

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Estandarización de qPCR con curvas de melting para los genes de resistencia a insecticidas (*kdr*) en *Aedes aegypti*: resultados preliminares de muestras de Galápagos

Karol Milena Lomas Galeano

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 18 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Estandarización de qPCR con curvas de melting para los genes de resistencia a insecticidas (*kdr*) en *Aedes aegypti*: resultados preliminares de muestras de Galápagos

Karol Milena Lomas Galeano

Nombre del profesor, Título académico

**Renato León, Ph.D.
David Valencia, MSc.**

Quito, 18 de diciembre de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Karol Milena Lomas Galeano

Código: 00320952

Cédula de identidad: 1005262751

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

RESUMEN

El mosquito *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) es el principal vector de enfermedades arbovirales como dengue, chikungunya, zika y fiebre amarilla. Hace un par de décadas, el dengue reemplazó a la malaria como la principal causa de enfermedades febriles en el Ecuador, y hoy en día en el 2024, se reporta del país un brote significativo con 59.120 casos y 164 de las Islas Galápagos. Para controlar las poblaciones de vectores y por ende la transmisión de enfermedades vectoriales, se utiliza insecticidas con el fin de eliminar larvas y adultos del mosquito, siendo los de tipo piretroides los más utilizados a nivel global. No obstante, el uso prolongado de insecticidas genera resistencia a las poblaciones del *Ae. Aegypti*. La resistencia a piretroides se asocia a mutaciones puntuales en el gen VGSC denominadas *kdr*, mismas que reducen la efectividad del insecticida lo que afecta al control vectorial aumentando el riesgo de transmisión del dengue. En este estudio, se evaluó la resistencia a Temephos (larvicida) y Deltametrina (adulticida) con bioensayos de campo en muestras de *Ae. aegypti* de San Cristóbal, Galápagos. Los resultados indicaron presencia de resistencia por lo que procedimos a usar técnicas moleculares y estandarizar un qPCR con curvas de melting para detectar las mutaciones *kdr* (F1534C y V1016I). Los resultados preliminares revelaron la mutación V1016I en una porción significativa de las muestras, lo cual implica resistencia a insecticidas. Hasta la información que hemos podido obtener, esta es la primera vez que se estudia mediante qPCR y curvas de melting la resistencia del *Ae. aegypti* de Galápagos.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, resistencia a insecticidas, piretroides, *kdr*, curvas de melting, Galápagos.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) mosquito is the primary vector of arboviral diseases such as dengue, chikungunya, Zika, and yellow fever. A few decades ago, dengue has replaced malaria as the leading cause of febrile illnesses in Ecuador, and nowadays in 2024, el country reports a significant outbreak with 59.120 cases including 164 from the Galápagos Islands. Overall, insecticides are generally used to control vector populations and thus disease transmission; this occurs by targeting mosquito larvae and adults with pyrethroid-based insecticides which is a common practice at a global level. However, the prolonged use of insecticides has led to resistance in *Ae. aegypti* populations. Pyrethroid resistance is associated with point mutations in the VGSC gene, known as *kdr* mutations, which reduce the effectiveness of the insecticides, affecting vector control and increasing the risk of dengue transmission. In this study, resistance to Temephos (larvicide) and Deltamethrin (adulticide) was evaluated through bioassays carried out in the field in *Ae. aegypti* samples from San Cristobal, Galapagos. The results suggested resistance, prompting the use of molecular tools through standardization of a qPCR with melting curves to detect *kdr* mutations (F1534C and V1016I). Preliminary results revealed the V1016I mutation in a significant portion of the samples, indicating insecticide resistance. To the best of our knowledge, this is the first time that the resistance of *Ae. aegypti* from the Galapagos has been studied using qPCR with melting curves.

Key words: *Aedes aegypti*, insecticide resistance, pyrethroid, *kdr*, melting curves, Galápagos

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	11
Métodos.....	15
Resultados	18
Discusión.....	19
Conclusiones	23
Tablas	24
Figuras.....	27
Referencias bibliográficas.....	29
Anexos	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos procesados de la prueba de resistencia en larvas <i>Ae. aegypti</i>	24
Tabla 2. Datos recolectados de la prueba de resistencia en <i>Ae. aegypti</i> adultos.	24
Tabla 3. Temperaturas de melting para el punto de mutación F1534C	25
Tabla 4. Temperaturas de melting para el punto de mutación V1016I.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curvas de melting para el punto de mutación F1534C	27
Figura 2. Curvas de melting para el punto de mutación V1016I.....	28

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ajustes a la metodología proporcionada por NAMRU-SOUTH.....	34
Anexo 2. Primers para identificación de genes kdr	34
Anexo 3. Master mix para el set de primers V1016I.....	34
Anexo 4. Master mix para el set de primers F1534C	35

INTRODUCCIÓN

El mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) es el principal transmisor (vector) de varios patógenos, incluyendo a arbovirus (virus transmitidos por Artrópodos) lo que causa un alto impacto en la salud humana y animal. Entre los arbovirus transmitidos por esta especie al hombre, están el virus de la fiebre amarilla, el virus de la fiebre del dengue, el chikunguña y el zika (Souza-Neto et al., 2019). Numerosas poblaciones de *Ae. aegypti* han sido identificadas en más de 100 países a nivel mundial incluyendo Asia, Centroamérica, Norteamérica, Suramérica, África y regiones mediterráneas y constituyen un gran riesgo por las enfermedades que pueden transmitir (Jing & Wang, 2019). El *Ae. aegypti* puede encontrarse en zonas tropicales y subtropicales tanto en regiones urbanas como rurales y las hembras del mosquito, si están infectadas, pueden transmitir estos patógenos mediante sus picaduras, provocando brotes de enfermedad, alta morbilidad y mortalidad (Kok et al., 2023).

El avance rápido de la urbanización, el Cambio Climático, un mayor flujo de personas y productos, el aumento de viajes y de comercio global, entre otros, favorecen la reproducción de este vector e incrementan el riesgo de transmisión (Kolimenakis et al., 2021). Además de los factores sociales asociados, la alta antropofilia de esta especie, hematofagia de las hembras del mosquito, y la preferencia por formar criaderos en agua almacenada en zonas urbanas, son hábitos de este vector que aumentan el riesgo de transmisión de enfermedades como el dengue (Conde et al., 2015).

En el Ecuador, prevalece la transmisión del dengue, que desde hace un par de décadas reemplaza a la malaria como la principal causa de casos febriles (Cifuentes et al., 2013) y en el 2024 es causante de uno de los mayores brotes epidémicos con 59.120 casos reportados a nivel nacional. Las Islas Galápagos siguen el mismo patrón que el Ecuador continental con picos de

transmisión cada 5 años y un brote epidémico con 164 casos en el 2024 hasta la Semana Epidemiológica 49 (Gaceta Vectores, SE 49 2024). Se estima que en general, hay una sub-notificación de casos reportados ya que muchos son asintomáticos o nunca diagnosticados (Ryan et al., 2019). Las estrategias para el control del contagio de estas enfermedades son limitadas, por lo que las organizaciones de control del sector público enfocan sus esfuerzos en el control vectorial que busca reducir la densidad poblacional del *Ae. aegypti* eliminando tanto los criaderos de estados inmaduros (larvas en sus diferentes estadios y pupas) como los mosquitos adultos (Gutiérrez et al., 2021). Para alcanzar este fin, se utilizan varias estrategias combinando campañas de comunicación social y estrategias enfocadas en la eliminación del vector, siendo la más eficiente el control vectorial químico con el uso de insecticidas tanto para la eliminación de larvas como para adultos (Jing & Wang, 2019).

El control vectorial a nivel mundial para mosquitos adultos suele realizarse con insecticidas organofosforados, piretroides, carbamatos y organoclorados; siendo los insecticidas de tipo piretroide los más utilizados por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador (Ryan et al., 2019). Los piretroides son un tipo de insecticida orgánico sintético que se obtienen a partir de la piretrina, un compuesto pesticida natural presente en las flores del crisantemo. Se pueden clasificar según su composición química en piretroides de tipo I y tipo II. Este es un grupo amplio de insecticidas en los que se puede incluir aletrina, tetrametrina, permetrina y el insecticida más popular a nivel mundial, la deltametrina (Ahamad & Kumar, 2023). Este tipo de insecticidas causan que el canal de sodio dependiente de voltaje (VGSC) se mantenga abierto por un tiempo prolongado causando el colapso del sistema nervioso del mosquito (Chen et al., 2020).

El uso constante de insecticidas también ha sido relacionado con la aparición de resistencia a los mismos en poblaciones de vectores incluyendo el *Ae. aegypti*, por lo que se ha reportado con

cada vez más frecuencia la resistencia a insecticidas piretroides y otros tipos. La resistencia se explica por mutaciones puntuales en el gen VGSC ubicado en el tercer cromosoma del mosquito (Campbell et al., 2019) y se la conoce como knockdown resistance mutations o *kdr*. Estas mutaciones reducen la sensibilidad del canal de sodio a los insecticidas de tipo piretroide haciéndolos ineficientes (Chen et al., 2020). Existen dos mutaciones de especial interés para entender la resistencia a piretroides, denominadas: F1534C y V1016I. La mutación F1534C se ubica en el dominio III segmento 6 del cromosoma (Chen et al., 2019) y reemplaza una fenilalanina por una cisteína (Yanola et al., 2011). Por otra parte, la mutación V1016I, ubicada en el dominio II segmento 6 del cromosoma VGSC (Chen et al., 2019) intercambia valina por isoleucina (Saavedra-Rodriguez et al., 2007). La mutación F1534C se relaciona a la resistencia de piretroides de tipo I como la permetrina, mientras que la mutación V1016I se relaciona a la resistencia de piretroides de tipo II como la deltametrina. La co-ocurrencia de estas mutaciones tiene un efecto aditivo lo cual resulta en mosquitos altamente resistentes al control vectorial (Zardkoohi et al., 2020).

La resistencia a insecticidas implica un mayor riesgo para la salud pública ya que afecta al eficiente control vectorial aumentando el riesgo de transmisión de arbovirus (Sumitha et al., 2023). Actualmente la resistencia a insecticidas es detectada mediante bioensayos "in vivo" que evalúan la supervivencia de mosquitos que han sido sometidos por un período definido de tiempo a insecticidas. No obstante, la implementación de estas pruebas a gran escala es difícil debido a la cantidad de especímenes necesarios en diferentes estados fisiológicos, además de que no es posible identificar el mecanismo de resistencia involucrado. Por esta razón, se recomienda el uso de análisis moleculares que permitan el estudio de ADN para identificar las mutaciones *kdr* de forma más eficiente (Ahmed et al., 2022).

La identificación de los mecanismos de resistencia presentes en las poblaciones del *Ae. aegypti* es esencial para la implementación de programas de control vectorial más eficientes por parte de organizaciones y gobiernos. La limitada información sobre la resistencia a insecticidas en las poblaciones de este vector en diferentes localidades del Ecuador especialmente en Galápagos implica un mayor riesgo de contagio de dengue así como un desperdicio de recursos al realizar fumigaciones con insecticidas no funcionales (Moyes et al., 2017). En este contexto, este estudio busca usar una técnica molecular con asesoramiento internacional que pueda identificar la resistencia o susceptibilidad a insecticidas piretroides en las poblaciones de *Ae. aegypti* (estandarizamos una prueba qPCR con curvas de melting para la identificación de las mutaciones *kdr* F1534C y V1016I en gen VGSC) y se obtuvo resultados preliminares de muestras provenientes de las Islas Galápagos.

MÉTODOS

Recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas en la provincia de Galápagos en la Isla San Cristóbal. Se recolectaron *Ae. aegypti* en sus etapas inmaduras (larvas y pupas) en el mes de agosto 2024 de aguas almacenadas en tanques y recipientes varios en el peridomicilio de viviendas de la zona. Las muestras de larva fueron recolectadas con ayuda de redes entomológicas, colocadas en recipientes plásticos para su transporte, separadas, identificadas y cuantificadas. Las larvas de *Ae. aegypti* fueron identificadas en base a su sifón respiratorio corto y oscuro, con peines basales distintivos; y su posición vertical al flotar en la superficie del agua (Soria et al., 2021). Las larvas fueron clasificadas según su estado larval, en este caso se utilizaron larvas de segundo y tercer estadio para el bioensayo que se realizó a continuación en el laboratorio de campo. Por otra parte, las pupas se colocaron dentro de eclosionadores hasta que puedan emerger en mosquitos adultos. Los mosquitos adultos en los eclosionadores fueron alimentados con algodones embebidos en agua con azúcar e identificados como *Ae. Aegypti* a nivel morfológico por la presencia de patas con bandas blancas y escamas blancas repartidas en tórax y abdomen (Huang, 2004) y ausencia de banda blanca en la probóscide que los distingue de *Ae. taeniorhynchus*, también presente en las islas Galápagos (Asigau et al., 2019). Por último, se separaron hembras de machos. Así se procede a los bioensayos con 400 larvas de segundo y tercer estadio y 50 hembras de mosquitos adultos.

Bioensayo en larvas y adultos

Se siguió la metodología sugerida por el CDC (2012) para la detección y caracterización de la resistencia a insecticidas en una población de vectores. El análisis de resistencia en larvas consiste en medir la susceptibilidad de larvas de segundo y tercer estadio a varias concentraciones

del larvicida escogido. En este caso se analiza la susceptibilidad de larvas de *Ae. aegypti* al larvicida Temefós con las concentraciones 0.005, 0.025, 0.125 y 0.625 ppm. El bioensayo consiste en 4 repeticiones por cada concentración del larvicida y un control. Se coloca 50 ml de agua y 1ml de cada solución de insecticida; en el control se reemplaza el larvicida por 1ml de etanol 70%. Se cuantifica la cantidad de larvas vivas en cada recipiente en el tiempo 0 y después cada 15 minutos hasta llegar a las 2 horas; se sigue el conteo a las 6, 12 y 24 horas. Tras finalizar el bioensayo se colocaron las larvas vivas en alcohol para almacenar las muestras para futuros análisis.

Para el estudio de resistencia en adultos se hace uso de 5 botellas Wheaton de 250 ml que serán utilizadas en 4 repeticiones y para un control durante el bioensayo. Las botellas correspondientes a las repeticiones fueron recubiertas con 1ml del insecticida seleccionado, de tal forma que haya una concentración de 10 μ g/botella; en este caso fue Deltametrina a una concentración de 10 μ g/ml. El insecticida fue repartido por todo el interior de la botella misma que fue sometida a movimiento mediante agitación hasta que las paredes del frasco se muestren completamente secas. Este proceso se repite con la botella de control añadiendo 1ml de etanol 70% en lugar de insecticida seleccionado.

El bioensayo se realizó únicamente con hembras del mosquito *Ae. aegypti* las que fueron introducidos con ayuda de un aspirador dentro de cada botella. En total se introdujeron 10 mosquitos hembra en cada botella. Se cuantificó la cantidad de mosquitos vivos desde el tiempo 0 y después cada 15 minutos por la siguiente hora. Para el conteo de mosquitos dentro de cada recipiente, se consideran muertos si estos ya no pueden mantenerse en pie. Una vez culminado el bioensayo, se almacenaron los mosquitos en tubos eppendorf con alcohol para futuros estudios moleculares.

qPCR y curvas de melting

Se analizaron 20 hembras de mosquitos, los mismos que previamente habían sido utilizados para el bioensayo con el fin de estandarizar la prueba qPCR con curvas de melting. Para esto se evaluó la preparación de los mosquitos de dos formas distintas para la extracción de ADN: a) el cuerpo completo del mosquito (n=10) fue sumergido en nitrógeno líquido por 10 minutos para después ser triturados, b) se recuperó las patas de otros 10 mosquitos para extraer el ADN y se almacenó el cuerpo. La extracción de ADN fue realizada siguiendo el protocolo del kit: Qiagen: Blood and tissue DNeasy[®] kit.

El protocolo para la prueba qPCR con curvas de melting fue proporcionado por el laboratorio NAMRU-SOUTH en Lima, Perú (Castro, 2021) el cual fue modificado para ser utilizado en otra marca de equipo. Se realizaron 13 ensayos para lograr la estandarización del protocolo, los ajustes en la metodología tras estos ensayos se detallan en el **Anexo 1**. El protocolo consiste en el uso de dos sets de primers especificados en el **Anexo 2**.

Para la prueba qPCR se preparó un master mix (**Anexo 3 y 4**) del cual se colocó 8 μ L en tubos PCR para cargarlos en el termociclador LEIA-X4 Biobase[®]. El programa qPCR para el análisis de curvas de melting se realizó de acuerdo al siguiente protocolo para ambos sets de primers: 95°C por 3 minutos, 42 ciclos de 95°C por 3 segundos y 60°C por 15 segundos, después se mantuvo 60°C por 3 minutos, seguidos de una rampa que empezó en 60°C hasta llegar a los 95°C mientras se toma la medida de fluorescencia cada 0.2°C. Se realizó los ensayos sin controles positivos por lo que los resultados obtenidos fueron analizados según los picos de temperatura reportados en la literatura (Saavedra-Rodriguez et al., 2007; Yanola et al., 2011) mismos que son los utilizados por el protocolo del NAMRU-SOUTH.

RESULTADOS

Los resultados del bioensayo en donde se puede observar el número promedio de larvas vivas obtenido de las 4 repeticiones por cada concentración de Temephos utilizado en el bioensayo se pueden ver en la **Tabla 1**. El porcentaje de mortalidad obtenido aumenta según la concentración de larvicida, sin embargo, el porcentaje de mortalidad de interés es aquel obtenido en la dosis diagnóstica (0.0125ppm) y tiempo diagnóstico (24h) mismo que es de 33.75%. Así mismo se puede ver los resultados del bioensayo realizado en mosquitos hembra con Deltametrina (10ug/botella) en la **Tabla 2**. El porcentaje de mortalidad en el tiempo diagnóstico (30 min) es de 62.5%.

Por su parte, las curvas de melting obtenidas para el punto de mutación F1534C muestran 20 curvas de melting y el control negativo (**Figura 1a**), entre las cuales la mayoría tienen un pico de temperatura cercano a los 80.5 °C. Al analizar las curvas más detenidamente, se las puede dividir en dos grupos: aquellas que tienen un temperatura cercanas a 80.5°C que corresponden a 17 muestras y aquellas que tiene un pico entre los 78-79°C que corresponden a 3 muestras (**Figura 1b**). De la misma manera se ven las curvas de melting para el punto de mutación V1016I en donde se observan las 20 curvas obtenidas y el control negativo (**Figura 2a**). Se ve que la mayoría de las curvas tienen un pico de temperatura cercano a los 79°C. Nuevamente, al analizar detalladamente las curvas se las puede dividir en tres grupos: aquellas que tienen el pico de temperatura cercano a los 77°C que corresponden a 2 muestras, aquellas que tienen las temperaturas cercanas a los 79°C que corresponden a 11 muestras y aquellas que parecen tener un doble pico en 77-78°C y 82/83°C que corresponden a 7 muestras (**Figura 2b**). Las temperaturas de los picos de las curvas de melting se detallan en la **Tabla 3** para la mutación F1534C y en la **Tabla 4** para la mutación V1016I. En ambas tablas se ve si el mosquito analizado es susceptible a piretroides (S) o resistente (R).

DISCUSIÓN

En las islas Galápagos, en donde los casos del dengue pueden afectar gravemente al turismo y a la comunidad local considerando la poca infraestructura médica en las islas, la resistencia a insecticidas es un gran problema (Katzelnick et al., 2024). Para el control vectorial, la práctica más usada es la aplicación de Temephos en hábitats larvales (Abatización) y el uso de Deltametrina (Fumigación) para la eliminación de mosquitos adultos (Ortega-López et al., 2024). Sin embargo, a pesar de las abatizaciones y fumigaciones constantes, se siguen reportando casos de dengue cada año y brotes ocasionales como en el 2024. Considerando que el control vectorial usando estas prácticas se realiza de una manera indiscriminada, es posible que esta aplicación masiva incrementa la resistencia a insecticidas lo que impide un control vectorial eficiente. En consecuencia se mantienen altas las poblaciones del *Ae. aegypti* en Galápagos y continúa la aparición ocasional de brotes epidémicos de dengue.

Se evaluó la susceptibilidad a insecticidas en 400 larvas y 50 mosquitos adultos de la isla San Cristóbal mediante los bioensayos recomendados por la CDC (2012) según los tiempos y dosis diagnósticas recomendadas. En el caso de larvas, la dosis diagnóstica de Temephos es 0.0125ppm. después de las 24 horas, momento para el cual se espera ver una tasa de mortalidad del 100%. Para los mosquitos adultos la dosis diagnóstica para la deltametrina es de 10ug/botella donde se espera ver una mortalidad del 100% después de media hora. Se ve que la mortalidad de larvas en el tiempo diagnóstico es de 33.75% (**Tabla 1**) mientras que en mosquitos es de 62.5% (**Tabla 2**). La OMS (2017) define que una tasa de mortalidad $> 80\%$ en los bioensayos sugiere la presencia de resistencia a insecticidas y recomienda el posterior análisis molecular para la identificación de mecanismos de resistencia.

Para el propósito mencionado, se pudo contar con el protocolo usado por el Instituto de la Marina de los Estados Unidos NAMRU-SOUTH con sede en Lima, Perú, el cual fue ajustado mediante 13 ensayos hasta llegar a las condiciones detalladas en el **Anexo 1**. Entre los cambios realizados se encuentra el uso del colorante fluorescente EVAgreen (EG) en lugar de SYBRgreen (SG). SG cuenta con ciertas desventajas que se ven resueltas al usar EG obteniendo resultados más robustos: (1) es posible utilizar mayores concentraciones del colorante sin inhibir la reacción qPCR; (2) la reacción del colorante es térmica, hidrolítica y fotolíticamente estable; (3) no se une a los subproductos de una prueba PCR; (4) la reproducibilidad de los resultados obtenidos con este colorante es muy alta. Por todas estas particularidades del colorante, las curvas de melting obtenidas utilizando EG tienden a tener mayor sensibilidad que aquellas que utilizan SG provocando cambios entre 1.5 - 2°C en los picos de las curvas de melting (Mao et al., 2007).

Gracias a los sets de primers utilizados es posible identificar la presencia de mutaciones en los puntos F1534C y V1016I. Los sets de primers consisten en un primer reverse y dos forward, siendo los forward los que permiten diferenciar la presencia de las mutaciones. Los primers forward tienen un blanco altamente específico para la mutación ya que se diferencian en una sola base debido a la naturaleza de las mutaciones *kdr*. Adicionalmente cuentan con colas de diferentes tamaños de GC lo que resulta en amplicones con un mayor o menor contenido de estas bases definiendo los picos de temperatura en las curvas de melting. Las curvas de melting se obtienen graficando las medidas de intensidad de fluorescencia conforme aumenta la temperatura, puesto que el amplicón de doble hebra se va denaturando liberando fluorescencia. (Radvanszky et al., 2015).

Para el punto de mutación F1534C se obtienen las curvas observadas en la **Figura 1a**, con los picos de temperatura reportados en la **Tabla 3**. La mayoría de muestras tienen un pico de

temperatura cercano a 80.5 °C que según Yanola, et al. (2011) implica susceptibilidad al acercarse a la temperatura de 79.3°C. Al analizar las curvas de melting obtenidas para el punto de mutación V1016I en la **Figura 2a**, se ve en su mayoría una temperatura de melting cercana a los 79°C (**Tabla 4**). Estas temperaturas según Saavedra-Rodríguez, et al. (2007) significan la presencia de mutaciones, sugiriendo un mosquito resistente. Es importante mencionar las diferentes curvas obtenidas en las pruebas qPCR para F1534C y para V1016I (**Figura 1b**, **Figura 2b**). Los cambios visualizados pueden deberse al tamaño o composición de los amplicones, ya que alteraciones en la secuencia del amplicon afectan a la temperatura a la que se da el pico de la curva (Radvanszky et al., 2015). A su vez, es interesante observar el grupo de curvas que parecen tener un doble pico en la mutación V1016I puesto que según la literatura los dos picos pueden significar la presencia de heterocigosis (Saavedra-Rodríguez et al., 2007). Para confirmar la causa de las anomalías en las curvas se recomienda realizar un secuenciamiento de los productos de la qPCR y una electroforesis para confirmar heterocigosis. Estos no se hicieron durante este estudio, pero se continuará con los experimentos para esclarecer estos detalles que serán incluidos en una publicación científica futura.

Como ya se ha mencionado, cada mutación se relaciona con la resistencia a diferentes tipos de piretroides, siendo la mutación V1016I fuertemente relacionada a la resistencia de piretroides de tipo II como lo es la Deltametrina. En consecuencia, se entiende que los mosquitos analizados de la Isla San Cristóbal poseen únicamente esta resistencia. Esto es poco usual ya que los reportes de la mutación V1016I se encuentran usualmente acompañadas de la mutación F1534C, especialmente a lo largo de todo el continente de América (Chen et al., 2019). La presión selectiva para la aparición de estas mutaciones en Galápagos es relativamente reciente dado que se reporta que *Ae. aegypti* llegó a las islas en el año 2002 con la subsecuente aparición del dengue en las islas

(Real-Cotto et al., 2017). En consecuencia, el uso de insecticidas en Galápagos es más reciente en comparación al Ecuador continental y por ende la presión selectiva que lleva a estas mutaciones también. Además de que la presión selectiva ha sido ejercida principalmente por la deltametrina, un insecticida piretroide de tipo II (Ministerio de Salud Pública, 2019). Al momento, con estos resultados preliminares, no es posible descartar la presencia de la mutación F1534C. Es necesario analizar un mayor número de muestras y localidades en Galápagos para corroborar estos hallazgos.

También es importante mencionar que la resistencia a piretroides se relaciona a más mutaciones dentro del gen VGSC. Se han reportado 11 mutaciones en este gen relacionadas y su ocurrencia dependen de la población analizada (Chen et al., 2019). Es posible que la resistencia en Galápagos se deba a la co-ocurrencia de la mutación V1016I con la mutación S989P o las mutaciones V410L y V1016G, que son mutaciones comunes en América (Ishak et al., 2015; Hernandez et al., 2023). Paralelamente, las mutaciones *kdr* pueden verse acompañadas de otros mecanismos de resistencia como la sobre expresión de enzimas detoxificantes como enzimas carboxilesterasas (GSTs) y monooxigenasas (citocromo P450). Estas enzimas ayudan a un metabolismo acelerado del insecticida piretroide disminuyendo su efectividad (Nugapola et al., 2021).

Estos resultados iniciales marcan el comienzo de un estudio más a profundidad para comprender la resistencia a insecticidas en Galápagos y en Ecuador donde esta temática es poco reportada. El primer paso a seguir es la confirmación de los resultados aquí obtenidos con el uso de controles positivos; realizar futuros estudios en donde se incluya un muestreo más amplio de las islas así como el análisis de otras mutaciones y mecanismos de resistencia. Por último, análisis adicionales permitirán explicar anomalías observadas en las curvas de melting.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este estudio resaltan la presencia de resistencia a insecticidas en las poblaciones de *Ae aegypti* de las Islas Galápagos, un hallazgo preocupante para las estrategias de control vectorial en la región. Los bioensayos realizados demostraron una pérdida de eficacia en Temephos (larvicida) y Deltametrina (insecticida), lo que sugiere que las poblaciones locales han desarrollado mecanismos de resistencia frente a estas sustancias. Este resultado es consistente con otros estudios que señalan la presión selectiva causada por el uso intensivo y prolongado de insecticidas como factor clave en la evolución de la resistencia en *Ae. aegypti*.

El análisis molecular mediante qPCR permitió detectar mutaciones kdr específicas, como V1016I, en un porcentaje significativo de las muestras. La presencia de esta mutación confirma que la resistencia observada está asociada a cambios genéticos que reducen la efectividad de los piretroides. Estos hallazgos subrayan la necesidad de diversificar las estrategias de control vectorial, incluyendo el monitoreo continuo de la resistencia y la implementación de nuevos enfoques que integren el uso racional de insecticidas junto con métodos alternativos. Esto es fundamental para prevenir brotes de enfermedades arbovirales y proteger la salud pública en esta región vulnerable. De la información que hemos podido recopilar, este es el primer estudio de la resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti* de Galápagos usando técnicas moleculares (gen kdr) mediante qPCR y curvas de melting.

TABLAS

Tabla 1. Datos procesados de la prueba de resistencia en larvas *Ae. aegypti*

Concentración [ppm]	Tiempo												% mortalidad
	0	0h15	0h30	0h45	1h	1h15	1h30	1h45	2h	6h	12h	24h	
0.005	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19.75	18.75	18.75	6.25
0.025	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19.25	19	19	5
0.125	20	20	20	20	20	20	19.75	19.25	19.25	18	16.75	13.25	33.75
0.625	20	20	20	19.5	19.25	19	18.75	18.75	18.75	18	15.25	9.5	52.5
Control	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	0

Descripción: En la tabla se observan el promedio del número de larvas vivas por cada concentración de Temephos utilizada en la prueba de resistencia. También se observa la tasa de mortalidad en forma de porcentaje, representando el porcentaje de larvas vivas y muertas después de las 24 horas de ensayo.

Tabla 2. Datos recolectados de la prueba de resistencia en *Ae. aegypti* adultos.

Tiempo [min]	Repetición				Promedio	Control
	1	2	3	4		
0	10	10	5	10	8.75	10
15	9	9	3	6	6.75	10
30	5	4	0	6	3.75	10
45	4	4	-	4	4	10
60	2	3	-	2	2.33	10
% de mortalidad	50	60	100	40	62.5	-

Descripción: Se muestra los datos recolectados de la prueba de resistencia de *Ae. aegypti* adultos. Se ve como la mortalidad en cada repetición es parecida entre sí a excepción de la repetición 3. El porcentaje de mortalidad se calcula en el tiempo de diagnóstico que en este caso es en el minuto 30. Adicionalmente se visualiza el porcentaje de adultos vivos al finalizar el ensayo.

Tabla 3. Temperaturas de melting para el punto de mutación F1534C

Muestra	Temperatura [°C]	Estado
1	80.56	S
2	80.60	S
3	80.52	S
4	80.40	S
5	80.42	S
6	80.21	S
7	80.38	S
8	79.26	S
9	80.50	S
10	80.52	S
11	80.59	S
12	80.59	S
13	80.55	S
14	80.62	S
15	80.66	S
16	80.00	S
17	80.55	S
18	78.36	S
19	80.55	S
20	80.67	S

Descripción: Se ven las temperaturas de los picos de las curvas de melting en el punto de mutación F1534C. La mayoría de las temperaturas se acercan a 80.5 °C a excepción de las muestras 2 (80.6 °C), 8 (79.26 °C) y 18 (78.36 °C). Se ve el estado de resistencia (R) o susceptibilidad (S) para las 20 muestrars analizadas.

Tabla 4. Temperaturas de melting para el punto de mutación V1016I

Muestra	Temperatura [°C]	Estado
1	79.32	R
2	79.40	R
3	79.19	R
4	78.61	R
5	79.20	R
6	78.86	R
7	78.40	R
8	77.65	R
9	79.18	R
10	78.47 - 82.70	-
11	78.94	R
12	79.26	R
13	79.13	R
14	79.23	R
15	82.41	R
16	78.45 - 81.93	-
17	79.16	R
18	77.25	R
19	78.92 - 82.42	-
20	79.32	R

Descripción: Se ven las temperaturas de melting para las 20 muestras analizadas. Se puede ver 3 muestras con dos picos de temperatura, 4 muestras cercanas a los 77 °C y 13 muestras cercanas a los 79 °C. Se ve el estado de resistencia (R) o susceptibilidad (S) para las 20 muestras analizadas.

FIGURAS

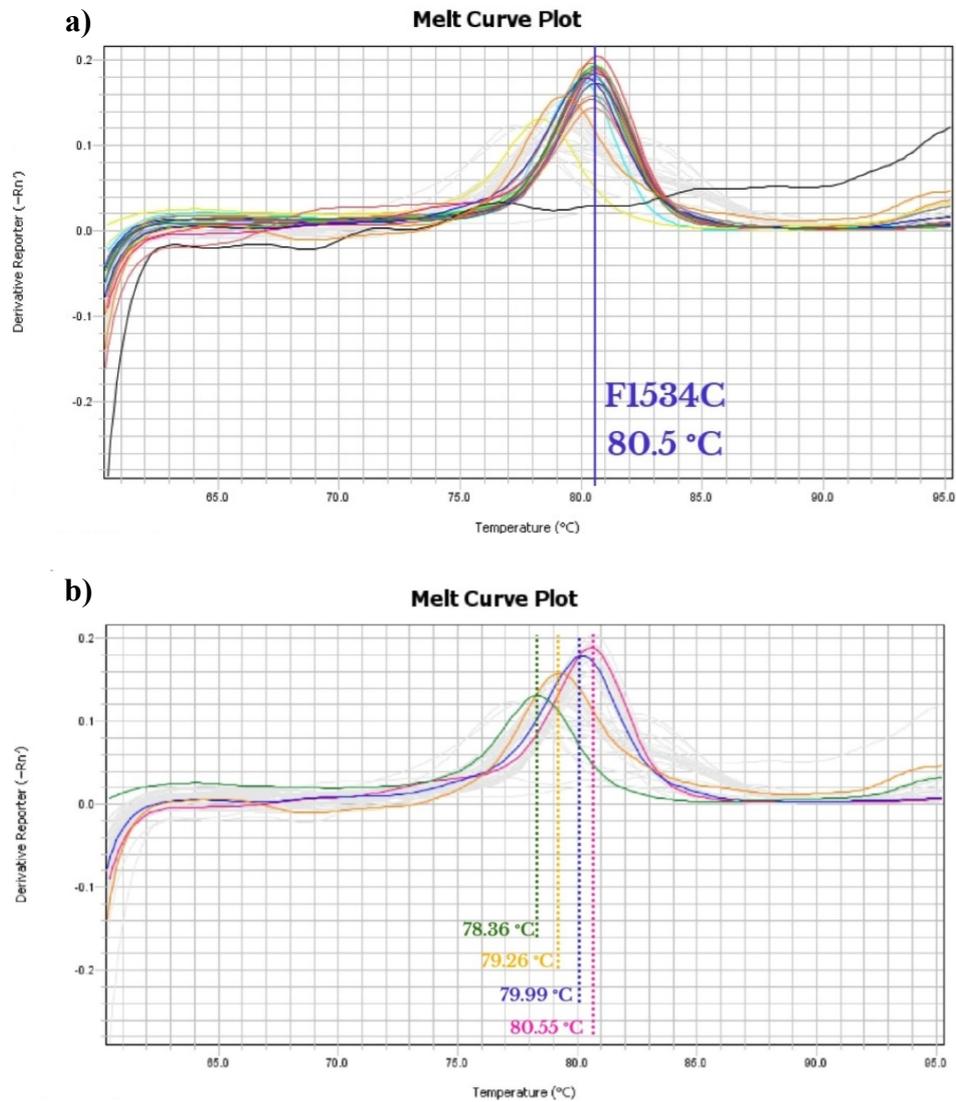


Figura 1. Curvas de melting para el punto de mutación F1534C

Descripción: a) Se observan 20 curvas de melting y el control negativo, la mayoría de curvas tiene un pico de temperatura cercano a los 80.5 °C. b) Se observa más detalladamente el tipo de curvas obtenidas. Se las puede dividir en dos grupos: aquellas que tienen un temperatura cercanas a 80.5°C que corresponden a 17 muestras y aquellas que tiene un pico entre los 78-79°C que corresponden a 3 muestras.

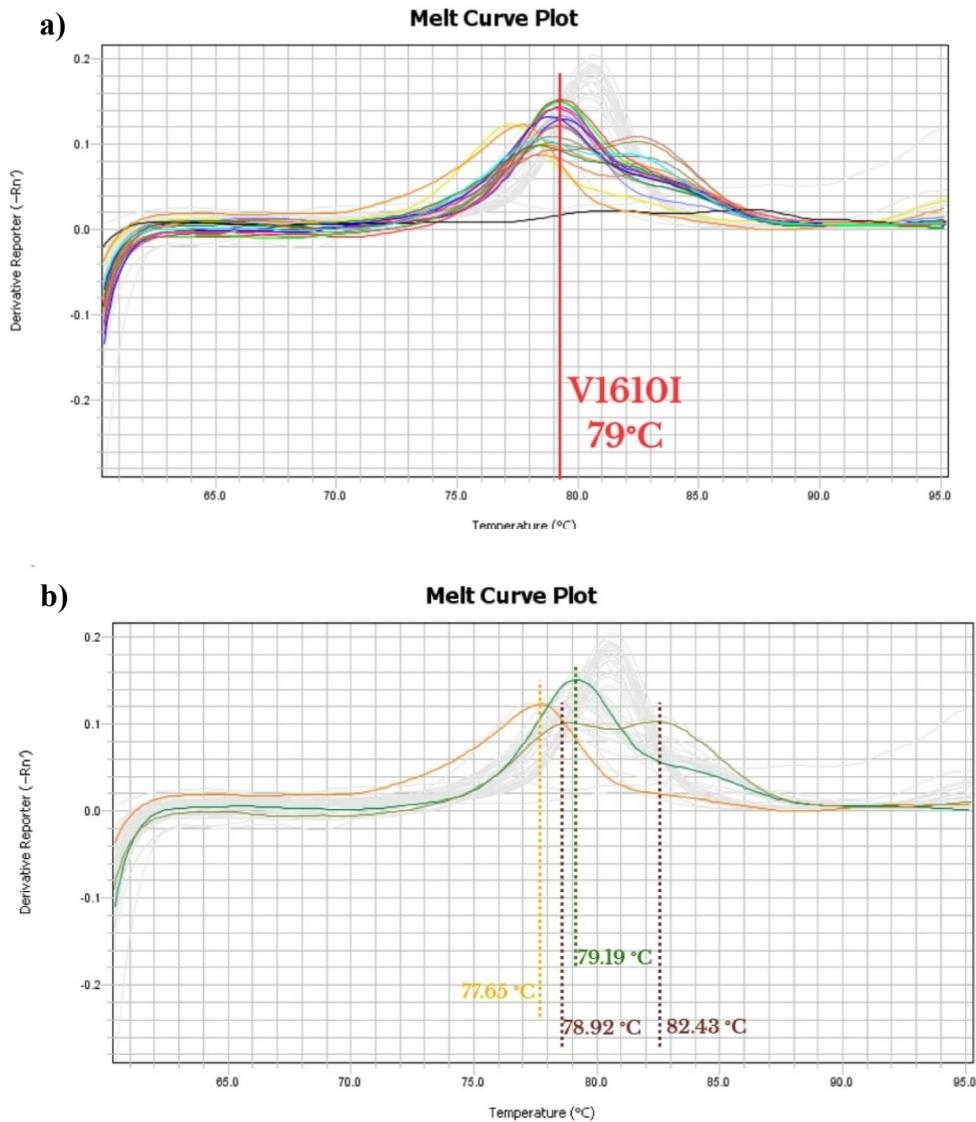


Figura 2. Curvas de melting para el punto de mutación V1016I

Descripción: a) Se observan las 20 curvas obtenidas y el control negativo. Se ve que la mayoría de las curvas tienen un pico de temperatura cercano a los 79°C. b) Se observa más detalladamente el tipo de curvas obtenidas para el punto de mutación V1016I. Se las puede dividir en tres grupos: aquellas que tienen el pico de temperatura cercano a los 77°C que corresponden a 2 muestras, aquellas que tienen las temperaturas cercanas a los 79°C que corresponden a 11 muestras y aquellas que parecen tener un doble pico en 77-78°C y 82/83°C que corresponden a 7 muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahamad, A., & Kumar, J. (2023). Pyrethroid pesticides: An overview on classification, toxicological assessment and monitoring. *Journal of Hazardous Materials Advances*, *10*, 100284. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2023.100284>
- Ahmed, M., Nath, N. S., Hugo, L. E., Devine, G. J., Macdonald, J., & Pollak, N. M. (2022). Rapid detection of *kdr* mutation F1534C in *Aedes aegypti* using recombinase polymerase amplification and lateral flow dipsticks. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *187*, 105209. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105209>
- Asigau, S., Salah, S., & Parker, P. G. (2019). Assessing the blood meal hosts of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes taeniorhynchus* in Isla Santa Cruz, Galápagos. *Parasites & Vectors*, *12*(1), 584. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3835-7>
- Campbell, C. L., Saavedra-Rodriguez, K., Kubik, T. D., Lenhart, A., Lozano-Fuentes, S., & Black, W. C. (2019). Vgsc-interacting proteins are genetically associated with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. *PLOS ONE*, *14*(1), e0211497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211497>
- Castro, F. (2021, abril 14). *Determine levels of resistance to pyrethroids in Aedes aegypti by quantification of kdr alleles*. U.S NAVAL MEDICAL RESEARCH UNIT SIX.
- Center for Global Health (U.S.). Division of Parasitic Diseases and Malaria. (2012). *Instrucciones para la evaluación de la resistencia a insecticida en vectores mediante del ensayo biológico de la botella de los CDC*. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/21776>
- Chen, M., Du, Y., Nomura, Y., Zhorov, B. S., & Dong, K. (2020). Chronology of sodium channel mutations associated with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *104*(2), e21686. <https://doi.org/10.1002/arch.21686>

- Chen, M., Du, Y., Wu, S., Nomura, Y., Zhu, G., Zhorov, B. S., & Dong, K. (2019). Molecular evidence of sequential evolution of DDT- and pyrethroid-resistant sodium channel in *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *13*(6), e0007432. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007432>
- Cifuentes, S. G., Trostle, J., Trueba, G., Milbrath, M., Baldeón, M. E., Coloma, J., & Eisenberg, J. N. S. (2013). Transition in the Cause of Fever from Malaria to Dengue, Northwestern Ecuador, 1990–2011. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(10), 1642–1645. <https://doi.org/10.3201/eid1910.130137>
- Conde, M., Orjuela, L. I., Castellanos, C. A., Herrera-Varela, M., Licastro, S., & Quiñones, M. L. (2015). Evaluación de la sensibilidad a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Caldas, Colombia, en 2007 y 2011. *Biomédica*, *35*(1), 43–52. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2367>
- Gutiérrez, E. M. P., Vallejo, D. A. Z., & Rivas, A. T. B. (2021). Metodología de canales endémicos del dengue en Ecuador 2015-2020: Necesidad para planificar y administrar la salud pública. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, *61*(1), Article 1. <http://iaes.edu.ve/iaespro/ojs/index.php/bmsa/article/view/222>
- Hernandez, J. R., Liu, S., Fredregill, C. L., & Pietrantonio, P. V. (2023). Impact of the V410L kdr mutation and co-occurring genotypes at kdr sites 1016 and 1534 in the VGSC on the probability of survival of the mosquito *Aedes aegypti* (L.) to Permanone in Harris County, TX, USA. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *17*(1), e0011033. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011033>
- Huang, Y.-M. (2004). The subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in the Afrotropical Region with keys to the species (Diptera: Culicidae). *Zootaxa*, *700*(1), Article 1. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.700.1.1>

- Ishak, I. H., Jaal, Z., Ranson, H., & Wondji, C. S. (2015). Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasites & Vectors*, *8*(1), 181.
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0797-2>
- Jing, Q., & Wang, M. (2019). Dengue epidemiology. *Global Health Journal*, *3*(2), 37–45.
<https://doi.org/10.1016/j.glohj.2019.06.002>
- Katzelnick, L. C., Quentin, E., Colston, S., Ha, T.-A., Andrade, P., Eisenberg, J. N. S., Ponce, P., Coloma, J., & Cevallos, V. (2024). Increasing transmission of dengue virus across ecologically diverse regions of Ecuador and associated risk factors. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *18*(1), e0011408. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011408>
- Kok, B. H., Lim, H. T., Lim, C. P., Lai, N. S., Leow, C. Y., & Leow, C. H. (2023). Dengue virus infection – a review of pathogenesis, vaccines, diagnosis and therapy. *Virus Research*, *324*, 199018. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.199018>
- Kolimenakis, A., Heinz, S., Wilson, M. L., Winkler, V., Yakob, L., Michaelakis, A., Papachristos, D., Richardson, C., & Horstick, O. (2021). The role of urbanisation in the spread of *Aedes* mosquitoes and the diseases they transmit—A systematic review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *15*(9), e0009631.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009631>
- Mao, F., Leung, W.-Y., & Xin, X. (2007). Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnology*, *7*(1), 76. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-76>
- Ministerio de Salud Pública. (2019). *Vigilancia y control de vectores en el Ecuador*.
- Moyes, C. L., Vontas, J., Martins, A. J., Ng, L. C., Koou, S. Y., Dusfour, I., Raghavendra, K., Pinto, J., Corbel, V., David, J.-P., & Weetman, D. (2017). Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans.

PLOS Neglected Tropical Diseases, 11(7), e0005625.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005625>

- Nugapola, N. W. N. P., De Silva, W. A. P. P., Weeraratne, T. C., & Karunaratne, S. H. P. P. (2021). Kdr type mutations and enhanced GST based insecticide resistance in dengue vector mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *International Journal of Tropical Insect Science*, 41(1), 409–417. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00219-3>
- Organización Mundial de la Salud. (2017). *Procedimientos de las pruebas para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos vectores del paludismo* (2a ed.). Organización Mundial de la Salud. <https://iris.who.int/handle/10665/258960>
- Ortega-López, L. D., Betancourth, M. P., León, R., Kohl, A., & Ferguson, H. M. (2024). Behaviour and distribution of *Aedes aegypti* mosquitoes and their relation to dengue incidence in two transmission hotspots in coastal Ecuador. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 18(4), e0010932. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010932>
- Radvanszky, J., Surovy, M., Nagyova, E., Minarik, G., & Kadasi, L. (2015). Comparison of different DNA binding fluorescent dyes for applications of high-resolution melting analysis. *Clinical Biochemistry*, 48(9), 609–616. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.01.010>
- Real-Cotto, J. J., Regato Arrata, M. E., Burgos Yépez, V. E., & Jurado Cobeña, E. T. (2017). Evolución del virus dengue en el Ecuador. Período 2000 a 2015. *Anales de la Facultad de Medicina*, 78(1), 29. <https://doi.org/10.15381/anales.v78i1.13018>
- Ryan, S. J., Lippi, C. A., Nightingale, R., Hamerlinck, G., Borbor-Cordova, M. J., Cruz B, M., Ortega, F., Leon, R., Waggoner, E., & Stewart-Ibarra, A. M. (2019). Socio-Ecological Factors Associated with Dengue Risk and *Aedes aegypti* Presence in the Galápagos Islands, Ecuador. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/ijerph16050682>

- Saavedra-Rodriguez, K., Urdaneta-Marquez, L., Rajatileka, S., Moulton, M., Flores, A. E., Fernandez-Salas, I., Bisset, J., Rodriguez, M., McCall, P. J., Donnelly, M. J., Ranson, H., Hemingway, J., & Black, W. C. (2007). A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, *16*(6), 785–798. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00774.x>
- Soria, C., Almirón, W. R., & Crocco, L. (2021). CAPÍTULO 2: *Aedes aegypti* características y su relación con el dengue. En *La culpa no es sólo del mosquito* (pp. 37–82).
- Souza-Neto, J. A., Powell, J. R., & Bonizzoni, M. (2019). *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infection, Genetics and Evolution*, *67*, 191–209. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009>
- Sumitha, M. K., Kalimuthu, M., Senthil, M. K., Paramasivan, R., Kumar, A., & Gupta, B. (2023). Status of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* in India: A review. *Journal of Vector Borne Diseases*, *60*(2), 116. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.361174>
- Yanola, J., Somboon, P., Walton, C., Nachaiwieng, W., Somwang, P., & Prapanthadara, L. (2011). High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Tropical Medicine & International Health*, *16*(4), 501–509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02725.x>
- Zardkoohi, A., Castañeda, D., Lol, J. C., Castillo, C., Lopez, F., Marín Rodriguez, R., & Padilla, N. (2020). Co-occurrence of kdr Mutations V1016I and F1534C and Its Association With Phenotypic Resistance to Pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations From Costa Rica. *Journal of Medical Entomology*, *57*(3), 830–836. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz241>

ANEXOS

Anexo 1. Ajustes a la metodología proporcionada por NAMRU-SOUTH.

	NAMRU - SOUTH	USFQ
Colorante fluorescente	SYBRgreen	EVAgreen (Marca:Tipgreen®)
Cantidad de ADN	2ug/rxn	4ug/rxn
Ciclos de amplificación	40	42
Medición de fluorescencia	0.3 °C	0.2 °C
Controles	Controles positivos	No hay controles

Anexo 2. Primers para identificación de genes *kdr*

Primer	Secuencia (5'-3')	Temperatura esperada
V1016F	GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG	85.6 °C
I1016F	GCGGGCACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA	77 °C
1016R	GGATGAACCSAAATTGGACAAAAGC	-
F1534F	GCGGGCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATATT	79.3 °C
C1534F	GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATGTG	84.4 °C
1534R	TCTGCTCGTTGAAGTTGTCGAT	-

Fuente: Saavedra-Rodriguez et al., 2007; Yanola et al., 2011

Anexo 3. Master mix para el set de primers V1016I

V1016I		
Reactivo	Volumen [µL] 1 rxn	Volumen total [µL]
Tip green®	6	126
V1016F	0.36	7.56
1016R	0.36	7.56
I1016F	0.3	6.3
Agua	0.98	20.58
ADN	4	-
Volumen total	8	168

Anexo 4. Master mix para el set de primers F1534C

F1534C		
Reactivo	Volumen [μL] 1rxn	Volumen total [μL]
Tip green®	6	126
F1534F	0.36	7.56
1534R	0.36	7.56
C1534F	0.24	5.04
Agua	1.04	21.84
ADN	4	-
Volumen total	8	168