

**Evaluación de la aptitud biológica asociada a los genes *beta-2 tubulin / doublesex-dsx* de individuos silvestres de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta (Santander)**

**Jose Arsenio Caceres Ayala**

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magister en Ciencias Básicas  
Biomédicas

Director

**Jonny Edward Duque Luna, Ph. D**

Doctor en Ciencias Básicas Biomédicas

Codirector

**Laura Alexandra Rengifo Correa, Ph. D**

Doctora en Ciencias Biológicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Bucaramanga

2024

**Dedicatoria**

A Dios padre celestial por darme la oportunidad, conocimiento, habilidades y la resiliencia para poder superar cada uno de los obstáculos que se presentaron en mi caminar y permitirme cumplir una meta más en mi vida.

A mi madre que siempre fue la piedra que me sostuvo en este largo camino, sin ella no podría llegar a este lugar, todos mis triunfos y metas siempre van dedicados a ella.

A mi padre que esta con papa Dios, esta va por ti mi viejo. Gracias por ser ese ejemplo de vida para mí; sé que estarás orgulloso de este logro obtenido. Gracias por formar parte de mi vida.

A mi hija, que fue el impulso para no dejar de luchar. Eres mi gran amor y tu existencia forjo parte de mi resiliencia la cual me permitió seguir escalando y aprendiendo. Gracias por darme el privilegio de ser tu padre.

A mi hermana que la quiero mucho y siempre la tengo presente en mis oraciones.

A Jose Caceres por el esfuerzo tan grande que realizó, triunfando en un área con poca afinidad a su carrera profesional, porque no es fácil ser enfermero, padre, trabajador y estudiar una maestría. Por demostrar que los obstáculos son mentales y que un enfermero puede triunfar en el mundo de las Ciencias Biomédicas.

Mil veces gracias.

### **Agradecimientos**

A la Universidad Industrial de Santander, por permitirme la culminación de esta meta, como miembro de esta importante institución.

A la Coordinación de posgrados por el apoyo logístico brindado, en especial a Claudita por siempre estar atenta a las dudas y necesidades de la carrera.

A mi director, profesor y amigo Jonny Duque, aparte de DIOS y mis padres, es la tercera persona que hizo posible este trabajo. Todo empezó en una clase de biociencias, cuando él vio un potencial en mí y me indico que yo estaba para grandes cosas. Desde ese día deposito la confianza en un estudiante de enfermería de primer semestre. Posteriormente, cada año respondía a mis correos indicándome que era bienvenido en su grupo de laboratorio, hasta que llego el allegado año 2020, donde tuve la oportunidad de ser parte del laboratorio 110 de entomología médica UIS, gran honor. Gracias a mi director de trabajo, logre aprender muchas cosas, desde la más sencilla aprenderme el nombre de algunos dispositivos del laboratorio como la más difícil que fue aprender el sistema de edición genética CRISPR CAS aplicando teórica molecular y luego de manera bioinformática. Me le quito el sombrero a mi director de proyecto, porque demostró que puede convertir un enfermero en un científico, algo que para muchos era imposible, él lo logró con los mejores resultados. Gracias, profesor Jonny por formar no solo mi parte educativa, sino también profesional y personal, agradezco cada consejo que me daba en cada situación o problema que se presentaba, personas como usted es

la que los estudiantes necesitan para seguir avanzando. Me queda corto este párrafo para darle a conocer los miles de motivos de agradecimiento, me da alegría y paz escuchar que sus objetivos conmigo se cumplieron, expreso mi gratitud hacia usted y acá tiene un amigo para lo que necesite.

A Gustavo Rincón por todo lo enseñado. Agradecimientos por enseñarme el manejo de las colonias de los diferentes individuos del laboratorio, por las salidas de campo, por las recetas para preparar el heno para la recolecta de material biológico de mosquitos, por los diferentes experimentos del laboratorio que fueron fundamentales para mi trabajo de grado, por prestarme la cafetera la cual me brindaba el delicioso Elixir (café) que me mantenía enérgico durante los experimentos, por ayudarme en las cuentas de cobro y los diferentes contratos que fueron fundamentales para mi sostenimiento durante la carrera, por enseñarme clasificación taxonómica de los individuos, por enseñarme el uso de los diferentes dispositivos que se encontraban tanto en el laboratorio 110 como en la zona antigua. Gracias porque más que un compañero, fuiste un amigo durante esta etapa profesional.

A Ruth Castillo por ser mi mama al principio de la maestría. Me enseñó a sobrevivir en el laboratorio. Gracias por los procedimientos experimentales que me enseñó, por los artículos científicos que me ayudo a comprender, por las clases todos los martes a las dos pm porque era el único horario que tenía disponible al inicio de la maestría, por enseñarme a anestesiar una rata albina tipo wistar una experiencia magnifica, por enseñarme a extraer ADN de larvas con los diferentes métodos, por enseñarme las diferencias entre aceites esenciales y su daño en el ADN, por enseñarme a ser ordenado en diferentes áreas de mi carrera, por enseñarme la humildad y el respeto hacia algunas

personas independientemente de la actitud hacia nosotros. Gracias por cada una de las cosas que me enseñó, siempre estaré agradecido contigo. Gracias por enseñarme sin necesidad de humillarme. Gracias por sacar tiempo todas las noches y escucharme exponer mis presentaciones orales. Gracias por tanto y disculpé lo poco que pude ofrecerte. Cuando te fuiste del laboratorio dejaste un gran vacío, pero nunca nos abandonaste, siempre estuviste atenta desde la distancia y te agradezco por eso. Está pendiente la salida con los chicos cuando nos volvamos a encontrar. Cuentas con un amigo más.

A mi codirectora Laura Rengifo por enseñarme la biología evolutiva, tema fundamental en mi trabajo de grado, tema complejo pero que gracias a ella pude entender y aplicar a mis experimentos, comprender conceptos como filogenética, deriva génica, flujo génico, cuello botella, efecto fundador, selección natural. Son cosas que para un enfermero es difícil aprender, pero con la metodología aplicada por mi codirectora puede aprender esos conceptos fundamentales para mi trabajo. Gracias por corregirme una y otra vez en los textos que escribía, queda la certeza que a la fecha puedo decir que mejore un 100 % en escritura gracias a sus enseñanzas. Gracias por las horas de clase semanales para poderme brindar parte de su sabiduría, eran temas tan interesantes que muchas veces la hora era corta y el hambre nos recordaba que tocaba ir almorzar. Gracias por prestarme su computador, fue de gran ayuda en los diferentes procesos de análisis molecular, sin él no podría haber realizado los diferentes alineamientos y evaluaciones de secuencias de mi trabajo. Gracias por enseñarme a realizar secuencias consenso de ADN, alineamiento en MEGA el cual permitió que un enfermero realizará una filogenia con un método bayesiano y coalescente. Gracias por presentarme a su

compañera de morfometría lineal, aprendí mucho del tema. Gracias por cada enseñanza, eres una gran profesional y tutora. Dios bendiga tu caminar.

A cada integrante del laboratorio que de una u otra manera aportaron su granito de arena al desarrollo de mi maestría. Gracias en especial a Alejandro Ortiz, gran compañero y excelente persona. Gracias por su gran ayuda. Espero me invite a su graduación. Admiración y respeto para usted.

A Juliana cuadros por la pregunta de ¿Qué son los halterios? y a Edwin por enseñarme que Arjona es el mejor cantante del mundo. Gracias por compartir momentos importantes de mi carrera. Gracias por esos cafés, chistes, chismes, bromas, hicieron que este caminar fuera más agradable. Admiración y respeto hacia ustedes.

A Paulita lo más lindo del laboratorio 110. Le cogí un cariño grande en el poco tiempo que compartimos, siempre te lo he dicho estas hecha para grandes cosas. Sé que te va a ir bien en tu camino profesional. Un abrazo grande y me debes ese pastel de banano con chocolate.

A mis evaluadores la profesora Clara Vargas y el profesor Oscar Obando, por su gran aporte en mi trabajo de maestría. Aprendí mucho de cada sugerencia dada.

Al profesor Fernando Rondóny la profesora Maryam Chaib, parte del comité tutorial. Gracias por su aporte en mi trabajo.

**Tabla de Contenido**

**Contenido**

Introducción .....	14
1. Planteamiento del problema .....	18
2. Marco Teórico y estado del arte.....	20
3. Objetivos .....	27
3.1 Objetivo General.....	27
3.2 Objetivos Específicos .....	27
4. Metodología.....	28
5. Resultados .....	35
5.2 Discusión .....	57
5.3 Conclusión .....	65
5.4 Consideraciones éticas.....	65
5.4 Presupuesto .....	87
5.5 Cronograma de actividades .....	89
Bibliografía .....	92

## Lista de tablas

<b>Tabla 1</b> Puntos de recolecta de huevos <i>A. aegypti</i> por municipio.....	29
<b>Tabla 2</b> Diferencia en la secuencia del fragmento del gen <i>beta-2 tubulin</i> de individuos silvestres de <i>A. aegypti</i> de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca, Piedecuesta y la cepa Liverpool .....	37
<b>Tabla 3</b> Diferencia en la secuencia del fragmento del gen <i>doublesex-dsx</i> de individuos silvestres de <i>A. aegypti</i> de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca, Piedecuesta y la cepa Liverpool .....	40
<b>Tabla 4</b> Mecanismo de mutaciones del fragmento del gen <i>beta-2 tubulin</i> de individuos silvestres de <i>A. aegypti</i> de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta, Colombia.....	42
<b>Tabla 5</b> Mecanismo de mutaciones del fragmento del gen <i>doublesex-dsx</i> de individuos silvestres de <i>A. aegypti</i> de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta, Colombia.....	44

**Lista de figuras**

- Figura 1. Caracterización del fragmento del gen beta-2 tubulin de individuos silvestres de *A. aegypti* de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta, Colombia. Los cuadros azules corresponden a la secuencia de adherencia de la guía CRISPR CAS. M (macho) H (hembra).....37
- Figura 2. Caracterización del fragmento del gen doublesex-dsx de individuos silvestres de *A. aegypti* de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta, Colombia. Los cuadros azules corresponden a la secuencia de adherencia de la guía CRISPR CAS. M (macho) H (hembra).....39
- Figura 3. Larvas que alcanzaron el estadio pupal de los individuos silvestres e individuos de laboratorio de *A. aegypti* al día 7; n=100; 3 repeticiones. \*Diferencia estadística significativa entre los individuos silvestres con respecto al control (Kruskal-Wallis test:  $H(3; N= 12) = 6.805848$   $p = < 0.05$ ). 5.2. Larvas que alcanzaron el estadio pupal de los individuos *A. aegypti* de la cepa control a los 7 y 10 días; n=100; 3 repeticiones. \*Diferencia estadística significativa en el porcentaje de pupas al día 10 respecto al día 7 (T-Tests; t-value -16.9716;  $p = < 0.05$ ). 5.3 Larvas que alcanzaron el estadio pupal de los individuos silvestres de *A. aegypti* al día 7 e individuos de laboratorio a día 10; n=100; 3

repeticiones. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA F (3; 8) =1.8372 p= 0.21855).....46

Figura 4. Emergencia de adultos en las 24 horas (ANOVA F (2; 6) =3.9085 p=0.08189), 48 horas (ANOVA F (2; 6) =4.5810, p=0.06197) y 72 horas (ANOVA F (2; 6) =0.39041 p=0.69280) en los individuos silvestres de *A. aegypti*. \*Diferencia estadística significativa entre los individuos silvestres de Floridablanca con respecto a los individuos de Piedecuesta en las 24 horas.....48

Figura 5. Oviposición de individuos silvestres y laboratorio de *A. aegypti*. \*Diferencia estadística significativa entre los individuos silvestres con respecto al control. (Kruskal-Wallis test: H (3, N= 226) =15.87508 p = 0.0012).....50

Figura 6. Promedio de eclosión de huevos por hembras silvestres y laboratorio de *A. aegypti*. \*Diferencia estadística significativa entre los individuos silvestres con respecto al control. (Prueba Kruskal-Wallis H (3, N= 226) =19.58628 p = 0.0002).....51

Figura 7. Promedio de larvas de individuos silvestres y laboratorio de *A. aegypti*. \*Diferencia estadística significativa entre los individuos silvestres con respecto al control. (Prueba Kruskal-Wallis H (3, N= 226) =22.02435 p = 0.0001).....52

Figura 8. Mortalidad y longevidad de individuos silvestres y laboratorio de *A. aegypti*; n=20; 3 repeticiones. No se encontró diferencia estadística significativa en la variable mortalidad entre los grupos. (Kruskal-Wallis test:  $H(199, N= 200) = 199.0000$   $p = 0.4867$ ). .....54

Figura 9. Probabilidad de supervivencia individuos *A. aegypti* silvestres y laboratorio. Time (días). Diferencia estadística significativa entre los individuos silvestres con respecto al control. (Chi-square = 27,28903 df = 3 p = .00001). .....55

Figura 10. Árbol filogenético de individuos del grupo de la especie *A. aegypti* Silvestres y cepa Liverpool con método bayesiano y análisis coalescente agrupados en un grupo poblacional, con una probabilidad posterior del 100%. .....56

### Resumen

**Título:** Evaluación de la aptitud biológica asociada a los genes *beta-2 tubulin / doublesex-dsx* de individuos silvestres de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta (Santander)\*

**Autor:** Jose Arsenio Caceres Ayala\*\*

**Palabras Claves:** *Aedes aegypti*, aptitud biológica, caracterización genómica, control vectorial, CRISPR/Cas9, pgSIT.

#### Descripción:

Se evaluó la aptitud biológica asociada a la variabilidad genética de los fragmentos de los genes *beta 2-tubulin* y *doublesex* de individuos silvestres de *Aedes aegypti* comparados con una cepa de laboratorio, para identificar aquellos en los cuales implementar técnica de insecto estéril guiada con precisión. Se recolectaron huevos de *A. aegypti* con trampas de oviposición en los municipios Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta (Santander). Para establecer colonias, las hembras de cada municipio se alimentaron con sangre de rata albina Wistar y se mantuvieron en jaulas de cría. La caracterización molecular de los especímenes involucró la extracción, amplificación y secuenciación por *Sanger* de ADN de 18 individuos de *A. aegypti* silvestres y dos de la cepa control. El porcentaje de similitud de las secuencias se evaluó por medio de BLAST. Para evaluar la homología de los sitios codificantes se realizó alineamiento de las secuencias con el algoritmo CLUSTALW en Benchling y se representaron los sitios polimórficos en MEGA. Posteriormente, se realizó un análisis filogeográfico para identificar grupos genéticos en los individuos con método bayesiano y coalescente, \*BEAST. Para la evaluación de la aptitud biológica, se tomaron y compararon los parámetros de desarrollo larva hasta pupa, pupa hasta adulto, fecundidad, fertilidad y longevidad en las colonias establecidas en laboratorio. Los datos se analizaron con la prueba de Kruskal Wallis y su prueba Post Hoc Dunn y ANOVA con su prueba post hoc Tukey. El gen *beta 2-tubulin* de los individuos silvestres de *A. aegypti* comparten homología en las regiones codificantes con el gen objetivo. Se encontró una mutación no silenciosa en un individuo macho del municipio de Bucaramanga en el fragmento del gen *doublesex*. No hay diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de aptitud biológica evaluados entre los individuos silvestres, pero sí de estos respecto al control ( $p < 0.01$ ). Los resultados indican que los individuos silvestres de *A. aegypti* de los municipios de Floridablanca y Piedecuesta sirven como plataforma en la creación de líneas modificadas genéticamente que serán utilizadas para crear el insecto estéril.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Director: Jonny Edward Duque Luna. Codirector:  
Laura Alexandra Rengifo Correa.

**Abstract**

**Title:** Evaluation of the biological fitness associated with the beta-2 tubulin / doublesex-dsx genes of wild individuals of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the municipalities of Bucaramanga, Floridablanca and Piedecuesta (Santander)\*

**Author:** Jose Arsenio Caceres Ayala \*\*

**Key Words:** *Aedes aegypti*, biological fitness, genomic characterization, vector control, CRISPR/Cas9, pgSIT.

**Descripción:**

The biological fitness associated with the genetic variability of fragments of the *beta 2-tubulin* and the *doublesex* genes of wild individuals of *Aedes aegypti* was evaluated and compared with the laboratory strain, to identify those individuals with optimal features to implement the precision-guided sterile insect technique. *Aedes aegypti* eggs were collected with oviposition traps in Bucaramanga, Floridablanca, and Piedecuesta (Santander) municipalities. To establish colonies, females from each municipality were fed with Wistar albino rat blood and kept in breeding cages. The molecular characterization of the specimens involved the extraction, amplification and Sanger sequencing of DNA from 18 wild *A. aegypti* individuals and two from the laboratory strain. The percentage of similarity from the sequences was evaluated by BLAST. To evaluate the homology of the coding sites, sequence alignment was carried out with the CLUSTALW algorithm in Benchling, and polymorphic sites were schematized with MEGA. To identify genetic groups of individuals, phylogeographic analysis was performed using a Bayesian and a coalescent method, \*BEAST. For the evaluation of biological fitness, the parameters of development from larva to pupa, pupa to adult, fecundity, fertility and longevity were taken and compared in the colonies established in the laboratory. The data were analyzed with the Kruskal Wallis test and its Post Hoc Dunn test and ANOVA with its Tukey post hoc test. The *beta 2-tubulin* gene from wild individuals of *A. aegypti* shares homology in the coding regions with the target gene. A non-silent mutation was found in a male individual from the municipality of Bucaramanga in the *doublesex* gene fragment. There are no statistically significant differences in the biological fitness parameters evaluated among the wild individuals, but there are differences between them compared to the control ( $p < 0.01$ ). The results indicate that wild individuals of *A. aegypti* from the municipalities of Floridablanca and Piedecuesta serve as a platform for the creation of genetically modified lines that will be used to create the sterile insect.

---

\* Thesis

\*\* Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Director: Jonny Edward Duque Luna. Codirector:  
Laura Alexandra Rengifo Correa.

### Introducción

El mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector de las enfermedades dengue, zika y chikunguña en humanos. Se estima que se producen aproximadamente 390 millones de infecciones por el virus del dengue cada año a nivel mundial, dentro de los cuales 96 millones manifestaron diferentes niveles de gravedad, 273.841 casos de chikunguña y 40.528 casos de zika (Díaz-Quíñonez, 2020). A diferencia de otras enfermedades virales (varicela, sarampión, rubéola, etc.), las transmitidas por *A. aegypti* a excepción de la fiebre amarilla carecen de una vacuna como medio de prevención. Por lo cual, las medidas de control vectorial se fundamentan en las etapas larvarias y adultas del mosquito con uso de insecticidas (Brandler et al., 2013). Sin embargo, se ha detectado en diferentes lugares del mundo que la presión de selección por insecticidas trae como resultado poblaciones resistentes a los métodos de control químico tradicionales con insecticidas comerciales. Un metaanálisis y revisión sistemática exploraron los patrones espaciales y temporales de la resistencia a insecticidas en el *A. aegypti* en Asia entre el año 2000 y 2021, donde encontraron resistencia en los siguientes países: Tailandia, Malasia y Camboya resistencia al DDT, la permetrina y deltametrina, en Singapur a la Permetrina y deltametrina, en Vietnam al DDT y permetrina (Zulfa et al. 2022). Por lo anterior es necesario generar nuevas técnicas para complementar los temas de control químico. En estudios de laboratorio se ha evaluado el efecto insecticida de metabolitos secundarios de plantas aromáticas y aceites esenciales donde se ha demostrado que son una alternativa al control químico

tradicional de estos vectores (Carreño Otero et al., 2014) debido a que su impacto ambiental es comparativamente menor y al ser de origen natural no generan resistencia como los productos tradicionales, sin embargo, la efectividad de estos compuestos es relativamente menor que la del control químico tradicional que puede limitarse por la baja persistencia en el ambiente (Shaalán et al., 2005).

Actualmente en Colombia no se ha utilizado la técnica del insecto estéril guiada con precisión como control poblacional del vector *A. aegypti*, según el documento técnico para la implementación de intervenciones para el control de este vector, realizado por la organización panamericana de la salud (*Formato Normalizado Para El Diseño de Perfiles Y Documentos de Proyectos de La OPS*, 1993), indica que los métodos utilizados actualmente son: el control químico enfocado en los estadios huevos, larvas y pupas, como el temefos (larvicida sintético). El control biológico enfocado en los estadios inmaduros de larvas y pupas, donde se introducen organismos que parasitan, compiten o de alguna manera reducen las poblaciones de la especie, los más utilizados son los géneros *Gambusia* y *Poecilia* (Poeciliidae) y los copépodos (Copepoda: *Cyclopoidea*) y el manejo ambiental que se enfoca en las transformaciones físicas permanentes de las características en los criaderos o acciones para reducir el contacto humano-vector, como instalación de mallas mosquiteras en ventanas, puertas y otros puntos de entrada, uso de toldillo. Actualmente han surgido nuevas tecnologías para el control del estadio adulto de este vector, como *Wolbachia* y la Técnica del insecto estéril. Sin embargo, se encuentran en fase de evaluación mediante estudios piloto en algunos países como Brasil, México, Cuba y Estados Unidos. De acá surge la necesidad de realizar estos estudios con el fin de evaluar la implementación de las

nuevas metodologías de control y garantizar una reducción poblacional que se podrá estimar indirectamente con la incidencia de casos de enfermedades transmitidas por este (*Formato Normalizado Para El Diseño de Perfiles Y Documentos de Proyectos de La OPS*, 1993).

Es por eso por lo que surgen técnicas de control de *A. aegypti* mediante genes de reducción poblacional. Un ejemplo de este método de control es la técnica del insecto estéril (TIE) que es un método de modificación genética que procura reducir las poblaciones del insecto a controlar con la introducción de machos no fértiles. La producción de los machos estériles se logra provocando mutaciones aleatorias en el genoma por rayos X, rayos gamma u otros compuestos capaces de generar mutagénesis. Esta técnica puede contaminar el ambiente con agentes radioactivos. Recientemente, se ha desarrollado la técnica del insecto estéril guiada con precisión (TIEgp) en modelos biológicos como *Drosophila melanogaster* (Kandul et al., 2019) en los cuales se utiliza el sistema CRISPR/cas tecnología compuesta por dos elementos donde una guía ARN (ARNg) identifica secuencias de ADN diana y una proteína cas que actúa como endonucleasa la cual corta pares de bases que identifica el ARNg (Doudna & Charpentier, 2014). Para poder obtener machos estériles en un porcentaje del 100%, la técnica TIEgp interrumpe genes esenciales para la viabilidad femenina (*doublesex-dsx*) y del esperma de los machos (*beta-2 tubulin*) lo que resulta en una supervivencia exclusiva de machos estériles que pueden liberarse en cualquier etapa de la vida, sin necesidad de utilizar radiaciones o compuestos mutagénicos. Lo anterior se obtiene mediante el cruce de dos líneas transgénicas producidas por ingeniería genética donde una línea del insecto tiene la proteína cas9 derivada del sistema CRISPR y la otra línea

el ARN guía para generar la disrupción de los genes objetivos. Los beneficios de esta técnica son un costo económico bajo en comparación con las técnicas de irradiación y un menor impacto ambiental en comparación a los métodos de control químicos (insecticidas). Una desventaja de la aplicación de esta técnica es que los organismos modificados en laboratorio presentan una menor aptitud biológica que las poblaciones silvestres, definiendo la aptitud biológica como la propiedad de un organismo, expresada como el producto de supervivencia y éxito reproductivo (Dawkins, 1990). Los mosquitos adultos modificados con estas técnicas presentan un tiempo de eclosión de huevos y desarrollo larva a pupa mayor a la de poblaciones silvestres (Li et al., 2021). Por lo tanto, los mosquitos adultos modificados presentan una menor capacidad biológica, lo que limita su aplicación como método de reducción de la población en ambientes reales (Aldersley et al., 2019). Se cree que la aptitud biológica de la cepa modificada se puede mejorar si se logra cruzar con cepas silvestres, para obtener así una nueva cepa con aptitud biológica mejorada y la capacidad de control vectorial del sistema CRISPR. Pero, previo a esto, se debe conocer las características genéticas y el fitness de las cepas silvestres a utilizar. En este proyecto se busca conocer si existe alguna diferencia en la aptitud biológica (fitness) asociada a la variabilidad de los genes *beta-2 tubulin / doublesex-dsx* de las poblaciones silvestres *A. aegypti*, en particular las provenientes de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta. Por lo tanto, se espera que puedan ser utilizadas como plataforma para la creación de líneas transgénicas portadoras del sistema TIEgp en un futuro.

### **1. Planteamiento del problema**

El manejo actual para combatir las ETV en Colombia se basa en combinar estrategias de control químico (insecticidas comerciales de síntesis química) y físico (eliminación de criaderos, análisis de índices entomológicos y participación comunitaria). A pesar de los múltiples controles utilizados no se ha generado un impacto significativo en la mitigación de las ETV. En Santander en la semana 52 del año 2023 se reportaron 11.499 casos de dengue de los cuales 154 fueron clasificados como dengue grave (Instituto Nacional de Salud. Colombia, 2023) siendo la cuarta entidad territorial de Colombia con mayor incidencia de casos de dengue a pesar de los controles actuales. El costo que genera el control vectorial químico es aproximadamente de 513.278.500 pesos colombianos (Salinas-López et al., 2018) y solo se aplica cuando hay alta incidencia de las enfermedades, por lo cual, su uso no es continuo, permitiendo el aumento de la población del mosquito.

De acuerdo con el panorama anterior, el control genético sería una opción de reducción de la población de *A. aegypti* ya que permite un control durante todo el año (Ruiz et al., 2018), en teoría tendría un costo económico bajo en comparación con las técnicas de irradiación y un menor impacto ambiental en comparación a los métodos de control tradicionales. El método TIEgp logró mediante el cruce de dos líneas transgénicas portadoras de la línea CAS 9 y ARN guía con una cepa de *A. aegypti* de laboratorio la creación del *A. aegypti* estéril. Sin embargo, presentaron una menor capacidad biológica dado que el tiempo de eclosión de sus huevos y el desarrollo larva a pupa era más lento en comparación con una población silvestre (Li et al., 2021). Por

lo anterior surge la necesidad de mejorar la aptitud biológica del insecto transgénico mediante el cruce con poblaciones silvestres, con la presunción de obtener una descendencia con mayor capacidad biológica. Actualmente en Colombia no existe ningún estudio que determine la aptitud biológica de las poblaciones silvestres con relación a la variabilidad de los genes *beta-2 tubulin / doublesex-dsx*. En este proyecto se busca conocer si existe alguna diferencia en la aptitud biológica (fitness) asociada a la variabilidad de los genes *beta-2 tubulin / doublesex-dsx* de las poblaciones silvestres *A. aegypti*, en particular las provenientes de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta. Una vez que se tenga claridad sobre la mejor población silvestre en cuanto a aptitud biológica sería utilizada como plataforma para la creación de líneas transgénicas portadoras del sistema TIEgp. De acuerdo con esto, la hipótesis planteada del proyecto es que existe diferencias en la aptitud biológica asociada a la variabilidad de los genes *beta-2 tubulin / doublesex-dsx* de las poblaciones silvestres *A. aegypti* (Diptera:Culicidae) de los municipios (Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta).

## 2. Marco Teórico y estado del arte

### 2.1 Principales enfermedades transmitidas por *A. aegypti*

#### 2.1.1 Dengue

Es una infección viral aguda transmitida por insectos (Rubio, 2014) que supone una gran carga socioeconómica y de enfermedad en muchas regiones tropicales y subtropicales, y es la enfermedad arboviral más frecuente a nivel mundial (Wilder-Smith et al., 2019). El virus causante del dengue tiene cinco serotipos de los cuales, cuatro siguen el ciclo humano (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) y uno el ciclo selvático (DENV-5) (Mustafá et al. 2015). Cada uno de estos serotipos tiene el potencial para causar la enfermedad y, por consiguiente, una persona a lo largo de su vida puede contagiarse de dengue en múltiples ocasiones. El dengue se caracteriza por presentar fiebre, cefalea, mialgias, artralgias, exantemas, algunos síntomas respiratorios, gastrointestinales y cambios en la química sanguínea como lo son la leucopenia y trombocitopenia (Wilder-Smith et al., 2019). El principal vector que transmite esta enfermedad es el *A. aegypti* (Wilder-Smith et al., 2019).

#### 2.1.2 Chikunguña

Es una enfermedad infecciosa febril, ocasionada por un virus tipo ARN que pertenece al género de los alfavirus (familia togaviridae). Esta enfermedad se transmite al ser humano por *A. aegypti* y *A. albopictus*. Presenta un periodo de incubación de 3 a 7 días. El virus fue identificado en Tanzania en 1953 documentado en regiones de África. Caracterizado por causar síntomas como fiebre, exantema cutáneo, cefalea,

edema de miembros inferiores, conjuntivitis, poliartritis, dolor abdominal acompañado de náuseas y vómito. Esta enfermedad es capaz de ocasionar mayor dolor articular, fiebre aguda con duración más corta y es muy raro observar hemorragia grave comparado con el dengue. Es importante diferenciar estas dos enfermedades (chikunguña / dengue) debido a que, en muchas zonas a nivel mundial como Colombia, coexisten ambas enfermedades (Simera & Reveiz, 2011) y, un mal diagnóstico puede llevar a tratamientos inadecuados empeorando la clínica del paciente.

### **2.1.3 Zika**

Enfermedad causada por un virus de ARN que pertenece a la familia Flaviviridae, del género Flavivirus. También, su principal vector de transmisión es *A. aegypti*. En entornos urbanos este virus se transmite de un mosquito infectado al humano, y luego un mosquito sano adquiere el virus del humano infectado (picadura), y se repite el ciclo. En menor medida *A. albopictus* ha sido vinculado con brotes epidémicos de Zika. El periodo de incubación del virus es menor a 7 días, seguida de la etapa febril (4 días), acompañado de síntomas como conjuntivitis, erupción cutánea, artralgia. Un estudio realizado en la Polinesia francesa reveló una fuerte asociación entre la infección previa por el virus Zika y el síndrome de Guillain Barré, también se han notificado meningoencefalitis, mielitis aguda (Petersen et al., 2016).

## **2.2 Métodos de control usados tradicionalmente contra *A. aegypti***

Para tener un control vectorial eficaz es necesario implementar enfoques integrados que aborden las etapas de ciclo de vida del mosquito, esto conlleva a seleccionar métodos de control adecuados, entre ellos tenemos los insecticidas, participación de la comunidad en el control del vector, métodos que se han evaluado en estudios de laboratorio como los aceites esenciales, control biológico y nuevas alternativas como la edición genética. El manejo actual para combatir las ETV (enfermedades transmitidas por vectores) a nivel nacional se basa en combinar estrategias como el control químico (insecticidas), eliminación de criaderos, análisis de índices entomológicos y participación comunitaria. Los métodos de control más utilizados son los insecticidas. Para el caso de las especies *A. aegypti* y *A. albopictus*, los insecticidas autorizados por el Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores del Ministerio de Salud y Protección Social del gobierno colombiano para el control del vector son organofosforados (malatión y temefos), piretroides (lambdacialotrina, deltametrina y ciflutrina) y reguladores de crecimiento (Pyriproxyfen, Fenoxicarb). El uso prolongado de insecticidas no ha logrado detener el incremento de las enfermedades, ni la dispersión de los vectores a nuevas áreas, pero sí han generado de manera indirecta la selección de poblaciones resistentes del vector a las moléculas empleadas para su control y contaminación del medio ambiente (López-Solís et al., 2020). Actualmente se han realizado estudios con aceites esenciales, síntesis de nuevas moléculas y diseño de insecticidas a partir de sitios de acción como la mitocondria (Borrero-Landazabal et al., 2020) y evaluación de la acción larvicida de distintos compuestos (Ríos et al., 2017) utilizando tasas de mortalidad en bioensayos empleando diferentes concentraciones letales del mismo (Vera et al., 2014) considerando este método como una opción a futuro en el control del vector.

### 2.2.1 Wolbachia

La técnica del insecto incompatible. Se basa en generar esterilidad a partir del apareamiento de dos líneas, hembras *A. aegypti* y machos infectados con una cepa de *Wolbachia*, esto genera un efecto de incompatibilidad citoplasmáticas después de la fertilización obteniendo como resultado la muerte del embrión. (Engelstädter & Hurst, 2009). Sin embargo, los individuos machos de *A. aegypti* infectados con la bacteria, presentan un costo en la aptitud biológica, lo cual afecta su fecundidad, fertilidad, capacidad de vuelo y tasa de supervivencia (Misbah-UI-Haq et al., 2022).

### 2.2.2 La técnica del insecto estéril (TIE) - *The sterile insect technique* (SIT)

Es un método de control de plagas utilizado para crear insectos estériles mediante mutaciones genéticas por medio de irradiación usando rayos X, gamma o compuestos químicos mutagénicos. Esta técnica fue usada en diferentes modelos biológicos para el control de insectos en condiciones de laboratorio entre ellos se encuentra individuos del orden diptera como el *Aedes aegypti* y *Drosophila* (mosca de la fruta), insectos del orden Lepidoptera y hemípteros (Salvemini et al., 2011). Con el uso de esta tecnología se ha demostrado la capacidad para suprimir, contener, prevenir e incluso erradicar localmente las poblaciones de plagas. Sin embargo, también existen algunos inconvenientes a perfeccionar como la necesidad de mejorar su eficiencia y disminuir los costos económicos que implica establecer operativamente este sistema de control genético (Bourtzis & Vreysen, 2021). Los estudios que han utilizado la técnica TIE han confirmado que la reducción de la diversidad genética puede deprimir la aptitud biológica del insecto, y es difícil hacer una correlación con un ámbito natural dado que estos estudios se evaluaron de manera experimental o en poblaciones aisladas (Azrag et al., 2016). La irradiación utilizada reduce la longevidad y capacidad de

apareamiento del macho estéril, obligando al aumento en la tasa de liberación para lograr una reducción en la población objetivo (Du et al., 2019). Lo anterior indica que la técnica TIE en su contexto funcional debe ser mejorada a partir de las falencias del sistema original, logrando así una mejor eficiencia.

### **2.2.3 La técnica de insecto estéril guiada con precisión (TIEgp)**

Es un método de control de plagas que ya se ha implementado previamente para crear insectos estériles. Se diferencia de TIE por utilizar el cruce de dos líneas transgénicas que generan descendencia 100 % infértil y sesgada a machos (Kandul et al., 2019). Lo anterior se logra gracias a que una de las líneas transgénicas posee la enzima Cas9 del sistema CRISPR, y la otra línea posee el ARN guía para poder crear la disrupción en los genes objetivos. Actualmente se han utilizado genes relacionados con la diferenciación sexual o de importancia en el éxito reproductivo del mosquito, como lo es el gen *beta-2 tubulin* que afecta la viabilidad del esperma de los machos localizado en el cromosoma 2 (Gen ID: LOC110676765) (Smith et al., 2007) y el gen *doublesex-dsx* que afecta la viabilidad de las hembras (Salvemini et al., 2011) localizado en el cromosoma 1. Para la activación del sistema, se deben cruzar las dos líneas, sin necesidad de utilizar la irradiación o elementos mutagénicos como la TIE. Una ventaja que se obtiene al realizar la técnica TIEgp es que se puede liberar en cualquier estadio del mosquito (huevo, larva, pupa o adulto). La metodología se creó en la Universidad de California, San Diego, utilizando *A. aegypti* cepa Liverpool como plataforma para la creación de las líneas modificadas (Cas 9 y ARNg). En condiciones de laboratorio se ha demostrado que el macho estéril resultado del cruce de las líneas transgénicas genera una supresión de la población de *A. aegypti*. Sin embargo, las

liberaciones adultas presentaron una menor capacidad biológica dado que el tiempo de eclosión de sus huevos y el desarrollo larva a pupa fue más lento (Li et al., 2021). Lo anterior se presume a que estas líneas no tienen la diversidad genética que se presenta en las cepas silvestres, lo que limita la capacidad de los machos estériles para competir con hembras silvestres o para afectar la esterilidad de los machos. Por lo tanto, en estos sistemas es necesario integrar los componentes de TIEpg de poblaciones de laboratorio sobre líneas silvestres para evaluar su eficiencia en la producción de machos estériles y la eficacia de la esterilización para suprimir una población de mosquitos en condiciones controladas de laboratorio (Aldersley et al., 2019).

#### **2.2.4 CRISPR/Cas9**

En 2012 fue creada y utilizada como una herramienta de edición genética con alta precisión. Este sistema está compuesto por una enzima Cas9 que tiene dos dominios HNH y RuvC los cuales actúan como tijera que corta las dos hebras del ADN simultáneamente, para lograr lo anterior es necesario que una molécula ARN actúe como guía de la proteína Cas9 y así llegue a su lugar objetivo. El sistema CRISPR significa “*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*” o en español repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente inter espaciadas (Jackson et al., 2017), sistema que fue identificado en las bacterias, y funciona como mecanismo de defensa ante agentes patógenos (Knott & Doudna, 2018). Hoy en día los científicos lo utilizan para realizar edición genética (Doudna & Charpentier, 2014). Este nuevo método se ha utilizado en la línea de investigación entomológica donde se han creado mosquitos estériles a partir del sistema CRISPR/cas, alterando genes esenciales de la fertilidad de los machos y viabilidad de las hembras, los cuales han demostrado que

sirven como método de control poblacional de mosquitos en condiciones de laboratorio, sumando a esto, se identificó el gen *beta-2 tubulin* en el escarabajo *Tribolium castaneum* (Khan et al., 2021), lo cual, indica que los genes objetivos utilizados por Kandul y colaboradores (Kandul et al., 2019) son comunes en varios insectos, lo que permite que esta tecnología pueda ser aplicada en diferentes especies, inclusive en aquellas que transmiten ciertas patologías.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo General

Caracterizar en condiciones de laboratorio, la aptitud biológica y los genes *beta 2-tubulin / doublesex-dsx* de individuos silvestres de *A. aegypti* colectados en los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta (Santander).

#### 3.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar los fragmentos de los genes *beta 2-tubulin* y *doublesex-dsx* de individuos silvestres de *A. aegypti* provenientes de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta.
2. Evaluar la aptitud biológica de individuos silvestres de *A. aegypti* provenientes de los municipios Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta bajo condiciones de laboratorio.
3. Correlacionar la aptitud biológica asociada a la variabilidad de los genes *beta 2-tubulin / doublesex-dsx* de los individuos silvestres *A. aegypti* (Diptera:Culicidae) de los municipios (Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta).

#### 4. Metodología

##### 4.1 Caracterización de los genes *beta-2 tubulin* y *doublesex-dsx* de individuos silvestres de *A. aegypti* provenientes de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta (Objetivo 1)

###### 4.1.1 Colecta y mantenimiento de mosquitos silvestres

Se recolectaron individuos de *A. aegypti* silvestres en el municipio de Piedecuesta, Bucaramanga y Floridablanca. Los tres municipios fueron seleccionados teniendo en cuenta el informe de dengue y dengue grave por municipio del instituto nacional de salud, a semana 30 epidemiológica del año 2022 se encuentran entre los cinco municipios del departamento de Santander con mayor incidencia de casos y, por logística del proyecto, eran los más indicados para la recolecta de mosquitos. Dichas colectas se hicieron de manera aleatoria en tres localidades de cada municipio (Tabla 1), mediante trampas de oviposición con infusión de heno (10%) (Ruiz et al., 2018). Los huevos se transportaron al laboratorio del CINTROP para su cría y mantenimiento. A partir de estos huevos, se estableció una colonia para cada localidad. Se realizó una clasificación taxonómica para incluir solo los individuos *A. aegypti*. Los mosquitos se mantuvieron en condiciones de insectario a  $25 \pm 30^{\circ}\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  HR; 12:12 (luz: Oscuridad= L:O) en jaulas de seguridad de  $25\text{ cm}^3$ , cubiertas con pijamas como contra seguridad y cámaras aisladas para evitar fuga o entrada de zancudos silvestres. Para la obtención de huevos F1, las hembras se alimentaron con sangre de *Rattus norvegicus*

*albinus* anestesiada por cada localidad de manera individual. Para los estudios moleculares y de aptitud biológica se utilizaron especímenes de la F2.

**Tabla 1**

*Puntos de recolecta de huevos A. aegypti por municipio*

<b>Municipio</b>	<b>Localidad</b>	<b>N trampas</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>
<b>Bucaramanga</b>	Puerta del sol (1)	10	7 °6'24.87" N	73 °7'0.26" O
<b>Bucaramanga</b>	Puerta del sol (2)	10	7 °6'20.34" N	73 °6'57.68" O
<b>Floridablanca</b>	Escoflor	10	7 °4'34.00" N	73 °5'48.38" O
<b>Bucaramanga</b>	Kennedy	10	7 °9'7.78" N	73 °8'7.34" O
<b>Floridablanca</b>	Altos de bellavista	10	7 °4'16.63" N	73 °5'36.68" O
<b>Floridablanca</b>	La paz	10	7 °3'37.10" N	73 °5'52.23" O
<b>Piedecuesta</b>	UIS guatiguara	10	6 °59'40.60" N	73 °3'57.01" O
<b>Piedecuesta</b>	Cabecera del llano	10	6 °59'29.88" N	73 °2'33.93" O
<b>Piedecuesta</b>	Candelaria	10	6 °58'59.22" N	73 °2'53.00" O

#### 4.1.2 Extracción de ADN

Se realizó extracción de ADN para 20 individuos de *A. aegypti*. Para cada municipio se procesaron 18 muestras (una hembra y un macho para cada una de las tres localidades de cada municipio) y dos para la cepa Liverpool (un macho y una hembra). El procedimiento de extracción se realizó según el protocolo del kit comercial Dneasy Blood & Tissue. La concentración y pureza del ADN se midió mediante espectrometría con el equipo NanoDrop™ One. La integridad se visualizó en un gel de agarosa al 1.5 % (p/v) coloreado con SYbr safe.

#### 4.1.3 Amplificación de los fragmentos de los genes *beta-2 tubulin* y *doublesex-dsx* PCR

Inicialmente, la amplificación de los fragmentos de los genes se realizó a partir de la extracción del ADN para los especímenes de *A. aegypti*. Se realizó detección molecular mediante el protocolo del kit comercial PCR Using Q5® High-Fidelity 2x Máster Mix de New England Bio Labs, Ipswich, MA, USA. utilizando los primers dirigidos a la región del gen *beta-2 tubulin*, (F: CTGCCGCCACAATGTAAATC y R: GTAGGATTCGTCCGTGTTCTC) (Li et al., 2021) la región del gen *doublesex-dsx* (F: GCAAAGAAGAATCGGAACGAAG y R: GGTGCGGTGAGAGACATTA) (Kandul et al. 2019). Las siguientes condiciones para el termociclador fueron: temperatura de desnaturalización inicial a 94°C, alineamiento de 34 ciclos sucesivos a una temperatura melting de 60°C y extensión final a 72°C. Se utilizó como control positivo para la PCR el ADN de la cepa *A. aegypti* Liverpool. El control negativo fue la mezcla de reactivos sin muestra de ADN.

#### 4.1.4 Secuenciación y caracterización

Para obtener las 20 secuencias dobles para cada marcador (18 por los tres municipios y dos de la cepa Liverpool), se realizó secuenciación Sanger mediante la amplificación de las regiones del producto purificado de PCR del fragmento del gen *beta-2 tubulin* y del gen *dsx protein doublesex* para esto se utilizaron los primers de la amplificación dirigidos a la región del gen *beta-2 tubulin*, (Li et al., 2021) y la región del gen *doublesex-dsx* (Kandul et al., 2019).

#### **4.1.5 Alineación e identificación de la variabilidad de los genes *beta-2 tubulin* /**

##### ***doublesex-dsx***

Se verificó el grado de similitud de las secuencias obtenidas con el gen objetivo, utilizando la Web Blast. Posteriormente se realizó el ensamble y alineamiento de las secuencias de los genes *beta-2 tubulin* y otro para *doublesex-dsx* de los individuos de *A. aegypti* provenientes de los tres municipios, con la secuencia de los genes de la cepa *A. aegypti* Liverpool en el programa benchling (Li et al., 2021). Para el alineamiento se empleó el algoritmo de secuencias múltiples en el programa Benchling.

#### **4.1.6 Análisis filogenético y poblacional de los genes *beta-2 tubulin* / *doublesex-dsx***

Se realizó un análisis coalescente (Heled & Drummond, 2012), modelo probabilístico que permitió estimar la genealogía de la muestra de genes de los individuos *A. aegypti* a través de un análisis bayesiano en el que se asume que no hay introgresión o duplicación de genes (Heled & Drummond, 2012) con la finalidad de identificar grupos poblacionales. Para el análisis filogenético se utilizaron dos alineamientos de 20 taxones de individuos silvestres de *A. aegypti* y cepa Liverpool. uno para el gen *doublesex-dsx* y otro para el gen *beta-2 tubulin*, de esta forma se infirió

los árboles de genes y un único árbol de especies con BEAST 2.7.5 utilizando cada alineamiento por separado de ambos genes (Rengifo-Correa et al., 2021), cada ejecución constó de 100 millones de generaciones, almacenando cada 50 mil generaciones. Se utilizó como parámetro del árbol el modelo Yule (Álvarez González, 2023). El modelo de evolución de las secuencias para ambos alineamientos fue JUKES-CANTOR, estimado en el software MEGA acorde a Jmodeltest. Se empleó un reloj biológico estricto para el árbol de especies. Realizamos un análisis coalescente (Heled & Drummond, 2010). Este método permitió estimar las especies y árboles genéticos en un único método bayesiano de Markov. Empleamos TREEANNOTATOR 2.7.5 para calcular el máximo árbol de credibilidad en cada clado, posteriormente se visualizó el árbol de especies en FIGTREE 1.4.4.

## **4.2 Evaluación de la aptitud biológica de individuos silvestres de *A. aegypti* provenientes de los municipios Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta bajo condiciones de laboratorio (Objetivo 2)**

### **4.2.1 Aptitud biológica de individuos silvestres de *A. aegypti***

A partir de las cohortes establecidas por cada localidad de los individuos silvestres *A. aegypti* en laboratorio se compararon los siguientes parámetros, los datos proporcionados fueron de cada localidad, para lo anterior se eclosionaron huevos de las cuatro líneas en paralelo durante 48 horas y se estimaron los parámetros bajo las mismas condiciones de laboratorio (Li et al., 2021).

- a. Desarrollo larval hasta pupa: Se utilizaron 100 larvas de cada colonia en recipientes separados en bandejas con 3 litros de agua sin cloro. Se alimentaron una vez al día con

un gramo de comida. Se realizó el conteo una vez por día hasta llegar a pupa, este proceso se realizó durante 7 días. Estos días se eligieron para estandarizar el proceso y obtener la mayoría de las pupas, tomando como referencia los resultados obtenidos de la prueba piloto realizada previa al experimento y literatura científica, lo anterior se realizó para poder disminuir la fuente de variación.

- b. Desarrollo pupal hasta adulto: las pupas se introdujeron en un vaso 100 mL de agua sin cloro y se registraron los sobrevivientes hasta adulto durante un tiempo de 72 horas. Estas horas se eligieron para estandarizar el proceso y obtener la mayoría de emergencia de adultos, tomando como referencia los resultados obtenidos de la prueba piloto realizada previa al experimento y literatura científica, lo anterior se realizó para poder disminuir la fuente de variación.
- c. Fecundidad y fertilidad: se introdujeron en jaula separadas 20 adultos hembra y 20 adultos machos, criados bajo las mismas condiciones larvales. Se dejaron aparear durante 48 horas, luego se sacaron los machos y posteriormente se alimentaron las hembras con sangre de *Rattus norvegicus albinus*, de manera individual se colocó sustrato de oviposición durante 5 días para cada hembra. La fecundidad se evaluó como el número de huevos puestos por cada hembra y la fertilidad con el porcentaje de huevos eclosionados.
- d. Longevidad: Se introdujeron en jaula separadas 20 individuos de diferente sexo, criados bajo las mismas condiciones larvales. Se alimentaron con sacarosa al 10% y se realizó el conteo diario de individuos muertos hasta la muerte de todos los mosquitos.

#### **4.2.2 Procesamiento de datos y análisis estadístico**

Se utilizaron las pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Para analizar diferencias entre los grupos que tuvieron distribución no paramétrica, se realizó la prueba de Kruskal Wallis y su prueba Post Hoc Dunn y la prueba ANOVA con su prueba Post Hoc Tukey para los datos que tuvieron una distribución paramétrica, Se utilizó como variable categórica los municipios de procedencia y variables cuantitativas los parámetros de aptitud biológica evaluados. Se utilizó la prueba Kaplan-Meier para estimar la probabilidad de supervivencia a partir del evento de muerte en el estadio adulto de los individuos *A. aegypti*.

#### **4.2.3 Correlación de la aptitud biológica asociada a la variabilidad de los genes *beta-2 tubulin / doublesex-dsx* de los individuos silvestres *A. aegypti* (Diptera: Culicidae) de los municipios (Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta) (Objetivo 3)**

No se aplicó el método estadístico spearman en las variables: parámetros de la aptitud biológica de los individuos silvestres y cepa Liverpool con la variable grupos poblacionales, lo anterior se debe a que solo se encontró un grupo poblacional en el análisis filogeográfico, indicando que, al encontrar diferencias estadísticas en la evaluación de la aptitud biológica, estas no dependían del grupo poblacional.

## 5. Resultados

### 5.1 Caracterización de los genes *beta-2 tubulin* y *doublesex-dsx* de individuos silvestres de *A. aegypti* provenientes de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta (Objetivo 1)

#### 5.1.1 Gen *beta-2 tubulin*

Se obtuvieron 20 secuencias consenso del fragmento del gen *beta-2 tubulin* de individuos de *A. aegypti* (18 secuencias individuos silvestres y dos individuos cepa Liverpool). Se muestra en la figura 1 el alineamiento múltiple de secuencias con el método Clustalw en la plataforma Benchling. Las secuencias del fragmento del gen *beta-2 tubulin* de individuos silvestres presentan conservación en el sitio de corte en el cual actúan las guías para el sistema CRISPR CAS comparados con los individuos de la cepa Liverpool.

En el alineamiento de las secuencias del fragmento del gen *beta-2 tubulin* (tabla 2) se encontraron mutaciones de tipo transversión evidenciadas en las posiciones 25, 35, 52, 142, 385 en individuos silvestres del municipio de Piedecuesta y Floridablanca, transiciones en la posición 488, 493 y 502 en individuos de Piedecuesta y Floridablanca e inserciones en la posición 57, 162, 163, 266, 267, 268, 269 en individuos de Floridablanca, Bucaramanga y Piedecuesta. La transversión encontrada en la posición 142 es compartida por un individuo hembra de Piedecuesta y un individuo macho de Bucaramanga. Las transiciones en la posición 488 y 502 es compartida por dos individuos machos de Floridablanca y un individuo hembra de Piedecuesta (Tabla 4).

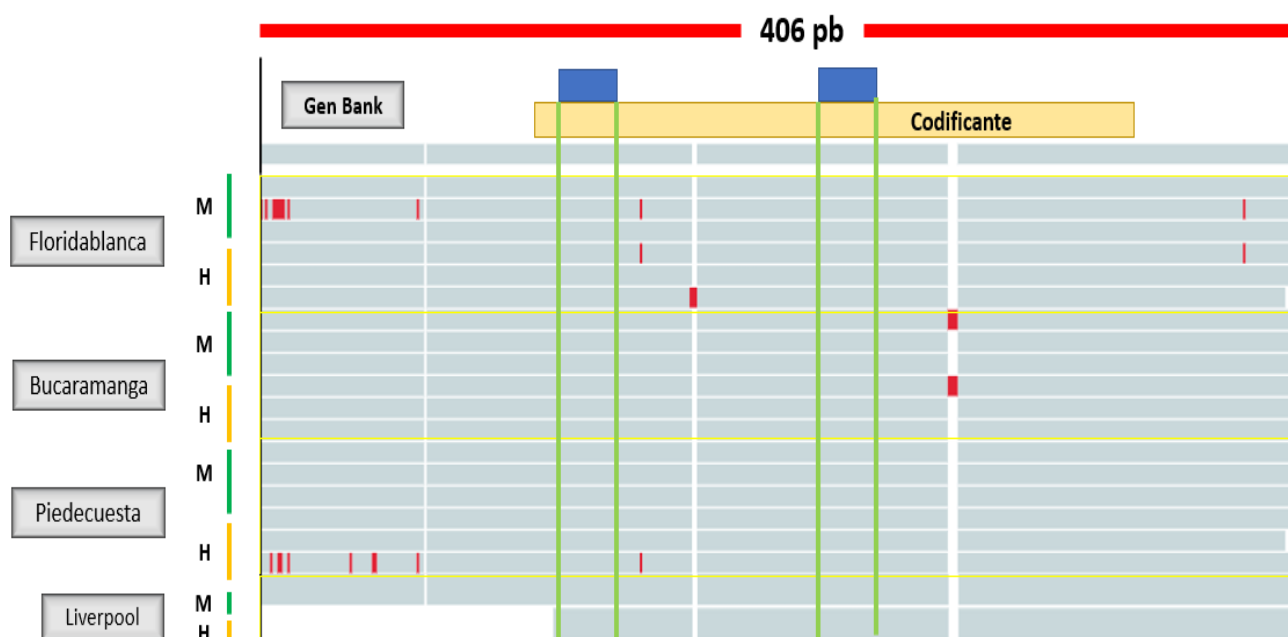
### 5.1.2 Gen *doublesex-dsx*

Se obtuvieron 20 secuencias consenso del fragmento del gen *doublesex-dsx* de individuos de *A. aegypti* (18 secuencias individuos silvestres y dos individuos cepa Liverpool). Se muestra en la figura 2 el alineamiento múltiple de secuencias con el método clustalw en la plataforma Benchling. En la secuencia del fragmento del gen *doublesex-dsx* de un individuo macho silvestre del municipio de Bucaramanga se encontró una mutación en la posición 695 debida a una transversión de tipo A – G en el sitio de corte en el cual actúa el sistema CRISPR CAS comparados con los individuos de la cepa Liverpool. Las demás secuencias obtenidas presentan conservación en el sitio de corte en el cual actúan las guías para el sistema CRISPR CAS comparados con los individuos de la cepa Liverpool.

En la alineación de nuestras secuencias relacionadas con el fragmento del gen *doublesex-dsx*, se encontraron mutaciones de tipo transversión evidenciadas en las posiciones 486, 543, 618 y 621 en individuos del municipio de Bucaramanga, transiciones en la posición 399 y 781 en individuos del municipio de Piedecuesta y Bucaramanga, inserciones en la posición 153, 154, 315, 476, 508, 587, 604, 607, 641, 683, 779 en individuos del municipio de Bucaramanga, Piedecuesta, Floridablanca y Cepa Liverpool, deleciones en la posición 594 de individuos del municipio de Floridablanca (Tabla 3). La inserción en la posición 587 en un individuo hembra de Floridablanca y Liverpool y la deleción en la posición 594 en un individuo hembra y un individuo macho de Floridablanca es compartida (Tabla 3 y 5).

**Figura 1**

*Caracterización del fragmento del gen beta-2 tubulin de individuos silvestres de A. aegypti de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta, Colombia*



*Nota. Los cuadros azules corresponden a la secuencia de adherencia de la guía CRISPR*

*CAS. M (macho) H (hembra).*

**Tabla 2**

*Diferencia en la secuencia del fragmento del gen beta-2 tubulin de individuos silvestres de A. aegypti de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca, Piedecuesta y la cepa Liverpool*

EVALUACIÓN DE LA APTITUD BIOLÓGICA ASOCIADA A LOS GENES

BETA-2 TUBULIN / DOUBLESEX-DSX

					1	3	4	4	5	
	2	3	3	5	4	8	8	9	0	
	5	4	5	2	2	5	8	3	2	Grupo
<hr/>										
Floridablanca										
R1Fm	T	G	C	A	G	T	T	T	T	
Floridablanca										
R2Fm	.	.	.	T	C	A	C	.	C	
Floridablanca										
R3Fm	.	.	.	T	A	.	.	C	.	
Floridablanca										
R1Fh	.	.	.	T	C	A	C	.	C	
Floridablanca										
R2Fh	.	.	.	T	C	A	?	?	?	
Floridablanca										
R3Fh	.	.	.	T	C	A	C	.	C	Floridablanca
<hr/>										
Bucaramanga										
R1Bm	.	.	.	T	C	A	C	.	C	
Bucaramanga										
R2Bm	.	.	.	T	C	A	C	.	C	
Bucaramanga										
R3Bm	.	.	.	T	C	A	C	.	C	Bucaramanga
<hr/>										

Bucaramanga										
R1Bh	.	.	.	T	C	A	C	.	C	
Bucaramanga										
R2Bh	.	.	.	T	C	A	C	.	C	
Bucaramanga										
R3Bh	.	.	.	T	C	A	C	.	C	
<hr/>										
Piedecuesta R1Pm	.	.	.	T	C	A	C	.	C	
Piedecuesta R2Pm	.	.	.	T	C	A	C	.	C	
Piedecuesta R3Pm	.	.	.	T	C	A	C	.	C	
Piedecuesta R1Ph	.	.	.	T	C	A	?	?	?	
Piedecuesta R2Ph	A	A	G	G	A	A	.	.	.	
Piedecuesta R3Ph	.	.	.	T	C	A	C	.	C	Piedecuesta
<hr/>										
Liverpool m	.	.	.	T	C	A	C	.	C	
Liverpool h	?	?	?	?	C	A	C	.	C	Liverpool

*Nota. La posición de las bases nitrogenadas se da en la parte superior (léidas verticalmente)*

*según la alineación de CLUSTAL W. “.” = identidad, “m” = macho, “h” = hembra).*

## **Figura 2**

*Caracterización del fragmento del gen doublesex-dsx de individuos silvestres de A. aegypti de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta, Colombia*



EVALUACIÓN DE LA APTITUD BIOLÓGICA ASOCIADA A LOS GENES

*BETA-2 TUBULIN / DOUBLESEX-DSX*

41

Floridablanca R2Fh	.	.	.	.	.	.	.	
Floridablanca R3Fh	.	.	.	.	.	.	.	
Bucaramanga R1Bm	.	.	.	.	.	.	.	
Bucaramanga R2Bm	.	.	.	C	.	.	?	
Bucaramanga R3Bm	.	.	C	.	.	.	.	
Bucaramanga R1Bh	.	.	.	.	.	.	.	
Bucaramanga R2Bh	.	.	.	.	.	.	.	
Bucaramanga R3Bh	G	A	.	.	A	C	.	Bucaramanga
Piedecuesta R1Pm	.	.	.	.	.	.	.	
Piedecuesta R2Pm	.	.	.	.	.	.	.	
Piedecuesta R3Pm	.	.	.	.	.	.	.	
Piedecuesta R1Ph	.	.	.	.	.	.	.	
Piedecuesta R2Ph	.	.	.	.	.	.	?	
Piedecuesta R3Ph	.	.	.	.	.	.	T	Piedecuesta
Liverpool m	.	.	.	.	.	.	.	
Liverpool h	.	.	.	.	.	.	.	Liverpool

Nota. La posición de las bases nitrogenadas se da en la parte superior (leídas verticalmente) según la alineación de CLUSTAL W. “.” = identidad, “m” = macho, “h” = hembra)

**Tabla 4**

*Mecanismo de mutaciones del fragmento del gen beta-2 tubulin de individuos silvestres de A. aegypti de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta, Colombia*

<b>Individuo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Posición</b>	<b>Base</b>	<b>Base</b>	<b>Mecanismo</b>
<b>Silvestre</b>				<b>Liverpool</b>	
<b>R1pb</b>	H	25	A	T	Transversión
<b>R1pb</b>	H	35	G	C	Transversión
<b>R1pb</b>	H	52	G	T	Transversión
<b>R3pb</b>	H	57	A	-	Inserción
<b>R1Fb</b>	M	142	G	C	Transversión
<b>R3Fb</b>	M	142	A	C	Transversión
<b>R1Pb</b>	H	142	A	C	Transversión
<b>R2Fb</b>	H	162	G	-	Inserción
<b>R2Fb</b>	H	163	G	-	Inserción
<b>R3FB</b>	H	266 - 269	GGCT	-	Inserción
<b>R3Bb</b>	M	266 - 269	GGCT	-	Inserción
<b>R1Fb</b>	M	385	T	A	Transversión
<b>R3Fb</b>	M	385	T	A	Transversión
<b>R1Fb</b>	M	488	G	C	Transversión
<b>R3Fb</b>	M	488	G	C	Transversión
<b>R1Pb</b>	H	488	G	C	Transversión

<b>R3Fb</b>	M	493	C	T	Transición
<b>R1Fb</b>	M	502	T	C	Transición
<b>R3Fb</b>	M	502	T	C	Transición
<b>R1Pb</b>	H	502	T	C	Transición

---

**5.1.3 Evaluación de la aptitud biológica de individuos silvestres de *A. aegypti* provenientes de los municipios Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta bajo condiciones de laboratorio (Objetivo 2).**

En la figura 3.1 se muestran los resultados obtenidos referente a las larvas que alcanzaron el estadio pupal de cada uno de los individuos silvestres pertenecientes a los tres municipios y la cepa de laboratorio al finalizar los 7 días establecidos para el seguimiento. El número de larvas empleadas para cada municipio fue de 100 por réplica. El porcentaje promedio de pupas obtenidas para el municipio de Floridablanca fue de  $83 \% \pm 7$ . Para Bucaramanga de  $76 \% \pm 10$ . Para Piedecuesta de  $78 \% \pm 14$  y la cepa control de  $4 \% \pm 2$ . No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos silvestres, pero sí entre estos respecto al control (ANOVA F (3; 8) =47.778 p=0.00002). Posteriormente se realizó seguimiento a la cepa control hasta el día 10, obteniendo un porcentaje promedio de pupas de  $65\% \pm 5,9$  (Figura 3.2). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el promedio de pupas a los 10 días respecto al día 7 en la cepa control (T-Test -16.9716; p= < 0.05). En la figura 3.3 se muestran los resultados obtenidos referente a las larvas que alcanzaron el estadio pupal de cada uno de los individuos silvestres al día 7 comparadas con la cepa de control

al día 10. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos

(ANOVA F (3; 8) =1.8372 p= 0.21855).

***Tabla 5***

*Mecanismo de mutaciones del fragmento del gen doublesex-dsx de individuos silvestres de A. aegypti de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta, Colombia*

**EVALUACIÓN DE LA APTITUD BIOLÓGICA ASOCIADA A LOS GENES**

*BETA-2 TUBULIN / DOUBLESEX-DSX*

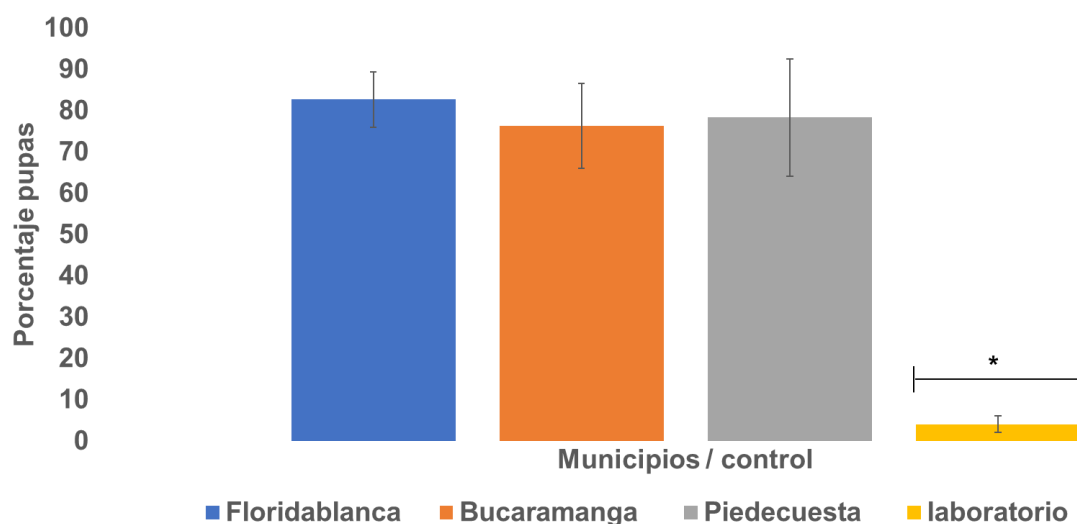
45

<b>Individuo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Posición</b>	<b>Base</b>	<b>Base Liverpool</b>	<b>Mecanismo mutación</b>
R3Bd	M	153	A	-	Inserción
R3Bd	M	154	C	-	Inserción
R1Bd	H	315	G	-	Inserción
R3Bd	H	399	G	A	Transición
R1Pd	H	476	A	-	Inserción
R3Bd	M	486	C	T	Transversión
Lb	M	508	G	-	Inserción
R2Bd	M	543	C	A	Transversión
R1Fd	H	587	C	-	Inserción
Lb	H	587	C	-	Inserción
R1Fd	M	594	-	A	Delección
R1Fd	H	594	-	A	Delección
R2Fd	H	604	A	-	Inserción
R2Pd	H	607	G	-	Inserción
R3Bd	H	618	A	C	Transversión
R3Bd	H	621	C	A	Transversión
R1Fd	M	641	A	-	Inserción

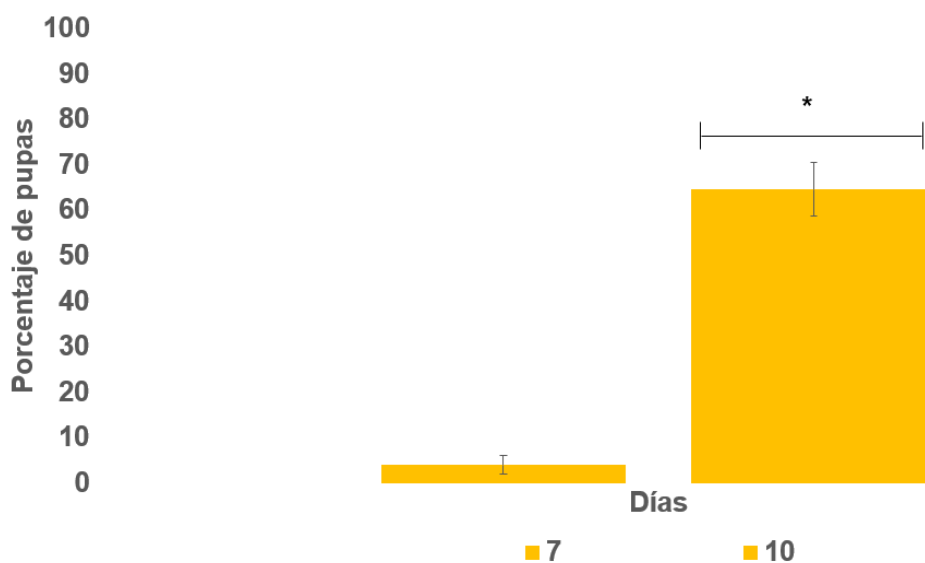
Lb	H	683	G	-	Inserción
R3Bd	M	779	A	-	Inserción
R3Pd	H	781	T	C	Transición

**Figura 3**

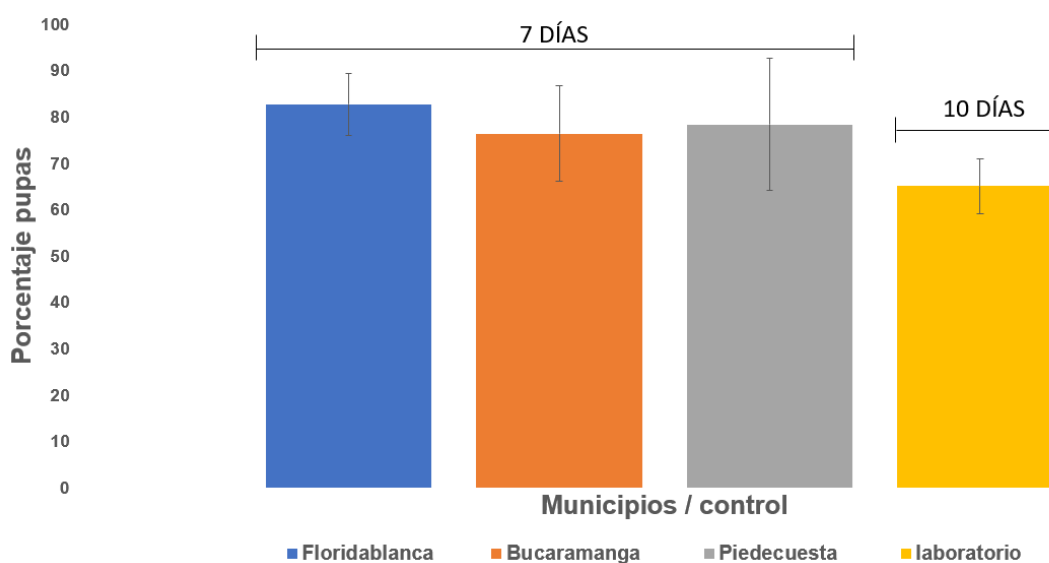
En la figura 3.1. Larvas que alcanzaron el estadio pupal de los individuos silvestres e individuos de laboratorio de *A. aegypti* al día 7; n=100; 3 repeticiones. 3.2. Larvas que alcanzaron el estadio pupal de los individuos *A. aegypti* de la cepa control a los 7 y 10 días; n=100; 3 repeticiones. 3.3 Larvas que alcanzaron el estadio pupal de los individuos silvestres de *A. aegypti* al día 7 e individuos de laboratorio a día 10; n=100; 3 repeticiones.



Nota. \*Diferencia estadística significativa entre los individuos silvestres con respecto al control (Kruskal-Wallis test:  $H(3; N=12) = 6.805848$   $p < 0.05$ ).



Nota. \*Diferencia estadística significativa en el porcentaje de pupas al día 10 respecto al día 7 (T-Tests;  $t$ -value  $-16.9716$ ;  $p = < 0.05$ ).



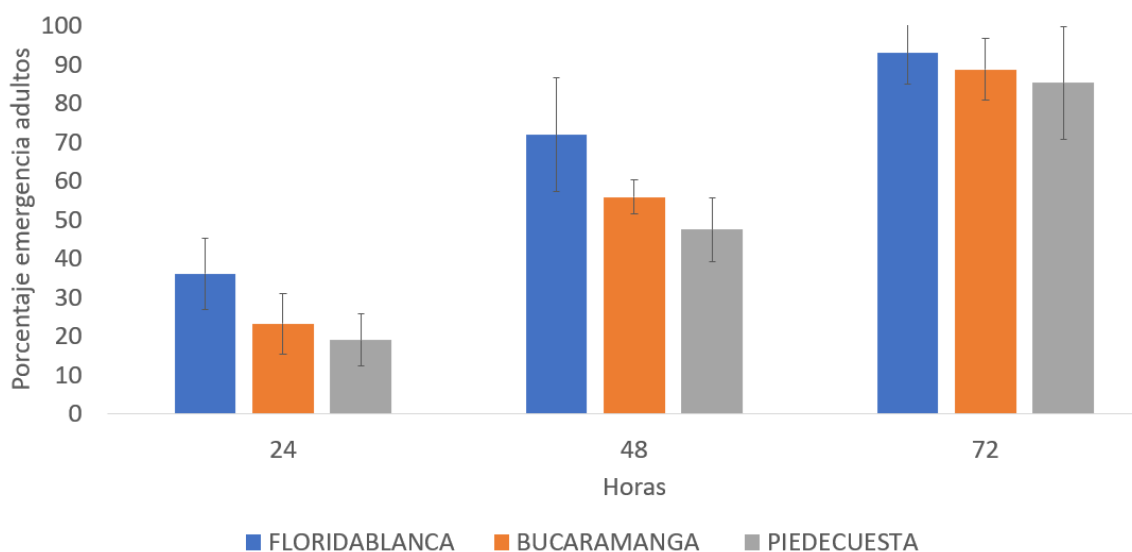
Nota. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA  $F(3; 8) = 1.8372$   $p = 0.21855$ ).

En la figura 4 se presenta el porcentaje promedio de emergencia de adultos *A. aegypti* de cada municipio y cepa control evaluadas en los tiempos de 24, 48 y 72 horas.

El número de pupas promedio utilizadas para el municipio de Floridablanca fue  $83 \pm 6.7$  obteniendo un porcentaje promedio de adultos en las 24 horas de  $36\% \pm 9\%$ , en las 48 horas de  $72\% \pm 15\%$  y en las 72 de  $93\% \pm 8\%$ . Para el municipio de Bucaramanga se emplearon  $76 \pm 10.3$  pupas obteniendo un porcentaje promedio de adultos en las 24 horas de  $23\% \pm 8\%$ , en las 48 horas de  $56\% \pm 4\%$ , en las 72 horas de  $89\% \pm 8\%$ . Para el municipio de Piedecuesta se emplearon  $78 \pm 14.2$  pupas obteniendo un porcentaje promedio de adultos en las 24 horas de  $19\% \pm 7\%$ , en las 48 horas de  $47\% \pm 8\%$ , en las 72 horas  $85\% \pm 14\%$ . No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos silvestres en las 24 (ANOVA F (2; 6) =3.9085 p=0.08189), 48 (ANOVA F (2; 6) =4.5810, p=0.06197) y 72 horas (ANOVA F (2; 6) =0.39041 p=0.69280) en el porcentaje de emergencia de adultos.

#### **Figura 4**

*Emergencia de adultos en las 24 horas (ANOVA F (2; 6) =3.9085 p=0.08189), 48 horas (ANOVA F (2; 6) =4.5810, p=0.06197) y 72 horas (ANOVA F (2; 6) =0.39041 p=0.69280) en los individuos silvestres de A. aegypti*

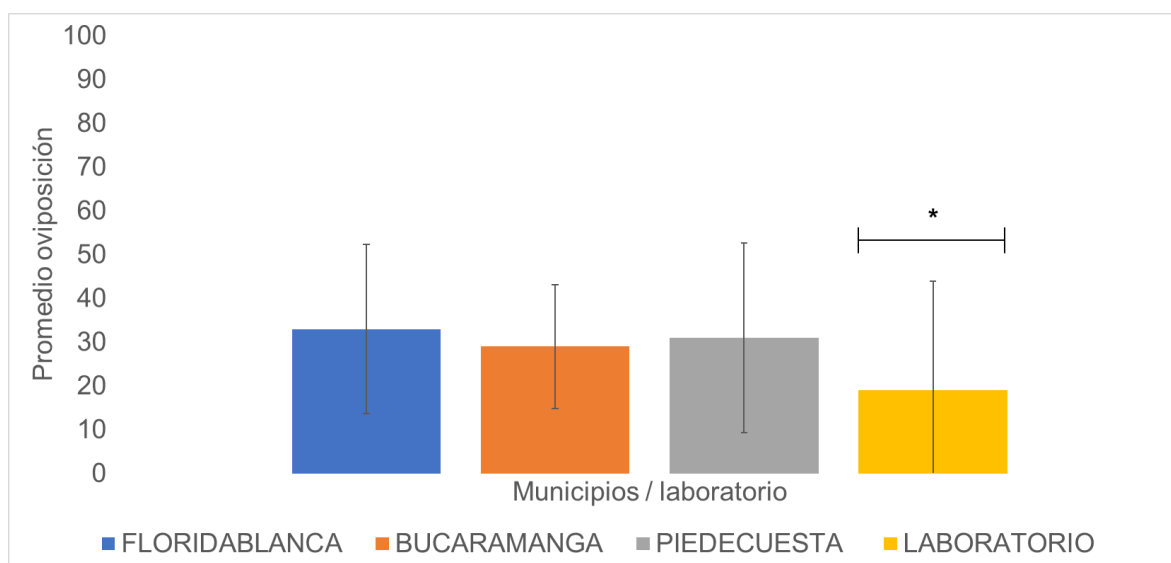


*Nota. \*Diferencia estadística significativa entre los individuos silvestres de Floridablanca con respecto a los individuos de Piedecuesta en las 24 horas.*

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos referente a la oviposición de las hembras *A. aegypti* de cada municipio. El número de hembras empleado para el municipio de Floridablanca fueron 58 obteniendo un promedio de oviposición por hembra de  $33 \pm 19$ ; para Bucaramanga fueron empleadas 58 hembras obteniendo un promedio de oviposición por hembra de  $29 \pm 14$ ; y para Piedecuesta fueron empleadas 60 hembras obteniendo un promedio de oviposición por hembra de  $31 \pm 22$ ; para los individuos de laboratorio fueron empleadas 50 hembras obteniendo un promedio de oviposición por hembra de  $19 \pm 25$ . No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos silvestres, pero sí entre estos respecto al control (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=226) = 15.87508$   $p = 0.0012$ ).

**Figura 5**

Oviposición de individuos silvestres y laboratorio de *A. aegypti*



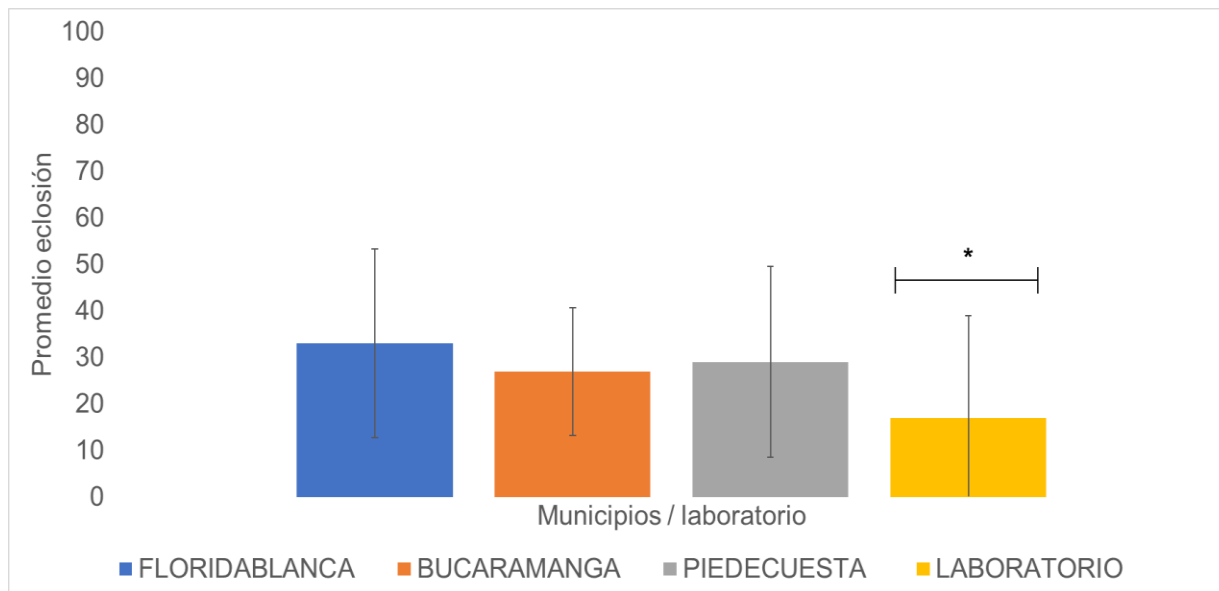
*Nota.* \*Diferencia estadística significativa entre los individuos silvestres con respecto al control. (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N= 226) = 15.87508$   $p = 0.0012$ ).

En la figura 6 se muestran los resultados de eclosión de los huevos colocados por hembras de *A. aegypti* de cada municipio e individuos de laboratorio. El número de huevos empleados para el municipio de Floridablanca fueron 1900 con una media de  $33 \pm 19.3$  obteniendo 1885 huevos eclosionados con una media de  $30 \pm 20$ ). Con un promedio de eclosión de huevos por hembra de  $33 \pm 20$ . Para Bucaramanga se emplearon 1702 huevos con una media de  $29 \pm 14.2$ , obteniendo 1554 huevos eclosionados con una media de  $27 \pm 14$ . Con un promedio de eclosión de huevos por

hembra de  $27 \pm 14$ ; y para Piedecuesta se emplearon 1846 huevos con una media de  $31 \pm 21.7$ , obteniendo 1731 huevos eclosionados con una media  $29 \pm 21$ . Con un promedio de eclosión de huevos por hembra de  $29 \pm 21$ . Para la cepa de laboratorio se emplearon 946 con una media de  $19 \pm 25$ , obteniendo 852 huevos eclosionados con una media de  $17 \pm 22$ . Con un promedio de eclosión de huevos por hembra de  $17 \pm 22$ . No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos silvestres, pero sí entre estos respecto al control (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=226) = 19.58628$   $p = 0.0002$ ).

### Figura 6

Promedio de eclosión de huevos por hembras silvestres y laboratorio de *A. aegypti*

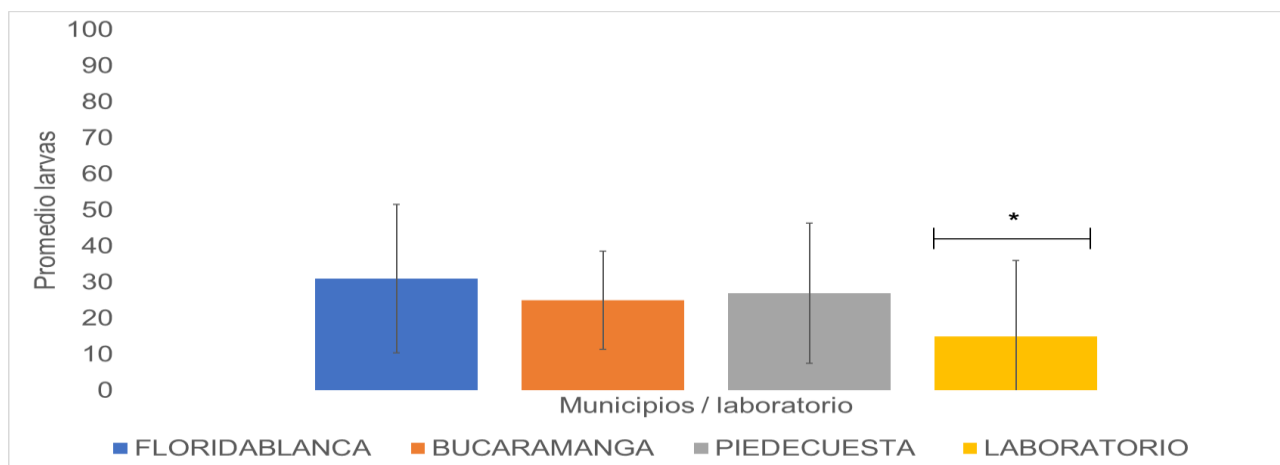


Nota. \*Diferencia estadística significativa entre los individuos silvestres con respecto al control. (Prueba Kruskal-Wallis  $H(3, N=226) = 19.58628$   $p = 0.0002$ ).

Una vez obtuvimos el número de huevos eclosionados para cada uno de los municipios, se realizó el conteo de larvas obtenidas. El número de huevos eclosionados de la muestra para el municipio de Floridablanca fueron 1885 con una media de  $33 \pm 20$  de los cuales se obtuvieron 1822 larvas con una media de  $31 \pm 20.5$ . Con un promedio de larvas por hembra de  $31 \pm 21$ . Para Bucaramanga fueron 1554 con una media de  $27 \pm 14$  huevos eclosionados de los cuales se obtuvieron 1469 con una media de  $35 \pm 13.6$  larvas. Con un promedio de larvas por hembra de  $25 \pm 14$ . Para Piedecuesta fueron 1731 con una media de  $29 \pm 21$  huevos eclosionados de los cuales se obtuvieron 1623 con una media de  $27 \pm 19.5$  larvas. Con un promedio de larvas por hembra de  $27 \pm 20$ . Para los individuos de laboratorio fueron 852 con una media de  $17 \pm 22$  huevos eclosionados de los cuales se obtuvieron 770 con una media de  $15 \pm 21$  larvas. Con un promedio de larvas por hembra de  $15 \pm 21$ . No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos silvestres, pero sí entre estos respecto al control (Kruskal-Wallis H (3, N= 226) =22.02435 p = 0.0001). (Figura 7).

### **Figura 7**

*Promedio de larvas de individuos silvestres y laboratorio de A. aegypti*



*Nota. \*Diferencia estadística significativa entre los individuos silvestres con respecto al control. (Prueba Kruskal-Wallis  $H(3, N= 226) = 22.02435$   $p = 0.0001$ ).*

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos de longevidad de los individuos silvestres y laboratorio de *A. aegypti*. En el municipio de Piedecuesta se presentó mortalidad a partir del día 21 generando una disminución constante hasta el día 42. El municipio de Bucaramanga presentó mortalidad en el día 27 generando una disminución constante hasta el día 46. El municipio de Floridablanca presentó mortalidad en el día 29 generando una disminución hasta el día 49. Los individuos de laboratorio presentaron mortalidad el día 11 generando una disminución constante hasta el día 35. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la variable mortalidad entre los grupos evaluados (Kruskal-Wallis test:  $H(199, N= 200) = 199.0000$   $p = 0.4867$ ).

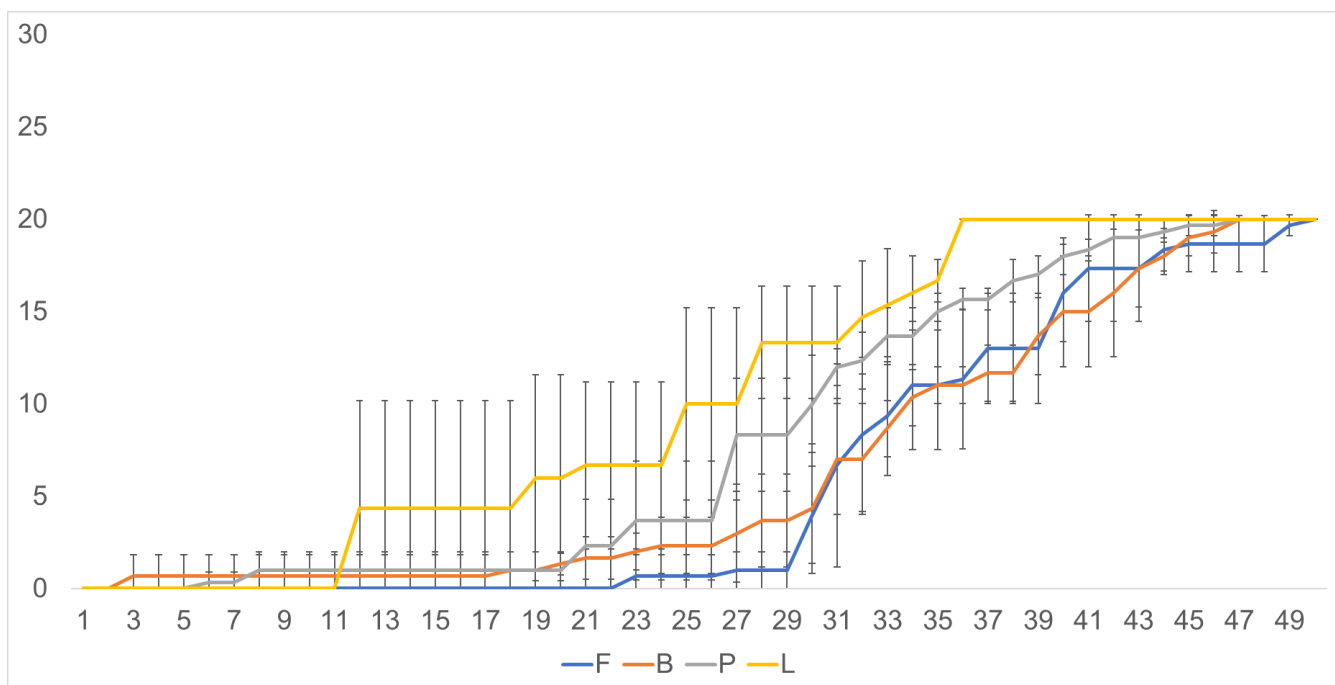
En el análisis de la supervivencia, con el estimador Kaplan-Meier no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos silvestres,

pero sí entre estos respecto al control. (Chi-square = 27.28903 df = 3 p = 0.00001).

(Figura 11).

**Figura 8**

*Mortalidad y longevidad de individuos silvestres y laboratorio de A. aegypti; n=20; 3 repeticiones*



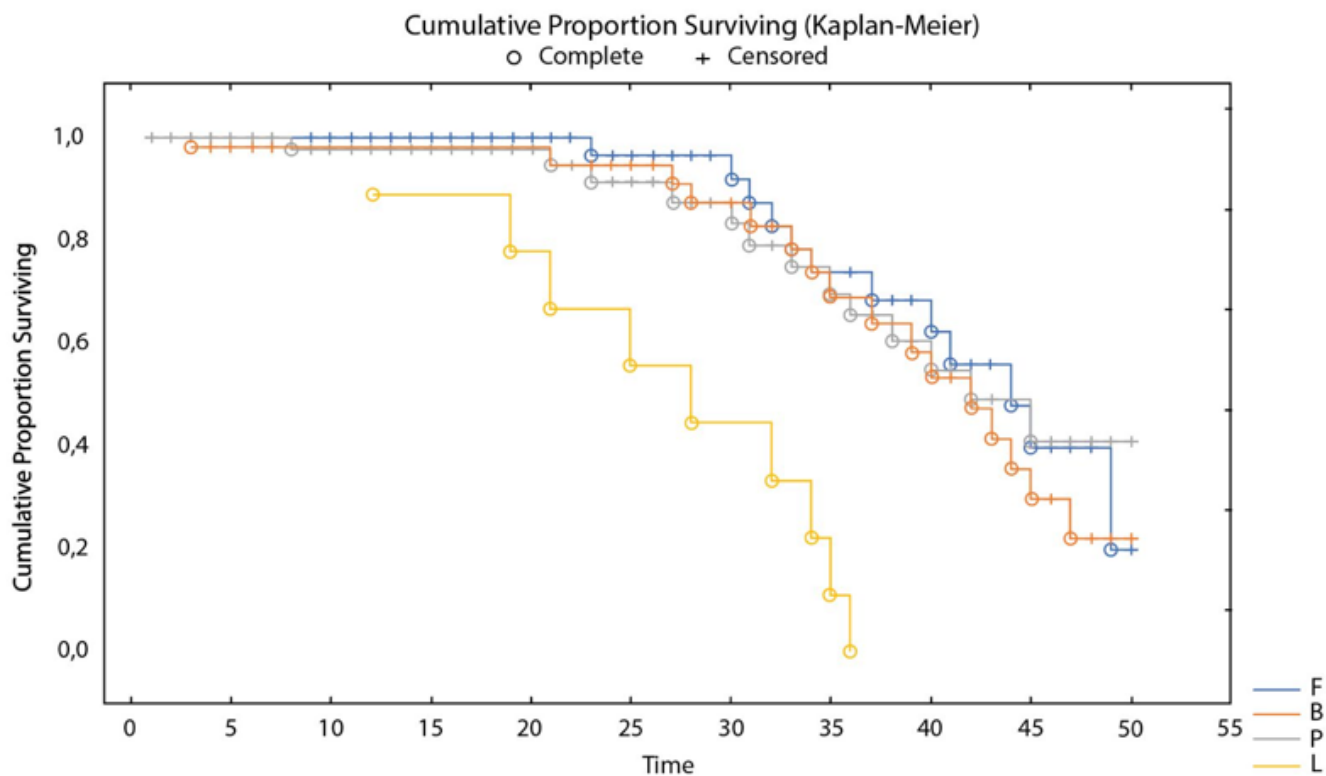
*Nota. No se encontró diferencia estadística significativa en la variable mortalidad entre los grupos. (Kruskal-Wallis test:  $H(199, N=200) = 199.0000$   $p = 0.4867$ ).*

**5.1.4 Correlación de la aptitud biológica asociada a la variabilidad de los genes *beta-2 tubulin* / *doublesex-dsx* de los individuos silvestres *A. aegypti* (Diptera: Culicidae) de los municipios (Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta) (Objetivo 3)**

Se esperó encontrar relación entre los parámetros de aptitud biológica y grupos poblacionales, sin embargo, el análisis filogenético de las secuencias de los genes *doublesex* y *beta-2 tubulin* de los individuos silvestres de *A. aegypti* y cepa Liverpool, determinó que ellos se encuentran agrupados en un grupo poblacional, con una probabilidad posterior del 100% (Figura 9). Es decir, el grupo control y los silvestres no difieren en las características genéticas analizadas. Por tal motivo, no se pudo realizar el análisis de correlación propuesto.

**Figura 9**

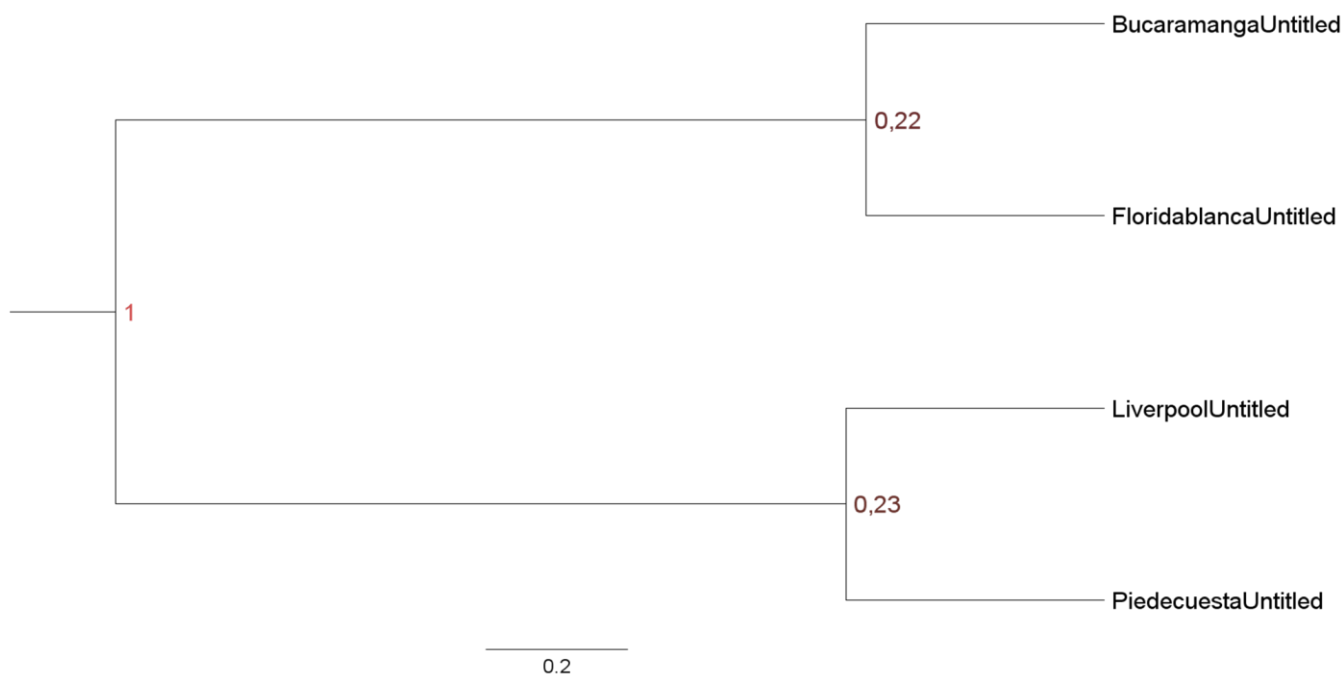
*Probabilidad de supervivencia individuos A. aegypti silvestres y laboratorio. Time (días)*



*Nota. Diferencia estadística significativa entre los individuos silvestres con respecto al control. (Chi-square = 27,28903 df = 3 p = .00001).*

### **Figura 10**

*Árbol filogenético de individuos del grupo de la especie *A. aegypti* Silvestres y cepa Liverpool*



*Nota. Método bayesiano y análisis coalescente agrupados en un grupo poblacional, con una probabilidad posterior del 100%.*

## 5.2 Discusión

Este estudio realizó el primer análisis de caracterización genética de poblaciones silvestres provenientes de los municipios Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta del departamento de Santander, Colombia, enfocado en los genes nucleares *beta-2 tubulin* y *doublesex-dsx*. Se encontró conservación en la secuencia correspondiente al sitio de corte en el cual actúa el sistema CRISPR CAS en los fragmentos de los genes *beta-2 tubulin* y *doublesex-dsx* de nuestros individuos silvestres comparadas con la cepa Liverpool descrita por Li y colaboradores en

California San Diego, Estados Unidos (Li et al., 2021). Lo anterior indica que los individuos silvestres de los municipios de Floridablanca y Piedecuesta utilizados en este estudio poseen las características genéticas para ser empleados como plataforma para la creación de insectos estériles usando pGSIT.

La incorporación de un aminoácido diferente a la cadena polipeptídica puede generar cambios en la estructura física de la proteína y su función biológica, viéndose está afectada si la sustitución se produce cerca del sitio activo (Benavides & Guénet, 2003), este tipo de mutaciones se conoce como mutaciones no silenciosas, las cuales son muy frecuentes y representan lo que normalmente se nombra en la literatura como polimorfismo bioquímico, encontradas en poblaciones naturales y pueden jugar un importante papel en la evolución. En este estudio se encontraron mutaciones en los fragmentos del gen *beta-2 tubulin* y *doublesex-dsx* en individuos machos y hembras de las diferentes localidades, lo que sugiere una posible mutación a nivel poblacional. Para el fragmento del gen *beta 2 tubulin* se encontró la transversión encontrada en la posición 142 en un individuo hembra de Piedecuesta y un individuo macho de Bucaramanga correspondiente a una mutación silenciosa conservando el aminoácido arginina y en la posición 488 y 502 en dos individuos machos de Floridablanca y un individuo hembra de Piedecuesta de manera similar correspondiente a una mutación no silenciosa por el cambio del aminoácido arginina por glicina. La expresión del gen *beta-2 tubulin* en el *A. aegypti* conlleva a la formación de proteínas globulares que forman parte de la subunidad beta de los microtúbulos, los cuales, participan en el proceso de espermatogénesis del individuo macho, sin embargo, cualquier cambio en la cadena

polipeptídica del gen podría generar esterilidad en el individuo (Chen et al., 2021). El fragmento del gen *doublesex-dsx* se encontró la inserción en la posición 587 en un individuo hembra de Floridablanca y Liverpool y la delección en la posición 594 en un individuo hembra y un individuo macho de Floridablanca. El gen *doublesex* cumple una función importante en la determinación del sexo del *A. aegypti*, específicamente en la diferenciación completa de las hembras (Ranian et al., 2022). Por lo cual, cualquier cambio en la cadena polipeptídica de este gen, podría generar alteraciones fenotípicas como la disminución del tamaño de las alas, acortamiento en la longitud de la probóscide, interrupción del desarrollo del sistema olfativo, disminución de la fecundidad y fertilidad debido a la reducción del tamaño en los ovarios y número de ovariolas (Mysore et al., 2015).

Cabe resaltar que para el fragmento del gen *doublesex* se detectó una mutación no silenciosa en la posición 695 debida a una transversión de tipo A – G en el sitio de corte en el cual actúa el sistema CRISPR CAS en un individuo macho del municipio de Bucaramanga. Dado que esta mutación fue hallada en un único individuo, se desconoce si es única o poblacional. La secuencia del individuo fue evaluada en la plataforma CHOP CHOP con el fin de modelar el porcentaje de efectividad del sistema CRISPR CAS en la secuencia objetivo con mutación. Se obtuvo como resultado 0% de efectividad de la enzima en esta secuencia, indicando que no es viable para utilizar este sistema. En cualquier caso, sugerimos no utilizar los individuos de esta localidad como plataforma, debido a que el mecanismo de acción del sistema CRISPR CAS consiste en realizar un corte de la doble cadena de ADN dirigida por una RNA guía la cual se diseña a base de la secuencia específica del gen que se quiere modificar (Arzate-Mejía

et al., 2018) y al encontrar variabilidad en la secuencia objetivo del gen, podría disminuir la probabilidad de obtener el corte y como resultado se tendrá una descendencia de individuos no estériles mediante cruces genéticos entre individuos silvestres con individuos modificados genéticamente (Herrera-Cabrera et al., 2021).

Los resultados encontrados en este estudio indican que los genes nucleares *beta-2 tubulin* y *doublesex-dsx* evaluados en la universidad california San Diego en la cepa de laboratorio Liverpool se pueden valorar en cepa silvestres y ser utilizados en futuros estudios enfocados en la caracterización de estos. sin embargo, es necesario seguir explorando los diferentes individuos silvestres localizados en zona geográficas diferentes a la del estudio.

Actualmente la mayoría de estudios realizados a nivel mundial enfocados en la técnica del insecto estéril, han utilizado como plataforma individuos de laboratorio, un ejemplo es la línea de *A. aegypti* OX513A creada por primera vez por los científicos de Oxitec en 2002 (Glandorf, 2017) la cual se caracteriza por la inserción de genes de otros microorganismos en su genoma, entre ellos un gen letal que consiste en una combinación de secuencias de ADN de la bacteria *E. coli* y del virus herpes simple que provoca que las larvas de mosquito mueran y no se desarrollen, sin embargo, un estudio realizado por la facultad de ciencias naturales de la Universidad de Oxford en Londres al evaluar esta línea encontró un déficit en la aptitud biológica (Bargielowski et al., 2011). Por otra parte, en california San Diego (Li et al., 2021) utilizaron el sistema CRISPR CAS para crear individuos estériles a partir de dos líneas de laboratorio modificadas genéticamente de la especie *A. aegypti*, lo mismo se realizó con líneas del género *Drosophila* (Kandul et al., 2019), sin embargo, los resultados obtenidos

concluyeron que los individuos estériles que provienen de cepas de laboratorio tienen la capacidad de lograr una reducción poblacional entre la misma cepa pero, al competir con individuos silvestres se ven obligados a aumentar el porcentaje de liberación del insecto estéril para obtener resultados positivos, esto se debe a que los individuos de laboratorio presentan una capacidad biológica en términos de éxito reproductivo menor comparados con individuos silvestres (Li et al., 2021). Los individuos de laboratorio se mantienen en condiciones favorables para el desarrollo de su ciclo de vida, inhibiendo la aparición de rasgos adaptativos a posibles situaciones de supervivencia en el hábitat natural. Algunos autores indican que el estrés ambiental es un factor que mejora la adaptación biológica en los individuos silvestres (Kang et al., 2020) algo que no está presente en el mantenimiento de individuos de laboratorio, a su vez, al no relacionarse biológicamente con diferentes poblaciones de su misma especie (endogamia), hace que su variabilidad genética sea menor comparada con la de individuos silvestres, lo anterior se debe a la ausencia de factores poblacionales como la selección natural y flujo génico (Barbadilla, 2012). Estos resultados respaldan lo encontrado en nuestro estudio, donde en términos de éxito reproductivo, en los parámetros evaluados, los individuos silvestres presentaron mejor aptitud biológica comparados con la cepa de laboratorio. Por otra parte, los individuos al ser modificados genéticamente presentan un costo en los parámetros de aptitud biológica, afectando su fecundidad, fertilidad, capacidad de vuelo, tasa de supervivencia, tasa de pupas y adultos (Misbah-Ul-Haq et al., 2022). Un claro ejemplo es la modificación del mosquito con la técnica de transfección de la bacteria *Wolbachia*, la cual, fue empleada en un estudio realizado por el Instituto Pasteur de Nueva Caledonia donde obtuvieron como resultado efectos negativos en la aptitud biológica de la cepa wMelPop, en los parámetros de fertilidad y

fecundidad de las hembras transfectadas (Pocquet et al., 2021). Un estudio realizado en la Universidad de Cornell Estados Unidos evaluó y comparó la aptitud biológica de individuos silvestres de *A. aegypti*, individuos de cepa endogámica (laboratorio) y cepa genéticamente modificada, concluyendo que los individuos silvestres tienen mayor rendimiento en términos de supervivencia, tasa de desarrollo y tamaño que los otros dos grupos (Koenraadt et al., 2010). Los anteriores resultados son similares a los encontrados en nuestro estudio, donde se comprobó que los individuos de laboratorio en términos de aptitud biológica presentan menor supervivencia y longevidad comparados con los individuos silvestre de los tres municipios. Debido a estos resultados, varios estudios se han enfocado en utilizar los individuos silvestres como plataforma para realizar cruces genéticos con individuos modificados genéticamente con el fin de mejorar la aptitud biológica de los individuos descendientes. Un estudio realizado por el departamento de microbiología y genética molecular de la Universidad Estatal de Michigan en Estados Unidos evaluaron la estabilidad a largo plazo de la línea wAlbB en *A. aegypti* mediante cruces con individuos silvestres, en este trabajo demostraron el establecimiento exitoso de una nueva línea WB2 con una eficiencia estable de transmisión materna en un 100%, encontrando que estos machos tuvieron un apareamiento competitivo comparados con sus homólogos de tipo silvestre (Liang et al., 2022). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, donde los individuos silvestres machos de los tres municipios no presentaron diferencias para la competencia en el apareamiento. El complejo médico del centro de investigación sobre el control de vectores en Puducherry, India examinaron los efectos de las infecciones por *Wolbachia* a través de cruces con líneas *A. aegypti* silvestres en lo referente a las características biológicas como fecundidad, tasa de eclosión de huevos,

viabilidad del huevo, actividad locomotora, alimentación sanguínea, supervivencia y capacidad de apareamiento de los machos, los resultados que obtuvieron en las mediciones de la aptitud biológica mostraron que las líneas cruzadas no están comprometidas negativamente en los parámetros evaluados y pueden ser liberadas en campo (Sadanandane et al., 2022), los resultados anteriores son similares a los encontrados en las tres líneas silvestres de este estudio, las cuales, al ser evaluadas en términos de aptitud biológica en los parámetros fecundidad, fertilidad y supervivencia no se vieron comprometidos negativamente y tampoco difieren entre ellos, es por eso, que estos resultados respaldan la viabilidad del uso de individuos silvestres como plataforma para la creación de insectos estériles con el fin de lograr, en términos adaptativos, un mayor rendimiento en la aptitud biológica, que permita mayor competencia con las cepas silvestres naturales logrando una reducción poblacional sin necesidad de aumentar el porcentaje de liberación de estos individuos. Los resultados de nuestro estudio concuerdan con lo discutido anteriormente, pues se logró evidenciar la capacidad idónea que tienen los individuos silvestres en términos de aptitud biológica para un desarrollo óptimo en condiciones de laboratorio.

En este estudio encontramos que, en términos del ciclo de vida, para el estadio larval se necesitaron en promedio 7 días para obtener el estadio pupa. Este tiempo está dentro del rango que mencionan algunos autores, que el estadio larval dura aproximadamente de 4 a 10 días, en condiciones favorables de temperatura entre 25-29 °C (Vargas, 1998). La duración del ciclo vital de los individuos silvestres descrita en esta investigación fue aproximadamente de 60 días similares al estudio realizado en la Universidad Nacional de Trujillo, Perú (Quispe et al., 2015). Se necesitaron tres días

del estadio pupa a adulto y la longevidad máxima encontrada en un individuo fue aproximadamente de 50 días, nuestros datos son semejantes a los encontrados en el estudio realizado en La Universidad de la Salle, Bogotá (Gracia, 2018). Estos resultados respaldan la capacidad idónea que tienen los individuos silvestres *A. aegypti* utilizados en este estudio en cuanto al progreso de cada estadio del ciclo de vida.

En términos de aptitud biológica sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas en la emergencia de adultos en las primeras 24 horas, siendo los individuos silvestres del municipio de Floridablanca los de mayor promedio comparado con los del municipio de Piedecuesta, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los demás parámetros. Estos resultados indican que en términos de éxito reproductivo los individuos *A. aegypti* de los tres municipios tienen capacidad similar de lograr un desarrollo óptimo de su ciclo de vida y podrían ser utilizados como plataforma para la creación del insecto estéril con el vigor de las líneas silvestres.

Por último, se esperaba encontrar diferencias entre los grupos de individuos *A. aegypti* silvestres y la cepa Liverpool, no obstante, el análisis filogenético determinó que los fragmentos de los genes de los individuos evaluados tienen una relación directa en términos poblacionales (grupo poblacional) (Morrone, 2013). Por lo cual, podemos deducir que los hallazgos encontrados en la evaluación de la aptitud biológica no están representados en los marcadores genéticos evaluados. Sin embargo, se sugiere realizar en próximos estudios un análisis de variabilidad genética en los individuos silvestres de los tres municipios utilizando marcadores mitocondriales con baja diversidad genética y flujo de genes, con el fin de identificar posible red de haplotipos que estén

relacionados con el hallazgo encontrado en la evaluación de la aptitud biológica (Aguirre-Obando et al., 2015).

### **5.3 Conclusión**

Los parámetros de aptitud biológica y genética evaluados indican que los individuos silvestres de *A. aegypti* de los municipios de Floridablanca y Piedecuesta sirven como plataforma en la creación de líneas modificadas genéticamente que serán utilizadas para crear el insecto estéril.

### **5.4 Consideraciones éticas**

Para el desarrollo de las actividades en el laboratorio se cumplieron con las especificaciones de la declaración de Helsinki Resolución 8430 de octubre 4 1993 Título IV de la bioseguridad de las investigaciones (Ministerio de salud, 1993).

Capítulo I. De la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos.

Para el desarrollo de las actividades en campo se cumplieron con las especificaciones de la resolución 0047 del 22 de enero de 2015.

Las salidas para colecta y el registro de individuos se han hecho en el marco del proyecto de machos estériles, por lo cual, las nuevas salidas del trabajo de maestría: **“Evaluación de la aptitud biológica asociada a los genes *beta-2 tubulin / doublesex-dsx* de individuos silvestres de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta (Santander) siguieron este modelo.**

Me permito indicar el paso a paso que se realizó para reportar los individuos en una colección según el permiso marco de colecta:

- Se remitió comunicación a la VIE informando sobre la salida a coleccionar individuos.
- La VIE reportó al ANLA sobre la salida y confirmó al responsable que ya hizo el respectivo reporte.
- Se diligenció la información de los especímenes recolectados en la plantilla Darwin Core.
- Se entregaron los especímenes debidamente etiquetados junto con el archivo Darwin Core a una colección autorizada. (si aplica, es decir si los individuos están en condiciones de ser ingresados a una colección ya que no se destruyeron en el proceso)
- Los de la colección revisaron que la información de los individuos entregados en físico correspondiera a lo registrado en la plantilla Darwin Core, posteriormente generaron un certificado del recibido de los individuos.
- Se diligenciaron los siguientes documentos:
  - Formato único nacional relación del material recolectado con permiso de recolección con fines de investigación científica no comercial.
  - Formato para la expedición del certificado de reporte del sib Colombia - permiso marco idb0398.

- Se remitieron todos los documentos a la VIE (Darwin Core, Certificado de depósito en la colección y los formatos del numeral 6), para que ellos realicen el cargue de la información al SiB Colombia y se obtenga el certificado.

Posteriormente se realizó el análisis de la capacidad reproductiva y desarrollo embrionario de los mosquitos *A. aegypti* de los tres municipios Floridablanca, Bucaramanga y Piedecuesta, comparándolos con la capacidad reproductiva de los mosquitos *A. aegypti* de la cepa Liverpool. De acuerdo con los principios establecidos en las normas de buenas prácticas clínicas (BPC), esta investigación corresponde a un estudio no clínico y seguirá las orientaciones del numeral 7.3.5 de las normas BPC (Conferencia Internacional De Armonización (CIARM, 1996).

La investigación tiene una clasificación de riesgo mínimo, ya que este trabajo no involucró experimento en humanos y los investigadores manipularon la especie *A. aegypti* bajo los protocolos de bioseguridad.

A la fecha, el proyecto no tiene un Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus productos derivados suscrito. No se hallaron aspectos técnicos que indiquen fines bio prospectivos por parte del proyecto en mención; se realizó una investigación básica sobre caracterización genética, filogenética y evaluación de aptitud biológica lo cual estaría amparado por el Permiso Marco de Recolección IDB0398 - ANLA (Resolución 0047 de 2015). Por lo anterior y según la información aportada, se considera que las actividades que se realizaron en el proyecto no configurarían acceso a recursos genéticos y sus productos derivados en Colombia.

**Normatividad nacional e internacional específica relacionada con los aspectos éticos que apliquen al proyecto**

- Acuerdo 093 del 12 de diciembre de 2010 del Consejo Superior, por el cual se reglamenta la propiedad intelectual de la Universidad Industrial de Santander.
  
- Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de República de Colombia, por el cual se reglamenta el uso de animales para la investigación biomédica en el título V (Ministerio de salud, 1993). En esta resolución se establece que se puede realizar experimentación en animales solamente después de estudiar su importancia en la salud humana, lo que aplicaría en este estudio porque los mosquitos *A. aegypti* participan en la transmisión de arbovirosis a humanos. Asimismo, se utilizará el mínimo número requerido de animales para obtener resultados científicamente válidos. Además, los mosquitos se mantendrán en condiciones adecuadas en el insectario del Laboratorio de Entomología Médica a una temperatura de  $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa de  $70 \pm 5\%$  y fotoperiodo 12:12 y permanecerán bajo el cuidado del personal altamente capacitado del laboratorio que son de profesión biólogos. Y el proceso de alimentar a la colonia con las ratas lo realizará con anestesia apropiada con el fin de evitar causar más dolor o angustia tal como lo estipulado en la presente resolución. Este procedimiento será llevado a cabo por personal capacitado.

- Ley 84 del 27 de diciembre de 1989 del Congreso de Colombia (Congreso de la república colombiana, 1989), por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales, se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. Se dará cumplimiento a esta ley en lo referente a que se prevendrán y tratarán el dolor y sufrimiento de los animales, además que promoverán la salud y el bienestar de los mismos, asegurándoles higiene, sanidad y condiciones apropiadas de existencia, conforme a lo estipulado en esta ley y no realizará ningún tipo de crueldad animal para con estos.
  
- Instalaciones: El trabajo de investigación con animales se desarrolló únicamente en el laboratorio de Entomología Médica en un área delimitada para las pruebas del proyecto, se encuentra ubicado en el Parque Tecnológico Guatiguará sede de la Universidad Industrial de Santander en el kilómetro 2 vía el Refugio del municipio de Piedecuesta, Departamento Santander, País Colombia. Las instalaciones del laboratorio cumplen con los lineamientos de la organización panamericana de la salud en lo referente a laboratorios en salud pública. El laboratorio está dividido en cubículos, en los cuales se encuentran las jaulas para los individuos *A. aegypti*, cada cubículo está separado por puertas dobles las cuales permanecen cerradas para evitar fuga de los individuos, se cuenta con un punto de agua en cada área de trabajo.
  
- Personal capacitado: el profesional participante en este estudio cuenta con la experiencia mayor a un año en las actividades de laboratorio y manipulación de colonias

de mosquitos criados en laboratorio. Además, recibió el acompañamiento y asesoría del director y codirectora del proyecto.

- Aval del comité de ética: Se contó con el aval del Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI) expedido el 23 junio de 2023.
- El macroproyecto titulado: “Producción de machos estériles de *A. aegypti* mediante la Técnica del Insecto Estéril guiada con precisión - TIEgp y validación de su efecto supresor contra *Aedes aegypti* silvestre en condiciones de laboratorio” ya cuenta con el aval del comité ético CEINCI el cual fue expedido el 9 octubre, 2020. Este proyecto tiene como objetivo general validar en laboratorio la eficacia de la producción de machos estériles y su efecto de supresión poblacional usando líneas nativas de *Ae. aegypti* TIEgp contra una población silvestre de *A. aegypti*. La propuesta de maestría evaluará la capacidad biológica de los individuos silvestres y la caracterización de dos genes objetivos para luego ser utilizados en el macroproyecto en la producción de machos estériles de *A. aegypti*.

### **Principios éticos**

**Beneficencia:** el uso de *A. aegypti* para la investigación permitió estudiar e implementar una alternativa diferente en los métodos del control del vector que disminuya la incidencia de las enfermedades transmitidas por este. Es importante mencionar que los experimentos se realizaron con *A. aegypti* debido a que es el principal vector de arbovirosis. También el uso de las ratas albinas tipo Wistar para que

les proporcionen así a las hembras *A. aegypti* los nutrientes necesarios para la producción de sus huevos, ya que solo alimentar a las hembras con miel no se logrará la producción de huevos. La sangre de la rata fue necesaria para la producción de huevos porque los mosquitos hembra requieren el aminoácido isoleucina que está presente en la sangre para tal fin. Además, es importante que se tengan esas dos fuentes de alimento a causa de que, si a los *A. aegypti* los alimentan con sangre con alto contenido de isoleucina y no les proporcionan una fuente de carbohidratos, la mayoría o todos los nutrientes de la sangre se utilizarán para el vitelogénesis, lo que provocaría que incluso los mosquitos alimentados con frecuencia mueran de hambre debido al agotamiento de las reservas de mantenimiento (Harrington et al., 2001).

**No maleficencia:** Referente a la Ley 84 de 1989 en especial el artículo 5, los animales que se utilizaron para este estudio se mantuvieron en condiciones óptimas para su desarrollo, por lo cual dentro de las variables que se controlaron para tal fin fueron: la temperatura para minimizar así el riesgo de estrés térmico. En general los insectos solo pueden funcionar dentro de un rango de temperaturas; más allá de los puntos mínimos y máximos su actividad es imposible y aumenta el riesgo de muerte (Reinhold et al., 2018).

Por otra parte, tal como lo establecido en la Ley mencionada anteriormente en el artículo 6, no se recargo de trabajo a los animales y no se le causó una muerte innecesaria o daño grave al animal actuando de manera vil. También, no se les hizo daño a las ratas con bisturí, aguja o cualquier otro medio con el que se les pueda perjudicar y ni se les aplicó ningún tipo de medicamento que no sea el necesario, solo aquel que sea necesario para anestesiarse, y en la cantidad estipulada, con el fin de

alimentar a la colonia sin causarles ningún tipo de dolor o trauma. Los medicamentos que utilizaron el personal competente para este fin son: Ketamina con una dosis de 80-120 mg/kg ket. IP, en donde 100 mL de la solución contiene: Ketamina base (como clorhidrato 5 g) y excipientes c.s. El otro fármaco es Xilacina en una dosis de 5-16mg/kg xil. IP, este es un sedante, analgésico y relajante muscular a la solución inyectable al 2%. Como está estipulado en la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud en el título V en especial el artículo 87 de la República de Colombia los investigadores y demás personal nunca dejarán de tratar a los animales como seres sensibles considerando como norma el cuidado y uso apropiado de estos para evitar o minimizar el discomfort, la angustia y el dolor.

Asimismo, para cuidar de los animales y al personal competente del laboratorio que los manipula, se utilizan los elementos de protección personal como: bata, guantes y tapabocas si es necesario. Por otra parte, siguiendo la normativa de la Ley mencionada anteriormente las personas encargadas del cuidado de la colonia de *A. aegypti* y las ratas Albinas tipo Wistar conforman un personal altamente calificado, estos son: biólogos y enfermeros. También para promover la salud y el bienestar de la colonia y las ratas, asegurándose higiene, sanidad y condiciones apropiadas de existencia, las personas encargadas realizaron el mantenimiento de los animales los lunes, miércoles y viernes. De manera resumida, para realizar el mantenimiento de la colonia, se limpió el recipiente de vidrio en el cual se depositó la miel con el agua declorada cada 2 días, el cambio del papel que se colocó dentro de las jaulas se realizó una vez por semana y se alimentaron el estadio larvario con comida para peces los días específicos, a su vez, cada dos días se realizó cambio de agua en los recipientes que contienen las larvas. A las ratas se les cambió la viruta, donde realizaron sus necesidades, se lavaron y secaron el recipiente en el que estuvieron para mantener un ambiente higiénico y se les agregó nueva comida y agua para cubrir sus necesidades. Elementos de protección personal

En el laboratorio, como en salidas de campo, se utilizaron todos los elementos de protección personal: guantes de látex, tapabocas, batas antifluido, máscaras de seguridad y campanas de extracción de gases según corresponda. También, como política de todos los laboratorios ubicados en la sede Guatiguará, se hizo un seguimiento estricto para mantener y cumplir las normas de bioseguridad en el lugar de trabajo, esto con el fin de mitigar el riesgo de lesión por los agentes químicos y biológicos (*A. aegypti*) utilizados en los procedimientos de laboratorio. Las salidas de campo se realizaron en las localidades de los tres municipios, localidades que fueron

elegidas al azar, las cuales están localizadas en zona urbana segura. Se contó con un medio de transporte óptimo para el traslado del personal y material que se utilizó para la recolecta de huevos de los individuos *A. aegypti*. El personal tenía afiliación activa con ARL.

**Procedimientos para el cuidado, sacrificio, manejo de individuos *A. aegypti* y ratas albinas tipo Wistar**

En lo referente al cuidado de los individuos *A. aegypti* para mitigar los factores de riesgo, se siguieron los protocolos previamente establecidos en el laboratorio de entomología médica del CINTROP en formación de personal, manipulación de mosquitos, uso de áreas con subdivisiones y la instalación de puertas de seguridad que evitarán el posible escape de mosquitos. Adicionalmente, antes de descartar los mosquitos, los huevos, larvas, pupas y adultos se congelaron a -20oC durante mínimo 24 horas, antes de descartarlos en los residuos de material biológico. Este procedimiento se ha mostrado efectivo y es usado en el insectario de la Universidad de California, San Diego, donde manejan en simultáneo más de 100 líneas de mosquitos modificados genéticamente.

Se contó con una licencia por parte de la autoridad nacional de licencias ambientales ANLA para la recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial, la cual se

encuentra especificada en la resolución 004 del 22 de enero del 2015. Los individuos recolectados de *A. aegypti* fueron puestos en jaulas separadas e independientes de los individuos *Ae. aegypti* de laboratorio. Para el cuidado de la colonia *A. aegypti* (silvestre y Liverpool) estos fueron almacenados en jaulas de seguridad en un insectario y mantenidos a condiciones controladas de temperatura de  $25 \pm 5$  °C, humedad relativa de  $70 \pm 5$  %, y fotoperiodo 12:12. Esto con el fin de mantener unas condiciones óptimas para el desarrollo de todas las etapas del ciclo de vida del zancudo *A. aegypti*. Tanto como machos y hembras se alimentaron constantemente con una solución de miel (carbohidratos) al 10% (v/v) y cumpliendo con la Ley mencionada anteriormente se cambió la solución de miel los lunes, miércoles y viernes para mantener las condiciones de higiene y de proporcionar alimento en cantidad y calidad suficientes, y se reemplazó por una solución nueva. Asimismo, los frascos en los que se depositó la miel se lavaron antes de adicionarla, el papel que se encontraba en las jaulas de seguridad se cambió los lunes y se desecharon en la caneca de color roja de riesgo biológico, adicionalmente el papel que cubre el tarro de la miel se empacó en una bolsa de plástico y se desechó en la caneca roja de riesgo biológico. Las larvas eclosionadas se almacenaron en recipientes de plásticos y se alimentaron con alimento para peces esos mismos días, y se separaron las pupas de las larvas y se colocaron en recipientes plásticos y se introdujeron directamente en la jaula de seguridad.

Para la obtención de huevos las hembras se les proporcionó habitualmente alimentación sanguínea con ratas albinas tipo Wistar (WI IOPS AF/Han strain) suministradas por el bioterio de la Universidad Industrial de Santander, siguiendo las disposiciones de la Ley y Resolución mencionadas anteriormente. La frecuencia de la

alimentación de las hembras en las jaulas se realizó según el material que se necesitaba para los experimentos con el fin de no disminuir la población de la colonia. Esta actividad se llevó a cabo todos los viernes en las horas de 8:00 a 10:00 en donde para no provocar ningún tipo de dolor y sufrimiento a las ratas se anestesiaron con los medicamentos: Ketamina en una dosis de 80-120 mg/kg ket. Intraperitoneal, en donde 100 mL de la solución contiene: Ketamina base (como clorhidrato 5 g) y excipientes c.s y Xilacina en una dosis de 5-16mg/kg xil de forma intraperitoneal este es un sedante, analgésico y relajante muscular es una solución inyectable al 2%, se utilizó una jeringa de 1 mL para el procedimiento, después de la administración de los medicamentos se dejó un tiempo prudente hasta observar ausencias de reflejos de la rata, posteriormente se cubrió con una servilleta la cola, los genitales, manos, pies y cara para que solamente la hembra del *A. aegypti* picará en el abdomen área la cual se depiló, esto se llevó a cabo con el fin de causarle menos sufrimiento y malestar al animal. Posteriormente se colocó en la jaula de seguridad en un recipiente a la rata y se dejó en la jaula por un tiempo aproximado de 15 minutos, luego de finalizar se limpió con alcohol en esa zona para evitar el efecto de prurito y se dejó en el lugar habitual. Después de la alimentación se colocaron los papeles de oviposición en un recipiente que contiene agua de clorada y se retiraron el lunes, se dejó secar el papel alrededor de 7 a 15 días. Luego se colocó a eclosionar los huevos con agua de clorada y comida para peces en vaso plástico grande durante un día, al siguiente día se sacaron las larvas y se pasaron a una bandeja con agua de clorada y comida para peces y se cuidaron como lo descrito anteriormente para las larvas. Los papeles en los cuales se encontraban los huevos se guardaron en una bolsa plástica y se desechó en la caneca de residuos biológicos. En general todos los

residuos que surgieron del cuidado de la colonia se desecharon en la caneca roja de residuos biológicos.

Referente al número requerido de zancudos para todo el proyecto por cada parámetro de evaluación en la aptitud biológica se utilizaron 100 larvas de *A. aegypti* por cada réplica que se realizó dado que es el mínimo número de réplicas que se necesitaron para poder realizar los análisis estadísticos.

El cuidado de las ratas al igual que el de la colonia lo realizó el personal capacitado del grupo de investigación, este se llevó a cabo los mismos días que el de la colonia, consistió en: cambiar la viruta y desecharla en la caneca de residuos biológico, ya que contendrá las heces de las ratas y su orina, adicionalmente se lavaron los recipiente en el cual se encontraban para mantener un hábitat limpio e higiénico, posterior a estos se secaron y se adiciono la nueva viruta, a este primero lo tamizaron para quitar los polvos finos que le podrían causar alergia a las ratas, posteriormente se agregó comida para perros y se cambió el agua de la botella de la cual beben las ratas con agua declorada nueva. En total para alimentar la colonia se contó en el Laboratorio de Entomología Médica 2 ratas albinas tipo Wistar, se utilizó esa raza en el laboratorio debido a que la Universidad Industrial de Santander cuenta con un Bioterio en la Facultad de Salud en donde se tiene un cuidado adecuado con los animales y seguridad en la trazabilidad de los animales y en su origen. El número de ratas se justificó, porque al tener una sola rata para toda la colonia causaría más sufrimiento y malestar en la rata siendo alimentada todas las semanas en todas las jaulas y la estresarían más, es por eso por lo que se utilizaron dos ratas teniendo en cuenta el principio de no maleficencia.

Con respecto al sacrificio de los zancudos que se utilizaron para el proyecto, una vez que se finalizó la prueba estos se colocaron en un refrigerador en un dispositivo especial por un periodo de 20 minutos para así sacrificar a los individuos utilizados en los experimentos.

Referente con el sacrificio de las ratas estos después de cumplir un período de tiempo de 4 a 6 meses en el laboratorio se entregaron otra vez al bioterio de la UIS quienes los sacrifican según los estándares estipulados, por lo cual en la presente investigación a las ratas no les aplicó el proceso de eutanasia.

#### **Procedimientos específicos para el manejo de sustancias**

Siguiendo las buenas prácticas en el laboratorio para garantizar la seguridad del investigador se utilizaron los elementos de protección personal (PPE) como bata de mangas largas, siempre bien abrochada con el fin de proteger la piel, además guantes de látex, gafas de seguridad y zapatos cerrado y si fuera necesario tapabocas. También se evitó el uso de accesorios como aretes, pulseras y collares y se recogerá el cabello.

En los ensayos de la investigación a desarrollar se contempla la generación de residuos peligrosos tanto químicos como biológicos de acuerdo con la ley 1252 del 27 de noviembre de 2008 del Congreso de la República. Ambos tipos de residuos fueron debidamente marcados siguiendo los lineamientos manejados por el Programa de Gestión Integral de Residuos (PGIR) de la UIS, ente encargado de la gestión de residuos

ordinarios y especiales para su inactivación (incineración, neutralización, entre otros) y disposición final.

**Normatividad interna disponible en Sistema de Gestión Integral de la Universidad Industrial de Santander aplicable al proyecto**

El presente proyecto de investigación se encuentra enmarcado en el protocolo de bioseguridad de laboratorios de la Universidad Industrial de Santander disponible en el Sistema de Gestión Integral.

En los laboratorios donde se encuentra el insectario y el lugar de experimentación del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP) en especial el Laboratorio de Entomología Médica, los residuos infecciones, riesgo Biológico, además de residuos Químicos que se generaron en el laboratorio 110 de biología molecular, fueron discriminados de la siguiente manera:

**Biosanitarios:**

Son todos aquellos elementos o instrumentos utilizados durante la ejecución de los procedimientos asistenciales que tienen contacto con materia orgánica, sangre o fluidos corporales del paciente humano o animal tales como: algodones, guantes, material de laboratorio como tubos capilares y de ensayo, medios de cultivo, láminas porta objetos y cubre objetos, laminillas, sistemas cerrados y sellados de drenajes.

**Cortopunzantes:**

Son aquellos que por sus características punzantes o cortantes pueden dar origen a un accidente percutáneo infeccioso. Dentro de éstos se encuentran: cuchillas, agujas, pipetas, láminas de bisturí o vidrio, y cualquier otro elemento que por sus características cortopunzantes pueda lesionar y ocasionar un riesgo infeccioso.

**Reactivos:**

Son aquellos que por sí solos y en condiciones normales, al mezclarse o al entrar en contacto con otros elementos, compuestos, sustancias o residuos, generan gases, vapores, humos tóxicos, explosión o reaccionan térmicamente colocando en riesgo la salud humana o el medio ambiente.

El manejo adecuado del material biosanitario siguió todos los procedimientos de la normativa ambiental, sanitaria y ocupacional de residuos potencialmente peligrosos. Los desechos cortopunzantes y reactivos fueron separados y descartados en recipientes rotulados de acuerdo con la normativa del manual de gestión integral de residuos de la Universidad Industrial de Santander.

Durante la ejecución de las diferentes pruebas, los investigadores utilizaron los elementos de protección personal como guantes de látex, tapabocas, bata antifluido, máscaras de seguridad, gafas y campanas de extracción de gases. También, como política de todos los laboratorios de la Universidad Industrial de Santander (UIS), se

realizó un seguimiento estricto para el cumplimiento de las normas de bioseguridad en el lugar de trabajo.

**De acuerdo con el PLAN DE GESTIÓN INTEGRAL DE RESIDUOS SÓLIDOS – PGIRS de la UIS, el manejo de los residuos que se producirán a lo largo del proyecto seguirá tres fases: Segregación, Tratamiento y Disposición Final.**

**Fase de Segregación:**

La fase de segregación contempla la plena identificación del tipo de residuo generado, así como el tipo de contenedor, recipiente o envase para el almacenamiento de residuos peligrosos dependiendo del tipo de residuo. Para los residuos biosanitarios que se generaron en el manejo de los mosquitos fueron: papeles de huevos eclosionados, papeles de las jaulas así como también los que se emplearon para tapar los tarros en los cuales se depositó la miel para que suba la solución por capilaridad al papel, y por último los zancudos que se sacrificaron y se utilizaron en el proyecto, se emplearon bolsas de polietileno de alta densidad de color rojo, de acuerdo al código de colores según lo establecido en la ruta biológica, rotulándolas con el símbolo de riesgo biológico, para material cortopunzantes se utilizaron recipientes herméticos con tapa de color rojo, estas bolsas y recipientes se llenaron hasta  $\frac{3}{4}$  partes de su capacidad, cerrándose adecuadamente antes de ser transportados al sitio de almacenamiento temporal y no se abrieron ni vaciaron. Las bolsas para recolección de residuos se

ubicaron dentro de una caneca plástica de color rojo sin aristas y con tapa fija. Los residuos cortopunzantes antes de su disposición final fueron inactivados añadiendo una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%, por 30 minutos y luego se descartó el líquido resultante por el desagüe con abundante agua. Las agujas, que se utilizaron para anestesiarse las ratas, se introdujeron en un recipiente sin refundar; las fundas de protección se arrojaron en los recipientes de residuos ordinarios. Después del proceso de desinfección, se selló el recipiente y se introdujo en una bolsa roja rotulada como material cortopunzante y por último para los residuos de medio de cultivo, se empleó Bidón plástico con proceso de solidificación.

Con los residuos químicos se utilizaron contenedores de polietileno de alta densidad, el cual es resistente a la mayoría de las sustancias químicas. Dentro de los reactivos que se utilizaron en este proyecto, se encuentran los disolventes no halogenados como alcohol al 90%, desechos del kit de extracción de ADN y kit de purificación PCR. El volumen del recipiente depende de la cantidad de residuo que se generó. Se utilizaron volúmenes pequeños no mayores a 4 litros, para facilitar el transporte de estos. El envase estaba en perfectas condiciones, es decir no tenía roturas o deformaciones. Los residuos líquidos se depositaron en recipientes de boca angosta y los sólidos en recipientes de boca ancha. Se dejó aproximadamente el 10-20% del contenedor o envase sin llenar, especialmente en las sustancias que tenían una presión de vapor alta. Sólo residuos químicamente compatibles fueron acumulados en cada recipiente correctamente etiquetado.

Todos los envases o contenedores donde se almacenan residuos peligrosos se etiquetan de manera que permita identificarlos y reconocer la naturaleza del peligro que



**Fase de Tratamiento:**

El tratamiento hace referencia a los procesos aplicables a los residuos con el fin de reducir o anular las características que le confieren peligrosidad para la salud humana y el ambiente, así como también para facilitar el transporte, almacenamiento, disposición final y aprovechamiento de las sustancias generadas. En el caso de los residuos que se generaron a lo largo del desarrollo del proyecto, no se les realizó ningún tipo de proceso o procedimiento de tratamiento debido a que no es necesario para su disposición final.

**Disposición final:**

La disposición final es el proceso de aislar y confinar los residuos o desechos peligrosos, en especial los no aprovechables, en lugares especialmente seleccionados, diseñados y debidamente autorizados para evitar, la contaminación y los daños o riesgos a la salud humana y al medio ambiente. Dicha disposición se realizó mediante un gestor externo, autorizado por la autoridad ambiental de la UIS.

**Sobre el riesgo para los seres vivos y medio ambiente**

En el proyecto de maestría “**Evaluación de la aptitud biológica asociada a los genes *beta-2 tubulin / doublesex-dsx* de individuos silvestres de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de los municipios de Bucaramanga, Floridablanca y Piedecuesta (Santander)**” no se realizó edición genética ni cruces con individuos modificados genéticamente. El proyecto tuvo como finalidad encontrar la población de *A. aegypti* con mejor aptitud biológica, para ser utilizada en un futuro como plataforma para la creación de mosquitos estériles.

La herramienta de edición genética CRISPR CAS presenta múltiples aplicaciones sobre animales y plantas. Tenemos varios ejemplos de la actualidad, se ha utilizado para generar cerdos inmunes a la enfermedad del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, que ocasiona pérdidas millonarias en todo el mundo, así como para la producción de ganado lechero sin cuernos, que evitaría la necesidad de cortarlos a las vacas y evitar el dolor. En cuanto a las plantas, este sistema puede mejorar sus características para consumo o uso humano. Actualmente, se ha utilizado en la soja con tolerancia a la sequía y la sal. También se han editado genéticamente múltiples plantas para hacerlas resistentes a enfermedades e incluso, ha conseguido modificar arroz para hacerlo resistente a la contaminación radioactiva, lo que supone una gran oportunidad para poder cultivarlo en las grandes extensiones de terreno agrícola que han sido contaminadas con radiación. CRISPR puede utilizarse para gene drive, de manera que un gen editado se extiende rápidamente a través de una población de individuos. Se debe realizar en una etapa temprana del ciclo de desarrollo del individuo, esta técnica puede ser utilizada para disminuir los mosquitos portadores de enfermedades como el virus de la fiebre amarilla, dengue o el Zika, o extender la resistencia al parásito de la malaria en la población del mosquito portador, controlar plantas invasoras o erradicar su resistencia a herbicidas. Actualmente se ha conseguido erradicar una población entera del mosquito transmisor de la malaria (*Anopheles gambiae*).

Todas estas aplicaciones pueden resultar de gran utilidad. Sin embargo, también suscitan objetivas cuestiones bioéticas que naturalmente deben ser consideradas. En primer lugar, es necesario indicar la diferencia entre los organismos transgénicos y los

editados con CRISPR u otras técnicas de edición genética, ya que importantes expertos en este campo están aludiendo a esta diferencia para defender el establecimiento de una regulación específica para el segundo caso. Los animales y cultivos modificados por ADN recombinante o transgénicos. Estos difieren de los modificados por edición genética en que los primeros contienen genes foráneos introducidos aleatoriamente en el genoma que producen proteínas nuevas en el organismo, otorgándole un rasgo diferencial que antes no tenía. En cambio, el sistema CRISPR CAS genera pequeñas alteraciones en genes ya existentes que le otorgan al organismo un rasgo diferencial al modificar los niveles de una proteína que ya estaba en el organismo. Por ello, los organismos modificados por este sistema se asemejan más a los organismos modificados por métodos tradicionales, aceptados actualmente.

Este sistema de edición genética también se utiliza para introducir una mutación recesiva que provoca esterilidad masculina en unos pocos individuos, consiguiendo eliminar por completo la población en unas 10 generaciones. A pesar de lo prometedor de estos resultados, todavía son necesarios numerosos estudios para garantizar la eficacia y seguridad de la técnica en el ambiente natural. El paso inmediatamente posterior va a ser repetir el experimento bajo condiciones de laboratorio que emulan el ambiente natural de estos mosquitos, tal y como ha recomendado la US National Academy of Sciences.

Los resultados de este proyecto no generaron ningún riesgo para el ambiente ni para los seres vivos, ya que estos se cuidaron de manera adecuada, respetados y se mantuvieron en condiciones apropiadas en el laboratorio, el riesgo de escape de los

organismos en el laboratorio es mínimo gracias a las instalaciones del mismo y su ubicación siempre se encuentra en la zona de estudio, además se realizaron acciones para mitigar cualquier tipo de daño o lesión y le suministraron bebida, alimento en cantidad y calidad suficiente al igual que las medicinas necesarias para las ratas tal y como lo estipulado en la Ley 84 de 1989.

### **5.4 Presupuesto**

Este proyecto fue financiado con recursos del proyecto: “Producción de machos estériles de *Aedes aegypti* mediante la Técnica del Insecto Estéril guiada con precisión - TIEgp y validación de su efecto supresor contra *A. aegypti* silvestre en condiciones de laboratorio”, aprobado por la VIE.

	<b>Ítem</b>	<b>Valor unitario</b>	<b>Valor total</b>
	Mantenimiento de Equipos	\$ 500.000,00	\$ 2.000.000,00
	Bibliografía	\$ 1.000.000,00	\$ 1.000.000,00

**EVALUACIÓN DE LA APTITUD BIOLÓGICA ASOCIADA A LOS GENES**

*BETA-2 TUBULIN / DOUBLESEX-DSX*

88

	Servicios técnicos	\$ 1.000.000,00	\$ 1.000.000,00
	Materiales e insumos	\$ 28.000.000,0 0	\$ 28.000.000,00
	Viajes, congresos	\$ 7.000.000,00	\$ 7.000.000,00
	Salidas de Campo (4)	\$ 300.000,00	\$ 1.200.000,00
	Apoyo económico estudiante de maestría	\$ 2.000.000,00	\$ 48.000.000,00
<b>Total, de presupuesto</b>			\$88.200. 000,00

5.5 Cronograma de actividades

Actividad (2023)	mayo Junio	julio	agosto	septiembre	octubre	Noviembre
Revisión bibliográfica	x	x	x	x	x	
Revisión CEINCI	x					
Cotización y compra de materiales		x				
Colecta y mantenimiento de mosquitos silvestres		x	x			
Extracción del ADN			x			
Secuenciación – Alineación			x	x		

# EVALUACIÓN DE LA APTITUD BIOLÓGICA ASOCIADA A LOS GENES

*BETA-2 TUBULIN / DOUBLESEX-DSX*

90

<b>Aptitud biológica</b> <i>(fitness)</i> de <b>poblaciones</b> <b>silvestres</b>		X	X	X		
<b>Procesamiento de</b> <b>datos y análisis</b> <b>estadístico</b>				X	X	
<b>Socialización de</b> <b>resultados</b>						X
<b>Entrega del</b> <b>trabajo final y</b> <b>sustentación</b>						X

## **Director**

Jonny Edward Duque Luna PhD.

Profesor Ciencias Básicas

Centro de Enfermedades Tropicales-CINTROP-UIS

Universidad Industrial de Santander

**Codirectora**

Laura Alexandra Rengifo Correa. PhD

Programa de apoyo a estancias Posdoctorales

Centro de Enfermedades Tropicales-CINTROP-UIS

Universidad Industrial de Santander

## Referencias Bibliográficas

- Aguirre-Obando, O. A., Bona, A. C. D., Duque L., J. E., & Navarro-Silva, M. A. (2015). Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Zoologia*, *32*(1), 14–22.
- Aldersley, A., Pongsiri, A., Bunmee, K., Kijchalao, U., Chittham, W., Fansiri, T., Pathawong, N., Qureshi, A., Harrington, L. C., Ponlawat, A., & Cator, L. J. (2019). Too “sexy” for the field? Paired measures of laboratory and semi-field performance highlight variability in the apparent mating fitness of *Aedes aegypti* transgenic strains. In *Parasites & Vectors* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3617-2>
- Álvarez González, E. (2023). Adaptation of the closest tree method for a two state quartet to Jukes-Cantor tripod trees. *Revista de Matemática Teoría Y Aplicaciones*, *30*(1), 69–85.
- Arzate-Mejía, R. G., Recillas-Targa, F., & Corces, V. G. (2018). Developing in 3D: the role of CTCF in cell differentiation. *Development*, *145*(6). <https://doi.org/10.1242/dev.137729>
- Azrag, R. S., Ibrahim, K., Malcolm, C., El Rayah, E., & El-Sayed, B. (2016). Laboratory rearing of *Anopheles arabiensis*: impact on genetic variability and implications for Sterile Insect Technique (SIT) based mosquito control in northern Sudan. In *Malaria Journal* (Vol. 15, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1484-2>
- Barbadilla, A. (2012). Genética de poblaciones. *Universidad Autónoma de Barcelona. En: Http://biologia. Uab. Es/divulgacio/genpob. Html# Factores, Consultado, 27*(10), 2012.
- Bargielowski, I., Alphey, L., & Koella, J. C. (2011). Cost of mating and insemination capacity of a genetically modified mosquito *Aedes aegypti* OX513A compared to its wild type counterpart. *PloS One*, *6*(10), e26086.

- Benavides, F. J., & Guénet, J.-L. (2003). Manual de genética de roedores de laboratorio. *Principios Básicos Y Aplicaciones*, 38.  
[http://www.montonerin.es/isttlegacy/books/Benavides\\_Guenet\\_2003/GENETICA\\_indice.pdf](http://www.montonerin.es/isttlegacy/books/Benavides_Guenet_2003/GENETICA_indice.pdf)
- Borrero-Landazabal, M. A., Duque, J. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2020). Model to design insecticides against *Aedes aegypti* using in silico and in vivo analysis of different pharmacological targets. In *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* (Vol. 229, p. 108664).  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108664>
- Bourtzis, K., & Vreysen, M. J. B. (2021). Sterile Insect Technique (SIT) and Its Applications. *Insects*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/insects12070638>
- Brandler, S., Ruffié, C., Combredet, C., Brault, J.-B., Najburg, V., Prevost, M.-C., Habel, A., Tauber, E., Desprès, P., & Tangy, F. (2013). A recombinant measles vaccine expressing chikungunya virus-like particles is strongly immunogenic and protects mice from lethal challenge with chikungunya virus. *Vaccine*, 31(36), 3718–3725.
- Carreño Otero, A. L., Vargas Méndez, L. Y., Duque L., J. E., & Kouznetsov, V. V. (2014). Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girsensohnine analogs on *Aedes aegypti*, vector of dengue fever. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 78, 392–400.
- Chen, J., Luo, J., Wang, Y., Gurav, A. S., Li, M., Akbari, O. S., & Montell, C. (2021). Suppression of female fertility in *Aedes aegypti* with a CRISPR-targeted male-sterile mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(22). <https://doi.org/10.1073/pnas.2105075118>
- Dawkins, M. S. (1990). From an animal's point of view: Motivation, fitness, and animal

welfare. *The Behavioral and Brain Sciences*, 13(1), 1–9.

Díaz-Quiñonez, J. A. (2020). Riesgo de enfermedades transmitidas por mosquitos Aedes en la zona metropolitana del Valle de México y amenaza de sindemias en el país. *Gaceta medica de Mexico*, 156(5). <https://doi.org/10.24875/gmm.20000563>

Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.

Du, W., Hu, C., Yu, C., Tong, J., Qiu, J., Zhang, S., & Liu, Y. (2019). Comparison between pupal and adult X-ray radiation, designed for the sterile insect technique for Aedes albopictus control. *Acta Tropica*, 199, 105110.

*Formato normalizado para el diseño de perfiles y documentos de proyectos de la OPS.* (1993). Organización Panamericana de la Salud.

Glandorf, D. C. M. (2017). *Technical evaluation of a potential release of OX513A Aedes aegypti mosquitoes on the island of Saba.* <https://rivm.openrepository.com/handle/10029/620888>

Gracia, M. A. D. (2018). *Análisis de tabla de vida de una población de Aedes aegypti Diptera. Culicidae bajo condiciones de laboratorio en Bogotá* [Universidad de La Salle]. <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/43/>

Heled, J., & Drummond, A. J. (2010). Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*, 27(3), 570–580.

Heled, J., & Drummond, A. J. (2012). Calibrated tree priors for relaxed phylogenetics and divergence time estimation. *Systematic Biology*, 61(1), 138–149.

Herrera-Cabrera, B. E., Salgado-Garciglia, R., López-Valdez, L. G., Reyes, C., Montiel-Montoya, J., Martínez, F. Z., Lucho-Constantino, G. G., & Barrales-Cureño, H. J. (2021). Edición genómica con CRISPR/Cas9: Premio Nobel de Química 2020. *Revista de Química*, 35(1), 22–30.

- Jackson, S. A., McKenzie, R. E., Fagerlund, R. D., Kieper, S. N., Fineran, P. C., & Brouns, S. J. J. (2017). CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science*, *356*(6333).  
<https://doi.org/10.1126/science.aal5056>
- Kandul, N. P., Liu, J., Sanchez C, H. M., Wu, S. L., Marshall, J. M., & Akbari, O. S. (2019). Transforming insect population control with precision guided sterile males with demonstration in flies. *Nature Communications*, *10*(1), 84.
- Kang, D. S., Cunningham, J. M., Lovin, D. D., Chadee, D. D., & Severson, D. W. (2020). Mating Competitiveness of Transgenic *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Males Against Wild-Type Males Reared Under Simulated Field Conditions. *Journal of Medical Entomology*, *57*(6), 1775–1781.
- Khan, S. A., Jakes, E., Myles, K. M., & Adelman, Z. N. (2021). Author Correction: The  $\beta$ 2Tubulin, Rad50-ATPase and enolase cis-regulatory regions mediate male germline expression in *Tribolium castaneum*. *Scientific Reports*, *11*(1), 21553.
- Knott, G. J., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, *361*(6405), 866–869.
- Koenraadt, C. J., Kormaksson, M., & Harrington, L. C. (2010). Effects of inbreeding and genetic modification on *Aedes aegypti* larval competition and adult energy reserves. *Parasites & Vectors*, *3*, 92.
- Liang, X., Tan, C. H., Sun, Q., Zhang, M., Wong, P. S. J., Li, M. I., Mak, K. W., Martín-Park, A., Contreras-Perera, Y., Puerta-Guardo, H., Manrique-Saide, P., Ng, L. C., & Xi, Z. (2022). *Wolbachia* wAlbB remains stable in *Aedes aegypti* over 15 years but exhibits genetic background-dependent variation in virus blocking. *PNAS Nexus*, *1*(4), gac203.
- Li, M., Yang, T., Bui, M., Gamez, S., Wise, T., Kandul, N. P., Liu, J., Alcantara, L., Lee, H., Edula, J. R., Raban, R., Zhan, Y., Wang, Y., DeBeaubien, N., Chen, J., Sánchez C, H.

- M., Bennett, J. B., Antoshechkin, I., Montell, C., ... Akbari, O. S. (2021). Suppressing mosquito populations with precision guided sterile males. *Nature Communications*, *12*(1), 5374.
- López-Solís, A. D., Castillo-Vera, A., Cisneros, J., Solís-Santoyo, F., Penilla-Navarro, R. P., Black, W. C., Iv, Torres-Estrada, J. L., & Rodríguez, A. D. (2020). Resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) de Tapachula, Chiapas, México. *Salud publica de Mexico*, *62*(4), 439–446.
- Misbah-Ul-Haq, M., Carvalho, D. O., Duran De La Fuente, L., Augustinos, A. A., & Bourtzis, K. (2022). Genetic Stability and Fitness of *Aedes aegypti* Red-Eye Genetic Sexing Strains With Pakistani Genomic Background for Sterile Insect Technique Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*, 871703.
- Morrone, J. J. (2013). *Sistemática: fundamentos, métodos, aplicaciones*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.
- Mysore, K., Sun, L., Tomchaney, M., Sullivan, G., Adams, H., Piscoya, A. S., Severson, D. W., Syed, Z., & Duman-Scheel, M. (2015). siRNA-Mediated Silencing of doublesex during Female Development of the Dengue Vector Mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(11), e0004213.
- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., & Honein, M. A. (2016). Zika Virus [Review of *Zika Virus*]. *The New England Journal of Medicine*, *375*(3), 294–295.
- Pocquet, N., O'Connor, O., Flores, H. A., Tutagata, J., Pol, M., Hooker, D. J., Inizan, C., Russet, S., Duyvestyn, J. M., Pacidônio, E. C., Girault, D., da Silva Gonçalves, D., Minier, M., Touzain, F., Chalus, E., Lucien, K., Cheilan, F., Derycke, T., Laumond, S., ... Rossi, N. (2021). Assessment of fitness and vector competence of a New Caledonia wMel *Aedes aegypti* strain before field-release. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *15*(9), e0009752.

- Quispe, E., Carbajal, A., Gozzer, J., & Moreno, B. (2015). Ciclo biológico y Tabla de Vida de *Aedes aegypti*, en laboratorio: Trujillo (Perú), 2014. *Revista REBIOLEST*, 3(1), 91–101.
- Ranian, K., Kashif Zahoor, M., Zulhussnain, M., & Ahmad, A. (2022). CRISPR/Cas9 mediated sex-ratio distortion by sex specific gene editing in *Aedes aegypti*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 3015–3022.
- Rengifo-Correa, L., Abad-Franch, F., Martínez-Hernández, F., Salazar-Schettino, P. M., Téllez-Rendón, J. L., Villalobos, G., & Morrone, J. J. (2021). A biogeographic–ecological approach to disentangle reticulate evolution in the *Triatoma phyllosoma* species group (Heteroptera: Triatominae), vectors of Chagas disease. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research = Zeitschrift Fur Zoologische Systematik Und Evolutionsforschung*, 59(1), 94–110.
- Ríos, N., Stashenko, E. E., & Duque, J. E. (2017). Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 61(4), 307–311.
- Rubio, F. F. (2014). *Artrópodos en medicina y veterinaria*. Ministerio de Defensa (España).
- Ruiz, N., Rincón, G. A., Parra, H. J., & Duque, J. E. (2018). Dinámica de oviposición de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae), estado gonadotrófico y coexistencia con otros culícidos en el área Metropolitana .... *Revista de La Universidad Nacional de Cordoba. Universidad Nacional de Cordoba*.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-08072018000400308](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072018000400308)
- Sadanandane, C., Gunasekaran, K., Panneer, D., Subbarao, S. K., Rahi, M., Vijayakumar, B., Athithan, V., Sakthivel, A., Dinesh, S., & Jambulingam, P. (2022). Studies on the fitness characteristics of wMel- and wAlbB-introgressed *Aedes aegypti* (Pud) lines in comparison with wMel- and wAlbB-transinfected *Aedes aegypti* (Aus) and wild-type

*Aedes aegypti* (Pud) lines. *Frontiers in Microbiology*, 13, 947857.

Salinas-López, M. A., Soto-Rojas, V. E., & Ocampo, C. B. (2018). Costos de un programa de control del vector *Aedes aegypti* en municipios de Colombia: el caso de Girón y Guadalajara de Buga, 2016. *Cadernos de Saúde Pública*, 34(12), e00044518.

Salvemini, M., Mauro, U., Lombardo, F., Milano, A., Zazzaro, V., Arcà, B., Polito, L. C., & Saccone, G. (2011). Genomic organization and splicing evolution of the doublesex gene, a *Drosophila* regulator of sexual differentiation, in the dengue and yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. In *BMC Evolutionary Biology* (Vol. 11, Issue 1).

<https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-41>

Shalan, E. A.-S., Canyon, D., Younes, M. W. F., Abdel-Wahab, H., & Mansour, A.-H. (2005). A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environment International*, 31(8), 1149–1166.

Smith, R. C., Walter, M. F., Hice, R. H., O'Brochta, D. A., & Atkinson, P. W. (2007). Testis-specific expression of the beta2 tubulin promoter of *Aedes aegypti* and its application as a genetic sex-separation marker. *Insect Molecular Biology*, 16(1), 61–71.

Vargas, M. V. (1998). *El mosquito: un enemigo peligroso : biología, control e importancia en la salud humana (Diptera: Culicidae)*. Editorial Universidad de Costa Rica.

Vera, S. S., Zambrano, D. F., Méndez-Sánchez, S. C., Rodríguez-Sanabria, F., Stashenko, E. E., & Duque Luna, J. E. (2014). Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 113(7), 2647–2654.

Viana-Medeiros, P. F., Bellinato, D. F., Martins, A. J., & Valle, D. (2017). Insecticide resistance, associated mechanisms and fitness aspects in two Brazilian *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*) populations. *Medical and Veterinary Entomology*, 31(4), 340–350.

Wilder-Smith, A., Ooi, E.-E., Horstick, O., & Wills, B. (2019). Dengue. *The Lancet*, 393(10169), 350–363.