



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE EL GIRÓN  
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**DETECCIÓN DE MUTACIONES *kdr* MEDIANTE PCR CONVENCIONAL EN TRES  
CODONES DEL GEN VGSC (VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNEL) EN *Aedes*  
*aegypti* RECOLECTADOS EN GUAYAQUIL-ECUADOR, 2022.**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:  
Ingeniera Biotecnóloga**

**AUTORA: KARLA JAZMIN PURUNCAJAS HERRERA**

**AUTORA: KATHERINE NAYELI QUISILEMA POZO**

**TUTORA: VIVIANA PAMELA CHILUISA UTRERAS**

**Quito-Ecuador**

**2024**

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

Nosotros, Karla Jazmin Puruncajas Herrera con documento de identificación N° 1726344458 y Katherine Nayeli Quisilema Pozo con documento de identificación N° 1723888804; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 7 de Agosto del año 2024

Atentamente,

-----  
Karla Jazmin Puruncajas Herrera  
1726344458

-----  
Katherine Nayeli Quisilema Pozo  
1723888804

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Karla Jazmin Puruncajas Herrera con documento de identificación No.1726344458 y Katherine Nayeli Quisilema Pozo con documento de identificación No.1723888804, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Detección de mutaciones *kdr* mediante PCR convencional en tres codones del gen VGSC (Voltage-gated sodium channel) en *Aedes aegypti* recolectados en Guayaquil-Ecuador, 2022.”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de Ingenieras Biotecnólogas, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 7 de Agosto del año 2024

Atentamente,

-----  
Karla Jazmin Puruncajas Herrera

1726344458

-----  
Katherine Nayeli Quisilema Pozo

1723888804

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Viviana Pamela Chiluisa Utreras con documento de identificación N° 1713168258, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: DETECCIÓN DE MUTACIONES *kdr* MEDIANTE PCR CONVENCIONAL EN TRES CODONES DEL GEN VGSC (VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNEL) EN *Aedes aegypti* RECOLECTADOS EN GUAYAQUIL-ECUADOR, 2022., realizado por Karla Jazmin Puruncajas Herrera con documento de identificación N° 1726344458 y por Katherine Nayeli Quisilema Pozo con documento de identificación N° 1723888804, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 7 de Agosto del año 2024

Atentamente,



-----  
Ing. Viviana Pamela Chiluisa Utreras, MSc

1713168258

## **Dedicatoria**

Expreso mi profunda gratitud hacia el Ser Supremo, la fuerza divina que me ha brindado fortaleza para superar los momentos más desafiantes. Además, le doy gracias por haberme bendecido con la oportunidad de alcanzar un anhelo muy preciado en mi existencia, un gran sueño que he logrado materializar.

A mis Queridos Padres William y Miriam que los amo con todo mi corazón, con quien estoy infinitamente agradecida por todo su amor y apoyo incondicional, a quienes debo todo lo que soy.

A mis abuelos Julio, Evita, Elsa quienes me han enseñado con su ejemplo y amor a cómo vivir correctamente en esta vida.

A mis hermanas Shirley que es mi ejemplo a seguir y Miley mi pequeño amor, con las que he compartido toda mi vida.

A mis amigos y compañeros Heydi mi fiel confidente, Luis mi mejor amigo, que me han alentado y acompañado en este camino, tanto en los momentos luminosos como en los más desafiantes.

**Katherine Quisilema.**

## **Dedicatoria**

A Dios que con su guía divina ha iluminado cada paso de mi vida bríndame la inspiración y determinación necesaria para alcanzar cada meta que me he dispuesto.

A mis queridos padres Carlos Puruncajas y Myriam Herrera, que con esfuerzo y amor me ayudaron en esta trayectoria universitaria, especialmente a mi madre que me acompañó en mis noches de desvelo, en mis logros y mis fracasos, y no ha dejado que me rinda en este pequeño paso de la vida.

A Tiffany Caiza, mi pequeña inspiración le dedico el primer paso de la promesa que algún día le hice, confirmando el cumplimiento de la misma.

A Stiven cuyo amor, apoyo incondicional y comprensión han sido fundamentales en la culminación de este trabajo.

A mis familiares, amigos que han estado cuando más lo he necesitado, para escucharme, darme consejos o un abrazo. Convirtiendo este viaje académico en una experiencia más enriquecedora y memorable.

**Karla Puruncajas.**

## **Agradecimientos**

Agradecemos al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), por abrirnos sus puertas y permitirnos realizar nuestro trabajo de titulación.

Agradecemos a todos nuestros tutores MSc. Viviana Chiluisa-Utreras, Dr. Diego Morales, MSc. Juan José Bustillos, MSc. Patricio Mora, MSc. Paul Quinatoa por su compromiso con nuestro crecimiento académico, dedicación y paciencia que demostraron al compartir su experiencia y conocimientos.

Agradecemos a Anabel Padilla y Paulina Ulloa por sus sabios consejos y conocimientos.

**Karla Puruncajas y Katherine Quisilema.**

## Resumen

Esta investigación se centró en detectar mediante PCR convencional mutaciones *kdr* en tres codones del gen VGSC en *Aedes aegypti*, vector transmisor de enfermedades arbovirales como el dengue, Zika, chikungunya y fiebre amarilla. Las mutaciones *kdr* confieren resistencia al derribo frente a los insecticidas piretroides utilizados en el control vectorial. Se analizaron muestras de *Ae. aegypti* recolectadas en 2022 en las localidades de Durán, Pascuales y Bastión Popular de la provincia de Guayas, Ecuador.

Mediante electroforesis en gel de agarosa, se genotipificaron las muestras para los codones 1016, 410 y 1534 del gen VGSC. Los resultados revelaron una alta frecuencia de heterocigosis y presencia considerable del alelo resistente en las localidades estudiadas. Se determinó que la población de Pascuales presenta estabilidad de la mutación V1016I del 59%, mientras que en Durán y Bastión Popular se encontró estabilidad del alelo resistente de la mutación V410L con 90% y 75% respectivamente. Además, la mutación F1534C mostró una alta frecuencia del alelo resistente con un 92%.

Se concluye que existe resistencia al derribo en las poblaciones de *Ae. aegypti* analizadas, lo que puede conducir a una estabilización del alelo resistente si persisten las condiciones selectivas que favorecen su permanencia. Por lo tanto, es recomendable continuar monitoreando la dinámica poblacional y los factores ambientales asociados, a fin de implementar estrategias adecuadas para el manejo de la resistencia a insecticidas en este vector.

**Palabras claves:** criaderos, colonias, temperatura, humedad relativa, bioensayos, piretroides, deltametrina, ADN, electroforesis, equilibrio de Hardy Weinberg, frecuencias genotípicas, frecuencias alélicas, frecuencias esperadas, Chi cuadrado.

## **Abstract**

This research focused on detecting *kdr* mutations in three codons of the VGSC gene in *Aedes aegypti*, vector of arboviral diseases such as dengue, Zika, chikungunya, and yellow fever, using conventional PCR.

*Kdr* mutations confer knockdown resistance to pyrethroid insecticides used in vector control. Samples of *Ae. aegypti* collected in 2022 from the localities of Durán, Pascuales and Bastión Popular in the province of Guayas, Ecuador, were analyzed by PCR amplification of VGSC gene to identify susceptibility or resistance condition of mosquitoes against pyrethroid insecticides.

By agarose gel electrophoresis, the samples were genotyped for codons 1016, 410, and 1534 of the VGSC gene. The results revealed a high frequency of heterozygosity and a considerable presence of the resistant allele in the studied locations. It was determined that the population in Pascuales shows a 59% stability of the V1016I mutation while in Durán and Bastión Popular, the V410L mutation stability was found of the resistant allele to be 90% and 75%, respectively. Additionally, the F1534C mutation showed a high frequency of the resistant allele at 92%.

The conclusion is that knockdown resistance exists in the analyzed populations of *Ae. aegypti*, which may lead to the stabilization of the resistant allele if selective conditions favoring its persistence continue. Therefore, it is recommended to continue monitoring the population dynamics and associated environmental factors to implement appropriate strategies for managing insecticide resistance in this vector.

**Keywords:** hatcheries, colonies, temperature, relative humidity, bioassays, pyrethroids, deltamethrin, DNA, electrophoresis, Hardy Weinberg equilibrium, genotypic frequencies, allelic frequencies, expected frequencies, Chi square.

## Tabla de contenidos

1.	Introducción .....	1
2.	Fundamentación teórica .....	4
2.1	Enfermedades arbovirales.....	4
2.2	Ciclo epidemiológico de los arbovirus .....	4
2.3	Factores que influyen en la transmisión de enfermedades arbovirales .....	5
2.4	<i>Aedes aegypti</i> como vector de enfermedades .....	5
2.5	Factores que influyen en la reproducción y supervivencia de <i>Aedes aegypti</i> .....	7
2.6	Estrategias de control vectorial.....	8
2.6.1	Control físico.....	8
2.6.2	Control biológico.....	8
2.6.3	Control químico.....	9
2.7	Resistencia a insecticidas.....	10
2.8	Factores que influyen en la resistencia .....	11
2.9	Tipos de resistencia .....	11
2.10	Mecanismos de resistencia .....	12
2.10.1	Resistencia por comportamiento .....	12
2.10.2	Resistencia morfológica .....	12
2.10.3	Resistencia metabólica.....	12
2.10.4	Resistencia al sitio blanco .....	13
2.11	Resistencia <i>kdr</i> .....	13
2.12	Técnicas para la detección molecular de resistencia <i>kdr</i> .....	14
2.12.1	Extracción de ADN .....	14
2.12.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
2.12.3	Electroforesis horizontal .....	16
2.13	Análisis poblacional entomológico .....	16
2.13.1	Hardy-Weinberg -Análisis estadístico.....	17
3.	Materiales y métodos .....	18

3.1	Zona de Estudio .....	18
3.2	Levantamiento de muestras .....	19
3.3	Mantenimiento de colonias.....	19
3.4	Selección de muestras – Bioensayos .....	20
3.5	Muestreo estratificado .....	20
3.6	Extracción de ADN .....	21
3.7	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	22
3.8	Electroforesis horizontal.....	24
3.9	Hardy Weinberg - Análisis estadístico .....	25
4.	Resultados y discusión.....	28
4.1	Visualización de resultados de amplificación en gel de agarosa.....	28
4.2	Análisis de Hardy-Weinberg del codón 1016.....	30
4.3	Análisis de Hardy-Weinberg del codón 410.....	33
4.4	Análisis de Hardy-Weinberg del codón 1534.....	36
5.	Conclusiones y recomendaciones .....	43
6.	Referencias.....	43
7.	Anexos.....	51

## Índice de tablas

TABLA 1. SECUENCIA DE PRIMERS UTILIZADOS .....	23
TABLA 2. PROTOCOLO DE PCR .....	24
TABLA 3. AMPLIFICACIÓN .....	24
TABLA 4. VISUALIZACIÓN DE RESULTADOS SEGÚN RESOLUCIÓN DE GELES.....	25
TABLA 5. RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS .....	28
TABLA 6. RESULTADOS DEL CODÓN 1016 .....	31
TABLA 7. FRECUENCIAS OBSERVADAS DE LOS GENOTIPOS DEL CODÓN 1016.....	31
TABLA 8. FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL CODÓN 1016 .....	32
TABLA 9. EVENTOS ESPERADOS CODÓN 1016 .....	32
TABLA 10. CHI-CUADRADO CALCULADO $\chi^2_c$ DEL CODÓN 1016 .....	33
TABLA 11. RESULTADOS DEL CODÓN 410 .....	34
TABLA 12. FRECUENCIAS OBSERVADAS GENOTÍPICAS DEL CODÓN 410 .....	34
TABLA 13. FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL CODÓN 410 .....	35
TABLA 14. EVENTOS ESPERADOS CODÓN 410 .....	35
TABLA 15. CHI-CUADRADO CALCULADO $\chi^2_c$ DEL CODÓN 410 .....	36
TABLA 16. RESULTADOS DEL CODÓN 1534 .....	37
TABLA 17. FRECUENCIAS OBSERVADAS GENOTÍPICAS DEL CODÓN 1534 .....	37
TABLA 18. FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL CODÓN 1534 .....	38
TABLA 19. EVENTOS ESPERADOS CODÓN 1534 .....	38
TABLA 20. CHI-CUADRADO CALCULADO $\chi^2_c$ DEL CODÓN 1534 .....	38

## Índice de ecuaciones

ECUACIÓN 1. PROPORCIONES DE HARDY-WEINBERG EN LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS .....	17
ECUACIÓN 2. POBLACIÓN DE ANÁLISIS .....	25
ECUACIÓN 3. FRECUENCIAS OBSERVADAS GENOTIPO HOMOCIGOTO RESISTENTE RR:.....	26
ECUACIÓN 4. FRECUENCIAS OBSERVADAS GENOTIPO SUSCEPTIBLE SS .....	26
ECUACIÓN 5. FRECUENCIAS OBSERVADAS GENOTIPO HETEROCIGOTO RS .....	26
ECUACIÓN 6. FRECUENCIA ALÉLICA RESISTENTE R.....	26
ECUACIÓN 7. FRECUENCIA ALÉLICA SUSCEPTIBLE S.....	26
ECUACIÓN 8. FRECUENCIA ESPERADA GENOTIPO RR.....	26
ECUACIÓN 9. FRECUENCIA ESPERADA GENOTIPO SS.....	26
ECUACIÓN 10. FRECUENCIA ESPERADA GENOTIPO RS .....	26
ECUACIÓN 11. CHI CUADRADO ( $\chi^2$ ) .....	27

## Índice de Figuras

FIGURA 1 LOCALIDADES DE DURÁN, PASCUALES Y BASTIÓN POPULAR.....	18
FIGURA 2. GENOTIPIFICACIÓN DE RESULTADOS DEL CODÓN 1016 (908 – 952). ....	29
FIGURA 3. GENOTIPIFICACIÓN DE RESULTADOS DEL CODÓN 410 (882 – 900). ....	29
FIGURA 4. GENOTIPIFICACIÓN DE RESULTADOS DEL CODÓN 410 (863 – 903). ....	30

## Índice de anexos

ANEXO 1: TABLA DE DISTRIBUCIÓN DE CHI- CUADRADO.....	51
ANEXO 2. BASE DE DATOS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS .....	52

## 1. Introducción

Las enfermedades arbovirales son aquellas provocadas por un grupo heterogéneo de virus y que dependen de insectos artrópodos hematófagos para su transmisión (OPS, 2019a). Se han identificado taxonómicamente alrededor de 500 especies de virus, de los cuales aproximadamente 150 presentan la capacidad de afectar a los seres humanos (Arredondo et al., 2016). El dengue (DENV), Zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV) y fiebre amarilla (VFA) son las enfermedades por arbovirus de mayor importancia a nivel mundial debido a su distribución global provocando grandes epidemias en regiones tropicales y subtropicales (OPS, 2019b).

Una de las enfermedades arbovirales de mayor importancia en el Ecuador es el dengue, que ha demostrado un comportamiento endemo-epidémico desde 1988 (MSP, 2013), con la circulación de los cuatro serotipos del virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) que a su vez pueden presentarse en diferentes formas clínicas como dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave (López & Neira, 2016). En el 2023 se reportó 25.790 casos de DENV por lo que se registró mayor incidencia a nivel nacional en comparación con años anteriores (MSP, 2023).

*Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) es una especie de mosquito considerado el principal vector de DENV, ZIKV, CHIKV y VFA, este vector es originario de África y su amplia distribución se ha visto influenciada por actividades humanas, principalmente por el comercio y turismo, llegando a establecerse ampliamente en Oceanía, Asia, Europa y América (Campos & Mendoza, 2018). En Ecuador, esta especie se consideraba erradicada desde 1960, sin embargo, a partir de un evento de reinfestación a finales de 1980, su distribución se extendió desde la región costera hasta la región de la cuenca del Amazonas (Morales & Quinatoa, 2019).

A falta de una vacuna específica y la alta incidencia que presentan las enfermedades arbovirales, la OMS recomienda el control vectorial para disminuir el riesgo de transmisión. Estos métodos de control pueden ser de tres tipos: biológico, químico y ambiental (OPS, 2021). Desde 1946 en Ecuador se comenzó a utilizar el insecticida dicloro difenil tricloroetano (DDT) convirtiendo al control químico en el principal método para reducir las poblaciones de vectores (Espinal et al., 2019).

No obstante, en 1993 Ecuador prohibió su uso al ser altamente recalcitrante, tóxico y cancerígeno (Echeverría, 2013). De esta manera el DDT fue reemplazado por insecticidas organofosforados como temephos con acción larvicida y piretroides como deltametrina con acción adulticida; compuestos que se degradan fácilmente en el medio ambiente y efectivos a bajas dosis (Manjarres & Olivero, 2013).

El uso indiscriminado de insecticidas, en la agricultura y otras actividades agropecuarias, ha facilitado el desarrollo de mecanismos de resistencia en las especies a las que se busca controlar, entre los mecanismos de resistencia más importantes se incluyen dos: la resistencia metabólica y alteración del sitio blanco, en el caso de los de uso domésticos que son mezclas de varios grupos de insecticidas, genera un mayor riesgo de resistencia múltiple (Zurita, 2021).

La resistencia metabólica tiene que ver con alteraciones en los niveles y por ende de la actividad de las enzimas detoxificantes, predominantemente esterasas, glutatión S-transferasa (GST) y citocromo P450. La alteración al sitio blanco consiste en mutaciones sencillas no silenciosas en genes estructurales como el gen de canal de sodio dependiente de voltaje conocido en inglés como “Voltage-gated sodium channel” (VGSC), receptores amino-butíricos (GABA) y acetilcolinesterasas (AChE) (López et al., 2022).

Sin embargo, uno de los principales mecanismos asociados a los insecticidas piretroides es la resistencia al derribo conocida en inglés como “*knockdown resistance*” (*kdr*), que ocurre por mutaciones no sinónimas en el gen VGSC (Rodríguez et al., 2008). En Ecuador, los primeros casos de poblaciones vectoriales resistentes se registraron en Guayaquil, identificando un incremento de la actividad enzimática de esterasas inespecíficas (Terán et al., 2014). Posteriormente, también se detectó resistencia *kdr* en las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Esmeraldas (Quinatoa, 2018a).

La resistencia al derribo en *Aedes aegypti*, dificulta y disminuye la eficacia de los programas de control de estos vectores, provocando a su vez la propagación de estos y la diseminación de las enfermedades que transmiten (Chiele et al., 2023). Por este motivo, es importante realizar un análisis evolutivo de estas mutaciones, la distribución y las frecuencias con las que se encuentran en los diferentes lugares que se ha identificado el vector, para poder así tomar medidas y evitar el crecimiento de la población vectorial resistente. Esta investigación se centrará en detectar mediante PCR convencional mutaciones *kdr* en tres codones del gen VGSC en *Aedes aegypti* colectados en Guayaquil-Ecuador, 2022.

## 2. Fundamentación teórica

### 2.1 Enfermedades arbovirales

Las enfermedades arbovirales (arthropod-borne viruses) son aquellas causadas por un grupo heterogéneo de virus que se encuentran en la naturaleza, estos patógenos son propagados a través de artrópodos hematófagos, es decir, aquellos que se alimentan de sangre (Arredondo et al., 2016). En este grupo, se han identificado al menos 500 especies de virus, los cuales se clasifican en 4 familias: Bunyaviridae, Flaviviridae, Reoviridae y Togaviridae. Los arbovirus con mayor relevancia a nivel mundial para la salud humana pertenecen a las familias Flaviviridae como el DENV, ZIKV, VFA y Togaviridae con el VCHIK (Del Ángel & Zárate, 2020).

### 2.2 Ciclo epidemiológico de los arbovirus

El ciclo de transmisión de arbovirus involucra una serie de eventos complejos que se dan entre virus, vector y huésped. El ciclo comienza con un mosquito hembra alimentándose de sangre de un huésped infectado, ya sea un animal o un humano. Los virus se multiplican y pasan las barreras del organismo que son tres: infección del intestino medio, escape del intestino medio y la transmisión en glándulas salivales (Ramírez, 2023).

Este proceso puede llevarse a cabo en un periodo de 10 a 14 días. En este punto el mosquito será un potencial vector por el resto de su vida y podrá infectar por medio de picaduras a un nuevo huésped vertebrado o transováricaente a su descendencia (Cruz, 2009). En este caso los machos infectados de manera transovárica pueden infectar a la hembra por medio de la cópula, también conocida como transmisión sexual; cabe recalcar que este mecanismo se ha demostrado solo en laboratorio (Rosen, 1987).

### 2.3 Factores que influyen en la transmisión de enfermedades arbovirales

La dificultad para controlar los ciclos naturales donde tiene lugar la transmisión de arbovirus radica, en la existencia e interacción de múltiples elementos: por una parte, están los artrópodos, que actúan como vectores; también existen animales que cumplen el rol de reservorios, favoreciendo los ciclos silvestres; y finalmente la actividad humana que promueve los ciclos urbanos. Debido a la presencia de todos estos factores, el ciclo de transmisión de estas enfermedades se vuelve más difícil de controlar, ya que se deben aplicar medidas específicas para intentar limitar cada elemento que forma parte del ciclo (González et al., 2020).

La temperatura es un factor relevante en comparación con las demás variables climáticas, debido a que cumple un papel fundamental en el desarrollo reproductivo del vector y la relación entre virus - vector. Se ha demostrado que a 30 °C la capacidad replicativa de arbovirus aumenta, se acelera el metabolismo del mosquito y reduce el periodo de diseminación a menos de siete días (Reyes et al., 2020).

A medida que hay mayor densidad de vectores en una población, mayor es la posibilidad que se presente una epidemia; también existen otras condiciones que favorecen la interacción huésped – vector como urbanización, migración, densidad poblacional, estado inmunológico de la población y la tasa de recombinación viral, ya que este proceso puede generar nuevas variantes virales con mayor capacidad de transmisión, virulencia, rango de hospedadores y vectores, así como resistencia a tratamientos antivirales, lo que facilita la propagación de la enfermedad (Betancourt & Falcón, 2022).

### 2.4 *Aedes aegypti* como vector de enfermedades

*Aedes aegypti* es un mosquito originario de África Subsahariana se estima que llegó al nuevo mundo en embarcaciones europeas entre los siglos XVII y XIX. Hoy en día, esta especie se ha

propagado extensamente por las zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo. Su veloz diseminación se atribuye principalmente a los grandes desplazamientos de población, debido a que los huevos de los mosquitos se depositaban y transportaban en recipientes que contenían agua (Gómez, 2018).

Se considera a *Ae. aegypti* como un mosquito urbano, por lo que los factores extrínsecos, como densidad poblacional y la globalización, contribuyen en la dinámica de la infección y en la dispersión de los arbovirus que transmite. Se ha demostrado que cepas de *Ae. aegypti* son competentes para transmitir 26 diferentes arbovirus (Pando et al., 2020). Entre esta variedad de arbovirus, aquellos que representan la mayor amenaza para la salud pública en el contexto ecuatoriano son DENV, ZIKV y VCHIK (Loor et al., 2023).

El ciclo vital del mosquito *Aedes aegypti* abarca diversas fases de desarrollo, iniciando desde la etapa de huevo y progresando a través de cuatro estadios larvales distintos antes de alcanzar la fase de pupa. Finalmente, el mosquito emerge como un individuo adulto, siendo esta última etapa la que se encuentra estrechamente vinculada a los rasgos de reproducción y alimentación. El huevo mide 1 mm de longitud, posee forma de cigarro, resisten a largos periodos de desecación hasta por un año, lo que representa un serio problema para su control. La larva se caracteriza por tener un ciclo de vida netamente acuático; esta es una fase de alimentación y crecimiento (Chico et al., 2001).

En relación con sus cuatro estadios larvales, cada uno se diferencia por su tamaño. La pupa es acuática y no se alimenta, esta etapa dura de dos a tres días. Finalmente, el adulto que es la fase reproductora se presenta como un mosquito oscuro con bandas blancas en las bases de los segmentos dorsales y un particular diseño en forma de lira en el mesonoto (sección del tórax del mosquito) (Fundación Charles Darwin, 2010).

Para poder diferenciar a la hembra y el macho adulto, se presentan las siguientes características: el tamaño en hembras es mayor al de los machos y también se puede observar que el abdomen del macho termina en forma redondeada, a diferencia de la hembra que es puntiaguda; para finalizar, en su comportamiento, la hembra es la única que se alimenta de sangre porque necesita las proteínas y nutrientes presentes en ésta para el desarrollo de sus huevos, por lo que termina siendo el vector de todas las enfermedades (Saavedra, 2007).

### 2.5 Factores que influyen en la reproducción y supervivencia de *Aedes aegypti*

Existen varios factores que favorecen o perjudican el desarrollo de la población de *Ae. aegypti*, desde su reproducción, ciclo de vida y distribución. Debido a que las etapas iniciales de desarrollo del mosquito son acuáticas, la disponibilidad de agua es un elemento primordial desde la ovoposición, por lo que se requiere de la presencia de reservorios en los que las hembras de esta especie puedan depositar los huevos. Dependiendo de la salinidad del agua, la ovoposición puede disminuir o aumentar (Domínguez et al., 2000).

*Ae. aegypti* es considerado un insecto poiquilotermo, lo que implica que todos los procesos biológicos se vean afectados por la temperatura ambiental. En el desarrollo larvario el rango óptimo de la temperatura del agua es de 16 y 35 °C. El rango óptimo para su desarrollo es de 26 – 28 °C, aumentando la cinética de desarrollo y la supervivencia de todas las etapas del insecto. En temperaturas superiores, su desarrollo decrece dramáticamente (Márquez et al., 2019).

Un factor que influye directamente con la dinámica poblacional del mosquito es la precipitación, ya que su aumento genera más hábitats naturales propicios para el ciclo de desarrollo de los mosquitos. En el Ecuador los cambios en las condiciones climáticas se

relacionan con el fenómeno de El Niño, generando temperaturas y humedad adecuada para la proliferación de *Ae. aegypti* (Reyes et al., 2020).

## 2.6 Estrategias de control vectorial

Es muy complejo implementar una estrategia definitiva para controlar el vector *Ae. aegypti*, debido a su gran capacidad de adaptarse a entornos rurales y urbanos. Este mosquito ha logrado interactuar muy bien en contextos ecológicos y sociales, debido a la heterogeneidad de los factores relativos al vector, el agente patógeno y el huésped (OPS, 2021), por lo que la OMS recomienda las siguientes medidas de control:

### 2.6.1 Control físico

En las medidas físicas se incluyen distintas actividades enfocadas en la manipulación del entorno para reducir la población de mosquitos y prevenir su reproducción, como tapar, voltear, lavar o eliminar criaderos, que consisten en depósitos de agua acumulada en recipientes artificiales como neumáticos viejos, floreros, platos de maceta, baldes y basura en general. La reducción de áreas favorables para el crecimiento y maduración de las fases larvarias y pupales del mosquito *Aedes aegypti* constituye una estrategia efectiva para limitar la multiplicación de ejemplares adultos. (Villegas et al., 2011).

### 2.6.2 Control biológico

El control biológico de *Ae. aegypti* implica la incorporación intencionada al ambiente de organismos vivos como patógenos, parásitos, parasitoides o depredadores que ayudan a reducir o eliminar las poblaciones vectoriales, especialmente durante las etapas larvales. Entre los agentes de biocontrol se encuentran peces larvívoros (*Gambusia* y *Poecilia* spp.) y algunos hongos entomopatógenos (Galavíz et al., 2016).

Otra técnica que se está desarrollando es la inserción de ADN exógeno en el mosquito vector con el objetivo de reducir la población del mismo, limitar o eliminar su capacidad de propagar agentes patógenos. Otra técnica prometedora es la esterilización de los insectos mediante el uso de radiación, buscando que los individuos afectados perezcan antes de alcanzar la etapa adulta de su ciclo de vida (Antonio et al., 2022).

### 2.6.3 Control químico

A lo largo de la historia, se han utilizado cuatro clases de insecticidas químicos para controlar *Ae. aegypti*: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. Los organoclorados son plaguicidas orgánicos sintéticos que se clasifican según su estructura química: I. Derivados halogenados de hidrocarburos alicíclicos (Hexaclorociclohexano - HCH), II. Derivados halogenados de hidrocarburos aromáticos (dicloro difenil tricloroetano – DDT), III. Derivados halogenados de hidrocarburos ciclodiénicos (dieldrín) (Calva & Torres, 1998).

Todos los organoclorados son considerados sustancias tóxicas, bioacumuladores en la cadena alimenticia y persistentes o recalcitrantes, debido a que sus estructuras químicas son muy estables y se degradan lentamente. A partir de 1993 Ecuador prohibió el uso de insecticidas organoclorados como el DDT firmando y ratificando acuerdos internacionales de Basilea, Estocolmo, Rotterdam (Echeverría, 2013).

Debido a las diferentes propiedades que presentan, los insecticidas organoclorados fueron reemplazados por organofosforados y carbamatos, los cuales actúan como neurotóxicos, cuyo mecanismo de acción se basa en el enlace con la acetilcolinesterasa, inhibiendo su función enzimática y obteniendo una acumulación excesiva del neurotransmisor de acetilcolina, provocando una estimulación prolongada de los órganos efectores colinérgicos (músculos de vuelo, glándulas salivales, glándulas reproductivas y sensores antenales)(Graterol et al., 2013).

La diferencia entre estos dos grupos de insecticidas es que los carbamatos tienen efecto aparentemente reversible, presentando una toxicidad y persistencia menor a la de los organofosforados. Entre los organofosforados más conocidos están Malatión, Fentión y Temephos y entre los carbamatos se encuentran el pirimicarb b y aldicarb (Ponce et al., 2006). Finalmente, los insecticidas piretroides se introdujeron en el mercado en 1980 debido a que se consideraron seguros gracias a sus altas propiedades insecticidas en bajas dosis de aplicación, corta persistencia en el medio ambiente, ausencia de bioacumulación y baja toxicidad. El mecanismo de acción se da en la membrana nerviosa, interactuando con la interfaz lípido-proteica y generando alteraciones en la conformación de las proteínas, provocando un retardo en el cierre de los canales de sodio (Manjarres & Olivero, 2013).

Los insecticidas piretroides se dividen en dos categorías principales según la presencia o ausencia de un grupo ciano en su porción alcohólica, lo cual influye en su mecanismo de acción. Los piretroides tipo 1 actúan prolongando la corriente de sodio, lo que genera descargas repetitivas en las fibras nerviosas sin causar una despolarización significativa de la membrana. Por otro lado, los piretroides tipo 2 inducen una despolarización pronunciada de la membrana neuronal y bloquean la propagación del impulso nervioso debido a una extensión excesiva de la corriente de sodio (Bisset, 2002).

## 2.7 Resistencia a insecticidas

Se define como resistencia a los insecticidas al fenómeno evolutivo que presentan los insectos para sobrevivir a la exposición de una determinada dosis de químico que, para la población normal de la misma especie, resultaría tóxica debido a una adaptación fisiológica o conductual, por lo cual el insecticida es metabolizado con mayor rapidez que los mosquitos susceptibles, respondiendo a un comportamiento de evitación (WHO, 2022).

## 2.8 Factores que influyen en la resistencia

Existen diversos factores que pueden influir en la aparición o aumento de resistencia, los cuales se pueden clasificar:

- i. Factor genético: se relaciona con el aumento de la frecuencia de los alelos de resistencia que se presentan en la población de insectos.
- ii. Factor biológico: influenciado por características biológicas como el ciclo de vida corto, alta fecundidad y las altas tasas de flujo genético, permitiendo una rápida diseminación y fijación de los alelos de resistencia en la población.
- iii. Factor operacional: se encuentra relacionado con la aplicación de los insecticidas, las cuales están bajo el control humano como el tiempo, dosis, formulación y selección del insecticida creando así una presión evolutiva sobre las poblaciones (Morales & Quinatoa, 2019).

## 2.9 Tipos de resistencia

Se identifican dos tipos de resistencia: la resistencia cruzada, que ocurre cuando una especie desarrolla resistencia a varios insecticidas relacionados químicamente debido a que afectan al mismo sitio blanco, generando así un mecanismo de resistencia común que confiere tolerancia a estos insecticidas similares; y la resistencia múltiple, en la cual el insecto genera o adquiere varios mecanismos de resistencia, permitiéndole contrarrestar el mecanismo de acción de diversos grupos químicos de insecticidas no relacionados entre sí; donde cada mecanismo actúa de manera específica para neutralizar el efecto de un determinado grupo químico (Alonso et al., 2006).

## 2.10 Mecanismos de resistencia

Los insectos han desarrollado diversos mecanismos de resistencia frente a los insecticidas, los cuales pueden clasificarse en diferentes categorías, el cambio de comportamiento, resistencia morfológica y la resistencia fisiológica o bioquímica.

### 2.10.1 Resistencia por comportamiento

Los insectos pueden desarrollar resistencia a los insecticidas a través de cambios en su comportamiento, lo cual se conoce como resistencia conductual. En este caso, los individuos evitan entrar en contacto directo con el producto químico, ya sea buscando refugio en zonas no tratadas o detectando y eludiendo activamente las superficies donde se ha aplicado el insecticida. Esta evasión se debe a las propiedades repelentes o irritantes del compuesto, lo que resulta en que una parte de la población de insectos no sea efectivamente controlada por el agroquímico (Badii & Almanza, 2015).

### 2.10.2 Resistencia morfológica

La resistencia morfológica, también conocida como mecanismo físico, se relaciona con casos de inhibición de penetración; por ejemplo, la composición del exoesqueleto del mosquito que puede estar modificada con mayor cantidad de lípidos y proteínas, reduciendo la velocidad de penetración, lo que permite al insecto contar con el tiempo necesario para la detoxificación del insecticida (Badii & Almanza, 2015). Otro ejemplo es la queratinización en las patas o cutícula del mosquito inhibiendo la penetración del insecticida (Jacobs et al., 2023).

### 2.10.3 Resistencia metabólica

Se da por un incremento en la expresión de genes codificadores de enzimas que metabolizan principalmente a los xenobióticos como las carboxilesterasas, donde las esterasas se unen rápidamente al insecticida, secuestrando dichas moléculas antes que lleguen al sitio de acción;

también se puede encontrar cambios en glutatión-s-transferasas y citocromo P450 provocando una elevada actividad enzimática y regulación genética (Rodríguez et al., 2008).

#### 2.10.4 Resistencia al sitio blanco

Se relaciona con la presencia de mutaciones puntuales no silentes en genes estructurales, provocando alteraciones estructurales en el sitio blanco, sin causar la pérdida de la función primaria del sitio de acción al aplicar el insecticida. Entre las más conocidas está la del canal de sodio provocando resistencia al derribo (*kdr*) y alteraciones en acetilcolinesterasa inhibiendo la actividad enzimática por medio de la fosforilación en el punto de acción (Morales & Quinatoa, 2019).

#### 2.11 Resistencia *kdr*

La capacidad de los mosquitos para sobrevivir a la exposición a insecticidas piretroides y organoclorados se debe principalmente a la resistencia *kdr*. Este interesante proceso biológico surge de cambios hereditarios específicos a nivel genómico: mutaciones no sinónimas que tienen lugar en el gen responsable de codificar el canal de sodio dependiente de voltaje (vgsc). Posee cuatro dominios (I, II, III y IV); cada dominio tiene seis hélices transmembranales (S1, S2, S3, S4, S5 y S6). La membrana permite conducir estímulos eléctricos a lo largo del sistema nervioso por medio de la activación e inactivación de los canales de sodio (Ontiveros, 2021).

El grado en que las mutaciones *kdr* afectan la capacidad de los piretroides para unirse a su sitio de acción varía según se trate del tipo de piretroide utilizado. A nivel mundial, se han identificado once mutaciones del gen *vgsc* en *Ae. aegypti* y en algunos casos se ha relacionado con cierto grado de resistencia a piretroides. Éstos incluyen G923V, L982W, I1011M y V1016G identificados por primera vez en 2003; I1011V y V1016I en 2007; D1763Y en 2009; S989P y F1534C en 2010; T1520I en 2015 y V410L en 2017 (Saavedra et al., 2018).

Estas mutaciones generalmente se limitan a áreas geográficas específicas y la coexistencia de ciertas mutaciones se puede asociar con niveles más altos de resistencia. Las mutaciones con mayor índice de presencia en América son V410L, que presenta un cambio de una valina por una leucina en IS6 y V1016I que presenta un cambio de una valina por una isoleucina en IIS6. Finalmente, F1534C se reporta en todo el mundo, presentado el cambio de una fenilalanina por una cisteína en IIIS6 (Enayati et al., 2024).

## 2.12 Técnicas para la detección molecular de resistencia *kdr*

### 2.12.1 Extracción de ADN

Existen cinco pasos básicos para la extracción de ácidos nucleicos, comenzando con la lisis celular, que consiste en la liberación del ADN/ ARN en solución. Para este proceso, se puede utilizar diferentes métodos como físico, enzimático, químico o combinación de los tres. Los métodos físicos se utilizan más en tejidos y plantas, estos pueden ser nitrógeno líquido, trituradores manuales o automatizados y perlas mecánicas o cerámicas (Maya et al., 2023).

Los métodos químicos se centran en alterar las membranas y desnaturalizar las proteínas, pero solo pueden ser utilizados con muestras fáciles de lisar o en combinación con otros métodos. los más utilizados son detergentes (SDS) y caotrópicos (soluciones alcalinas). Los métodos enzimáticos permiten alterar las paredes celulares resistentes, por lo que se utilizan en tejidos vegetales, bacterias y levaduras, pero siempre en combinación con otros métodos. Los más conocidos son lisozima, zimolasa, proteinasa K, lipasa, etc (Marcos et al., 2019).

Una vez realizada la lisis, se requiere eliminar los restos celulares no deseados, mediante centrifugación, filtración o perlas. En la siguiente etapa de purificación, se busca separar el ADN de los demás componentes presentes en la solución. Para lograr este objetivo, se pueden emplear diversos métodos químicos, uno de ellos es el método de precipitación utilizando

soluciones salinas para sedimentar las proteínas e isopropanol para precipitar ADN (Besbes et al., 2022).

Otro método es unir el ADN a una matriz de sílice o celulosa en alto contenido de sal caotrópica y alcoholes. Un método muy utilizado es el de intercambio iónico, que consiste en la interacción entre partículas cargadas positivamente y los fosfatos cargados negativamente presentes en el ADN. Terminada la purificación del ADN, es necesario realizar lavados para eliminar proteínas, sales y otros contaminantes con tampones de lavado que suelen contener alcoholes. El último paso es la elución, que consiste en resuspender el ADN en agua libre de nucleasas o un tampón de elución que suele contener EDTA (PROMEGA, 2024a).

#### 2.12.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es un método revolucionario que permite la amplificación y análisis eficiente del ADN. Este procedimiento *in vitro* se caracteriza por su rapidez, versatilidad y alta especificidad. Mediante la PCR, es posible seleccionar y multiplicar exponencialmente una secuencia específica de ADN (secuencia diana) a partir de una muestra de ADN total previamente extraída. Esta capacidad de amplificación selectiva facilita enormemente el estudio y la manipulación de material genético, convirtiéndola en una herramienta fundamental en la biología molecular moderna, con aplicaciones que abarcan desde la investigación básica hasta el diagnóstico clínico y el análisis forense (Instituto de Genética Barbara McClintock, 2017).

Consiste en la desnaturalización de la doble hélice de ADN, por medio de altas temperaturas (95 – 98°C) obteniendo dos hélices sencillas, seguido del alineamiento donde los cebadores oligonucleótidos sintéticos se unen a las hebras sencillas de ADN en sitios específicos a (60°C), finalmente se extienden los cebadores con ayuda de la ADN polimerasa utilizando los cuatro desoxinucleótidos trifosfato a (70-72°C). Dando como resultado copias complementarias de

ADN y al poder realizar este proceso entre 25 a 40 ciclos se puede producir una amplificación masiva (Smith, 2004).

### 2.12.3 Electroforesis horizontal

Para separar moléculas como el ADN-ARN se utiliza la técnica de electroforesis, que consiste en hacer migrar estas macromoléculas cargadas negativamente a través de un campo electroforético hacia el polo positivo. La resolución de esta técnica para distinguir entre fragmentos depende de su tamaño o masa. Para separar fragmentos pequeños que van desde 5 a 500 pares de bases, se emplean geles de poliacrilamida con concentraciones del 3,5% al 20%. En cambio, para fragmentos más grandes, que oscilan entre 2 y 60 kilobases, se utilizan geles de agarosa con concentraciones que van del 0,5% al 2% ( Morales & Chiluisa-Utreras, 2022).

Con el fin de suspender adecuadamente la muestra en el gel, se le añade un marcador de peso molecular y en el caso de muestras provenientes de PCR contienen un green master mix por lo general comercial, y para crear un campo electroforético se utiliza tampones como TAE (Tris-Acetato-EDTA) o TBE (Tris-Borato-EDTA). La visualización de los ácidos nucleicos separados mediante electroforesis requiere el uso de bromuro de etidio o tintes específicos para ácidos nucleicos, estos compuestos se unen al ADN y ARN, y al ser expuestos a luz ultravioleta emiten fluorescencia permitiendo visualizar la posición de los ácidos nucleicos en el gel y de esta manera comparar con la escalera de referencia (Peña et al., 2013).

### 2.13 Análisis poblacional entomológico

La genética de poblaciones es una subdisciplina de la biología evolutiva que estudia los patrones de variación genética dentro y entre grupos de individuos capaces de reproducirse. Se enfoca en cómo las mutaciones cambian la estructura genética de las poblaciones, formando así la base del cambio evolutivo (Klug et al., 2013).

La investigación de la dinámica de poblaciones de insectos es importante por varias razones como proteger las comunidades forestales, determinar la estabilidad de los sistemas ecológicos, controlar plagas en sector agrícola o forestales e insectos que transmiten enfermedades humanas (Copley et al., 1974). Estudiar la dinámica poblacional de los insectos suele ser más rápido que en otras especies por que se caracteriza por generaciones sincrónicas y procesos vitales discretos (Isaev et al., 2017).

### 2.13.1 Hardy-Weinberg -Análisis estadístico

El principio de Hardy-Weinberg establece que en una población ideal se cumplen las siguientes condiciones: el tamaño de la población es infinito, los individuos se aparean aleatoriamente, no ocurren mutaciones, no hay migraciones de ningún tipo los alelos son igualmente competentes para hacer copias de sí mismos (Ginnobili, 2010). Cuando se cumple estos supuestos se puede decir que la población está en equilibrio por lo que se puede aplicar la fórmula:

Ecuación 1. Proporciones de Hardy-Weinberg en las frecuencias genotípicas

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

En donde  $p^2$  representa la frecuencia de los genotipos AA (homocigotos dominantes),  $2pq$  representa la frecuencia de los genotipos Aa (heterocigotos) y  $q^2$  representa la frecuencia de los genotipos aa (homocigotos recesivos) (Mora, 2013).

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Zona de Estudio

La provincia del Guayas está comprendida por 56 parroquias de las cuales se escogió al azar tres localidades Durán, Pascuales y Bastión Popular (Figura 1) que se caracterizan por un clima cálido y húmedo. En Durán, las temperaturas oscilan entre los 23°C y 32°C durante todo el año, con una alta humedad debido a su cercanía al Estero Salado. La principal actividad económica es el comercio a través de sus numerosos mercados y el movimiento portuario (Prefectura ciudadana del Guayas, 2021a).

Pascuales, por su parte, registra temperaturas similares y una fuerte presencia industrial con fábricas de alimentos, plásticos y químicos. En Bastión Popular, un poco más alejado del centro, las temperaturas son ligeramente más frescas, entre 21°C y 30°C. Su economía se basa en el sector servicios y el pequeño comercio. En cuanto a las precipitaciones, esta zona tiene un régimen de lluvia caracterizado por una estación lluviosa de enero a abril (AME, 2022).

#### Localidades estudiadas de mutaciones *kdr*

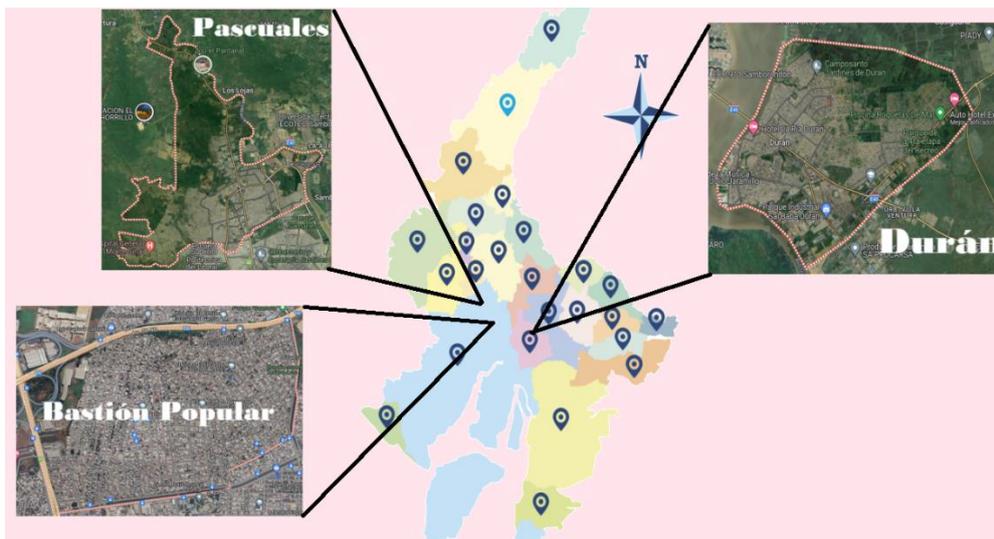


Figura 1 Localidades de Durán, Pascuales y Bastión Popular.

Elaborado por: Las autoras (2024)

### 3.2 Levantamiento de muestras

El Centro de Referencia Nacional de Vectores (CRNV) realizó una colecta de muestras en las viviendas de las localidades de Durán, Bastión Popular y Pascuales, que se encuentran en la Provincia de Guayas en el año 2022. Se recolectaron larvas de *Ae. aegypti* de criaderos que se encontraban en recipientes de uso doméstico. La metodología de colecta de muestras en las zonas se basó en la colecta manual de especímenes mediante el uso de una pipeta con la que se inspecciono los depósitos de agua y se procedió a almacenar los individuos inmaduros (larvas y pupas) en botellas con agua para su posterior transporte al laboratorio del CRNV (Quinatoa, 2018a).

Las muestras se transportaron en recipientes plásticos herméticamente sellados para su mantenimiento e identificación morfológica en el laboratorio. La identificación morfológica de las diferentes especies del estadio adulto recolectados en campo se realizó mediante la aplicación de claves taxonómicas específicas que, basadas en caracteres morfológicos, permitieron la identificación de varias especies de dípteros (Rueda, 2004).

### 3.3 Mantenimiento de colonias

Las muestras de larvas se mantuvieron en el insectario de (CRNV), en bandejas plásticas de color blanco, separadas por localidad. Las larvas fueron alimentadas pasando un día con 0,4 mg de balanceado de conejo acompañado de una fuente proteica de solución de hígado en polvo.

Cuando las larvas pasaron al estadio de pupa fueron transferidas a otra bandeja plástica de color blanco cubiertas con una cofia, al llegar al estadio adulto se mantuvieron los mosquitos en jaulas de 30 x 30 cm, por cada localidad. Las colonias de mosquitos fueron alimentadas con una solución azucarada al 10% y las hembras se alimentaron con sangre de bovino por membrana Hemoteck, para el proceso de reproducción (ovoposición). Las condiciones del insectario se

mantuvieron a una temperatura ( $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), humedad relativa ( $60 \pm 5\%$ ) y un fotoperiodo de 12 horas (Quinatoa, 2018b)

### 3.4 Selección de muestras – Bioensayos

Se utilizó la metodología propuesta por el Centro de Prevención y Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) Brogdon & Chan (2010), que permitió determinar la resistencia y/o susceptibilidad de *Aedes aegypti* en adultos con el método de la botella impregnada. Para determinar la dinámica de la resistencia se utilizaron mosquitos hembra y machos de 3 a 5 días de edad con un total de 100 individuos por cada localidad. Se utilizó cinco frascos Boeco Germany de 250 mL por cada bioensayo (cuatro repeticiones y un control).

Se colocó en cada botella 1 mL de la dosis diagnóstica (Deltametrina 10,46 ppm), que, de acuerdo al CDC, es la dosis que mata al 100% de mosquitos susceptibles expuestos en un tiempo determinado, en el caso de *Ae. aegypti* el tiempo diagnóstico es de 30 min. Para la solución control se utilizó una botella impregnada de 1 mL de etanol absoluto. Por cada botella se utilizaron de 20 a 25 individuos y se registró la mortalidad cada 15 minutos, desde el tiempo 0 durante 1 hora. Terminado el bioensayo se mantuvieron las muestras en congelación.

Se utilizaron los parámetros de la CDC para el diagnóstico de susceptibilidad a los insecticidas en artrópodos vectores: cuando la mortalidad fue superior al 98%, se diagnosticó susceptibilidad al insecticida, cuando la mortalidad fue entre 80 - 97% se consideró en riesgo de resistencia y cuando la mortalidad fue menor al 80% se consideró como resistencia al insecticida (Brogdon & Chan, 2010).

### 3.5 Muestreo estratificado

Se separaron hembras y machos por cada localidad (Durán, Pascuales y Bastión Popular), asignando una numeración para luego escoger aleatoriamente 15 hembras y 15 machos. Se individualizaron las muestras en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, rotulando la localidad,

fecha de colecta, sexo y código único asignado. Se conservaron las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para proseguir con el protocolo de extracción de material genético.

### 3.6 Extracción de ADN

La extracción del ADN de los mosquitos recolectados se realizó utilizando el kit comercial “Wizards SV Genomic DNA Purification System - Promega” basado en el método de extracción de material genético mediante columnas de purificación, con las siguientes especificaciones de Promega (2024b):

Primero, se preparó la solución de digestión mezclando los siguientes reactivos y volúmenes por muestra: Nuclei Lysis Solution (200  $\mu\text{L}$ ), EDTA 0,5M (50  $\mu\text{L}$ ), Proteinasa K (20  $\mu\text{L}$ ), RNase A solution (5  $\mu\text{L}$ ), dispensando 275  $\mu\text{L}$  de esta mezcla en cada tubo que contenía la muestra. Posteriormente, se trituró cada muestra con la solución de digestión utilizando un pistilo estéril. Las muestras se incubaron a  $58^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.

Después de la incubación, se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de Wizard SV Lysis Buffer a cada muestra y se mezclaron mediante vórtex por 20 segundos. El lisado se transfirió a una columna de purificación del kit, insertada en un tubo de colecta. La solución en la columna se incubó por 1 minuto y se centrifugó durante 3 minutos a 13000 x rpm (revoluciones por minuto). Se desechó el líquido del tubo colector y se colocó el mismo tubo nuevamente.

Posteriormente, se añadieron 650  $\mu\text{L}$  de Column Wash Solution (con etanol al 95% agregado) y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 x rpm. Se descartó el líquido del tubo colector y se colocó la columna en el mismo tubo. Este paso se repitió tres veces. Después, se vació el tubo de recolección y se centrifugó el tubo vacío a 13000 x rpm durante 2 minutos para secar la columna.

Luego, se descartó el tubo y se transfirió la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Se añadieron 50 µL de Nuclease-Free Water a la columna y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente, se centrifugó por 1 minuto a 14000 x rpm. Se desechó la columna y se almacenó el ADN purificado en el tubo de 1,5 mL a -20°C.

### 3.7 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó la técnica de PCR convencional para amplificar diferentes segmentos del gen VGSC, en los que se encuentren los codones 1016, 410 y 1534 de las muestras de ADN extraídas a partir de *Aedes aegypti* y por cada amplificación una muestra de control negativa. Se utilizaron primers específicos para cada codón, para el 1016 se utilizó V1016f, Ile1016f e Ile1016r, para el 410 V410f, L410r y 410r, para el 1534 Ae1534f-r, Ae1534c-r y en este caso se utiliza cebadores externos C1534f, C1534r (Tabla 1).

En cada amplificación se utilizó master mix, agua libre de nucleasas y primers específicos para cada codón, para visualizar las concentraciones de cada reactivo para cada codón (Tabla 2). Las condiciones de amplificación para cada codón (Tabla 3).

Tabla 1. Secuencia de primers utilizados

Codón	Cebadores	Referencias
<b>1016</b>	V1016f (5'- GGGGAGGGGGGGGGGGGGGGCC/ACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG -3')	(Hernandez et al., 2021)
	Ile1016f (5'-GCGGGCACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA -3')	
	Ile1016r(5'-TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC-3')	
<b>410</b>	V410f (5'- GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCATCTTCTTGGGTTCGTTCTAC CGTG-3')	(Villanueva et al., 2020a)
	L410r (5'-TTCTTCCTCGGCGGCCTCTT-3')	
	410r (5'-GGCGACAATGGCCAAGATC-3')	
<b>1534</b>	c1534f (5'-GGAGAACTACACGTGGGAGAAC -3')	(Fan & Scott, 2020)
	c1534-r (5'-CGCCACTGAAATTGAGAAT-3')	
	Ae1534F-r (5'- GCGTGAAGAACGACCCGA -3')	
	Ae1534C-r (5'-GCGTGAAGAACGACCCGC -3')	

Tabla 2. Protocolo de PCR

<b>Codón</b>	<b>Concentración cebadores</b>	<b>Master mix</b>	<b>Agua libre de nucleasas</b>	<b>Muestra ADN</b>	<b>Volumen final</b>
1016	1,02 µM	8,00 µL	11,19 µL	2,00 µL	25,00 µL
410	1,27 µM	12,50 µL	10,00 µL	3,00 µL	30,00 µL
1534	0,82 µM	12,50 µL	10,40 µL	3,00 µL	30,00 µL

Fuente: (Villanueva et al., 2020a).

Tabla 3. Amplificación

<b>Codón</b>	<b>1016</b>		<b>410</b>		<b>1534</b>	
Desnaturalización inicial	95°C x 2 min		95°C x 2 min		95°C x 3 min	
Desnaturalización	45 ciclos	95°C x 30 seg	45 ciclos	95°C x 30 seg	30 ciclos	95°C x 30 seg
Hibridación		58,6°C x 1 min		58,6°C x 1 min		60°C x 30 seg
Extensión		72°C x 30 seg		72°C x 30 seg		72°C x 1 min
Extensión final	72°C x 2 min		72°C x 2 min		72°C x 7 min	
Referencias	(Villanueva et al., 2020a)		(Villanueva et al., 2020a)		(Fan & Scott, 2020)	

### 3.8 Electroforesis horizontal

Se realizó, por cada codón, una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% durante 55 minutos a 100 voltios. Posteriormente, mediante el uso de un fotodocumentador se visualizó el patrón de bandeo en cada muestra amplificada y se evaluaron los resultados según el tamaño de la banda, se utilizó una escalera de 100 pb como referencia (Tabla 4).

Tabla 4. Visualización de resultados según resolución de geles

Codón	Genotipo	Resultado	Bandeo
1016	Mutante homocigoto I1016/I1016	Resistente	82 pb
	Salvaje homocigoto V1016/V1016	Susceptible	102 pb
	Heterocigoto V1016/I1016	Heterocigoto	102 pb - 82 pb
410	Mutante homocigoto L410/L410	Resistente	113 pb
	Salvaje homocigoto V410/V410	Susceptible	133 pb
	Heterocigoto L410/V410	Heterocigoto	113pb - 133 pb
1534	Control interno	Región no específica con la que se hibridan primers específicos que determinan resistencia o susceptibilidad.	368 pb
	Mutante homocigoto C1534/C1534	Resistente	368 pb - 180 pb
	Salvaje homocigoto F1534/F1534	Susceptible	368 pb - 232 pb
	Heterocigoto F1534/C1534	Heterocigoto	368 pb – 232 pb – 180 pb

Fuente: (Villanueva et al., 2020b).

### 3.9 Hardy Weinberg - Análisis estadístico

Se tabularon los resultados obtenidos en la resolución de los geles de agarosa, por cada codón analizado bajo los siguientes parámetros de resultados: 1. Resistente, 2. Susceptible, 3. Heterocigoto y 0. Sin amplificación. En el caso de presentarse el parámetro 0, se actualizó la población de análisis a partir de la siguiente fórmula.

Ecuación 2. Población de análisis

*Población = n (individuos estudiados) – individuos sin amplificación*

Se clasificaron los datos obtenidos u observados por cada localidad y genotipo posible por cada codón, obteniendo de esta manera las frecuencias mediante las siguientes fórmulas explicadas por Mantella & Holh (2021):

Ecuación 3. Frecuencias observadas genotipo homocigoto resistente RR:

$$f_{RR} = \# \text{ de } \frac{RR}{n}$$

Ecuación 4. Frecuencias observadas genotipo susceptible SS

$$f_{SS} = \# \text{ de } \frac{SS}{n}$$

Ecuación 5. Frecuencias observadas genotipo heterocigoto RS

$$f_{RS} = \# \text{ de } \frac{SR}{n}$$

Para el cálculo de las frecuencias alélicas se utilizaron las siguientes fórmulas:

Ecuación 6. Frecuencia alélica resistente R

$$p = f_{RR} + \left( \frac{f_{RS}}{2} \right)$$

Ecuación 7. Frecuencia alélica susceptible S

$$p = f_{SS} + \left( \frac{f_{RS}}{2} \right)$$

Las frecuencias esperadas con las siguientes fórmulas:

Ecuación 8. Frecuencia esperada genotipo RR

$$RR \text{ esp} = R^2(n)$$

Ecuación 9. Frecuencia esperada genotipo SS

$$SS \text{ esp} = S^2(n)$$

Ecuación 10. Frecuencia esperada genotipo RS

$$RS \text{ esp} = 2RS(n)$$

Con los datos obtenidos se aplicó el principio de Hardy Weinberg siguiendo la fórmula de  $X^2$  Ecuación 11. Chi cuadrado ( $X^2$ )

$$X^2(df) = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Aceptando o rechazando la hipótesis nula, la cual establece que la población de *Ae. aegypti* se encuentra en equilibrio, por lo tanto, la presencia del alelo resistente se encuentra estable.

En el caso de rechazar hipótesis nula, se aceptó la hipótesis alternativa que establece que uno de los alelos no se encuentra en equilibrio. El nivel de significancia es de 5,991, p-valor de 0,05 y 2 grados de libertad (Anexo 1).

#### 4. Resultados y discusión

Se realizó una base de datos con los resultados obtenidos en el bioensayo realizado por el grupo de CRNV y los resultados obtenidos en el análisis molecular, datos y resultados completos (Anexo 2) y resultados resumen (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de resultados obtenidos

Localidad	1016				410				1534				Total				
	RR	RS	SS	SA	RR	RS	SS	SA	RR	RS	SS	SA	RR	RS	SS	SA	Total
Pascuales	10	0	7	13	1	18	0	11	15	0	1	14	26	18	8	38	90
Durán	0	18	11	1	19	5	0	6	20	1	1	8	39	24	12	15	90
Bastión popular	7	15	4	4	15	15	0	0	21	5	0	4	43	35	4	8	90
Total	17	33	22	18	35	38	0	17	56	6	2	26	108	77	24	61	270

Elaborado por las autoras: (2024).

Nota: RR = Homocigoto resistente, RS = Heterocigoto, SS = Homocigoto susceptible y SA = Sin amplificación.

##### 4.1 Visualización de resultados de amplificación en gel de agarosa

En el codón 1016 se observó en 17 muestras una sola banda de 82 pb para el genotipo homocigoto mutante (I1016/I1016) como se muestra en pocillo 912 correspondiente a la característica resistente, en el caso del genotipo homocigoto salvaje (V1016/V1016) se observó 22 muestras con una banda de 102 pb tal como se ve en pocillo 939 correspondiente a la característica susceptible y para el genotipo heterocigoto (V1016/I1016) se observó 33 muestras con dos bandas de 82 pb y de 102 pb como se presenta en el pocillo 912 (Figura 2).

## Resolución de resultados del codón 1016

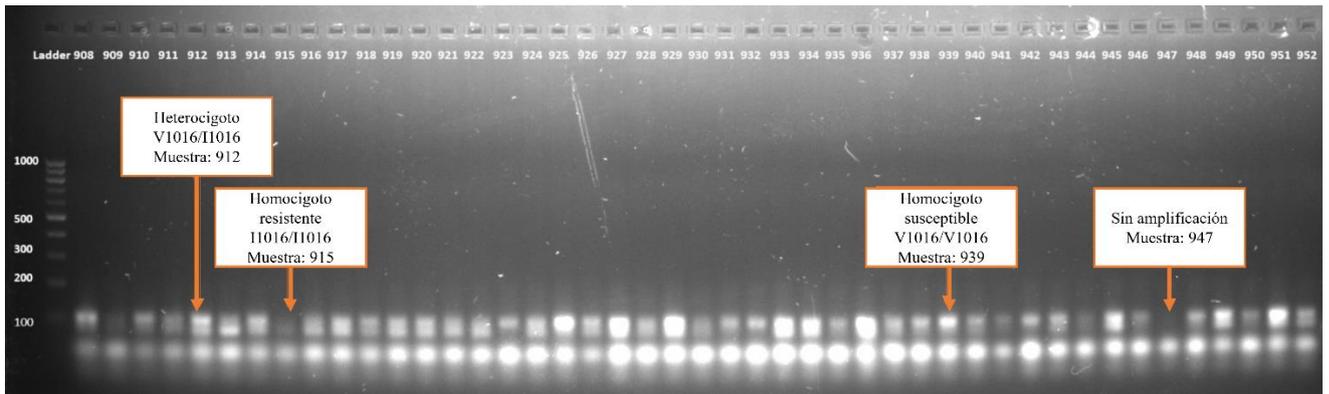


Figura 2. Genotificación de resultados del codón 1016 (908 – 952).

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

En el codón 410 se observó en 35 muestras una banda de 113 pb en el genotipo homocigoto mutante (L410/L410) como se ve en el pocillo 891 correspondiente a la característica resistente, no se obtuvo resultados con el genotipo susceptible (V410/V410) y para el genotipo heterocigoto (V410/L410) se observó 38 muestras como se observa en el pocillo 898 las dos bandas de 113 pb y 133 pb (Figura 3).

## Resolución de resultados del codón 410

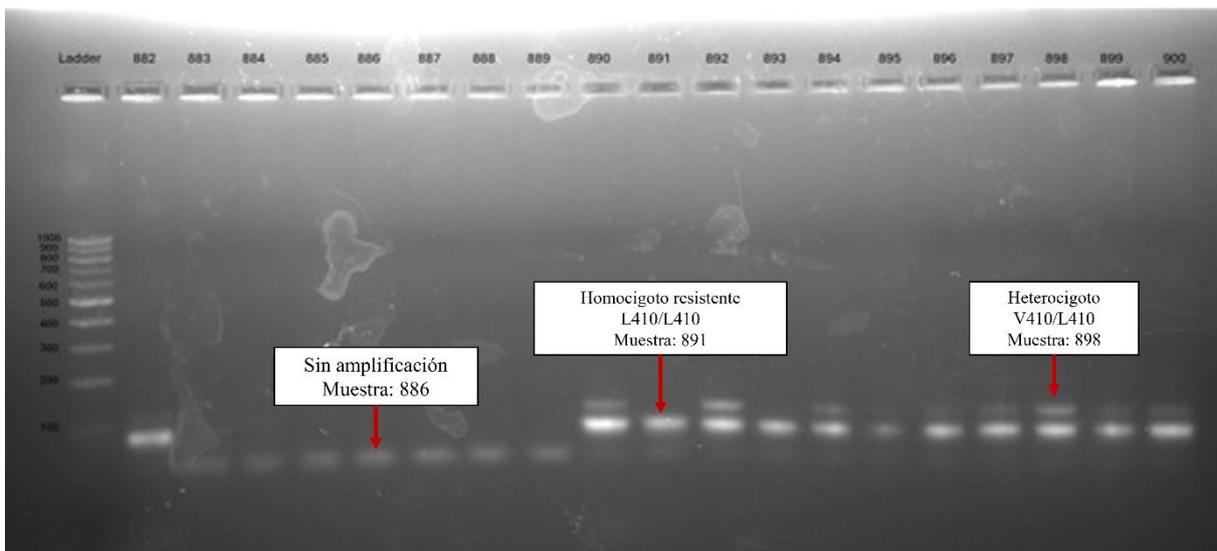


Figura 3. Genotificación de resultados del codón 410 (882 – 900).

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Finalmente, en el codón 1534 se obtuvo una banda de 180 pb en 56 muestras para el genotipo homocigoto mutante (C1534/C1534) como se ve en el pocillo 869 característica resistente, 2 muestras para el genotipo homocigoto salvaje (F1534/F1534) se observó una banda de 232 pb característica susceptible como se ve en el pocillo 881. 6 muestras del genotipo heterocigoto (F1534/C1534) con la presencia de las dos bandas de 232 pb y 180 pb. Se observó una banda de control interno de 368 pb evidenciando la amplificación de la región no específica con la que se hibridan los primers específicos que determinan susceptibilidad o resistencia (Figura 4).

### Resolución de resultados del codón 1534

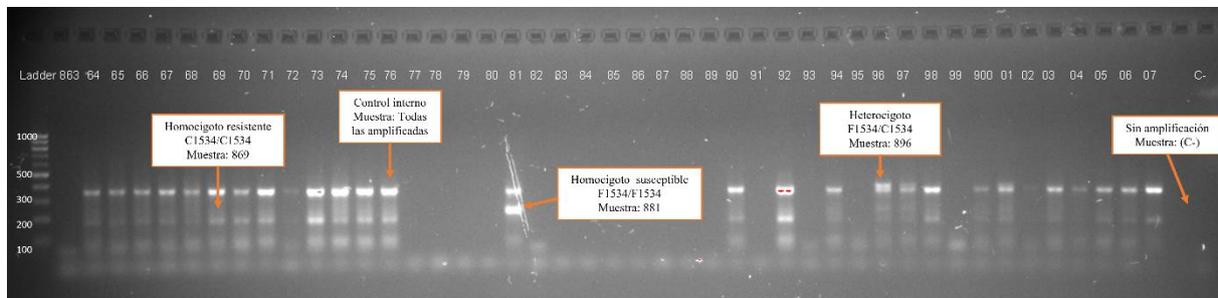


Figura 4. Genotipificación de resultados del codón 410 (863 – 903).

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

#### 4.2 Análisis de Hardy-Weinberg del codón 1016

Se actualizó la población de estudio en base a los resultados obtenidos y las muestras que no mostraron amplificación utilizando la ecuación 2.

$$Población \text{ de Pascuales} = 30 - 13 = 17$$

$$Población \text{ de Durán} = 30 - 1 = 29$$

$$Población \text{ de Bastión Popular} = 30 - 4 = 26$$

$$Población \text{ total codón 1016} = 90 - 18 = 72$$

A partir de los resultados obtenidos de la amplificación del codón 1016 (Tabla 6), se calcularon las frecuencias genotípicas observadas (Tabla 7), con las que se pudo obtener la frecuencia

alélica resistente y susceptible (Tabla 8), seguido se obtuvo los resultados esperados (Tabla 9), los cuales se compararon con los resultados observados por medio del estadístico Chi- cuadrado (Tabla 10).

Tabla 6. Resultados del codón 1016

Localidad	Observado RR	Observado RS	Observado SS	Población
Pascuales	10	0	7	17
Durán	0	18	11	29
Bastión popular	7	15	4	26
Total	17	33	22	72

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Tabla 7. Frecuencias observadas de los genotipos del codón 1016

Localidad	Frecuencia RR	Frecuencia RS	Frecuencia SS	Total
Pascuales	0,59	0,00	0,41	1,00
Durán	0,00	0,62	0,38	1,00
Bastión Popular	0,27	0,58	0,15	1,00
Total	0,24	0,46	0,31	1,00
Porcentaje	24%	46%	31%	100%

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Tabla 8. Frecuencias alélicas del codón 1016

Localidad	Alelo R	Alelo S	Total
Pascuales	0,59	0,418	1,00
Durán	0,31	0,69	1,00
Bastión Popular	0,56	0,44	1,00
Total	0,47	0,53	1,00
Porcentaje	47%	53%	100%

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Tabla 9. Eventos esperados codón 1016

Localidad	Esperado RR	Esperado SS	Esperado RS	Total
Pascuales	5,88	2,88	8,24	17,00
Durán	2,79	13,79	12,41	29,00
Bastión popular	8,09	5,09	12,83	26,00
Total	15,59	20,59	35,83	72,00

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Tabla 10. Chi-Cuadrado calculado ( $X^2c$ ) del codón 1016

Localidad	Distancia ( $X^2$ )	Distancia ( $X^2$ )	Distancia ( $X^2$ )	$(X^2c)$
	RR	RS	SS	
Pascuales	2,88	8,24	5,88	17,00
*Durán	2,79	2,51	0,57	5,87
*Bastión popular	0,15	0,37	0,23	0,75
-Total	0,13	0,22	0,10	0,45

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Nota: \* = localidades en equilibrio HW. - = población en equilibrio HW.

Aceptando la  $H_0$  solo para la localidad de Durán y Bastión Popular, por lo tanto, presenta una población con la mutación V1016 estable con una frecuencia de 31% y 56% respectivamente, para el alelo resistente I1016. La localidad de Pascuales no presenta equilibrio de Hardy-Weinberg, puesto que presenta un alto valor de resistencia 59%. De la misma manera se analizaron los resultados totales de la amplificación del codón 1016 obteniendo una población estable con la presencia del alelo resistente I1016 del 47%.

#### 4.3 Análisis de Hardy-Weinberg del codón 410

Se actualizó la población de estudio en base a los resultados obtenidos y las muestras que no mostraron amplificación utilizando la ecuación 2.

$$Población\ de\ Pascuales = 30 - 11 = 19$$

$$Población\ de\ Durán = 30 - 6 = 24$$

$$Población\ de\ Bastión\ Popular = 30 - 0 = 30$$

$$Población\ total\ codón\ 410 = 90 - 17 = 73$$

A partir de los resultados obtenidos de la amplificación del codón 410 (Tabla 11), se calcularon las frecuencias genotípicas observadas (Tabla 12), con las que se pudo obtener la frecuencia

alélica resistente y susceptible (Tabla 13), seguido se obtuvo los resultados esperados (Tabla 14), los cuales se compararon con los resultados observados por medio del estadístico Chi-cuadrado (Tabla 15).

Tabla 11. Resultados del codón 410

Localidad	Observado RR	Observado RS	Observado SS	Población de análisis
Pascuales	1	18	0	19
Durán	19	5	0	24
Bastión popular	15	15	0	30
Total	35	38	0	73

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Tabla 12. Frecuencias observadas genotípicas del codón 410

Localidad	Frecuencia RR	Frecuencia RS	Frecuencia SS	Total
Pascuales	0,05	0,95	0	1,00
Durán	0,79	0,21	0	1,00
Bastión Popular	0,50	0,50	0	1,00
Total	0,48	0,52	0	1,00
Porcentaje	48%	52%	0%	100%

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Tabla 13. Frecuencias alélicas del codón 410

Localidad	Alelo R	Alelo S	Total
Pascuales	0,53	0,47	1,00
Durán	0,90	0,10	1,00
Bastión Popular	0,75	0,25	1,00
Total	0,74	0,26	1,00
Porcentaje	74%	26%	100%

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Tabla 14. Eventos esperados codón 410

Localidad	Esperado RR	Esperado SS	Esperado RS	Total
Pascuales	5,26	4,26	9,47	19,00
Durán	19,26	0,26	4,48	24,00
Bastión popular	16,88	1,88	11,25	30,00
Total	39,95	4,95	28,11	73,00

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Tabla 15. Chi-Cuadrado calculado ( $X^2c$ ) del codón 410

Localidad	Distancia ( $X^2$ )	Distancia ( $X^2$ )	Distancia ( $X^2$ )	$(X^2c)$
	RR	RS	SS	
Pascuales	3,45	7,67	4,26	15,39
*Durán	0,00	0,06	0,26	0,32
*Bastión popular	0,21	1,25	1,88	3,33
Total	0,61	3,48	4,95	9,04

Elaborado por: (Las autoras,2024).

Nota: \* = localidades en equilibrio HW.

Se acepta la  $H_0$  en las localidades de Durán y Bastión Popular, obteniendo un porcentaje del 79% y 50% respectivamente para el genotipo homocigoto resistente (L410/L410). En el caso de Pascuales como se presenta un 95% de heterocigotos, se acepta la hipótesis alternativa, por lo tanto, la población no se encuentra en equilibrio corriendo el riesgo de a futuro presentar estabilidad en la mutación. En este caso los valores totales no resultaron con una población estable, pero es importante analizar la frecuencia alélica del 74% L410.

#### 4.4 Análisis de Hardy-Weinberg del codón 1534

Se actualizó la población de estudio en base a los resultados obtenidos y las muestras que no mostraron amplificación utilizando la ecuación 2.

$$Población\ de\ Pascuales = 30 - 14 = 16$$

$$Población\ de\ Durán = 30 - 8 = 22$$

$$Población\ de\ Bastión\ Popular = 30 - 4 = 26$$

$$Población\ total\ codón\ 1534 = 90 - 26 = 64$$

A partir de los resultados obtenidos de la amplificación del codón 1534 (Tabla 16), se calcularon las frecuencias observadas (Tabla 17), con las que se pudo obtener la frecuencia alélica resistente y susceptible (Tabla 18), seguido se obtuvo los resultados esperados (Tabla 19), los cuales se compararon con los resultados observados por medio del estadístico Chi- cuadrado (Tabla 20).

Tabla 16. Resultados del codón 1534

Localidad	Observado RR	Observado RS	Observado SS	Población
Pascuales	15	0	1	16
Durán	20	1	1	22
Bastión popular	21	5	0	26
Total	56	6	2	64

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Tabla 17. Frecuencias observadas genotípicas del codón 1534

Localidad	Frecuencia RR	Frecuencia RS	Frecuencia SS	Total
Pascuales	0,94	0,00	0,06	1,00
Durán	0,91	0,05	0,05	1,00
Bastión Popular	0,81	0,19	0,00	1,00
Total	0,88	0,09	0,03	1,00
Porcentaje	88%	9%	3%	100%

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Tabla 18. Frecuencias alélicas del codón 1534

Localidad	Alelo R	Alelo S	Total
Pascuales	0,94	0,06	1,00
Durán	0,93	0,07	1,00
Bastión Popular	0,90	0,10	1,00
Total	0,92	0,08	1,00
Porcentaje	92%	8%	100%

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Tabla 19. Eventos esperados codón 1534

Localidad	Esperado RR	Esperado SS	Esperado RS	Total
Pascuales	14,06	0,06	1,88	16,00
Durán	19,10	0,10	2,80	22,00
Bastión popular	21,24	0,24	4,52	26,00
Total	54,39	0,39	9,22	64,00

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Tabla 20. Chi-Cuadrado calculado ( $X^2c$ ) del codón 1534

Localidad	Distancia ( $X^2$ )			$(X^2c)$
	RR	RS	SS	
Pascuales	0,06	1,88	14,06	16,00
Durán	0,04	1,15	7,88	9,08
*Bastión popular	0,00	0,05	0,24	0,29
Total	0,05	1,12	6,63	7,80

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Nota: \* = localidades en equilibrio HW.

Se acepta la  $H_0$  para la localidad de Bastión popular, presentando a los dos alelos estables en la población, pero para las localidades de Pascuales y Durán se rechaza la  $H_0$ , indicando que uno de los alelos no se encuentra estable en la población al tener el alelo resistente una frecuencia de 0,94 y 0,93 respectivamente se puede decir que la mutación F1534C se encuentra estable en la población. Analizando los valores totales la población no se encuentra en equilibrio debido a la alta frecuencia que presenta el alelo C1534 con 92% mientras que el alelo susceptible F1534 se presenta con un 8%.

En el Ecuador se utiliza insecticidas como deltametrina, malatión y temephos en el control vectorial, en el año 2019 se detectó resistencia a los tres insecticidas que se usan en el país, al tener la deltametrina un sitio de acción en los canales de sodio igual que los organoclorados como el DDT se cree que *Ae. aegypti* desarrollo una resistencia cruzada y una adaptación evolutiva debido a la presión ejercida por el insecticida (MSP, 2020). Las altas frecuencias resistentes en esta investigación en los tres codones demuestran que estos dos factores han favorecido el desarrollo de la resistencia al insecticida deltametrina.

Estos factores que han influido en la adaptación de *Ae. aegypti* se validan con los datos obtenidos en esta investigación ya que las frecuencias genotípicas de la mutación F1534C han aumentado con respecto a la investigación que se realizó en el año 2018 en Ecuador en las localidades de la Concordia y Quinindé donde se obtuvo una mayor frecuencia de heterocigotos F1534/C1534 (Quinatoa, 2018a). En esta investigación se presentó un 88% del genotipo C1534/C1534, demostrando que la característica resistente esta estable en población y la susceptible ha disminuido considerablemente.

Se conoce que la mutación V1016I es de carácter recesivo, siendo necesario la presencia del genotipo homocigoto mutante para la expresión de resistencia, en esta investigación se obtuvo

un 24% de genotipos resistentes y un 46% de genotipos heterocigotos lo que puede aumentar la resistencia en la población. En una investigación se estudió el progreso de la mutación V1016I desde los años 1996 hasta 2009 en México, donde se obtuvo un crecimiento de la mutación en el periodo de tiempo de estudio y por medio de una proyección usando el modelo de Fisher a partir de los resultados genotípicos determinaron que las frecuencias resistentes y heterocigotas pueden favorecer el aumento de la mutación V1016I, debido a la constante exposición de la permetrina los individuos que sobrevivieron serían homocigotos resistentes y heterocigotos, provocando que la segunda generación sea más resistente (García et al., 2009).

Tal como se puede observar en el estudio de Quinatoa (2018a) comparando los resultados obtenidos en esta investigación, como también en el estudio de García et al., (2009), la presencia del genotipo heterocigoto en la población, favorece el aumento de la mutación *kdr*, debido a la presión evolutiva ejercida por el insecticida ya que a la constante aplicación de deltametrina provoca que solo sobrevivan los resistentes y una pequeña cantidad de heterocigotos y como se ha demostrado que las siguientes generaciones presentan más individuos resistentes.

En Uagadugú capital de Burkina Faso se realizó un estudio del desarrollo de las mutaciones F1534C, V410L y V1016I comparando sus resultados con datos de otros años demostrando la fijación mutante V1016I y C1534F debido al aumento de las frecuencias del alelo resistente, también se detectó altas frecuencias de V410L aunque no ha sido detectado antes (Sombié et al., 2023). Este tipo de estudios son importantes porque permiten ver el desarrollo de las mutaciones y en base a esto se puede tomar medidas de apoyo para un mejor manejo del control vectorial.

Estudios previos realizados en Guajira, Colombia determinaron que en los 15 municipios de la localidad se presentó resistencia a la permetrina fenotípicamente, asociada directamente a la

mutación triple F1534C+V410L+V1016I, pero no se presentó resistencia a la deltametrina (Maestre et al., 2023). En la presente investigación si se presentó resistencia a la deltametrina, pero no se obtuvo la mutación triple resistente, si no la combinación de los genotipos V1016I+F1534C o V410L+F1534C con la presencia heterocigoto del codón faltante, asociando directamente a la doble mutación con la deltametrina.

En base a los resultados obtenidos se puede observar que la presencia de al menos una de las mutaciones en la población confiere resistencia a *Ae. aegypti*, pero la presencia de la combinación de las mutaciones V410L+V1016I o V410L+F1534C confiere mayor resistencia como lo explica Ayres et, al (2020), en su estudio en África donde la mutación V410L aparece y coevoluciona con la mutación V1016I en Angola confiriendo niveles altos de resistencia a piretroides, mientras que en Madeira la resistencia a piretroides se interrumpe por la coexistencia de múltiples mecanismos de resistencia.

Estudios realizados de las mutaciones V1016I, V410L y F1534C en el estado de Amapá (selva amazónica), Brasil se reportó que Macapá presentó un 77,9% de F1534C y Oiapoque con un 52,2% del haplotipo (V1016/I1016+L410/L410+ C1534/C1534) el cual causa el nivel más alto de resistencia a deltametrina (Souza et al., 2023). En el presente estudio se obtuvo una muestra con el haplotipo triple resistente en la localidad de Bastión popular, pero se obtuvieron 10 individuos con el haplotipo (I1016/I1016+V410/L410+C1534/C1534) y 19 individuos con el haplotipo (V1016/I1016+L410/L410+C1534/C1534), confirmando que la presencia de doble resistencia con heterocigotos, da mayor nivel de resistencia a la deltametrina que la triple resistencia.

Se obtuvo una nueva cepa denominada Rock *kdr* a partir de una cepa CIT-32 (los progenitores tenían las mutaciones V1016I+V410L homocigotos resistentes) y Rockefeller (cepa susceptible

con el fin de incorporar el alelo resistente) con el objetivo de estudiar la adaptación de las mutaciones, dando como resultado que el desarrollo del mosquito sea más largo, pero es más resistente a la permetrina (Brito et al., 2013), por lo que es importante estudiar este tipo de combinaciones y como afecta a la población de *Ae. aegypti* en Ecuador, en este caso se obtuvo un total de 29 individuos con combinaciones de mutaciones, dando mayor resistencia a la población, pero no se sabe que efectos tuvo directamente la población en su desarrollo, reproducción, estilo de vida, entre otros,

En el año 2018 en el Ecuador se realiza una de las primeras investigaciones a nivel molecular de mutaciones *kdr* en las localidades de La Concordia y Quinindé reportando 100% de genotipos homocigotos mutantes en las dos localidades en la mutación V1016I y con la mayor presencia del genotipo heterocigoto F1534/C1534 56% para La Concordia y 72% para Quinindé (Quinatoa, 2018b), en comparación con los resultados de esta investigación que presentó mayor presencia el genotipo resistente C1534/C1534 con un promedio de frecuencia del 88% en las tres localidades analizadas y en el codón 1016 se presentó en su mayoría el genotipo heterocigoto con un 46%, con respecto al codón 410 es el primer reporte que se realiza en Ecuador. Estos datos demuestran la importancia de estos estudios, ya que la diferencia de datos se puede deber al lapso de tiempo que se da entre los estudios o también por la distancia geográfica que las localidades estudiadas presentan.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

El material genético que se obtuvo a partir de la extracción de ADN con el kit de purificación de ADN genómico “Wizards SV Genomic DNA Purification System”, presentó varias muestras sin amplificación se recomienda utilizar muestras frescas para que la calidad de ADN sea mejor y permita mejores resultados en posteriores estudios.

Se determinó que en todas las localidades existe resistencia al derribo al insecticida deltametrina, demostrando fenotípicamente una mortalidad del 60% para Durán, 65% para Pascuales, estas dos con carácter resistente y un 85% para Bastión Popular con riesgo de resistencia, estos datos son corroborados con los resultados genotípicos debido a las altas frecuencias del alelo mutante en los tres codones.

No se logró determinar la estabilidad del alelo resistente en todas las localidades analizadas para los codones 1016 y 410, pero se observó una alta frecuencia de heterocigosis del 46% y 52% respectivamente, incrementando considerablemente la presencia del alelo resistente en la población estudiada con 47% y 74%. Esta situación podría conducir a una estabilización del alelo resistente dentro de dicha población, en caso de mantenerse las condiciones selectivas que favorecen su persistencia.

Es importante analizar la evolución de la resistencia *kdr* en determinados lapsos de tiempo, evaluando cómo interaccionan las mutaciones entre sí y si diferentes combinaciones aumentan la resistencia o no la afectan. Asimismo, se debe estudiar la interacción de estas mutaciones con otros mecanismos de resistencia y con el organismo de estudio. Estos temas deberían abordarse con un enfoque integral a nivel nacional para obtener un panorama completo de la situación en el territorio ecuatoriano. Esto permitirá apoyar la toma de decisiones en el control vectorial, considerando la mayor cantidad posible de consecuencias a futuro.

## Referencias

- Alonso, M., Rodríguez, R., & Fragoso, H. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas Ixodicide. In *Arch. Med. Vet.* (Vol. 38, Issue 2).  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200003>
- AME. (2022). *Cantón Guayaquil*. <https://ame.gob.ec/2010/05/20/canton-guayaquil/>
- Anderson, D., Sweeney, D., & Williams, T. (2008). *Estadística para administración y economía*.
- Antonio, M., Huarcaya, M., Castillo, C., & Rodriguez, M. (2022). Intervenciones genéticas de *Aedes aegypti* para el control de arbovirosis. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 62(4), 663–669. <https://doi.org/10.52808/bmsa.7e6.624.006>
- Arredondo, J., Mendez, A., & Medina, H. (2016). Arbovirus en Latinoamérica. *Acta de Pediatría Continuada*, 5(5), 298–301. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(07\)74151-3](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(07)74151-3)
- Ayres, C., Seixas, G., Borrego, S., Marques, C., Monteiro, I., Marques, C., Gouveia, B., Leal, S., Troco, A., Fortes, F., Parreira, R., Pinto, J., & Sousa, C. (2020). The V410L knockdown resistance mutation occurs in island and continental populations of *Aedes aegypti* in West and Central Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008216>
- Badii, M., & Almanza, V. (2015). Resistencia en Insectos, Plantas y Microorganismos. *CULCyT*, 0(18). <https://doi.org/http://orcid.org/0000-0001-8280-0180>
- Besbes, N., Sáiz, M., & Sadok, S. (2022). Comparative study of DNA extraction to initiate harmonized protocol for a simple method of species identification: Fresh and canned Tuna case study. *CYTA - Journal of Food*, 20(1), 39–49.  
<https://doi.org/10.1080/19476337.2021.2020337>
- Betancourt, M., & Falcón, J. (2022). Arbovirus y salud pública. In *Ciencia* (Vol. 71, Issue 1).  
<https://amc.edu.mx/>
- Bisset, J. (2002). Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. In *Revista Cubana de Medicina Tropical* (Vol. 54, Issue 3). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=s0375-07602002000300005&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=s0375-07602002000300005&script=sci_arttext)
- Brito, L. P., Linss, J. G. B., Lima-Camara, T. N., Belinato, T. A., Peixoto, A. A., Lima, J. B. P., Valle, D., & Martins, A. J. (2013). Assessing the Effects of *Aedes aegypti kdr* Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost. *PLoS ONE*, 8(4).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060878>
- Brogdon, W., & Chan, A. (2010). *Guideline for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle Bioassay*. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/21777>
- Calva, L., & Torres, M. (1998). *Plaguicidas organoclorados*. June.  
<http://iaes.edu.ve/iaespro/ojs/index.php/bmsa/article/view/540/775>

- Campos, P., & Mendoza, G. (2018). “*Ficha técnica del vector Aedes aegypti (Linnaeus, 1762)*”, pp. 105-118. En: Ma. Guadalupe Galindo Mendoza y Carlos Contreras Servín, coord., *Geomedicina y la tecnología espacial*. (Issue October).
- Chico, P., Hidalgo, F., & Ochoa, R. (2001). Ciclo de vida del *Aedes aegypti* y manifestaciones clínicas del dengue. In *Acta Pediátrica de México* 22(2):114-117 (Vol. 22, Issue 2). <http://repositorio.pediatrica.gob.mx:8180/handle/20.500.12103/1532>
- Chiele, A., Florentino, I., Schulz, R., Figueiredo, E., Librelotto, C., & Colacite, J. (2023). Estudio da variabilidade genética e análise de possíveis mutações *kdr* no gene codificador dos canais de sódio relacionados à resistência do *Aedes aegypti* a inseticidas. *Research, Society and Development*, 12(3), e11312340474. <https://doi.org/10.33448/rsd-v12i3.40474>
- Copley, G., Gradwell, M., & Hassell, G. (1974). *Insect population ecology an analytical approach*. University of California Press.
- Cruz, M. (2009). *Determinación de la existencia del fenómeno de transmisión transovárica en poblaciones de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) durante la epidemia de dengue 2007 en la ciudad de Santa Cruz - Bolivia*.
- Del Ángel, R., & Zárate, S. (2020). Ciclo replicativo y evolución de los arbovirus. In *Revista de la Academia Mexicana de Ciencias* (Vol. 71, Issue 1). [https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/71\\_1/PDF/05\\_71\\_1\\_1203\\_Ciclo\\_Replicativo.pdf](https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/71_1/PDF/05_71_1_1203_Ciclo_Replicativo.pdf)
- Domínguez, M., Ludueña, F., & Almirón, W. (2000). Dinámica poblacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev. SoCo Entomol. Argent*, 59(4), 41–50. <https://www.biotaxa.org/RSEA/article/view/32372>
- Echeverría, M. (2013). *Sustancia tóxica DDT en el Ecuador: ¿Se cumplen las normas del derecho internacional, constitucional y de la legislación vigente?*. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/ec>
- Enayati, A., Valadan, R., Bagherzadeh, M., Cheraghpour, M., Nikookar, S., Fazeli-Dinan, M., Hosseini, N., Sahraei, F., Shabani, R., Raeisi, A., Nikpour, F., Miroyaei, A., Bagheri, F., Sedaghat, M., Zaim, M., Weetman, D., & Hemigway, J. (2024). *kdr* genotyping and the first report of V410L and V1016I *kdr* mutations in voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Iran. *Parasites and Vectors*, 17(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06123-w>
- Espinal, M., Andrus, J., Jauregui, B., Waterman, S., Morens, D., Santos, J., Horstick, O., Francis, L., & Olson, D. (2019). Emerging and reemerging aedes-transmitted arbovirus infections in the region of the americas: Implications for health policy. *American Journal of Public Health*, 109(3), 387–392. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2018.304849>
- Fan, Y., & Scott, J. (2020). The F1534C voltage-sensitive sodium channel mutation confers 7- to 16-fold resistance to pyrethroid insecticides in *Aedes aegypti*. *Pest Management Science*, 76(6), 2251–2259. <https://doi.org/10.1002/ps.5763>

- Fundación Charles Darwin. (2010). *Aedes aegypti* Linnaeus 1762. <https://datazone.darwinfoundation.org/es/checklist/?species=11720>
- Galavíz, J., Vega, F., Cupul, F., Navarrete, J., Ruiz, L., Vargas, M., & Chong, O. (2016). Control químico y biológico de larvas de *Aedes aegypti* en la costa norte de Jalisco, México. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 68(2), 111–124. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602016000200001&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602016000200001&script=sci_arttext)
- García, G., Flores, A., Fernández-Salas, I., Saavedra-Rodríguez, K., Reyes-Solis, G., Lozano-Fuentes, S., Bond, J., Casas-Martínez, M., Ramsey, J., García-Rejón, J., Domínguez-Galera, M., Ranson, H., Hemingway, J., Eisen, L., & Black IV, W. (2009). Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000531>
- Ginnobili, S. (2010). *La teoría de la selección natural darwiniana y la genética de poblaciones*. 169–183. <https://doi.org/https://doi.org/10.5944/endoxa.24.2010.5216>
- Gómez, G. (2018). *Aedes (Stegomyia) aegypti* (diptera: Culicidae) and its importance for human health. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=81903>
- González, C., Cime, J., & Correa, F. (2020). Control integrado de vectores en México. *Ciencia*, 71(1), 52–63. <https://revistaciencia.amc.edu.mx/index.php/vol-71-numero-1>
- Graterol, L., Herrera, E., & Herrera, F. (2013). Evaluación De La Exposición Ocupacional a Plaguicidas Organofosforados Y Carbamatos En Una Comunidad Agraria Del Estado Carabobo: Actividad De La Colinesterasa Serica Y La Isoforma Cyp3a4. *Suparyanto Dan Rosad* (2015, 5(3), 248–253. <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/2137207>
- Hernandez, J., Longnecker, M., Fredregill, C., Debboun, M., & Pietrantonio, P. (2021). *Kdr* genotyping (V1016i, f1534c) of the nav channel of *Aedes aegypti* (L.) mosquito populations in harris county (houston), Texas, USA, after permanone 31–66 field tests and its influence on probability of survival. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(11), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009833>
- Instituto de Genética Barbara McClintock. (2017). *Fundamentos de PCR*. Youtube.
- Isaev, A., Soukhovolsky, V., Tarasova, O., Palnikova, E., & Kovalev, A. (2017). *Forest Insect Population Dynamics, Outbreaks, and Global Warming Effects* (1st ed.). John Wiley & Sons Incorporated.
- Jacobs, E., Chrissian, C., Rankin, S., Wear, M., Camacho, E., Broderick, N., McMeniman, C., Stark, R., & Casadevall, A. (2023). Cuticular profiling of insecticide resistant *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36926-3>
- Klug, W., Cummings, M., Spencer, C., & Palladino, M. (2013). *Conceptos de genética* (10th ed.). Pearson.

Loor, L., Mendoza, M., & Fuentes, E. (2023). Arbovirus en el Ecuador: epidemiología, diagnóstico, manifestaciones clínicas. *MQRInvestigar*, 7(1), 2929–2947. <https://doi.org/10.56048/mqr20225.7.1.2023.2929-2947>

López, A., Castillo, A., Cisneros, J., Solís, F., Penilla, R., Black, W., Estrada, J., & Rodríguez, A. (2022). Resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) de Tapachula, Chiapas, México. *Salud Publica de Mexico*, 62(4), 439–446. <https://doi.org/10.21149/10131>

López, M., & Neira, M. (2016). Influencia del cambio climático en la biología de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquito transmisor de arbovirosis humanas. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 37. <https://doi.org/https://doi.org/10.26807/remcb.v37i2>

sou

Manjarres, A., & Olivero, J. (2013). Chemical control of *Aedes aegypti* : a historical perspective. In *Revista Costarricense de Salud Pública* (Vol. 22, Issue 1). [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-14292013000100012&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292013000100012&lng=en&nrm=iso&tlng=en)

Mantella, M., & Hohl, D. (2021). CAPÍTULO 6: Genética de poblaciones. In *Elementos de Genética para estudiantes de Ciencias Biológicas*.

Marcos, J., Gallego, R., & Ochoa de alda, J. (2019). Extracción de ADN con material cotidiano: desarrollo de una estrategia interdisciplinar a partir de sus fundamentos científicos. In *Educación Química* (Vol. 30, Issue 1). <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2019.1.65732>

Márquez, Y., Monroy, K., Martínez, E., Peña, V., & Monroy, Á. (2019). Influencia de la temperatura ambiental en el mosquito *Aedes spp* y la transmisión del virus del dengue. *Ces Medicina*, 33(1), 42–50. <https://doi.org/10.21615/cesmedicina.33.1.5>

Maya, A., Durango, Y., Gómez, L., & Gómez, G. (2023). *Mejoramiento de un método no comercial para la extracción de ADN de moscas de interés médico-legal*. <https://doi.org/10.31910/rudca.v26.n1.2023.1946>

Mora, E. (2013). *Detección múltiple de las mutaciones kdr V410L, V1016I y F1534C en poblaciones de Aedes aegypti (L.) resistentes a insecticidas piretroides*. <http://eprints.uanl.mx/19254/>

Morales, D., & Quinatoa, P. (2019). *Manual para la Vigilancia de la Resistencia a los insecticidas en el Ecuador*. 1–34. [https://www.investigacionosalud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/01/Manual\\_resistencia\\_version1.0.pdf](https://www.investigacionosalud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/01/Manual_resistencia_version1.0.pdf)

Morales, J., & Chiluisa-Utreras, V. (2022). *Mejoramiento biotecnológico de plantas y modificación genética*. [http://142.93.18.15:8080/jspui/bitstream/123456789/794/1/GENNBIO\\_JMorales\\_Libro\\_2022\\_%281%29.pdf](http://142.93.18.15:8080/jspui/bitstream/123456789/794/1/GENNBIO_JMorales_Libro_2022_%281%29.pdf)

- MSP. (2013). *Boletín epidemiológico de la situación del Dengue en el Ecuador; No. 46, 07 de enero de 2013*. <https://www.salud.gob.ec/boletin-epidemiologico-de-la-situacion-del-dengue-en-el-ecuador-no-46-07-de-enero-de-2013/>
- MSP. (2020). *Gaceta \_resistencia- \_insecticidas \_utilizados \_control \_vectorial \_julio-dic2019*.
- MSP. (2023). Gaceta Epidemiológica, Enfermedades transmitidas por vectores Semana Epidemiológica 01-48/ 2023, Ecuador. In *Gaceta-de-Vectoriales-SE-48* (Vol. 1). <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2023/12/Gaceta-de-Vectoriales-SE-48.pdf>
- Ontiveros, K. (2021). *Variación espacial de la resistencia kdr a insecticidas piretroides en Aedes Aegypti (L.) en México*. [Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/22226/1/1080315297.pdf>
- OPS. (2019a). *Estrategia de gestión integrada para la prevención y el control de las enfermedades arbovirales en las Américas*. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51787>
- OPS. (2019b). *Estrategia de gestión integrada para la prevención y el control de las enfermedades arbovirales en las Américas*. Organización Panamericana de la Salud. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51787>
- OPS. (2021). Métodos de vigilancia entomológica y control de los principales vectores en las Américas. In *Métodos de vigilancia entomológica y control de los principales vectores en las Américas*. <https://doi.org/10.37774/9789275323953>
- Pando, V., Ortega, A., & Huerta, H. (2020). Mosquitos vectores de arbovirus. In *Ciencia* (Vol. 71, Issue 1). <https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/index.php>
- Peña, J., Gregorio, O., & Barrera, B. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación Química*, 24(2), 237–246. [https://doi.org/10.1016/s0187-893x\(13\)72468-6](https://doi.org/10.1016/s0187-893x(13)72468-6)
- Ponce, G., Flores, A., Badii, M., & Zapata, R. (2006). Modo de acción de los insecticidas. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 7(4), 18. <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDREVISTA=95&IDARTICULO=13294&IDPUBLICACION=1381>
- Prefectura ciudadana del guayas. (2021). *Guayas es la provincia con mayor población y una de las que más aporta en beneficio de la economía del país*. <https://guayas.gob.ec/demografia/>
- PROMEGA. (2024a). *DNA Purification*. <https://worldwide.promega.com/es-es/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/#genomic-dna-isolation-b40f5877-a1b4-493f-b48f-d64915a3eb3d>
- PROMEGA. (2024b). *DNA Purification*. <https://worldwide.promega.com/es-es/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/#genomic-dna-isolation-b40f5877-a1b4-493f-b48f-d64915a3eb3d>

brito

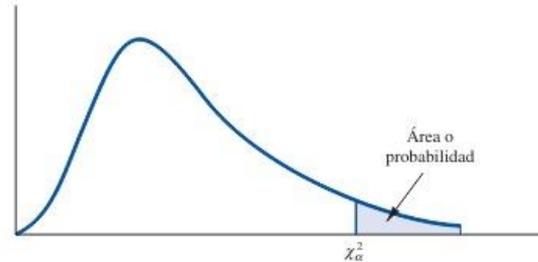
- Quinatoa, P. (2018b). *Resistencia de Aedes aegypti (Diptera, Culicidae) a Malatión, Temefos y Deltametrina, Insecticidas utilizados en Salud Pública para el control vectorial en las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas, La Concordia y Esmeraldas. Quinindé.*
- Ramírez, L. (2023). *Comparación In silico de la diversidad y evolución del viroma de los mosquitos vectores Aedes aegypti Culex pipens.* [Universidad Autónoma del Estado de Morelos]. <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/4282>
- Reyes, J., Apolo, A., Merchán, M., & Valero, J. (2020). Factores ambientales y climáticos de la provincia de Manabí y su asociación a la presencia de las Ciencias de la salud Artículo de investigación. *Polo Del Conocimiento*, 46(6), 453–488. <https://doi.org/10.23857/pc.v5i6.1507>
- Rodríguez, R., Hodgkinson, J., & Trees, A. (2008). Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* : situación actual y mecanismos de resistencia. In *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias* (Vol. 3, Issue SUPPL. 1). [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242012000500004](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242012000500004)
- Rosen, L. (1987). Sexual transmission of dengue viruses by *Aedes albopictus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(2), 398–402.
- Rueda, L. (2004). Pictorial keys for the identificación of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission. *Zootaxa*, 589.
- Saavedra, K. (2007). *Mapeo cuantitativo de loci que controlan la resistencia a la permetrina en el mosquito Aedes aegypti (Diptera:culicidae).* <http://eprints.uanl.mx/1810/1/1020160702.PDF>
- Saavedra, K., Maloof, F., Campbell, C., Garcia, J., Lenhart, A., Penilla, P., Rodriguez, A., Sandoval, A., Flores, A., Ponce, G., Lozano, S., & Black, W. (2018). Parallel evolution of vgsc mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25222-0>
- Smith, J. (2004). *Biotecnología*. (4th ed.). Cambridge University Press.
- Sombié, A., Ouédraogo, W., Oté, M., Saiki, E., Sakurai, T., Yaméogo, F., Sanon, A., McCall, P., Kanuka, H., Weetman, D., & Badolo, A. (2023). Association of 410L, 1016I and 1534C *kdr* mutations with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Ouagadougou, Burkina Faso, and development of a one-step multiplex PCR method for the simultaneous detection of 1534C and 1016I *kdr* mutations. *Parasites and Vectors*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05743-y>
- Souza, B., Lima, L., Galardo, A., Corbel, V., Lima, J., & Martins, A. (2023). Genetic structure and *kdr* mutations in *Aedes aegypti* populations along a road crossing the Amazon Forest in Amapá State, Brazil. *Scientific Reports*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44430-x>

- Terán, M., Rodríguez, M., Leyva, Y., & Bisset, J. (2014). Evaluación de temefos y pyriproxifeno en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Guayaquil, Ecuador. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66(1), 71–83. <http://scielo.sld.cuhttp://scielo.sld.cu>
- Villanueva, K., Ponce, G., López, B., Mora, E., Perales, L., Gonzalez, F., Ontiveros, K., Davila, J., & Flores, A. (2020a). Multiplex PCR for simultaneous genotyping of *kdr* mutations V410L, V1016I and F1534C in *Aedes aegypti* (L.). *Parasites & Vectors*, 13(1), 325. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04193-0>
- Villanueva, K., Ponce, G., López, B., Mora, E., Perales, L., Gonzalez, F., Ontiveros, K., Davila, J., & Flores, A. (2020b). Multiplex PCR for simultaneous genotyping of *kdr* mutations V410L, V1016I and F1534C in *Aedes aegypti* (L.). *Parasites & Vectors*, 13(1), 325. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04193-0>
- Villegas, A., Che, A., González, M., Guillermo, G., González, H., Dzul, F., Ulloa-García, A., Danis-Lozano, R., Manrique-Saide, P., Da Silva, L., Gurgel, A., Costa, A., Diderichsen, F., Lacaz, F., Parra-Henao, G., Rigotto, R., Nodari, R., Santos, S., Pérez, D., ... Van Der Stuyft, P. (2011). Control enfocado de *Aedes aegypti* en localidades de alto riesgo de transmisión de dengue en Morelos, México. *The Lancet*, 53(10023), 141–151. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=29567>
- WHO. (2022). Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions. In *Organização Mundial da Saúde*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240051089>
- Zurita, A. (2021). *Los usos de los insecticidas piretroides y su relación con la resistencia a insecticidas en el vector de la malaria, Nyssorhynchus albimanus , caso de la provincia de El Oro*. [FLACSO Ecuador]. <https://repositorio.flacsoandes.edu.ec/handle/10469/17608>

## 7. Anexos

### Anexo 1: Tabla de distribución de Chi- cuadrado

**TABLA 3** DISTRIBUCIÓN CHI-CUADRADA



Las entradas que aparecen en la tabla dan los valores de  $\chi_{\alpha}^2$ , donde  $\alpha$  es el área o probabilidad en la cola superior de la distribución chi-cuadrada. Por ejemplo, para 10 grados de libertad y un área de 0.01 en la cola superior,  $\chi_{0.01}^{10} = 23.209$ .

Grados de libertad	Áreas en la cola superior									
	0.995	0.99	0.975	0.95	0.90	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005
1	0.000	0.000	0.001	0.004	0.016	2.706	3.841	5.024	6.635	7.879
2	0.010	0.020	0.051	0.103	0.211	4.605	5.991	7.378	9.210	10.597
3	0.072	0.115	0.216	0.352	0.584	6.251	7.815	9.348	11.345	12.838
4	0.207	0.297	0.484	0.711	1.064	7.779	9.488	11.143	13.277	14.860
5	0.412	0.554	0.831	1.145	1.610	9.236	11.070	12.832	15.086	16.750
6	0.676	0.872	1.237	1.635	2.204	10.645	12.592	14.449	16.812	18.548
7	0.989	1.239	1.690	2.167	2.833	12.017	14.067	16.013	18.475	20.278
8	1.344	1.647	2.180	2.733	3.490	13.362	15.507	17.535	20.090	21.955
9	1.735	2.088	2.700	3.325	4.168	14.684	16.919	19.023	21.666	23.589
10	2.156	2.558	3.247	3.940	4.865	15.987	18.307	20.483	23.209	25.188
11	2.603	3.053	3.816	4.575	5.578	17.275	19.675	21.920	24.725	26.757
12	3.074	3.571	4.404	5.226	6.304	18.549	21.026	23.337	26.217	28.300
13	3.565	4.107	5.009	5.892	7.041	19.812	22.362	24.736	27.688	29.819
14	4.075	4.660	5.629	6.571	7.790	21.064	23.685	26.119	29.141	31.319
15	4.601	5.229	6.262	7.261	8.547	22.307	24.996	27.488	30.578	32.801
16	5.142	5.812	6.908	7.962	9.312	23.542	26.296	28.845	32.000	34.267
17	5.697	6.408	7.564	8.672	10.085	24.769	27.587	30.191	33.409	35.718
18	6.265	7.015	8.231	9.390	10.865	25.989	28.869	31.526	34.805	37.156
19	6.844	7.633	8.907	10.117	11.651	27.204	30.144	32.852	36.191	38.582
20	7.434	8.260	9.591	10.851	12.443	28.412	31.410	34.170	37.566	39.997
21	8.034	8.897	10.283	11.591	13.240	29.615	32.671	35.479	38.932	41.401
22	8.643	9.542	10.982	12.338	14.041	30.813	33.924	36.781	40.289	42.796
23	9.260	10.196	11.689	13.091	14.848	32.007	35.172	38.076	41.638	44.181
24	9.886	10.856	12.401	13.848	15.659	33.196	36.415	39.364	42.980	45.558
25	10.520	11.524	13.120	14.611	16.473	34.382	37.652	40.646	44.314	46.928
26	11.160	12.198	13.844	15.379	17.292	35.563	38.885	41.923	45.642	48.290
27	11.808	12.878	14.573	16.151	18.114	36.741	40.113	43.195	46.963	49.645
28	12.461	13.565	15.308	16.928	18.939	37.916	41.337	44.461	48.278	50.994
29	13.121	14.256	16.047	17.708	19.768	39.087	42.557	45.722	49.588	52.335

**Anexo 1.** Tabla 3 distribución de Chi-cuadrado, obtenida del libro Estadística para administración y economía apéndice B, utilizada para calcular el  $X^2$  tabulado en la investigación con una probabilidad de 95% y 2 grados de libertad (Anderson et al., 2008).

Anexo 2. Base de datos de los resultados obtenidos

Reporte de Datos											
Número	Código	Especie	Provincia	Localidad	Sexo	Fecha de bioensayo	Resultado de bioensayo	% mortalidad (30 min)	Análisis molecular		
									Resultado 1016	Resultado 410	Resultados 1534
1	863	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	2	3	0
2	864	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	2	3	1
3	865	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	2	3	1
4	866	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	1	3	1
5	867	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	2	3	1
6	868	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	2	3	1
7	869	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	1	3	1
8	870	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	1	3	1
9	871	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	1	3	1
10	872	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	0	3	1
11	873	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	2	3	1

12	874	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	1	3	1
13	875	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	1	3	1
14	876	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	1	3	1
15	877	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	0	0	0
16	878	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	0	0	0
17	879	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	0	0	0
18	880	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	0	0	0
19	881	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	1	3	2
20	882	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	1	3	0
21	883	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	0	0	0
22	884	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	0	0	0
23	885	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	0	0	0
24	886	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	0	0	0
25	887	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	0	0	0
26	888	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	0	0	0

27	889	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Hembra	9/2/2022	1	69%	0	0	0
28	890	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	1	3	1
29	891	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	0	1	0
30	892	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Pascuales	Macho	9/2/2022	1	69%	2	3	1
31	893	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	1	1	0
32	894	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	1	3	1
33	895	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	1	3	0
34	896	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	1	3	3
35	897	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	1	3	3
36	898	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	1	3	1
37	899	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	0	3	0
38	900	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	0	3	1
39	901	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	0	3	3
40	902	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	3	1	1
41	903	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	2	3	1

42	904	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	2	3	1
43	905	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	2	3	1
44	906	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	3	1	1
45	907	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	3	3	1
46	908	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	2	1	3
47	909	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	0	1	1
48	910	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	3	1	1
49	911	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	3	1	3
50	912	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	3	1	0
51	913	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	3	1	1
52	914	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	3	1	1
53	915	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Hembra	18/5/2022	1	85%	1	1	1
54	916	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	3	3	1
55	917	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	3	3	1
56	918	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	3	1	1

57	919	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	3	3	1
58	920	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	3	1	1
59	921	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	3	1	1
60	922	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Bastión popular	Macho	18/5/2022	1	85%	3	1	1
61	923	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	2	1	2
62	924	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	3	1	1
63	925	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	2	1	0
64	926	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	3	1	1
65	927	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	3	1	1
66	928	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	3	1	1
67	929	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	3	1	1
68	930	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	3	0	1
69	931	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	2	1	1
70	932	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	2	1	0
71	933	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	3	3	1

72	934	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	3	1	1
73	935	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	2	1	1
74	936	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	3	1	1
75	937	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Hembra	22/2/2022	1	60%	3	1	1
76	938	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	2	1	0
77	939	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	2	1	0
78	940	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	3	1	0
79	941	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	2	0	0
80	942	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	2	1	0
81	943	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	3	1	1
82	944	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	3	0	1
83	945	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	3	3	3
84	946	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	3	0	1
85	947	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	0	0	0
86	948	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	3	0	1

87	949	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	3	3	1
88	950	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	3	1	1
89	951	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	2	3	1
90	952	<i>Ae. aegypti</i>	Guayas	Duran	Macho	22/2/2022	1	60%	2	3	1

Anexo 2. Tabla de datos de muestras de *Ae. aegypti* de las localidades de Bastión popular, Pascuales y Durán, se categorizó las variables de genotipificación de la siguiente manera 0 sin amplificación, 1 resistente, 2 susceptible, 3 heterocigoto. Elaborado por: (Las autoras, 2024).