION) y fue almacenado a 4°C y se cuantificó inmediatamente utilizando el Nanodrop.

7.4. Cuantificación de ADN

Para cuantificar el ADN genómico en cada muestra, se empleó el espectrofotómetro NanoDrop One de Thermo Scientific. Cada muestra se mezcló con un vortex y se centrifugó brevemente. Posteriormente, se añadió 1 μL de agua DEPC al NanoDrop One como blanco de lectura. A continuación, se colocó 1 μL de cada muestra individualmente para su cuantificación. Es importante destacar que las muestras debían tener una concentración superior a 8 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para poder ser analizadas mediante qPCR. Aquellas muestras que sobrepasaban la concentración fueron diluidas con agua DEPC a una concentración final de 8 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

7.5. PCR convencional, detección de controles positivos

Se realizó un PCR convencional a muestras que se sospechaban serían homocigotas resistentes, homocigotas susceptibles y heterocigotas. Se realizó un PCR convencional de las mutaciones V1016I y F1534C.

Se utilizaron los primers IIS5-6F y IIS5-6R (5'-ATCGCTTCCCGGACAAGAC-3', 5'-GTTGGCGATGTTCTGACTTGA-3') a una concentración de 10 μM para la mutación V1016I con un volumen de 0.5 μl , 10.5 μl de agua DEPC y 12.5 μl de Go Taq HotStart Colorless Master Mix. Se trasladó a la campana de ADN para agregar 1 μl de la muestra de ADN, a una concentración de 8 $\text{ng}/\mu\text{L}$, a la reacción. Para amplificar el canal de sodio se utilizaron las siguientes condiciones en el termociclador (SimpliAmp Thermal Cycler) de amplificación del codón 1016: Activación (95C/2min), 1 ciclo; desnaturalización (94C/30 seg), Hibridación (50C/30seg), Extensión (72/1min), 40 ciclos; y extensión final (72C/10min) por 40 ciclos (Al Nazawi et al., 2017).

Para la mutación F1534C se utiliza 26.5 μl de agua DEPC, 20.5 μl de Go Taq HotStart Colorless Master Mix y 0.5 μl a 50 μM de los primers AaNa31F (5'-CCCATTGCTGCCTAAACACT-3') y AaNa31R (5'-CTTTTCGCAGTCGTTGATGA-3'). Al terminar se trasladó a campana donde se le colocó 1 μl de ADN a una concentración

de 8 ng/μL. Para amplificar el canal de sodio se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación del codón 1534: Activación (95C/2min), 1 ciclo; desnaturalización (94C/30 seg), Hibridación (59C/30seg), Extensión (72/1min), 40 ciclos; extensión final (72C/10min) por 35 ciclos (Harris et al., 2010). Al finalizar el tiempo en el termociclador se visualizó el producto con un gel de agarosa de 1%, con buffer TBE 1X y 1.2ul de bromuro de etidio. Se cargaron las muestras (2ul) mezcladas con 2ul de loading dye 1x, seguido se conectó el sistema de electroforesis y se corrió el gel por 40 minutos a un voltaje de 100. Se colocó el gel en el transiluminador (UVP) y se verificó la amplificación de las muestras en el gen del canal de sodio. Las muestras con resultados positivos se mandaron a secuenciar a Macrogen USA. Se utilizó el programa MEGA para analizar las secuencias e identificar si se trataba de homocigotas resistentes, homocigotas susceptibles o heterocigotas.

7.6. PCR tiempo real para la detección de mutaciones *kdr* en el canal de sodio

7.6.1. Mutación *V1016I*

Se utilizó un templado digital para la introducción de las muestras y controles, detallando que las muestras son de ADN genómico y los controles obtenidos de las muestras enviadas a secuenciar con un PCR convencional. Este sistema ajusta automáticamente la cantidad de reactivos según el número de muestras, tal como se describe en los anexos, siguiendo la plantilla suministrada por la Unidad de Entomología Médica, CES. Se procedió a preparar las diluciones de las muestras a una concentración de 8 ng/μL de ADN para cada reacción.

El *master mix* se preparó conforme a la plantilla digital, asegurándose de agitar cada componente antes de su incorporación. En cada reacción, se agregaron 1.5 μL de agua DEPC, 0.5 μL de los cebadores Val1016_F, Ile1016_F, Ile1016_R a 25 μM (utilizando los cebadores publicados por Saavedra-Rodriguez et al., 2007) y 5 μL de SYBRGreen (PowerUp®). Una vez listo el *master mix*, se trasladó a la campana de ADN, donde se añadieron 2 μL de ADN a 8 ng/μL por reacción.

La amplificación se llevó a cabo con las siguientes etapas de temperatura en un termociclador QuantStudio 3 (appliedbiosystems): activación (95°C/2 min), desnaturalización (95°C/10 sec), hibridización (60°C/10 sec) y extensión (72°C/30 sec) durante 40 ciclos. Se incluyó una curva de disociación (melting curve) con inicio (95°C/10 sec), inicio de rampa (65°C/2 sec) y final (95°C/2 sec), siguiendo el protocolo proporcionado por la Unidad de Entomología Médica, CES. Es importante destacar que este procedimiento se fundamenta en una metodología previamente publicada por Saavedra-Rodriguez (2007) con adaptaciones específicas.

7.6.1. Mutación F1534C

Se utilizó el mismo templado usado para la mutación V1016I pero con los reactivos necesarios para la mutación F1534C, los cuales se describen a continuación.

Se preparó el *master mix* según la plantilla digital, se agitó cada componente antes de agregarlo. Se agrega por reacción agua DEPC (1.84ul), primers F1534-f (0.5ul), F1534-r (0.5ul), Cys1534-f (0.165ul) (10uM) (Yanola et al., 2011) y Sybr green (PowerUp®) (5 ul) por reacción. Luego de preparar el *master mix*, este se traslada ya alicuotado y en una gradilla fría a la campana de ADN, en donde se le agrega 2ul de ADN a 8ng/ul. La reacción amplifica en las siguientes temperaturas: Activación (95C/3min), desnaturalización (95C/10 sec), hibridización (57C/10sec) y extensión (72C/30 sec) en 40 ciclos. Con una curva de disociación (Melting curve) de Inicio (95C/10sec), Inicio de rampa (65C/5sec) y Fin (95C/5sec).

7.7. Curva de concentración para PCR tiempo real

Se realizó una curva de concentraciones con las muestras utilizadas como control: RC1 (muestra de cepa Rockefeller) y muestras: 21TA30 (muestra resistente F1534C), 21TA34 (muestra resistente V1016I) y 21TA385 (muestra que demostró problemas para amplificar). Se realizaron diluciones de 12ng/ul, 10g/ul, 8g/ul, 6g/ul, 4g/ul y 2g/ul. Estas muestras se corrieron en un qPCR para cada mutación y así se determinó la concentración más eficiente para utilizar por mutación y crear así controles positivos para futuras muestras.

7.8. Frecuencia de alelos presentes en las manzanas

Se analizaron los alelos de las muestras mandadas a secuenciar en MEGAx (Stecher et al., 2018). Con los resultados del PCR tiempo real, se realizó un análisis de la frecuencia de mutaciones, alelos silvestres y heterocigotos presentes en cada una de las manzanas seleccionadas. Se calculó la frecuencia alélica de cada una de las mutaciones y de la incidencia de mutaciones por manzana. Por último se calculó la prueba de estadístico de chi cuadrado para el equilibrio de Hadry-Weinberg, con el cual se puede comparar la frecuencia genotípica con la frecuencia esperada de Hardy-Weinberg. La distribución de las frecuencias de haplotipos se graficó en mapas realizados en QGIS 2.18 (QGIS Development Team, 2016) .

8. RESULTADOS

Cuadro 3. Frecuencias genotípicas y alélicas de las mutaciones *kdr* V1016I y F1534C en poblaciones de *Aedes aegypti* de la colonia Tikal, San Benito, Guatemala.

Manzana	V1016I				F1534C				WE _x ²	
	/I	/I	/V	F recuencia	/C	/C	/F	F recuencia		
7	0	9		.96	.03	9.12	0		A	
1	0	8		.93	.06	0.39	9	.96	.03	9.12
4	6/29*	5		.96	.03	3.97	6	.89	.10	7.79

Nota: Elaboración propia. Manzana: identificación de la zona de muestreo, N: tamaño de muestra, frecuencias genotípicas y alélicas para cada mutación, valor del estadístico de prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg (HWEX2) para cada mutación y población. *26 muestras evaluadas para la mutación V1016I y 29 muestras evaluadas para la mutación F135C

Este cuadro presenta los datos de las frecuencias genotípicas y alélicas de las mutaciones *kdr* V1016I y F1534C en muestras de *Aedes aegypti* recolectadas en la colonia Tikal, San Benito, Guatemala. Los resultados muestran que las poblaciones de *Aedes aegypti* en esta región presentan altas frecuencias de las mutaciones *kdr* V1016I y F1534C, lo cual puede estar asociado a la resistencia a insecticidas piretroides en esta especie vectora.

Cuadro 4. Frecuencias genotípicas de resistencia *kdr* en poblaciones de *Aedes aegypti* de la colonia Tikal, San Benito, Guatemala.

Manzana	N	Frecuencia genotípica			
		II/CC	II/FF	VV/CC	VV/FF
		RR/RR	RR/SS	SS/RR	SS/SS
1	30	0.93 (28)	0 (0)	0 (0)	0.07 (2)
4	26	0.92 (24)	0.04 (1)	0.04 (1)	0 (0)
7	30	0.96 (29)	0 (0)	0.04 (1)	0 (0)

Nota: Elaboración propia

Este cuadro presenta las frecuencias genotípicas de resistencia *kdr* en muestras de *Aedes aegypti* recolectadas en la colonia Tikal, San Benito, Guatemala. Los datos muestran la distribución de los genotipos II/CC(RR/RR), II/FF(RR/SS), VV/CC(SS/RR), VV/FF(SS/SS) en las manzanas 1, 4 y 7, junto con las frecuencias correspondientes y la cantidad de muestras por genotipo entre paréntesis.

Se evaluaron 30 muestras en dos de las manzanas, 26 para un alelo (1016) y 29 para el otro (1534) en la manzana 4, debido a que algunas muestras no amplificaron correctamente. Se evidencia una alta frecuencia de la doble mutación en las tres manzanas evaluadas. Al comparar el valor de χ^2 con el valor crítico de la distribución chi cuadrado con 1 grado de libertad, a un nivel de significancia deseado ($\alpha = 0.05$) de 3.84, se supera este valor. Esto indica que las poblaciones no están en equilibrio de Hardy-Weinberg. Se observaron solamente cinco muestras con alelos homocigotos susceptibles y dos con doble alelo susceptible en las 89 muestras evaluadas.

Figura 4. Mapa de la distribución de la frecuencia alélica de *Aedes aegypti* en las mutaciones F1534C y V1016I en colonia Tikal, San Benito, Guatemala.



Nota: Elaboración propia

En la Figura 7, se observa la distribución espacial de la frecuencia de mutaciones, en donde el azul profundo expresa los alelos resistentes (II/CC); un celeste más claro, un alelo resistente y uno susceptible (II/FF); la siguiente tonalidad de celeste, un alelo susceptible y uno resistente (VV/CC); y el celeste más claro, dos alelos susceptibles (VV/FF).

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El objetivo principal de esta investigación fue determinar la distribución espacial de la frecuencia de mutaciones alélicas del gen del canal de sodio dependiente de voltaje (*kdr*) asociadas a la resistencia a insecticidas en mosquitos *Aedes aegypti* de Guatemala. Para cumplir con este objetivo se optimizó la metodología del PCR tiempo real otorgada por la Unidad de Entomología Médica y Malaria del CES, al realizar cambios en la concentración de ADN utilizado y se realizó la identificación de controles positivos para ambos alelos (ver anexos). En el cuadro 4 y 5 se observan los resultados de las 89 muestras evaluadas para los dos alelos, en estas se puede notar que los alelos resistentes están presentes en las 3 manzanas muestreadas.

Los resultados de los bioensayos de la botella de CDC, realizados por la Unidad de Entomología Médica y Malaria (cuadro 1), nos dan indicios a que existan mutaciones asociadas al gen del canal de sodio dependiente de voltaje (*kdr*). Podemos observar la resistencia que poseen a piretroides en dosis y tiempo diagnósticos; Deltametrina (57.4% de incapacidad) y Permetrina (7.21% de incapacidad). Estos resultados indican que las poblaciones poseen resistencia fenotípica. Para saber si la resistencia es conferida por genes metabólicos o por el canal de sodio dependiente de voltaje (*kdr*), se realizaron los bioensayos de botella de CDC con sinergistas. Los resultados no indican evidencia significativa (mortalidad <90%) que demuestre interferencia metabólica en las poblaciones de San Benito, Tikal, Guatemala. Por consiguiente, para comprobar si existe resistencia por *kdr*, se realizó el genotipado para las dos mutaciones asociadas F1534C y V1016I. Se ha reportado que la co-ocurrencia de estas mutaciones está presente en América y que confiere resistencia a los piretroides (Chen et al. 2019).

En el cuadro 4 se observa que la prueba de chi cuadrado para el equilibrio de Hardy Weinberg indica un resultado mayor al de una población en equilibrio (<3.84), lo que indica

que las poblaciones presentan desequilibrio para ambas mutaciones, o no se mantienen constantes entre generaciones. Esto indica que existen fuerzas evolutivas actuando sobre la población, resultando en una alteración de alelos. Estas alteraciones pueden ser provocadas por una selección diferencial, migración, endogamia o apareamientos no aleatorios. Esta información coincide con la investigación de Fisher et., al (2023), en donde se observó el fitness cost (costo de aptitud) en la pérdida de la mutación F1534C en 7 generaciones en ausencia de la presión de selección por insecticidas. Estos datos nos dan un indicio de lo ocurrido con las poblaciones muestreadas. Debido a que en la colonia San Benito, Tikal, Guatemala, se usan piretroides con cierta periodicidad para el control de vectores. Por lo que las muestras colectadas posiblemente poseían una presión de selección para la resistencia a piretroides en el canal de sodio dependiente de voltaje (*kdr*). Como se evidencia en la tabla 5, se observó una alta frecuencia de la co-ocurrencia de los alelos mutantes V1016I y F1534C en las tres manzanas evaluadas. Esto sugiere una posible resistencia a piretroides, en especial la mutación V1016I, la cual, según Chen (2019) posee un efecto de resistencia a los piretroides tipo I y II. Otros estudios correlacionan la presencia de la mutación V1016I con la resistencia fenotípica (Deming et al. 2016). Se debe de resaltar que en Guatemala, el insecticida autorizado por el ministerio de salud para el control de vectores es Deltametrina, un piretroide tipo II.

En las tres manzanas evaluadas se observa una frecuencia de 0.93 a 0.96 en la mutación V1016I, y aunque no se encontró ningún heterocigoto en las muestras, la frecuencia de los alelos silvestres es muy baja comparada con la de los mutantes (0.03-0.06). En este alelo no podemos ver mayor diferencia entre manzanas, esto indica que las tres manzanas posiblemente se encuentren bajo una misma presión selectiva de resistencia a piretroides tipo II.

En la mutación F1534C, se observó una frecuencia alta, mayor a la de la mutación V1016I. Se observó que en la manzana 7 el 100% de las muestras evaluadas poseen el alelo asociado a la resistencia en esta mutación, indicando que la mutación está fijada. Se observó también que en manzana 1 y 4 se tiene una frecuencia de 0.96 y 0.89 respectivamente, lo que nos indica una diferencia entre manzanas, pero ninguna cumple con el equilibrio de Hardy-Weinberg, demostrando así que existe una presión en estas poblaciones, aunque

posiblemente a diferente intensidad. Al tener las manzanas una distancia menor a 100m, considerando que el rango de vuelo de *Aedes spp.* es de 50-100m (Reiter, Amador, Anderson & Clark, 1995), el observar una diferencia entre manzanas, aunque sea leve, nos puede indicar la fuerza evolutiva a la cual son sometidos los mosquitos del área. Al observar la figura 7, se puede ver que la manzana 4 es la más alejada de las tres. La manzana 1 y 7 están separadas por un campo de juegos, que en base a comunicación con habitantes de la zona es fumigado con mayor frecuencia. La manzana 7 y 1 poseen una frecuencia relativamente mayor (1 y 0.96) a la manzana 4 (0.89) para la mutación F1534C, esto se puede relacionar con la frecuencia de fumigación en la zona.

Al comparar este resultado con las poblaciones de Limón, Costa Rica, en donde no se encontró ninguna muestra con el alelo silvestre para el codón F1534C o para México donde obtuvieron resultados similares (Zardkoohi et al., 2019 & Vera-Maloof et al., 2015), los resultados de Tikal no presentan un alelo mutante fijado para todas las manzanas, lo cual indica que aún se puede actuar contra esta mutación. Según un estudio publicado por Vera-Maloof et al. (2020) en cepas de laboratorio al no ser expuestas a insecticida, en tan solo 8 generaciones bajó la frecuencia en la mutación F1534C. Estos resultados son clave para un plan de acción del uso de insecticidas en la zona, las cuales pueden incluir estrategias como la reducción del uso de piretroides tipo II, desarrollar un plan para el manejo de la resistencia y tecnologías emergentes para el control de transmisión de arbovirosis. Es importante un cambio en el uso indiscriminado y la poca rotación de insecticidas debido a que las poblaciones de mosquitos pueden desarrollar resistencia cruzada. En el caso de la colonia San Benito, Tikal, Guatemala se observa una resistencia a Permetrina, Deltametrina, así como a DDT. La mutación F1534C se ha asociado a la resistencia a DDT y debido a la resistencia cruzada *Aedes aegypti* también presenta resistencia a piretroides tipo I y II (Du et al., 2013, Hirata et al., 2014).

Zardkoohi (2019) reporta que la fijación de la mutación F1534C representa una gran amenaza para el control de vectores basado en insecticidas en Costa Rica. La mutación fijada podría favorecer a otras mutaciones, como V1016I. El tener múltiples mutaciones en una población confieran resistencia a los insecticidas y disminuye la eficacia de los programas de control de vectores aplicados a la zona.

La evaluación de únicamente tres manzanas nos proporciona información que puede ser extrapolada a la colonia Tikal, Guatemala, dando a conocer el tipo de presión que existe sobre esta población de *Aedes aegypti*. Estos resultados proporcionan información valiosa para el plan de acción del uso de insecticidas en el país, ya que al tener permitido solamente utilizar Temephos (larvas) y piretroides (adultos) induce a las poblaciones de *Aedes aegypti* de la zona a tener una presión selectiva de resistencia. Este estudio es la primera evidencia para Guatemala de la distribución espacial de mutaciones *kdr* en una escala fina. Si bien es cierto que en este estudio no es posible calcular estadísticamente la diferencia entre manzanas, debido a la falta de heterocigotos, alerta una posible variación en la resistencia fenotípica y genotípica de las poblaciones a una escala fina. Esta variación supone un reto para los programas de control de vectores de la región, debido a que se podría llegar a necesitar utilizar diferentes insecticidas por área. Dada la alta frecuencia y posible fijación de las mutaciones *kdr* en las poblaciones de *Aedes aegypti* de la región, es crucial implementar estrategias de manejo de resistencia para mantener la efectividad de los programas de control de este vector. Estos resultados resaltan la importancia de monitorear de manera continua la distribución espacial y temporal de las mutaciones *kdr* en las poblaciones. Se sugiere una ampliación del tiempo de muestreo y del área muestreada para poder tener mejores resultados.

10. CONCLUSIONES

10.1. Se detectó una alta frecuencia de las mutaciones *kdr* V1016I y F1534C en las poblaciones de *Aedes aegypti* evaluadas en las tres manzanas de la colonia Tikal, San Benito, Guatemala.

10.2. La mutación F1534C y V1016I presentan frecuencias muy cercanas a fijarse en las tres manzanas muestreadas si las presiones selectivas de la población no cambian.

10.3. El mecanismo de resistencia mediado por mutaciones en el canal de sodio dependiente al voltaje (*kdr*) contribuye a la resistencia de estas poblaciones.

10.4. La presencia de la F1534C sugiere resistencia a piretroides tipo I, y la coocurrencia de la F1534C y la V1016I en las tres manzanas muestreadas nos indican la resistencia genotípica para piretroides tipo II.

10.5. La distribución de estas mutaciones *kdr* no fue uniforme entre las manzanas, lo que indica una posible respuesta diferencial a la presión de selección por insecticidas.

10.6. La falta de equilibrio de Hardy-Weinberg en las poblaciones de *Aedes aegypti* sugiere la influencia de fuerzas evolutivas que alteran la distribución de los alelos, posiblemente debido a procesos como selección y migración.

11. RECOMENDACIONES

11.1. Implementar estrategias de manejo de resistencia: se recomienda establecer un plan de manejo de resistencia que incluya la rotación de insecticidas con diferentes modos de acción para evitar la selección de resistencia en las poblaciones de *Aedes aegypti*. La diversificación de los insecticidas utilizados puede ayudar a reducir la presión selectiva sobre las mutaciones *kdr*, así como a mantener la eficacia de los programas de control de vectores.

11.2. Explorar tecnologías alternativas: se sugiere investigar y considerar el uso de tecnologías alternativas, como mosquitos genéticamente modificados, para el control de *Aedes aegypti* en la región. Estas tecnologías innovadoras pueden ofrecer enfoques complementarios y sostenibles para el control de vectores, reduciendo la dependencia de insecticidas convencionales y mitigando la resistencia.

11.3. Establecer un programa de monitoreo continuo: es fundamental implementar un programa de monitoreo continuo de las mutaciones *kdr* en las poblaciones de *Aedes aegypti* para detectar cambios en las frecuencias alélicas y genotípicas a lo largo del tiempo. Este monitoreo permitirá una evaluación constante de la resistencia y facilitará la toma de decisiones informadas para ajustar las estrategias de control según sea necesario.

11.4. Promover la colaboración interdisciplinaria: se recomienda fomentar la colaboración entre entomólogos, genetistas, epidemiólogos y autoridades de salud pública para abordar de manera integral el problema de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*. La interdisciplinaria puede enriquecer las estrategias de control y fortalecer la respuesta ante los desafíos de salud pública asociados con este vector.

11.5. Educar y sensibilizar a la comunidad: es importante involucrar a la comunidad en las acciones de control de vectores y en la prevención de enfermedades transmitidas por mosquitos. La educación y sensibilización sobre medidas de prevención, el uso adecuado de insecticidas y la importancia de la participación comunitaria pueden contribuir significativamente a la eficacia de los programas de control.

12. REFERENCIAS

- Achee, L., Gould, F., Perkins, T., Reiner, R., Morrison, A., & Ritchie, S. (2015). A critical assessment of vector control for dengue prevention. *PLoS Negl Trop Dis.*, 9(10), e0003655.
- Achee, N., Grieco, J., Vatandoost, H., Seixas, G., Pinto, J., Ching-Ng, L., & ... (2019). Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS Negl Trop Dis.*, 13(1), e0006822.
- Al Nazawi, A. M., Aqili, J., Alzahrani, M., McCall, P. J., & Weetman, D. (2017). Combined target site (kdr) mutations play a primary role in highly pyrethroid resistant phenotypes of *Aedes aegypti* from Saudi Arabia. *Parasites and Vectors*, 10, 1–10.
- Alvarez, L. C., Ponce, G., Saavedra-Rodriguez, K., Lopez, B., & Flores, A. E. (2014). Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest Management Science*, 70(6), 933-937. <https://doi.org/10.1002/ps.3846>
- Boyce, R. (1911). The prevalence, distribution and significance of *Stegomyia fasciata* (calopus Mg.) in West Africa. *Bull. Ent. Res.*, 1, 233-63.
- Casida, J. E., Gammon, D. W., Glickman, A. H., & Lawrence, L. J. (1983). Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 23, 413-438.
- Cleton, N., Koopmans, M., Reimerink, J., Godeke, G., & Reusken, C. (2012). Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. *Journal of Clinical Virology*, 55(3), 191-203. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.07.004>
- Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R., & Williamson, M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, 59(3), 127-194.
- De Buck, A. (1938). Das Exochorion der *Stegomyia*aeier. *Proc. K. Akad. Wet.*, 41, 677-83.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., & ... (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem Mol Biol.*, 50, 1-17.

- Du, Y., Nomura, Y., Satar, G., Hu, Z., Nauen, R., He, B. S., & Zhorov, K. (2013). Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(25), 11785-11790.
- Ensley, S. (2007). Pyrethrins and Pyrethroids. In R. C. Gupta (Ed.), *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles* (pp. 494-498). Academic Press.
- Fajardo-Dolci, G., Melijem-Moctezuma, J., & Vicente-González, E. (2012). El dengue en México. *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 50(6), 631-39.
- García-Rejón, J., López-Uribe, M., Loroño-Pino, M., Arana-Guardia, R., Puc-Tinal, M., López-Uribe, G., & ... (2012). *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes* (Howardina) *cozumelensis* in Yucatán State, México. *Journal of Vector Ecology*, 37, 365-372.
- Gubler, D. (2004). The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27, 319-330.
- Gubler, D., & Clark, G. (1995). Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerging Infectious Diseases*, 1(2), 55-7.
- Hale, M. L., Burg, T. M., & Steeves, T. E. (2012). Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies: 25 to 30 Individuals per Population Is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies. *PLOS ONE*, 7(9), e45170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045170>
- Harris, A., Rajatileka, S., & Ranson, H. (2010). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(2), 277-84.
- He, F., Wang, S., & Liu, L. (1989). Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. *Archives of Toxicology*, 63, 54-58.
- Hénault-Ethier, L. (2015). Health and environmental impacts of pyrethroid insecticides: What we know, what we don't know and what we should do about it. Executive Summary and Scientific Literature Review. Prepared for Équiterre.
- Hirata, K., Komagata, O., Itokawa, K., Yamamoto, A., Tomita, T., & Kasai, S. (2014). A single crossing-over event in voltage-sensitive Na⁺ channel genes may cause critical failure of dengue mosquito control by insecticides. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, e3085.
- Hu, Z., Du, Y., Nomura, Y., & Dong, K. (2011). A sodium channel mutation identified in *Aedes aegypti* selectively reduces cockroach sodium channel sensitivity to type I, but not type II pyrethroids. *Insect Biochem Mol Biol.*, 41(1), 9-13.

- Ioos, S., Mallet, H., & Leparc-Goffart, I. (2014). Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(11), 302-7.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety). (1990). Environmental Health Criteria 97, Deltamethrin. World Health Organization.
- MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS). (2015). Manual Operativo de Vigilancia y Control Entomológico de *Aedes aegypti* Vector del Dengue y Chikungunya en Guatemala.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS). (2022). Situación Epidemiológica de las Arbovirosis en Guatemala.
- Morrison, C., Zielinski-Gutierrez, E., Scott, T., & Rosenberg, R. (2008). Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. *PLoS Medicine*, 5(3), e68.
- Moyes, C. L., Vontas, J., Martins, A., Koou, S., Dusfour, I., & ... (2017). Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), e0005625.
- Muir, L., & Kay, B. (1998). *Aedes aegypti* survival and dispersal estimated by mark-release-recapture in northern Australia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58, 277-82.
- Narahashi, T. (2000). Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294, 1-26.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), (2016). Estrategia de Gestión Integrada para la Prevención y el Control de las Enfermedades Arbovirales, EGI-Arbovirosis, Primera versión.
- Powell, J. (2018). Mosquito-Borne Human Viral Diseases: why *Aedes aegypti*? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, 1563-1565.
- Ray, D. E., & Fry, J. R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology and Therapeutics*, 111, 174-193.

- Reiter, P., Amador, M. A., Anderson, R. A., & Clark, G. G. (1995). Short report: dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52(2), 177-9.
- Rizzo, N., Gramajo, R., Escobar, M., Arana, B., Kroeger, A., & Manrique-Saide, P. (2012). Dengue vector management using insecticide treated materials and targeted interventions on productive breeding-sites in Guatemala. *BMC Public Health*, 12, 931.
- Rodriguez-Cruz, R. (2002). Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(3), 189-201.
- Saavedra-Rodriguez, K., Beaty, M., Lozano-Fuentes, S., Denham, S., Garcia-Rejon, J., Reyes, G., & ... (2015). Local Evolution of Pyrethroid Resistance Offsets Gene Flow among *Aedes aegypti* Collections in Yucatan State, Mexico. *Arthropod-borne and Infectious Diseases Laboratory, Department of Microbiology, Immunology, and Pathology, Colorado State University*.
- Solis-Santoyo, F., Rodriguez, A. D., Penilla, R. P., Saavedra-Rodriguez, K., Dzul-Manzanilla, F., Che-Mendoza, A., & ... (2021). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* from Tapachula, Mexico: Spatial variation and response to historical insecticide use. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(9), e0009746.
- Souza, B. S., Lima, L. F., Galardo, A. K. R., & ... (2023). Genetic structure and kdr mutations in *Aedes aegypti* populations along a road crossing the Amazon Forest in Amapá State, Brazil. *Scientific Reports*, 13, 17167.
- Trpis, M., Häusermann, W., & Craig, G. (1995). Estimates of Population Size, Dispersal, and Longevity of Domestic *Aedes aegypti aegypti* (Diptera: Culicidae) by Mark–Release–Recapture in the Village of Shauri Moyo in Eastern Kenya. *Journal of Medical Entomology*, 32(4), 531-8.
- Uribarren-Berrueta, T. (2015). Dengue, fiebre Chikungunya y otros arbovirus. Recursos en virología. México. Acceso: 15 de noviembre del 2015. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/dengue.html>
- Valentine, W. M. (1998). Pyrethrin and pyrethroid insecticides. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 20(2), 375.
- Vera-Maloof, F., Saavedra-Rodriguez, K., Elizondo-Quiroga, A., Lozano-Fuentes, S., & Black, W. (2015). Coevolution of the Ile1,016 and Cys1,534 mutations in the voltage gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
- World Health Organization (WHO) & Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). (2009). *Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment,*

Prevention and Control (WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1).
https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/44188/9789241547871_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y

World Health Organization. (2012). Handbook for Integrated Vector Management.

World Health Organization. (2018). Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010-2016. Geneva: World Health Organization.
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>

Zardkoohi, A., Castañeda, D., Lol, J., Castillo, C., Lopez, F., Marín, R., & Padilla, N. (2019). Co-occurrence of kdr Mutations V1016I and F1534C and Its Association With Phenotypic Resistance to Pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations From Costa Rica. *Journal of Medical Entomology*, 57(3), 830–836. doi: 10.1093/jme/tjz241

13. ANEXOS

14.1. Metodología

Figura 5. Diagrama de la metodología para realizar controles positivos para utilizar el qPCR y evaluar las muestras.



Created in BioRender.com bio

Nota: Elaboración propia

Figura 6. Diagrama de la metodología para la evaluación de los alelos en qPCR

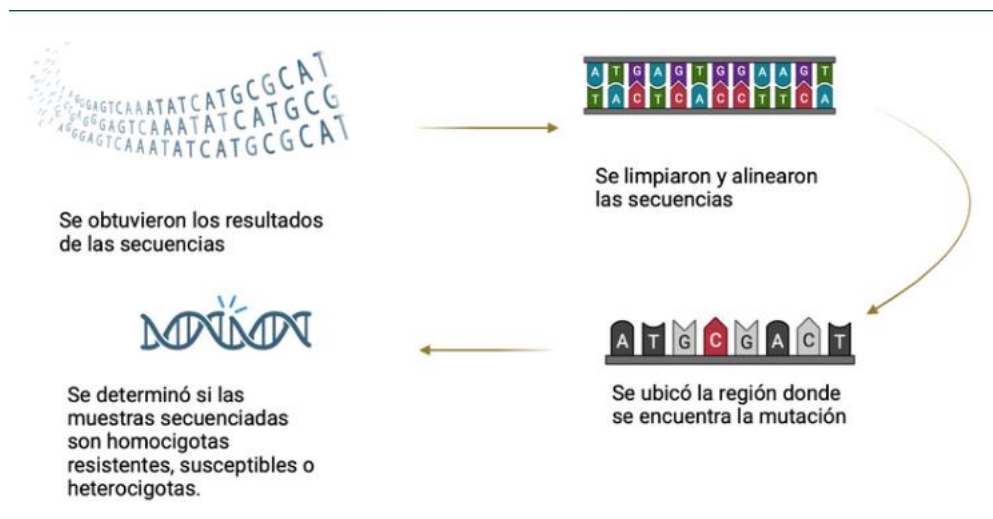


Created in BioRender.com bio

Nota:

Elaboración propia

Figura 7. Diagrama de la metodología para la realización de un PCR convencional.



Nota: Elaboración propia.

14.1.1. Procedimiento para la extracción de ADN de las muestras seleccionadas Unidad de Entomología Médica y Malaria, Centro de Estudios en Salud.

Objetivo

Describir la metodología a seguir para el aislamiento de ADN de mosquitos adultos, tanto anofelinos como del género *Aedes*, frescos o preservados en RNALater utilizando DNAzol. La metodología que se presenta sigue las recomendaciones del fabricante, con algunas ligeras modificaciones para producir una mayor cantidad de ADN.

Definiciones y acrónimos

- POE: Procedimiento de operación estándar.

Procedimientos de operación estándar asociados

- POEX “Guía para el uso de NanoDrop”
- POEX “Guía para el uso de centrífuga”

Equipo, materiales y reactivos

- Marcador con punta fina
- Cinta adhesiva
- Toallas de papel
- Guantes
- Contenedor para descarte bio-infeccioso
- Pinza entomológica
- Gradillas para tubos de 1.5mL y 0.5mL
- Cajas para almacenar tubos de 0.5mL
- Tubos estériles de 1.5mL
- Tubos estériles de 0.5mL
- Pipeta 10 μ L
- Pipeta 20 μ L
- Pipeta 200 μ L
- Pipeta 1000 μ L
- Puntas bloqueadas para micro-pipeta de 0.5-10 μ L, 10-100 μ L y 100-1000 μ L
- Pistilos plásticos estériles
- Centrifuga para tubos de 1.5 mL
- Refirgerador (4°C)
- Congelador (-20°C)
- NanoDrop
- Campana extractor de químicos

- Reactivos para extracción y purificación
 - DNazol
 - Etanol absoluto
 - Etanol 70%
 - Agua DEPC
 - NaOH 1M
- Etanol 70% (limpieza)
- Cloro al 10% (limpieza)

Precauciones y seguridad

- Utilizar bata y guantes durante todo el trabajo en el laboratorio.
- Descartar los desechos biológicos el contenedor de desechos biológicos y los desechos químicos según indique la ficha de seguridad.
- Anotar todos los detalles del procedimiento y resultados en el cuaderno de laboratorio respectivo.

Procedimiento

Preparación del área y materiales

Limpie el área de extracción con toallas de papel impregnadas con cloro al 10% seguido de etanol al 70%.

Prepare y limpie con etanol al 70% todos los materiales que usará para la extracción de ADN: bolsa tubos estériles, cajas de puntas bloqueadas, micro-pipetas, gradilla, pinzas entomológicas, etc.

Preparación de material

Busque las muestras a procesar (no más de 24) y coloque a 4°C antes de empezar a trabajar.

Rotule tubos de 1.5ml con el ID del mosquito, fecha de extracción y la palabra “ADN”. Si los mosquitos están en grupo, utilizando pinzas entomológicas coloque un mosquito por tubo de 1.5ml estéril rotulado con el ID del mosquito.

Si los mosquitos se encuentran almacenados de RNALater, agregar 1mL de agua DEPC a cada tubo para lavar el mosquito y eliminar trazas de RNALater que puedan interferir en la extracción de ADN.

Extracción de ADN

Agregue 100 µL de DNazol a cada tubo que contiene las partes del mosquito, mosquito entero o extracto y macere hasta no ver partes reconocibles con un pistilo de plástico estéril.

NOTA: Si está trabajando extracto de mosquito no es necesario macerar, y proceda al paso 2. En caso el número de muestras a procesar es impar, recuerde preparar un tubo con agua DEPC para utilizar como balance en la centrifuga.

Centrifugue los tubos por 10 minutos a 10,400 rpm (Centrifuga Hettich Mikro 120, Hettich EBA 12R y Eppendorf 5418R) o 13,660 g en la centrifuga Hettich EBA 12R o 9,300 g en la centrifuga Eppendorf 5418R a temperatura ambiente.

Transfiera el sobrenadante de cada muestra a un nuevo tubo de 1.5mL estéril rotulado con el ID del mosquito, fecha y la palabra ADN (utilice una punta por cada muestra).

El pellet de macerado puede ser utilizado inmediatamente o almacenado a -20°C para posteriores extracciones.

Agregue 500 µL de etanol absoluto a cada tubo que contiene el sobrenadante y mezcle por inversión 8 veces.

Incube las muestras a temperatura ambiente por 3 minutos.

Centrifugue a 6,600 rpm (Centrifuga Hettich Mikro 120, Hettich EBA 12R y Eppendorf 5418R) o 5500 g en la centrifuga Hettich EBA 12R o 3,800 g en la centrifuga Eppendorf 5418R por 5 minutos a temperatura ambiente.

Remueva y descarte el sobrenadante de cada muestra (utilice una punta por muestra).

Lave el pellet de ADN con 800µL de etanol 70% (observe si el pellet se despega, en caso no suceda, mezcle con la punta y cámbiela para la siguiente muestra).

Mezcle por inversión 6 veces y centrifugar a 6,600 rpm (Centrifuga Hettich Mikro 120, Hettich EBA 12R y Eppendorf 5418R) o 5500 g en la centrifuga Hettich EBA 12R o 3,800g en la centrifuga Eppendorf 5418R por 5 minutos a temperatura ambiente.

Repita el paso 3.8 y 3.9.

Remueva y descarte el sobrenadante de cada muestra (utilice una punta por muestra).

Deje secar el pellet en la campana de químicos con el extractor puesto. Para esto, colocar todos los tubos en una gradilla y dejarlos abiertos por 30 min dentro de la campana.

Resuspenda el pellet en 50 µl de NaOH 8mM (este dura un mes), agua DEPC o buffer AE.

El ADN puede ser almacenado a 4°C o ser cuantificado inmediatamente utilizando el Nanodrop.

Almacene la muestra de ADN a -20°C hasta su posterior uso.

Al terminar el proceso, limpiar el área de trabajo con etanol al 70%. Limpie las gradillas micro-pipetas y cajas de puntas con etanol al 70%.

Los pistilos se dejan en una solución de NaOH 1M por toda una noche, al día siguiente se enjuagan con agua de chorro, seguidos de jabón no iónico y se dejan por toda una noche en agua destilada y por último se dejan secar a temperatura ambiente en beaker listos para su posterior esterilización por autoclave.

Control de Calidad

La cuantificación de ADN utilizando el equipo Nanodrop da indicios acerca de la calidad, pureza y concentración del ADN extraído. En caso las concentraciones sean muy bajas, se recomienda realizar la extracción nuevamente utilizando el pellet. Los anofelinos pueden procesarse con el PCR de la región ITS2, para confirmar la especie.

Referencias

1. Rosero, A., Gutierrez, A., Cinfuegos, V., Jaramillo, M., Correa, M. (2010). Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. *Revista Colombiana de Entomología*, 36(2), 260-263. Retrieved November 10, 2017, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882010000200015&lng=en&tlng=es.

2. Thermo Fisher Scientific. Extraction of DNA using DNAzol® Reagent. Recuperado de: <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/dna-extraction-protocols/extraction-of-dna-using-reagent.html#proto>

14.1.2. PCR en tiempo real alelo específico para la mutación F1534C Unidad de Entomología Médica y Malaria, Centro de Estudios en Salud.

Objetivo

Esta PCR se realiza para la identificación de los diversos genotipos (homocigoto mutante, homocigoto no mutante y heterocigoto) que puede poseer cada individuo de la especie *Aedes aegypti* para la mutación F1534C.

Definiciones y Acrónimos

ADN: Ácido Desoxirribonucleico
PCR: Reaccionó en cadena de la polimerasa
qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo NTC: Non template control.

Equipo, materiales y reactivos

1. Materiales

- Tubos en strips de 0.2mL ópticos para PCR en tiempo real.
- Tapas ópticas para los strips de 0.2mL.
- Placas ópticas de 96 pozos para PCR en tiempo real
- Films adhesivos opticos para PCR en tiempo real para los sistemas de Applied

Biosystems.

- Tubos de 1.5 mL
- Puntas bloqueadas de 0.5 - 10 µL, 20- 200 µL, y 100 - 1000 µL
- Gradillas para strips de tubos de 0.2 mL y 1.5 mL
- Guantes de nitrilo
- Cinta Adhesiva
- Marcador con punta ultra fina
- Contener para descarte
- Bolsa roja para descarte

Reactivos para limpieza del área de trabajo: Etanol al 70%
Cloro al 10%

2.2. Reactivos para qPCR

REACTIVO	MARCA	NUMERO DE CATALOGO	Aplicación
Agua Destilada grado Biología Molecular	Gene Choice	5161	qPCR
Primer Val1016_F	NA	N/A	qPCR
Primer Ile1016_F	NA	N/A	qPCR
Primer Ile1016_R	NA	N/A	qPCR
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	Life Technologies	A25780	qPCR

2.3. Información de Primers

Nombre	Secuencia	Tamaño del producto	Referencia
F1534-f	5'-GCGGGCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATATT-3'	93 pb	Yanola et al. 2011
C1534-f	5'-GCGGGCAGGGCGGGCGGGGGCGGGGCCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATGTG-3'	113 pb	
CP-r	5'-TCTGCTCGTTGAAGTTGTCGAT-3'	93/113 pb	

Equipo de laboratorio

- • Refrigeradora 4°C
- • Congelador -20°C
- • Refrigerador 4oC
- • Termociclador QuantStudio3 (Applied Biosystems)
- • Vortex
- • Mini-Centrifuga
- • Centrifuga para placas de PCR
- • Gradilla fría a -20oC para tubos de PCR 0.2ml.

Preparación del templado para el qPCR alelo específico.

Abra el templado digital correspondiente para el PCR que se realizara. En los anexos puede encontrarse un listado de templados que se encuentran como hojas de Excel.

NOTA: *En el templado digital se encuentran las condiciones de amplificación del PCR, cálculos necesarios para la cantidad de muestras a procesar, las especificaciones del programa de amplificación y cualquier otra información pertinente de la reacción.*

Introduzca el número de reacciones a realizar en la casilla correspondiente, considere si va a trabajar en duplicado, triplicado, etc. El templado ya calcula un error de pipeteo del 10% del número total de reacciones.

IMPORTANTE: Debe tomarse en cuenta los controles, positivos o negativos, y en caso de PCRs para genotipaje, controles positivos para cada genotipo.

Imprima y guarde el documento con él; Año, No. de PCR, el nombre del gen, región a amplificar o mutación a evaluar y la fecha. Ejemplo: 2021_05 qPCR F1534C 02022011.

Preparación del área de trabajo para realizar el MasterMix

Encienda las luces de la campana y limpie la superficie y todos los materiales a usar con cloro al 10% y etanol al 70% para prevenir cualquier contaminación.

Asegúrese que dentro de la campana tenga tubos de 0.2ml, tubos de 1.5 ml para el master mix, pipetas, cajas de puntas, recipiente para descarte de desechos dentro de la campana.

Apague la luz y encienda la luz UV de la campana y permita que esta actúe por lo menos por 15 minutos.

Después de apagar la luz UV, encienda la luz blanca.

Retirar de almacenamiento en frío los demás componentes a utilizar para preparar el Master Mix según lo indica el templado digital: PowerUp® SYBR Green Master Mix y los primers correspondientes a la mutación a analizar.

Preparación del área para adición de ADN

Encienda la campana y limpie la superficie con etanol al 70%.

Coloque las pipetas, cajas de puntas, recipiente para descarte de desechos dentro de la campana. Limpie la superficie de todos los materiales con etanol al 70% para prevenir la contaminación.

Encienda la luz UV de la campana y permita que esta actúe por lo menos por 15 minutos.

Preparación de Master Mix

Rotulación: Si se están usando strips para PCR en tiempo real se recomienda rotular en algún lugar donde no afecte la lectura óptica, la tapa óptica por ningún motivo debe ser manchada o marcada. En el caso de utilizar placas, es mejor no marcar la placa.

Rotule un tubo de 1.5 ml o 2.0 mL con MM, este servirá para el Master Mix.

Prepare el Master Mix, según templado digital que fue realizado con anterioridad con los reactivos que fueron colocados dentro de la campana con anterioridad. Agite cada

componente del mastermix ya sea por vortex y centrifúguelo brevemente utilizando la mini- centrifuga ubicada en la campana de PCR o por pipeteo.

Combine todos los reactivos en un tubo de 1.5 mL o 2 mL.

Después de que el master mix haya sido preparado, agitar por medio de vortex y hacer una centrifugación breve, en la minicentrifuga ubicada adentro de la campana de PCR, para asegurar que la mezcla de los reactivos sea homogénea.

Agregue el volumen de master mix especificado en el templado digital a cada tubo del strip a ser usado o cada pozo de la placa óptica para tiempo real.

Retire strips o placa con el master mix de la campana, colóquelos en una gradilla fría (-20oC) y transfíralos a la campana de trabajo de ADN.

Preparación de las muestras

Colocar en una gradilla el ADN de las muestras a procesar y también los controles. En el caso que el ADN este almacenado a -20oC, se recomienda sacarlos con un mayor tiempo de anticipación del congelador y colocarlos a 4oC para que el cambio de temperatura no sea tan alto y no afecte la integridad de los ácidos nucleicos.

Una vez descongeladas, agite las muestras vigorosamente por medio de vortex y centrifugue brevemente en la minicentrifuga ubicada al lado de la campana de ADN. Al momento de usarlas se debe transportarse las muestras a la campana de trabajo de ADN.

NOTA: Las muestras deben utilizarse cuando el MasterMix ya esté listo (leer Preparación del Master Mix), mientras tanto se deben mantener en hielo, gradilla fría o en la refrigeradora a 4oC.

Limpie bien con etanol la gradilla para ingresarla a la campana ya esterilizada por medio de UV. Trate de no colocar un exceso de etanol directo a los tubos ya que puede correr el riesgo de eliminar el rotulo de las muestras.

Desinfectar el área de trabajo de la misma manera que se realizó antes de trabajar, siguiendo las instrucciones de los incisos 2.1 y 2.4.

Retire las muestras de ADN, y siga el procedimiento descrito en el inciso 4.2 y 4.3.

Añada el volumen de ADN indicado en la hoja de PCR en su respectivo tubo o pozo de la placa utilizada. Mezcle por medio de la pipeta el ADN y el mastermix para asegurar que esta sea una reacción homogénea.

Los strips deben ser tapados de igual forma y la placa debe ser sellada con plástico adherente óptico.

Si está trabajando con strips, puede agitar brevemente por medio de un vortex los strips después de que el ADN haya sido añadido y los strips debidamente tapado. Este procedimiento no se realiza cuando se está trabajando con placas ya que el líquido de la reacción puede quedarse adherida al plástico de sellado ya que este es adhesivo.

Si está utilizando strips colóquelos en la minicentrífuga con el adaptador adecuado para strips y centrifúgelos brevemente. Si está utilizando placa óptica utilice la centrifuga para placas.

NOTA: Es importante que los tubos o pozos no tengan burbujas, ya que estas burbujas pueden afectar la lectura óptica del termociclador de tiempo real.

Al terminar, diríjase al área donde se encuentre el termociclador. Enciéndalo, coloque los tubos, strips o placa dentro del bloque de manera que concuerde con el mapa previamente realizado en el templado digital (qPCR) y cierre la tapa del equipo.

Seleccione el programa ya establecido con las condiciones de PCR. En este caso, existe el F1534C template ubicado en el “Escritorio” del computador.

En “Plate Set Up”, debe indicar todas las muestras a ser analizadas. Se pueden seguir las instrucciones que están en el templado digital de cada mutación. Marcar todas las muestras con el target correspondiente y como “U” de “unknown” y los controles negativos como “NTC”.

Revise las condiciones que tiene en el templado digital que preparo con anterioridad, el programa seleccionado debe coincidir con las condiciones que se encuentran en el templado. Si no coincide realice las modificaciones necesarias.

Inicie la corrida.

Limpie la campana del área de adición de ADN, con etanol al 70%. Limpie la superficie y cada uno de los materiales que se encuentran dentro de la campana. Encienda la luz UV de la campana y permita que esta actúe por lo menos por 15 minutos.

Cuando el programa de PCR haya terminado, retire los tubos o placa del termociclador y apague el equipo utilizado. En caso haya sido PCR convencional guarde los productos de PCR a 4°C hasta que se realice la electroforesis (Protocolo: Electroforesis de agarosa), si fue qPCR puede descartar los productos, si estos no van a ser utilizados posteriormente.

Documentación

Registrar los resultados en el templado digital, en la sección de resultados y registrarlos en el cuaderno físico.

Documentos Asociados

1. NN qPCR F1534C DDMMAA
2. Manual de Usuario del Termociclador en tiempo real QuantStudio3.

Referencias

- Alvarez, L. C., Ponce, G., Saavedra-Rodriguez, K., Lopez, B., & Flores, A. E. 2015. Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest Management Science*, 71(6), 863–869. <https://doi.org/10.1002/ps.3846>
- Yanola, J., Somboon, P., Walton, C., Nachaiwieng, W., Somwang, P. and Prapanthadara, L.-a. (2011), High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Tropical Medicine & International Health*, 16: 501-509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02725.x>

14.1.3. PCR en tiempo real alelo específico para la mutación V1016I Unidad de Entomología Médica y Malaria, Centro de Estudios en Salud.

Objetivo

Esta PCR se realiza para la identificación de los diversos genotipos (homocigoto mutante, homocigoto no mutante y heterocigoto) que puede poseer cada individuo de la especie *Aedes aegypti* para la mutación V1016I.

Definiciones y Acrónimos

ADN: Ácido Desoxiribonucleico
PCR: Reaccion en cadena de la polimerasa
qPCR: reaccion en cadena de la polimerasa cuantitativo NTC: Non template control.

Equipo, materiales y reactivos

1. Materiales

- Tubos en strips de 0.2mL opticos para PCR en tiempo real.
- Tapas opticas para los strips de 0.2mL.
- Placas opticas de 96 pozos para PCR en tiempo real
- Films adhesivos opticos para PCR en tiempo real para los sistemas de Applied

Biosystems.

- Tubos de 1.5 mL
- Puntas bloqueadas de 0.5 - 10 µL, 20- 200 µL, y 100 - 1000 µL
- Gradillas para strips de tubos de 0.2 mL y 1.5 mL
- Guantes de nitrilo
- Cinta Adhesiva
- Marcador con punta ultra fina
- Contener para descarte
- Bolsa roja para descarte

Reactivos para limpieza del área de trabajo: Etanol al 70%
Cloro al 10%

2.2. Reactivos para qPCR

REACTIVO	MARCA	NUMERO DE CATALOGO	Aplicación
Agua Destilada grado Biología Molecular	Gene Choice	5161	qPCR
Primer Val1016_F	NA	N/A	qPCR
Primer Ile1016_F	NA	N/A	qPCR
Primer Ile1016_R	NA	N/A	qPCR
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	Life Technologies	A25780	qPCR

2.3. Información de Primers

Nombre	Secuencia	Tamaño del producto	Referencia
Val1016_F	5'--GCGGGCAGGGCGGGGGGCGGGGC- -CACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG-3'	102 pb	Saavedra-Rodriguez et al. 2007
Ile1016_F	5'-GCGGGCACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA-3'	82 pb	
Ile1016_R	5'-GGATGAACCSAAATTGGACAAAAGC-3'	102/82 pb	

Equipo de laboratorio

- • Refrigeradora 4°C
- • Congelador -20°C
- • Refrigerador 4oC
- • Termociclador QuantStudio3 (Applied Biosystems)
- • Vortex
- • Mini-Centrifuga
- • Centrifuga para placas de PCR

- • Gradilla fría a -20oC para tubos de PCR 0.2ml.

Preparación del templado para el qPCR alelo específico.

Abra el templado digital correspondiente para el PCR que se realizara. En los anexos puede encontrarse un listado de templados que se encuentran como hojas de Excel.

***NOTA:** En el templado digital se encuentran las condiciones de amplificación del PCR, cálculos necesarios para la cantidad de muestras a procesar, las especificaciones del programa de amplificación y cualquier otra información pertinente de la reacción.*

Introduzca el número de reacciones a realizar en la casilla correspondiente, considere si va a trabajar en duplicado, triplicado, etc. El templado ya calcula un error de pipeteo del 10% del número total de reacciones.

IMPORTANTE: Debe tomarse en cuenta los controles, positivos o negativos, y en caso de PCRs para genotipaje, controles positivos para cada genotipo.

Imprima y guarde el documento con él; Año, No. de PCR, el nombre del gen, región a amplificar o mutación a evaluar y la fecha. Ejemplo: 2021_05 qPCR V1016I 02022011.

Preparación del área de trabajo para realizar el MasterMix

Encienda las luces de la campana y limpie la superficie y todos los materiales a usar con cloro al 10% y etanol al 70% para prevenir cualquier contaminación.

Asegúrese que dentro de la campana tenga tubos de 0.2ml, tubos de 1.5 ml para el master mix, pipetas, cajas de puntas, recipiente para descarte de desechos dentro de la campana.

Apague la luz y encienda la luz UV de la campana y permita que esta actúe por lo menos por 15 minutos.

Después de apagar la luz UV, encienda la luz blanca.

Retirar de almacenamiento en frío los demás componentes a utilizar para preparar el Master Mix según lo indica el templado digital: PowerUp® SYBR Green Master Mix y los primers correspondientes a la mutación a analizar.

Preparación del área para adición de ADN

Encienda la campana y limpie la superficie con etanol al 70%.

Coloque las pipetas, cajas de puntas, recipiente para descarte de desechos dentro de la campana.

Limpie la superficie de todos los materiales con etanol al 70% para prevenir la contaminación.

Encienda la luz UV de la campana y permita que esta actúe por lo menos por 15 minutos.

Preparación de Master Mix

Rotulación: Si se están usando strips para PCR en tiempo real se recomienda rotular en algún lugar donde no afecte la lectura óptica, la tapa óptica por ningún motivo debe ser manchada o marcada. En el caso de utilizar placas, es mejor no marcar la placa.

Rotule un tubo de 1.5 ml o 2.0 mL con MM, este servirá para el Master Mix.

Prepare el Master Mix, según templado digital que fue realizado con anterioridad con los reactivos que fueron colocados dentro de la campana con anterioridad. Agite cada componente del mastermix ya sea por vortex y centrifúguelo brevemente utilizando la mini-centrifuga ubicada en la campana de PCR o por pipeteo.

Combine todos los reactivos en un tubo de 1.5 mL o 2 mL.

Después de que el master mix haya sido preparado, agitar por medio de vortex y hacer una centrifugación breve, en la minicentrífuga ubicada adentro de la campana de PCR, para asegurar que la mezcla de los reactivos sea homogénea.

Agregue el volumen de master mix especificado en el templado digital a cada tubo del strip a ser usado o cada pozo de la placa óptica para tiempo real.

Retire strips o placa con el master mix de la campana, colóquelos en una gradilla fría (-20oC) y transfíralos a la campana de trabajo de ADN.

Preparación de las muestras

Colocar en una gradilla el ADN de las muestras a procesar y también los controles. En el caso que el ADN este almacenado a -20oC, se recomienda sacarlos con un mayor tiempo de anticipación del congelador y colocarlos a 4oC para que el cambio de temperatura no sea tan alto y no afecte la integridad de los ácidos nucleicos.

Una vez descongeladas, agite las muestras vigorosamente por medio de vortex y centrifugue brevemente en la minicentrífuga ubicada al lado de la campana de ADN. Al momento de usarlas se debe transportarse las muestras a la campana de trabajo de ADN.

NOTA: Las muestras deben utilizarse cuando el MasterMix ya esté listo (leer Preparación del Master Mix), mientras tanto se deben mantener en hielo, gradilla fría o en la refrigeradora a 4oC.

Limpie bien con etanol la gradilla para ingresarla a la campana ya esterilizada por medio de UV. Trate de no colocar un exceso de etanol directo a los tubos ya que puede correr el riesgo de eliminar el rotulo de las muestras.

Desinfectar el área de trabajo de la misma manera que se realizó antes de trabajar, siguiendo las instrucciones de los incisos 2.1 y 2.4.

Retire las muestras de ADN, y siga el procedimiento descrito en el inciso 4.2 y 4.3.

Añada el volumen de ADN indicado en la hoja de PCR en su respectivo tubo o pozo de la placa utilizada. Mezcle por medio de la pipeta el ADN y el mastermix para asegurar que esta sea una reacción homogénea.

Los strips deben ser tapados de igual forma y la placa debe ser sellada con plástico adherente óptico.

Si está trabajando con strips, puede agitar brevemente por medio de un vortex los strips después de que el ADN haya sido añadido y los strips debidamente tapado. Este procedimiento no se realiza cuando se está trabajando con placas ya que el líquido de la reacción puede quedarse adherida al plástico de sellado ya que este es adhesivo.

Si está utilizando strips colóquelos en la minicentrífuga con el adaptador adecuado para strips y centrifúgelos brevemente. Si está utilizando placa óptica utilice la centrifuga para placas.

NOTA: Es importante que los tubos o pozos no tengan burbujas, ya que estas burbujas pueden afectar la lectura óptica del termociclador de tiempo real.

Al terminar, diríjase al área donde se encuentre el termociclador. Enciéndalo, coloque los tubos, strips o placa dentro del bloque de manera que concuerde con el mapa previamente realizado en el templado digital (qPCR) y cierre la tapa del equipo.

Seleccione el programa ya establecido con las condiciones de PCR. En este caso, existe el V1016 template ubicado en el “Escritorio” del computador.

En “Plate Set Up”, debe indicar todas las muestras a ser analizadas. Se pueden seguir las instrucciones que están en el templado digital de cada mutación. Marcar todas las muestras con el target correspondiente y como “U” de “unknown” y los controles negativos como “NTC”.

Revise las condiciones que tiene en el templado digital que preparo con anterioridad, el programa seleccionado debe coincidir con las condiciones que se encuentran en el templado. Si no coincide realice las modificaciones necesarias.

Inicie la corrida.

Limpie la campana del área de adición de ADN, con etanol al 70%. Limpie la superficie y cada uno de los materiales que se encuentran dentro de la campana. Encienda la luz UV de la campana y permita que esta actúe por lo menos por 15 minutos.

Cuando el programa de PCR haya terminado, retire los tubos o placa del termociclador y apague el equipo utilizado. En caso haya sido PCR convencional guarde los productos de PCR a 4°C hasta que se realice la electroforesis (Protocolo: Electroforesis de agarosa), si fue qPCR puede descartar los productos, si estos no van a ser utilizados posteriormente.

Documentación

Registrar los resultados en el templado digital, en la sección de resultados y registrarlos en el cuaderno físico.

Documentos Asociados

1. NN qPCR V1016I DDMMAA
2. Manual de Usuario del Termociclador en tiempo real QuantStudio3.

Referencias

Alvarez, L. C., Ponce, G., Saavedra-Rodriguez, K., Lopez, B., & Flores, A. E. 2015. Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest Management Science*, 71(6), 863–869. <https://doi.org/10.1002/ps.3846>

Saavedra-Rodriguez, K., L. Urdaneta-Marquez, S. Rajatileka, M. Moulton, A. E. Flores, I. Fernandez-Salas, J. Bisset, M. Rodriguez, P. J. McCall, M. J. Donnelly, H. Ranson, J. Hemingway, and W. C. Black IV. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 16: 785–798.

14.1.4. Prueba molecular para la amplificación y detección de la mutación F1534C en el canal de sodio de *Aedes aegypti*, Unidad de entomología médica.

Objetivo

Estandarizar el procedimiento para la amplificación y detección de la mutación F1534C en el canal de sodio de *Aedes aegypti*.

Definiciones y acrónimos

- Canal de sodio
- Mutación F1534C
- ADN
- PCR

Responsabilidades

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

Equipo, materiales y reactivos

- ADN genómico de las muestras a utilizar
- Termociclador para PCR convencional
- Campana de PCR
- Campana de bioseguridad nivel 2
- Transiluminador
- Sistema de electroforesis horizontal
- Sistema para preparar geles
- Balanza
- Vortex
- Probeta
- Erlenmeyer de 100mL
- Minicentrífuga para tubos de 1.5mL y 0.2mL
- Gradilla fría para tubos de 1.5mL
- Gradilla para tubos de 1.5mL y 0.2mL
- Micropipetas de 10, 20, 200 y 1000 uL
- Puntas estériles con filtro para micropipetas de 10, 20, 200 y 1000 uL
- Tubos estériles de 1.5 mL y 0.2mL
- Recipientes de pesaje plástico
- Espátula de pesaje metálica
- Pizeta con etanol 70%
- Papel mayordomo
- Sharpie punta ultra fina
- dNTPs mix 10mM (Catálogo U151B, Promega)
- Agua DEPC, grado molecular
- Primer AaNa31F (GACTCGCGGGAGGTAAGTT)
- Primer AaNa31R (CCGTCTGCTTGTAGTGATCG)
- GoTaq Hot Start Polymerase (Catálogo M5005, Promega), incluye el Colorless GoTaq Felix Buffer (5X) y MgCl₂ (25mM)
- Agarosa, grado molecular

- Buffer TBE 1X
- Bromuro de etidio
- Marcador molecular 50pb (Catálogo 70538, Novagen)

Precauciones y seguridad

- Limpiar la superficie de las campanas con etanol al 70% antes y después de realizar la prueba molecular.
- Utilizar guantes y bata de laboratorio durante la realización de la prueba molecular
- 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.
- Al momento de realizar la prueba molecular, mantenga los reactivos en una gradilla fría todo el tiempo

Procedimiento

Preparación de las muestras de ADN:

Colocarse guantes de nitrilo y buscar las muestras a trabajar en el congelador -20°C.

Colocar las muestras de ADN a descongelar en una refrigeradora a 4°C.

Al estar descongeladas todas las muestras, mezclar por vortex.

Seguidamente, centrifugar por 30 segundos las muestras en la minicentrífuga para tubos de 1.5mL.

Colocar las muestras nuevamente en la refrigerador a 4°C hasta que sean utilizadas, y descarte los guantes

Preparación de la reacción de PCR:

Colocarse guantes de nitrilo nuevos y buscar los reactivos para la PCR.

Colocar los reactivos de la PCR a descongelar en una gradilla fría.

Al estar descongelados los reactivos, prepare un master mix siguiendo el Cuadro 1. Dependiendo del número de muestras, en la última columna debe realizar los cálculos, multiplicado la cantidad de cada reactivo por reacción (1X) por el total de reacciones (total de muestras + 2 controles negativos).

Cuadro 1. Mezcla de reacción para la amplificación del codón 1534 en el canal de sodio de *Ae. aegypti* mediante PCR convencional.

Reactivo	[stock]	[final]	1X (µL)	X (µL)
Agua DEPC, grado molecular	--	--	26.50	
Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega)	5X	1X	10.00	
MgCl ₂ (Promega)	25 mM	1.5 mM	5.00	
dNTPs mix (Promega)	2 mM	0.2 mM	5.00	
AaNa31F	50 µM	0.5 µM	0.50	
AaNa31R	50 µM	0.5 µM	0.50	
GoTaq Hot Start Polymerase (Promega)	5 U/µL	2.5U	0.50	

Al terminar de preparar el master mix, colocarlo en la gradilla fría.

Rotular la cantidad de tubos de 0.2mL equivalente al total de muestras (genere un código único para estas para su posterior análisis) y el control negativo, con un Sharpie punta ultra fina y colocar los tubos en la gradilla para tubos de 0.2mL.

Destape todos los tubos de 0.2mL, mezclar el master mix por vortex, y agregar a cada tubo 48µL.

Tape todos los tubos, y luego preparé una alícuota de agua DEPC (10µL) para el control negativo en un tubo de 0.2mL.

Regresé todos los reactivos al congelador -20°C, y apague la luz y el viento de la campana de PCR.

Traslade la gradilla con los tubos que contienen el master mix y el agua DEPC a la campana de bioseguridad nivel 2.

Sacar las muestras de ADN del refrigerador a 4°C y colocarlas en la campana de bioseguridad nivel 2.

Para completar el volumen de 50µL de reacción de PCR, agregar 2µL (equivalente a 5ng) de la muestra de ADN a cada tubo según corresponda. En el caso del control negativo, agregar 2µL del agua DEPC hasta el final.

Regresar las muestras de ADN al refrigerador 4°C si se fueran a utilizar al siguiente día, o en el congelador -20°C para su posterior uso.

Seguidamente, centrifugar por 30 segundos los tubos que contiene la mezcla de reacción en la minicentrífuga de tubos de 0.2mL.

Luego trasladar la gradilla con los tubos que contienen la mezcla de reacción al área donde se encuentra el termociclador.

Amplificación del canal de sodio:

Encender el termociclador, y colocar los tubos dentro de este.

Descarte los guantes.

Abrir el programa de amplificación y asegurarse que este cumpla con los parámetros que se indican a continuación:

Cuadro 2. Condiciones de amplificación del codon 1534 en el canal de sodio de *Ae. aegypti* por PCR convencional.

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación	1	95°C	2 min	1
Desnaturalización	2	94°C	30 seg	35
Hibridización	3	59°C	30 seg	
Extensión	4	72°C	1 min	
Extension final	6	72°C	10 min	1
Hold	7	4°C	∞	1

Al terminar el proceso de amplificación, sacar las muestras (usar guantes para esto) y colocarlas en un refrigerador a 4°C.

Apagar el termociclador.

Colocarse guantes y encender la balanza.

Pesar 1.2g de agarosa en un recipiente plástico utilizando una espátula metálica.

Apagar la balanza, y cuidadosamente colocar la agarosa pesada en el erlenmeyer de 100mL para preparar geles sin tocar este, el cual se encuentra en el área de bromuro de etidio.

Colocar el recipiente de pesaje en el área de material sucio para lavar.
 Colocarse un segundo par de guantes para trabajar en el área de bromuro de etidio.
 Utilizando una probeta de 100mL, medir 60mL de buffer TBE 1X y agregarlo al recipiente donde está la agarosa. Esto nos da un gel de agarosa al 2%.
 Mezclar la solución y colocarla en el microondas por 30 segundos
 Al terminar el tiempo, verificar si la agarosa se disolvió completamente, en caso contrario, colocar otros 30 segundos, y repetir el proceso hasta que se haya disuelto completamente la agarosa.
 Seguidamente, agregar 1.2uL de bromuro de etidio a la solución de agarosa y mezclar.
 Colocar la solución de agarosa en un molde para geles y colocar el peine dependiendo del número de pozos que se necesiten, ya sean 8 o 17.
 Dejar secando el gel de agarosa por 25 min.
 Al terminar el tiempo de secado, retire el peine cuidadosamente y verificar que los pozos del gel no estén perforados, luego colocar el gel en el sistema de electroforesis horizontal.
 Agregar buffer TBE 1X al sistema hasta que esté cubra totalmente el gel.
 Antes de cargar las muestras en el gel, mezclar 3uL de cada muestra con 2uL de Loading dye 1X.
 Al terminar la corrida, colocar el gel en el sistema de documentación y tomar una foto para verificar si las muestras amplificaron el gen del canal de sodio.

Referencias

Harris, A. F., S. Rajatileka, and H. Ranson. 2010. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83: 277–284.

MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K. 2018. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.

14.2. Resultados

Cuadro 5. *Resultados de las muestras de manzana 1, San Benito, colonia Tikal, Guatemala.*

Manzana	Código de muestra	Muestra	Muestra código	Sexo de muestra	ng/uL	A260/280	AA260/230	A1016	1534	Resultados
1	M1	21TA	1	h	8.2	1.6	0.28	R	R	
1	M2	21TA	3	h	8.5	1.7	0.15	R	R	
1	M3	21TA	4	h	9.8	1.5	0.26	R	R	
1	M4	21TA	6	h	20.7	1.7	0.66	R	R	
1	M5	21TA	7	h	7.1	1.6	0.39	R	R	
1	M6	21TA	11	h	7.8	1.5	0.44	S	S	
1	M7	21TA	13	h	5.9	1.6	0.23	R	R	
1	M8	21TA	16	h	7.8	1.8	0.24	R	R	
1	M9	21TA	17	h	9,2	2.11	0.1	R	R	

1	M10	21TA	19	h	5.7	1.6	0.28	S	S
1	M11	21TA	20	h	41.6	2.1	0.12	R	R
1	M12	21TA	24	h	5.7	1.7	0.22	R	R
1	M13	21TA	28	h	18.7	1.6	0.23	R	R
1	M14	21TA	30	h	35.7	2.2	0.14	R	R
1	M15	21TA	32	h	14.3	1.7	0.32	R	R
1	M16	21TA	34	h	5.7	1.3	0.19	R	R
1	M17	21TA	35	h	7.2	1.4	0.21	R	R
1	M18	21TA	36	h	5.5	1.5	0.29	R	R
1	M19	21TA	37	h	14.9	1.9	0.14	R	R
1	M20	21TA	39	h	25.6	1.8	0.29	R	R
1	M21	21TA	40	h	5.6	1.5	0.28	R	R
1	M22	21TA	41	h	23.2	1.8	0.2	R	R
1	M23	21TA	43	h	4.7	1.4	0.19	R	R
1	M24	21TA	48	h	9.8	1.5	0.26	R	R
1	M25	21TA	49	h	6.7	1.5	0.44	R	R
1	M26	21TA	448	h	130.6	2.2	0.19	R	R
1	M27	21TA	452	h	16.9	1.8	0.64	R	R
1	M28	21TA	454	h	15.2	1.7	0.2	R	R
1	M29	21TA	455	h	41	2.2	0.16	R	R
1	M30	21TA	456	h	9.4	1.85	0.23	R	R

Nota: Elaboración propia

Cuadro 6. Resultados de las muestras de manzana 4, San Benito, colonia Tikal, Guatemala

Manzana	Código de muestra	Muestra	Muestra a código	Sexo de muestra	de ng/uL	A260/A280	A260/A230	1016 Resultado	1534 Resultados
4	M31	21TA	153	h	23.6	1.9	0.17	S	R
4	M32	21TA	158	h	47.5	2.12	0.23	R	R
4	M33	21TA	159	h	45.2	2	0.2	R	R
4	M34	21TA	162	h	51.4	2.06	0.24	R	R
4	M35	21TA	171	h	28.8	2	0.16	R	R
4	M36	21TA	377	m	9.5	1.41	0.1	R	R
4	M37	21TA	378	m	16	2.08	0.09	R	R
4	M38	21TA	379	m	14.9	1.95	0.07	R	R
4	M39	21TA	380	m	7.1	2.11	0.05	R	R
4	M40	21TA	381	m	11.4	1.9	0.1	R	R
4	M41	21TA	383	m	12.1	2.1	0.05	R	R

4	M42	21TA	384	m	4	2	0.08	R	R
4	M43	21TA	385	m	12.2	22.16	0.04	R	R
4	M44	21TA	386	m	15.4	2.18	0.09	R	R
4	M45	21TA	657	m	15.1	1.85	0.04	R	R
4	M46	21TA	658	m	9.8	2.13	0.05	R	R
4	M47	21TA	659	m	10.2	2.04	0.03	NA	NA
4	M48	21TA	660	m	8.9	2	0.05	R	R
4	M49	21TA	661	m	9.8	1.8	0.07	R	R
4	M50	21TA	770	h	95.1	1.9	0.28	R	R
4	M51	21TA	807	m	10.3	1.9	0.12	NA	R
4	M52	21TA	808	m	17.4	2.16	0.01	R	R
4	M53	21TA	809	m	9.3	1.86	0.05	R	R
4	M54	21TA	810	m	11.5	2.8	0.1	NA	R
4	M55	21TA	811	m	14.4	1.84	0.08	R	R
4	M56	21TA	812	m	8.8	1.85	0.06	R	R
4	M57	21TA	813	m	38.6	1.86	0.07	R	S
4	M58	21TA	815	m	14.9	1.84	0.05	NA	S
4	M59	21TA	816	m	7.5	1.89	0.07	R	R
4	M60	21TA	882	h	5.2	2.1	0.01	R	R

Nota: Elaboración propia

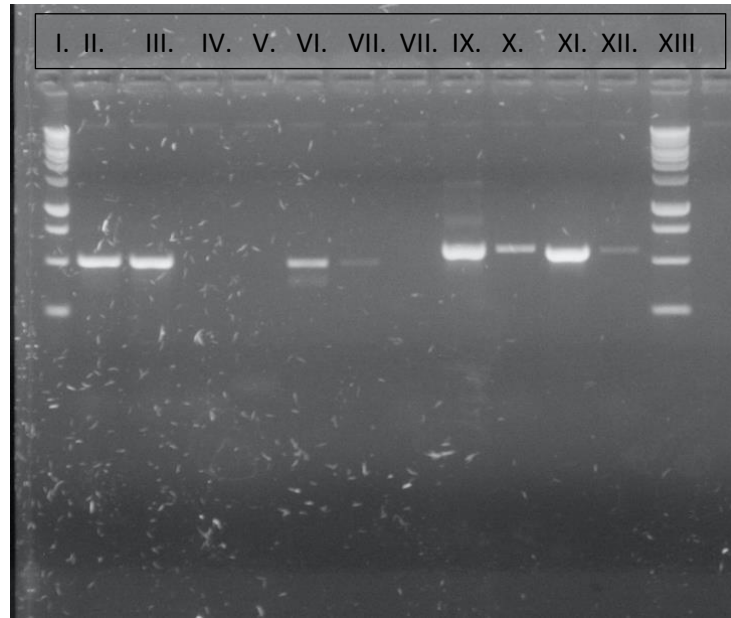
Cuadro 7. Resultados de las muestras de manzana 7, San Benito, colonia Tikal, Guatemala

Manzana	Código de muestra	Muestra	Muestra código	Sexo de muestra	ng/uL	A260/A280	A260/A230	1016 Resultado	1534 Resultados
7	M61	21TA	210	h	21	2.2	0.16	R	R
7	M62	21TA	211	h	21.9	1.9	0.18	R	R
7	M63	21TA	213	h	13.8	2.2	0.15	R	R
7	M64	21TA	217	h	43	1.89	0.2	R	R
7	M65	21TA	218	h	80.4	1.98	0.25	R	R
7	M66	21TA	219	h	73	1.9	0.2	R	R
7	M67	21TA	222	h	11.3	1.96	0.04	R	R
7	M68	21TA	224	h	32	1.9	0.2	R	R
7	M69	21TA	225	h	79.4	2.17	0.16	R	R
7	M70	21TA	227	h	28.5	2.28	0.21	R	R

7	M71	21TA	228	h	31.9	2.16	0.16	S	R
7	M72	21TA	229	h	70	1.63	0.29	R	R
7	M73	21TA	231	h	29.2	2	0.21	R	R
7	M74	21TA	232	h	20.1	2.27	0.11	R	R
7	M75	21TA	233	h	51.8	2.16	0.2	R	R
7	M76	21TA	235	h	36	1.99	0.14	R	R
7	M77	21TA	236	h	21.3	1.89	0.2	R	R
7	M78	21TA	237	h	77.6	2.1	0.19	R	R
7	M79	21TA	238	h	34.2	2.03	0.23	R	R
7	M80	21TA	239	h	20	2.1	0.17	R	R
7	M81	21TA	241	h	29	2.3	0.18	R	R
7	M82	21TA	243	h	24.5	2.14	0.17	R	R
7	M83	21TA	245	h	31	2.11	0.13	R	R
7	M84	21TA	246	h	18	2.13	0.16	R	R
7	M85	21TA	248	h	58.4	2.16	0.2	R	R
7	M86	21TA	471	h	35.6	2.2	0.19	R	R
7	M87	21TA	487	h	73.4	1.98	0.25	R	R
7	M88	21TA	489	h	27.2	2.2	0.16	R	R
7	M89	21TA	493	h	30.1	1.9	0.18	R	R
7	M90	21TA	495	h	16.2	1.89	0.2	R	R

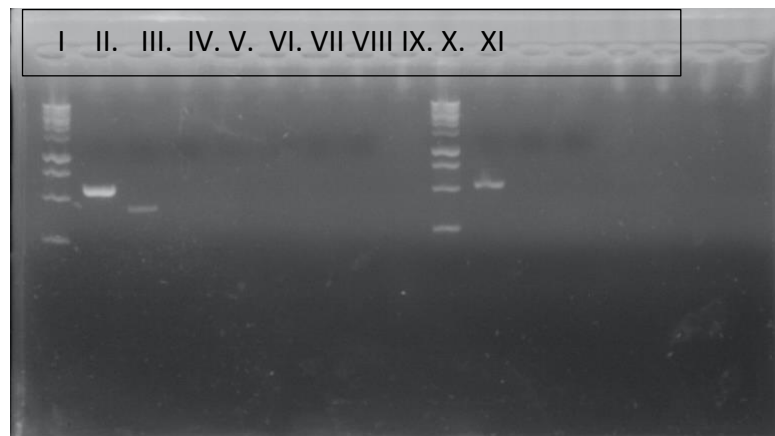
Nota: Elaboración propia

Figura 8. *Gel de electroforesis de muestras con posibles mutaciones.*



Nota: Elaboración propia. I: escalera 25pb, II: 1534 RC1, III: 1534 M14, IV:1534 NTC, V:410 NTC, VI:410 RC1, VII:410 M14, VIII: 1016 NTC, IX:1016 M10, X: 1016 M16, XI:1016 RC1, XII:1016 M6, XIII: escalera 25 pb.

Fig. 9. Gel de electroforesis de muestras que indicaban una posible heterocigosidad en curvas de qPCR.



Nota: Elaboración propia. I: escalera 25 pb, II: 1016 M72, III: 1016 M31, X: escalera 25 pb, XI: 1534 M31.

Cuadro 8. Muestras evaluadas por PCR convencional para uso como controles positivos en qPCR.

Muestras	Alelos observados en secuencia	Mutación evaluada
M14	C/C	F1534C
RC1	F/F	F1534C
M6	V/V	V1016I
M10	V/V	V1016I
M16	I/I	V1016I
RC1	V/V	V1016I

Nota: Elaboración propia. V/V y F/F (homocigotos susceptibles), V/I y F/C (heterocigotos) y C/C y I/I (homocigotos resistentes). A cada una de las 90 muestras se le asignó un código de muestra y la cepa de referencia Rockefeller fue utilizada para obtener individuos susceptibles (RC1)