

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
PROGRAMA EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD
SUPROGRAMA BIOLOGÍA

INFORME FINAL INTEGRADO
DE LA PRÁCTICA DE EDC BIOLOGÍA
LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA APLICADA Y PARASITOLOGÍA -LENAP-
PERÍODO DE REALIZACIÓN
ENERO 2017 – ENERO 2018

JOSÉ PABLO PINEDA BRAN
PROFESOR SUPERVISOR DE EDC: Dra. MARÍA EUNICE ENRÍQUEZ COTTON
ASESOR INSTITUCIONAL: MSc. ELIZABETH SOLÓRZANO
Vo.Bo. ASESOR INSTITUCIONAL

ÍNDICE

Introducción	1
Cuadro resumen de las actividades de EDC	1
Actividades realizadas durante la práctica de EDC	2
Actividades de servicio	2
Actividades de docencia	4
Actividades no planificadas	6
Informe final de investigación	8
Anexos	23

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
PROGRAMA EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD
SUPROGRAMA BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO Y DOCENCIA
LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA APLICADA Y PARASITOLOGÍA -LENAP-
PERÍODO DE REALIZACIÓN
MARZO 2017 – JULIO 2017

JOSÉ PABLO PINEDA BRAN
PROFESOR SUPERVISOR DE EDC: Dra. MARÍA EUNICE ENRÍQUEZ COTTON
ASESOR INSTITUCIONAL: MSc. ELIZABETH SOLÓRZANO
Vo.Bo. ASESOR INSTITUCIONAL

INTRODUCCIÓN

El informe final cumple la función de mantener una organización con respecto al avance de las actividades planificadas a realizarse durante el período de EDC, permitiendo así hacer un análisis de las actividades realizadas, la calidad de las mismas y que el profesor supervisor pueda dar un seguimiento adecuado al trabajo realizado por el estudiante en su unidad de práctica. La presentación oral del informe cumpliría la función de compartir experiencias con el resto de estudiantes y aprender de las mismas para mantener un nivel de trabajo alto con respecto a lo realizado.

La presente práctica permitió, mediante las actividades de servicio y docencia, mejorar las condiciones en las cuales se encuentran las colecciones pertenecientes al LENAP, obtener el conocimiento adecuado para tener la capacidad de impartir éste a otras personas interesadas en adquirirlo, así como para poner en práctica las técnicas aprendidas durante el proceso en las actividades de investigación y contar con la capacidad de analizar los resultados obtenidos y discutir adecuadamente los mismos.

Se presenta un resumen de las actividades tanto de servicio como de docencia, la descripción de la actividad realizada, los objetivos alcanzados durante las mismas y las limitaciones que se pudieron presentar al llevarlas a cabo. Finalmente, se presenta un cuadro en el cual se expone la cantidad de horas empleada para cada actividad, la cantidad de horas asignadas inicialmente mediante el plan de trabajo para cada actividad y el porcentaje de horas completadas según lo asignado.

CUADRO RESUMEN DE LAS ACTIVIDADES DE EDC

Programa/ Actividades	Fecha propuesta	Horas EDC asignadas	Horas EDC Acumuladas	% de Horas EDC de Avance/acumuladas
A. Servicio				
Servicio Coleccs.	Febrero	40 hrs.	40 hrs.	100%
Bases de datos	Febrero-octubre	50 hrs.	28 hrs.	100%
Bioterio	Febrero-octubre	36 hrs.	26 hr.	100%
Actividades aniversario	Febrero-octubre	20 hrs.	60 hr.	100%
Colecciones triatominos	Febrero-octubre	50 hrs.	30 hr.	100%
Disección de triatominos	Febrero-octubre	20 hrs.	6 hrs.	100%
Gestión de calidad de laboratorios	Febrero-octubre	12 hrs.	7 hr.	100%
Alimentación de chinchas	Febrero-octubre	9 hrs.	4 hrs	100%
Apoyo giras de campo	Junio	48 hrs.	92 hrs	100%
Preparación de bolsas de víveres*	Febrero-octubre	-	1 hr.	-
Traslado equipo cómputo*	-	-	1 hr.	-
Panel-Foro Rocjá Pomtilá*	-	-	4 hrs.	-
Material INFOUSAC*	-	-	9.5 hrs	-
Total			268.5 hrs	100%

B. Docencia					
Conferencias Loyola-Vermont	27 Febrero	5 hrs.	5 hrs.	100%	
Capacitaciones internas biología molecular	Marzo-Mayo	40 hrs.	81 hrs.	100%	
Docencia por aniversario	Marzo	25 hrs.	10 hrs.	100%	
Capacitaciones disección	Marzo-mayo	12 hrs.	8 hr.	100%	
Elaboración de muestrarios	Mayo-Junio	20 hrs	5 hrs	100%	
Homenaje Lic. Mario Dary*	-	-	1 hr.	-	
Seminario Bioinformática*	-	-	2.5 hrs.	-	
Exposiciones INFOUSAC*	25-28 Abril	-	11.5 hrs.	-	
Total			124 hrs	100%	

392.5 hrs

ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA PRÁCTICA DE EDC

ACTIVIDADES DE SERVICIO

ACTIVIDAD 1: Mantenimiento de las bases de datos digitales.

OBJETIVOS: Contar con una base de datos actualizada y ordenada.

DESCRIPCIÓN: Se actualizaron las bases de datos GENEPO y se creó una nueva para los especímenes de la investigación de EDC a través de la plataforma Google Drive, de manera que los datos recabados sean de fácil acceso.

RESULTADOS: Se actualizó la información ya ingresada en las bases de datos GENEPO y se estableció una base de datos propia con el fin de consultar la información a utilizar durante la fase de investigación.

LIMITACIONES: Ninguna.

ACTIVIDAD 2: Mantenimiento del bioterio.

OBJETIVOS: Mantener limpios y en óptimas condiciones a los ratones de laboratorio que son utilizados para la alimentación de chinches y estudios para el laboratorio.

DESCRIPCIÓN: Se contribuyó con la limpieza del área general del bioterio, las mesas de trabajo y se ordenó el material ubicado en las estanterías, además de apoyar en el mantenimiento de las jaulas de los ratones y alimentación de los mismos.

RESULTADOS: Organización del material ubicado en dos estanterías y limpieza general del área del bioterio.

LIMITACIONES: Ninguna.

ACTIVIDAD 3: Gestión de la Calidad en Laboratorios de Biología Molecular.

OBJETIVOS: Mantener las condiciones ideales de las áreas asignadas para análisis molecular.

DESCRIPCIÓN: Se revisaron cada dos días los deshumificadores de los laboratorios de biología molecular, vaciando el agua en las áreas designadas en caso de encontrar llena la cubeta recolectora de agua. También se realizó un monitoreo de temperaturas de los tres congeladores y del aire acondicionado, registrando estas actividades en las hojas de control de gestión de calidad. Así mismo, mensualmente se realizó una limpieza general de los laboratorios de biología molecular y de las zonas inmediatamente exteriores a éstos para asegurar las condiciones de trabajo ideales en los mismos.

RESULTADOS: Limpieza y mantenimiento de los laboratorios de biología molecular.

LIMITACIONES: Ninguna.

ACTIVIDAD 4: Disección de triatominos.

OBJETIVOS: Apoyar en la disección de especímenes recibidos como producto de las actividades de vigilancia vectorial en diversas aldeas.

DESCRIPCIÓN: Los triatominos colectados fueron enviados vivos en frascos grandes con malla de seda y una cinta elástica para garantizar su supervivencia. Los frascos cuentan con etiquetas preparadas por las familias de aldeas de vigilancia del vector o por personal del Ministerio de Salud. Al encontrarse éstas en el laboratorio, el contenido de los frascos se evaluó visualmente para identificar el estadio del triatolino, tomando las precauciones adecuadas para separar cada espécimen. Los datos necesarios serán anotados en el cuaderno de colección y el espécimen será disectado para lograr la extracción del contenido de la ampolla rectal, que será colocado entre un porta y cubre objetos con solución salina para su observación en un campo microscópico, en el cual se revisará la presencia del parásito *Tripanosoma cruzi*.

RESULTADOS: Observación e identificación de *T. cruzi* en doce especímenes de triatominos examinados.

LIMITACIONES: Ninguna.

ACTIVIDAD 5: Alimentación de chinches.

OBJETIVOS: Mantenimiento del cultivo de chinches vivas, asegurando buenas condiciones de las mismas.

DESCRIPCIÓN: Se alimentaron los triatominos con vida pertenecientes a la colección del LENAP, permitiendo que éstas se alimenten de una rata que fue inmovilizada a través de una malla, sin obstruir la capacidad para respirar de éste. Posteriormente, los triatominos fueron devueltos a su sitio correspondiente en la incubadora y se registró el proceso en las hojas de control y en el cuaderno de control adecuado.

RESULTADOS: Tres alimentaciones exitosas de chinches, registradas adecuadamente en las hojas de control.

LIMITACIONES: Ninguna.

ACTIVIDAD 6: Apoyo en coordinación de actividades del 25 aniversario del LENAP.

OBJETIVOS: Colaborar con la organización de las actividades a realizar, asegurando el cumplimiento de los objetivos de cada actividad.

DESCRIPCIÓN: Se apoyó en la logística de cada actividad, tanto en la elaboración de material didáctico o informativo a utilizar en las mismas, como en listados de asistencia, reparto de material didáctico durante la actividad, elaboración de diplomas, entre otras.

RESULTADOS: Actividades de presentación de investigaciones de biología molecular llevadas a cabo en el LENAP y proyectos elaborados en conjunto con las universidades de Loyola y Vermont coordinados exitosamente.

LIMITACIONES: Ninguna.

ACTIVIDAD 7: Mantenimiento de colecciones de triatominos.

OBJETIVOS: Tener una colección de triatominos en óptimas condiciones.

DESCRIPCIÓN: Se realizó una revisión de cada frasco de la colección de triatominos para asegurar que cada frasco tenga una cantidad adecuada de alcohol y éste se encuentre en buen estado. Se evaluó la condición en la que se encontraba el alcohol, reemplazando el mismo con una solución nueva si la actual presentaba un color amarillento. Además se revisaron las condiciones del organismo, con el fin de comparar éstas con las reportadas en el cuaderno de colección y realizando las anotaciones pertinentes, en caso que las condiciones hayan cambiado. Durante esta actividad también se revisó que los frascos estén sellados con parafilm y las etiquetas de identificación de los mismos. De igual forma, se ingresaron debidamente a las colecciones existentes los organismos enviados por parte de trabajadores del Ministerio de Salud y de familias pertenecientes a diferentes aldeas del país.

RESULTADOS: Hasta 3,000 frascos pertenecientes a la colección revisados y alrededor de 80 organismos ingresados a las colecciones.

LIMITACIONES: Ninguna.

ACTIVIDAD 8: Salida de campo a Almolonga, Jutiapa.

OBJETIVOS: Apoyo en traslado de equipo, toma de datos y organización de material necesario para las giras que campo a realizarse.

DESCRIPCIÓN: Se apoyó en traslado de equipo, toma de datos durante la jornada de serología llevada a cabo durante el viaje de campo, organización del material, revisión del mismo, escaneo y organización de los documentos obtenidos durante el viaje de campo.

RESULTADOS: Se contribuyó en la toma de puntos GPS de 50 casas, además de llenar las fichas epidemiológicas y de consentimiento a 451 personas en dos jornadas completas de trabajo y media jornada durante el último día. Se ordenó, escaneó, engrapó, y nombro los archivos electrónicos de cada ficha epidemiológica y consentimiento presente.

LIMITACIONES: Ninguna.

ACTIVIDADES DE DOCENCIA

ACTIVIDAD 1: Capacitaciones internas sobre habilidades prácticas y teóricas de biología molecular.

OBJETIVOS: Aprender las técnicas necesarias para los procesos a realizar durante el período de EDC, así como el manejo adecuado del equipo y la teoría que fundamenta dichas técnicas.

DESCRIPCIÓN: Se recibieron capacitaciones técnicas y teóricas sobre el uso del equipo y el procedimiento adecuado para la extracción del ADN, fundamentos teóricos necesarios para poner en práctica estos procesos, identificación y resolución de problemas presentados durante los análisis moleculares mediante el

uso de la herramienta Blast y el software Gel Analyzer, capacitaciones en análisis morfométricos y sobre el manejo del equipo utilizado para técnicas de PCR cuantitativo (qPCR). Con los conocimientos adquiridos, se impartieron las bases de las técnicas de biología molecular aplicadas en el laboratorio a 6 estudiantes que se acercaron al laboratorio con el fin de aprender éstas.

RESULTADOS: Introducción a las bases teóricas sobre la biología molecular y los procesos a seguir durante el período de EDC, capacitación en morfometría y en el uso del equipo utilizado para análisis cuantitativos de PCR y 6 capacitaciones impartidas a estudiantes.

LIMITACIONES: Ninguna.

ACTIVIDAD 2: Capacitación sobre las técnicas de disección de triatominos.

OBJETIVOS: Familiarizarse con las técnicas utilizadas para la disección de chinches.

DESCRIPCIÓN: Se recibieron capacitaciones por personal del LENAP acerca de las técnicas adecuadas para la disección de triatominos, identificación del parásito *Trypanosoma cruzi* e identificación del estadio del organismo, así como de los datos a tomar para que éstos sean ingresados a la base de datos posteriormente.

RESULTADOS: Aprendizaje sobre las técnicas de disección de triatominos e identificación de múltiples triatominos infectados con el parásito *T. cruzi*.

LIMITACIONES: Ninguna.

ACTIVIDAD 3: Docencia impartida por investigadoras de la Universidad de Loyola y la Universidad de Vermont.

OBJETIVOS: Conocer sobre los proyectos de investigación y académicos desarrollados en LENAP en conjunto con las Universidades de Vermont y Loyola.

DESCRIPCIÓN: Se participó en la charla impartida por las investigadoras con el fin de familiarizarse con los procesos llevados a cabo en el LENAP. También se proporcionó asistencia a los estudiantes de la Universidad de Loyola que asistieron a las conferencias y se les dio una introducción a las instalaciones de la USAC y los procesos que se siguen dentro de la misma.

RESULTADOS: Participación exitosa en una conferencia y en la guía a los estudiantes de la Universidad de Loyola.

LIMITACIONES: Ninguna.

ACTIVIDAD 4: Docencias por el 25 aniversario del LENAP.

OBJETIVOS: Desarrollar la actividad de la mejor manera posible y contribuir en difundir la información.

DESCRIPCIÓN: Participación en los talleres y charlas realizadas con motivo de celebración del 25 aniversario del LENAP. Se apoyó logísticamente a los expositores de las actividades de exposición de los proyectos llevados a cabo con las universidades de Loyola y Vermont, así como en la presentación de las diferentes investigaciones llevadas a cabo en el LENAP fuera de la temática de la biología molecular.

RESULTADOS: Exposiciones de investigaciones de biología molecular realizadas en el LENAP, así como los proyectos llevados a cabo en conjunto con las universidades de Loyola y Vermont completadas satisfactoriamente, además de participación como oyentes en ambas actividades.

LIMITACIONES: Ninguna.

ACTIVIDAD 5: Elaboración de muestrarios del ciclo de vida de *Triatoma dimidiata*.
OBJETIVOS: Elaboración de muestrarios para que puedan ser expuestos en puestos de salud y hospitales para que la población pueda observar el ciclo de vida de *Triatoma dimidiata*.
DESCRIPCIÓN: Se prepararon múltiples muestrarios representando el ciclo de vida de *T. dimidiata* mediante la preparación de geles, sobre los cuales fueron colocados triatominos en los diferentes estadios que éstos pueden presentar, así como fichas impresas sobre papel transparente con el fin de identificar los mismos.
RESULTADOS: Elaboración de 20 muestrarios del ciclo de vida de *T. dimidiata*.
LIMITACIONES: Localización de los estadios adecuados para los ciclos de vida.

ACTIVIDADES NO PLANIFICADAS

ACTIVIDAD 1: Traslado de equipo de cómputo hacia el bioterio.
OBJETIVOS: Contar con un área de trabajo limpia y ordenada.
DESCRIPCIÓN: Se colaboró con el traslado de equipo que no se encuentra en operación desde las oficinas del LENAP hacia el bioterio, para que éste pudiera ser almacenado y posteriormente procesado para ser dado de baja.
RESULTADOS: Traslado de equipo de cómputo hacia el bioterio y ordenamiento de las oficinas pertenecientes al LENAP.
LIMITACIONES: Ninguna notable.

ACTIVIDAD 2: Participación en el homenaje al Lic. Mario Dary por parte de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
OBJETIVOS: Informarse acerca de la historia de la facultad y la importancia de la biología en Guatemala.
DESCRIPCIÓN: Se participó en el acto de homenaje póstumo al Lic. Mario Dary y el reconocimiento por parte de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia hacia su trabajo por la facultad y la fundación de la Escuela de Biología.
RESULTADOS: Participación exitosa en el acto, sin ningún inconveniente presentado.
LIMITACIONES: Ninguna notable.

ACTIVIDAD 3: Participación en el Seminario “Nuevas perspectivas de apoyo entre la Ingeniería y Medicina en Ciencias de la Salud: Biocomputación clínica e informática biomédica en la investigación del cáncer”, impartida por la Escuela de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ingeniería
OBJETIVOS: Introducirse al área de la Bioinformática y sus aplicaciones en las ciencias biológicas.
DESCRIPCIÓN: Asistencia al seminario impartido por profesionales del área de la bioinformática para introducirse a este campo y conocer acerca de los usos de ésta y cómo puede ser una herramienta útil dentro de los estudios de las ciencias biológicas.
RESULTADOS: Participación exitosa en el seminario impartido sin ningún inconveniente.
LIMITACIONES: Ninguna notable.

ACTIVIDAD 4: Apoyo en la organización del Panel-Foro “Estudios de Impacto Ambiental: Caso Hidroeléctrica en Rocjá Pomtilá”.

OBJETIVOS: Colaborar con la organización de la actividad, asegurando que los objetivos de la misma se cumplan.

DESCRIPCIÓN: Se apoyó en la organización de la actividad, transportando el material a utilizar durante la misma y actuando como redactor de la actividad, registrando las ideas y los comentarios realizados durante la misma.

RESULTADOS: Realización exitosa del Panel-Foro, cumpliendo los objetivos de la misma y entregando la redacción digital de lo mencionado por los panelistas durante la duración de la actividad.

LIMITACIONES: Ninguna.

ACTIVIDAD 5: Participación como expositores y preparación de material de exposición para las actividades de INFOUSAC de la carrera de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

OBJETIVOS: Contar con material suficiente para informar a la comunidad estudiantil de nivel básico con deseos de ingresar a la Universidad de San Carlos acerca de las características de la carrera, áreas de desempeño y oportunidades que ofrece la Escuela de Biología.

DESCRIPCIÓN: Preparación de gafetes, trifoliales informativos, pénsums, carteles informativos y traslado del material a utilizarse durante la actividad hacia las áreas de exposición. También se participó en las actividades de INFOUSAC como expositores del material didáctico presentado por la Escuela de Biología y de la experiencia como estudiantes de la carrera de Biología, así como brindar información acerca de la carrera a las personas que así lo requirieran.

RESULTADOS: Material preparado y trasladado exitosamente hacia las áreas de desarrollo de la actividad. Participación exitosa en las exposiciones, sin ningún inconveniente presentado.

LIMITACIONES: Ninguna.

ACTIVIDAD 6: Elaboración de bolsas de víveres para pacientes que presentan la enfermedad de Chagas.

OBJETIVOS: Preparar bolsas de suplementos nutricionales básicos para ser entregadas a personas que presentan la enfermedad de Chagas y residen en zonas rurales del interior del país.

DESCRIPCIÓN: Se llevó a cabo una organización y preparación de bolsas de víveres que contenían suplementos nutricionales básicos como frijol, arroz, sopa, azúcar, etc., para que éstas pudieran ser entregadas a pacientes de escasos recursos y que residen en zonas rurales en el interior del país.

RESULTADOS: Preparación exitosa de 27 bolsas de víveres para posteriormente ser trasladadas a los vehículos en las cuales serían trasladadas hacia las zonas en las que serán entregadas.

LIMITACIONES: Ninguna.

1 EVALUACIÓN DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS ANÁLISIS DE FUENTES

2 ALIMENTICIAS EN TRIATOMINOS POR MEDIO DE PCR.

3 José Pineda^{1,2}, Elizabeth Solórzano¹, Daniel Penados^{1,2}, Salvador Castellanos¹, Gabriela
4 Rodas¹, Carlota Monroy¹

5 ¹ Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología. Escuela de Biología. Universidad de San Carlos, Ciudad de
6 Guatemala, Guatemala. ² Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad -EDC-, carrera de Biología, Facultad de
7 Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

8 RESUMEN

9 La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, continúa siendo un
10 problema de salud en latinoamérica, ocasionando más de 10,000 muertes por año.

11 Adicionado a esto, los tratamientos pueden tener efectos secundarios severos en los
12 pacientes, lo que puede conllevar el abandono del mismo. Por estos motivos, se ha
13 optado por enfoques holísticos cuya meta es disminuir la transmisión del principal vector
14 para la región centroamericana, *Triatoma dimidiata*, entre los cuales se encuentra el
15 enfoque de Ecosalud. Una de las maneras de evaluar la eficacia de dichos enfoques es la
16 identificación de los hábitos biológicos empleando técnicas moleculares, así como la
17 elaboración de perfiles alimenticios y la evaluación de patrones de infección e infestación.

18 Sin embargo, durante el desarrollo de algunos estudios previos se ha observado que
19 existen porcentajes de detección bajos, establecidos por el porcentaje de insectos a los
20 cuales se les ha detectado como mínimo una fuente alimenticia. Así mismo, también se
21 han determinado niveles de reproducibilidad bajos durante los análisis de fuentes
22 alimenticias. Por lo tanto, el objetivo del siguiente estudio es evaluar las potenciales

23 fuentes de error en dichos análisis para poder así reestandarizar el método de detección
24 de fuentes alimenticias por PCR. Estos resultados serán de mucha utilidad para futuros
25 análisis de detección de fuentes alimenticias en triatominos.

26 **INTRODUCCIÓN**

27 La enfermedad de Chagas es una de las más graves en temas de salud pública en América
28 Latina, pues la WHO estimó en 2017 que existen entre 6 a 7 millones de personas
29 infectadas con esta enfermedad a nivel mundial (WHO, 2017). El 80% de infecciones
30 reportadas son debidas a los vectores del parásito *Trypanosoma cruzi*, con *Triatoma*
31 *dimidiata* como vector principal para Centro América (WHO, 2017; Sanmartino y Crocco,
32 2000).

33 La aplicación de técnicas de control vectorial previenen la infestación de los vectores
34 dentro de las comunidades y los domicilios, entre las cuales están la mejora de vivienda,
35 rociamiento y la educación en las comunidades (Oliveria, 1997). Con el método de
36 rociamiento se han observado casos de reinfestación posteriores a la aplicación de
37 pesticidas (Dumonteil, Ruiz-Piña, Rodríguez-Félix, Barrera-Pérez, Ramírez-Sierra,
38 Rabinovich, Menu, 2004). Así, las técnicas de mejora de vivienda y enseñanza de hábitos
39 saludables están entre las técnicas de control vectorial más recomendadas debido a su
40 alta efectividad en el control del vector (Monroy, Bustamante, Pineda, Rodas, Castro,
41 Ayala, Quiñones y Moguel, 2009; Monroy, 2003; Lucero, Morrissey, Rizzo, Rodas, Garnica,
42 Stevens, Bustamante y Monroy, 2013).

43 Un método para evaluar la efectividad de las técnicas de mejora de vivienda y otros
44 enfoques ecosistémicos para el control vectorial es el estudio de las fuentes alimenticias

45 del vector y de detección de *T. cruzi* por medio de técnicas de PCR (Polymerase Chain
46 Reaction). Estas técnicas permiten determinar las especies de las cuales se han alimentado
47 los triatomos antes y después de aplicar el tratamiento. Así como identificar la presencia
48 del parásito causante de la enfermedad de Chagas en el contenido intestinal del vector
49 (Dorn, Engelke, Rodas, Rosales, Melgar, Brahney, Flores y Monroy, 1999; Pellecer, Dorn,
50 Bustamante, Rodas y Monroy, 2013; Bustamante, Urioste-Stone, Juárez y Pennington,
51 2014).

52 Algunos estudios anteriores llevados a cabo en el Laboratorio de Entomología Aplicada y
53 Parasitología -LENAP- no han presentado resultados consistentes. Se han obtenido
54 porcentajes de detección de fuentes alimenticias bajos en comparación con otros
55 estudios, afectando así el análisis de resultados (Pellecer, et al, 2013). Estos resultados
56 inconsistentes pueden deberse a problemas metodológicos relacionados con inhibidores
57 de la PCR o por contaminación de las muestras durante procesos previos a la
58 amplificación, o bien, debido al bajo número de repeticiones (Fernández-Cuenca, 2004).

59 Algunos procedimientos implican varias repeticiones y sugieren una evaluación de la
60 reproducibilidad y sensibilidad de los resultados, así como la identificación y reducción de
61 las posibles fuentes de error (Poutou, Burbano, Sierra, Torres, Carrascal y Mercado, 2005;
62 Mejía y Triana, 2005). Por las razones anteriormente expuestas, surge la necesidad de
63 llevar a cabo una validación del método utilizado para la detección fuentes alimenticias
64 del vector y del parásito *T. cruzi* mediante técnicas de PCR, y determinar cuáles son los
65 factores que disminuyen la reproducibilidad.

66 Se realizó un análisis del porcentaje de fuentes alimenticias detectadas para las muestras
67 de *T. dimidiata* y *T. nítida* obtenidas en Guatemala, Honduras y El Salvador. El mismo
68 consistió en una amplificación de muestras de ADN previamente extraídas de organismos
69 muestreados en los países anteriormente mencionados. Posterior a esto, se llevó a cabo
70 una electroforesis para detectar alguna fuente alimenticia según la presencia o ausencia
71 de la secuencia de ADN amplificada. Estos resultados fueron contrastados con los
72 resultados obtenidos en estudios anteriores para determinar si existe alguna variación en
73 los mismos.

74 Ante esto, surge la pregunta de cuáles son las principales fuentes de error que
75 comprometen los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR para los análisis de las
76 fuentes alimenticias del vector.

77 Como objetivo principal del estudio se pretende estandarizar la técnica de PCR para los
78 análisis de las fuentes alimenticias del vector, realizando para esto una evaluación de la
79 reproducibilidad de las muestras que presentan inconvenientes en sus resultados
80 mediante múltiples repeticiones de los procesos de PCR aplicados a éstas anteriormente,
81 comparando los resultados obtenidos durante la investigación con los obtenidos
82 previamente y establecer las posibles fuentes de error que podrían propiciar estas
83 diferencias. A través de este estudio se establecerá un procedimiento de evaluación de
84 fuentes alimenticias en triatominos que permita obtener resultados más certeros y
85 confiables.

86 **MATERIALES Y MÉTODOS**

87 *Análisis de reproducibilidad*

88 La reproducibilidad, que consiste en la capacidad de lograr replicar el mismo resultado
89 que en un análisis o estudio previo, fue evaluada a través de 3 repeticiones del proceso de
90 PCR y de análisis electroforético. Éste se orientó hacia las muestras utilizadas en un
91 análisis previo de fuentes alimenticias, donde se presentó una discrepancia en los
92 resultados de las fuentes alimenticias detectadas. El equipo, los reactivos utilizados y los
93 procesos practicados en ambos estudios no presentaron diferencias, salvo el reemplazo
94 de bromuro de etidio por el reactivo SYBR Green como agente intercalante durante la
95 electroforesis.

96 *Análisis de muestras por PCR*

97 El procedimiento de PCR llevado a cabo consistió en la amplificación de las muestras de
98 ADN conservadas en un rango de temperatura de -20 a -25°C, utilizando un cebador
99 diferente para cada fuente analizada (humano, cerdo, gallina, rata, ratón, tacuazín, perro y
100 *T. cruzi*) y controles positivos específicos para cada cebador. Los controles positivos fueron
101 obtenidos de diversas maneras: 1) el control de humano se obtuvo del personal del
102 LENAP, 2) los controles de cerdo y gallina a partir de carne comercial, 3) los controles de
103 rata, ratón y tacuazín fueron obtenidos a partir de muestras de sangre de individuos
104 muestreados en Guatemala, 4) el control de perro fue donado por la Universidad de
105 Vermont de Estados Unidos. A los controles negativos preparados durante el proceso de
106 amplificación se les añadió agua en grado molecular en sustitución del material genético
107 de las muestras. Posterior a la adición del ADN a la mezcla maestra, las muestras fueron
108 amplificadas mediante un termociclador SimpliAmp de la casa comercial Life

109 Technologies. Los ciclos de temperatura específicos para cada fuente alimenticia se
110 encuentran detallados en el Cuadro 2.

111 Al finalizar la amplificación, las muestras con las secuencias amplificadas fueron
112 almacenadas a 4°C hasta llevar a cabo la electroforesis. Posteriormente, se corrieron en
113 una cámara de electroforesis a una carga de 160 voltios. Para esto último se preparó un
114 gel de agarosa al 2% (p/v) utilizando SYBR Green como agente intercalante del ADN y
115 escaleras de 50 pares de bases (pb). Los resultados de la electroforesis fueron visualizados
116 en un transiluminador de la casa comercial Major Science, capturando la imagen de las
117 muestras y analizando las mismas en el software GelAnalyzer 2010a.

118 *Prueba de los cebadores de rata y ratón*

119 Debido al parentesco de la rata y ratón y para evitar sesgos, se llevó a cabo una prueba
120 para determinar la eficiencia del cebador de rata y ratón utilizado durante el estudio. Para
121 esto, se seleccionó una chinche de la colección del LENAP. Dicha chinche se alimentó con
122 rata doméstica albina (*Rattus norvegicus var alba*) y con ratón (*Mus musculus*).

123 Posteriormente, la chinche fue disectada y se extrajo el material genético intestinal
124 (sangre) mediante el kit de extracción DNEasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Esto, para
125 amplificar el ADN obtenido durante este proceso y analizarlo posteriormente mediante
126 una electroforesis en gel de agarosa, identificando si se presentaban resultados positivos
127 para las secuencias de los cebadores de rata y ratón en la muestra obtenida, así como en
128 diluciones 1:5, 1:10 y 1:20 preparadas a partir del material genético extraído.

129 *Análisis estadístico*

130 Para determinar si existe alguna diferencia significativa entre los resultados obtenidos
131 durante el presente estudio y los obtenidos en estudios previos, se llevó a cabo un análisis
132 de chi-cuadrado, donde los resultados obtenidos durante el presente estudio fueron los
133 resultados observados, y los obtenidos previamente como los resultados esperados.
134 Para establecer si existen diferencias significativas entre los porcentajes de detección en
135 las diferentes fuentes alimenticias, en cada repetición, así como para determinar si existe
136 una variabilidad en la reproducibilidad de los análisis durante el estudio, se utilizó un
137 ANOVA. El ANOVA también fue utilizado para detectar variabilidad entre los porcentajes
138 de detección en las diferentes fuentes alimenticias.

139 **RESULTADOS**

140 Se observó un bajo porcentaje de detección, inferior al esperado (Cuadro 1). Si bien en
141 algunas fuentes alimenticias como las de perro y *T. cruzi* se obtuvo un número similar de
142 resultados positivos a los obtenidos previamente, en otras fuentes alimenticias como
143 humano, cerdo y tacuazín el número de positivos resultó significativamente más bajo de lo
144 esperado. Por lo que predominaron los resultados negativos para la evaluación de las
145 fuentes humano, perro, ave, tacuazín, rata y ratón, sin alcanzar las muestras positivas el
146 50% total de muestras analizadas en ninguna fuente alimenticia.
147 Algunas muestras que tuvieron un mínimo de dos resultados positivos también habían
148 sido reportadas como positivas previamente (Cuadro 1). Sin embargo, también se
149 presenta el caso de muestras positivas que previamente habían sido reportadas como
150 negativas en el caso de perro, *T. cruzi* y rata. La muestra Pr1 representa la prueba llevada
151 a cabo para verificar la efectividad de los cebadores de rata y ratón, obteniendo durante

152 ésta un resultado positivo para ambas fuentes alimenticias, así mismo, se obtuvo un
153 resultado positivo para la dilución 1:5 de esta muestra, no siendo así para las diluciones
154 1:10 y 1:20.

155 El número de resultados positivos encontrados durante el presente estudio difiere
156 significativamente de aquellos obtenidos previamente, ($X^2=23.077$; $X_1=14.07$); $gl=7$;
157 $IC=95\%$, $p=0.00151359$ (Serret, 1995, p. 321). Esto se debe principalmente, a la falta de
158 resultados positivos durante los análisis de las fuentes alimenticias de humano y cerdo.

159 No existe diferencia significativa entre los porcentajes de detección presentes en cada una
160 de las repeticiones llevadas a cabo ($p=0.942$, $IC=95\%$). Por otro lado, sí existe una variación
161 significativa entre las fuentes alimenticias ($p=0.0000000445$, 95% de IC). Las diferencias
162 encontradas entre estas fuentes se encuentran en la relación (Humano-Ave, Tacuazín-Ave,
163 *T. cruzi*-Ave, Perro-Cerdo, *T. cruzi*-Cerdo, Perro-Humano, *T. cruzi*-Humano, Perro-Tacuazín,
164 *T. cruzi*-Tacuazín, Rata-Perro, Ratón-Perro, *T. cruzi*-Rata y *T. cruzi*-Ratón; figura 1),
165 encontradas con un posterior análisis de diferencias significativas honestas de Tukey.

166 **DISCUSIÓN**

167 Considerando los resultados negativos obtenidos para las fuentes alimenticias de cerdo,
168 humano, rata y ratón, es posible que se haya dado una degradación de ADN como
169 consecuencia de los continuos procesos de congelación y descongelación del ADN por la
170 acción de nucleasas endógenas, que son inactivadas por las bajas temperaturas (González-
171 Andrade, 2006). De esta manera, la concentración de ADN blanco no sería la adecuada
172 para lograr una amplificación de las secuencias de los cebadores. Algunos autores (Rosero,
173 Gutiérrez, Cienfuegos, Jaramillo y Corre, 2010) recomiendan preservar una alícuota del

174 material genético a temperaturas de -20 o -80°C y realizar los análisis moleculares
175 rápidamente para evitar la degradación del material expuesto a temperatura ambiente.
176 Durante los procesos de amplificación de ADN llevados a cabo no se detectaron
177 problemas recurrentes en la detección de los controles positivos, de manera que se
178 descarta que existiera algún inhibidor de la PCR, entre los cuales podemos mencionar:
179 cantidades elevadas de polisacáridos y compuestos fenólicos que impiden la acción de la
180 ADN polimerasa (Kim, et al, 1997). Así mismo, debido a que se llevó a cabo una
181 amplificación utilizando únicamente controles positivos y negativos, obteniendo los
182 resultados esperados durante estas pruebas, se descartó la presencia de algún inhibidor
183 de la reacción durante el estudio.

184 El resultado positivo obtenido para las diluciones 1:5 realizadas con el ADN extraído
185 durante la prueba llevada a cabo para los cebadores de rata y ratón permitió establecer
186 que a partir del procedimiento de extracción se obtuvo una buena cantidad de ADN para
187 llevar a cabo la amplificación. Durante las pruebas mencionadas, se realizó una búsqueda
188 en BLAST utilizando la secuencia de los cebadores de rata y ratón. Los principales
189 resultados de dicha búsqueda alinearon las secuencias con las especies *Rattus norvegicus*
190 y *Mus musculus*, respectivamente. Ambas especies se encuentran distribuidas en
191 Guatemala (Puckett, et al, 2016; Goodwin y Larson, 1955), sin embargo, es necesario
192 esclarecer futuramente si dichas especies han sido reportadas en las áreas de estudio.

193 Al no encontrar diferencias significativas entre las repeticiones, se considera que el
194 método llevado a cabo no es el causante de las diferencias entre los resultados obtenidos
195 con los logrados por el análisis previo de fuentes alimenticias. Además, esto permite

196 establecer que un total de 3 repeticiones es un número adecuado para el análisis de
197 fuentes alimenticias, ya que algunas muestras obtuvieron un resultado positivo en una de
198 las repeticiones, mientras que para el resto de repeticiones el resultado fue negativo. Esto
199 se debe, posiblemente, a una contaminación durante el procedimiento de amplificación o
200 durante la electroforesis llevada a cabo para determinar la presencia de las bandas de
201 ADN.

202 Se recomienda realizar pruebas de detección similares a las llevadas a cabo para los
203 cebadores de rata y ratón, para establecer si existe una detección positiva con los
204 cebadores utilizados actualmente, así mismo, se recomienda realizar alícuotas del
205 material genético para mantener diversas de éstas en stock.

206 **CONCLUSIONES**

207 Los continuos ciclos de congelación y descongelación de las muestras pueden ser los
208 causantes de los resultados negativos al degradar continuamente el ADN durante éstos.

209 No se detectó la presencia de algún inhibidor de la PCR durante el estudio.

210 Las cantidades de ADN obtenidas mediante los kits de extracción utilizados para obtener
211 el material genético son suficientes para ser detectadas por una prueba de electroforesis
212 en gel de agarosa al 2%.

213 No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de detección en las
214 diferentes repeticiones, estableciendo así que el procedimiento llevado a cabo es el
215 adecuado para el análisis de fuentes alimenticias por PCR.

216 **AGRADECIMIENTOS**

217 A Elisa Laparra y Mauricio Blanco por su ayuda durante el análisis de las muestras.

218 **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 219 Bustamante, D. M., De Urioste-Stone, S. M., Juárez, J. G. y Pennington, P. M. (2014).
220 Ecological, social and biological risk factors for continued *Trypanosoma cruzi*
221 transmission by *Triatoma dimidiata* in Guatemala. *PLoS One*, 9(8), e104599.
- 222 Dorn, P. L., Engelke, D., Rodas, A., Rosales, R., Melgar, S., Brahney, B., Flores, J. y
223 Monroy, C. (1999). Utility of the Polymerase Chain Reaction in Detection of
224 *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. *The American*
225 *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(5), 740-745.
- 226 Dumonteil, E., Ruiz-Piña, H., Rodríguez-Félix, E., Barrera-Pérez, M., Ramírez-Sierra, M.
227 J., Rabinovich, J. y Menu, F. (2004). Re-infestation of houses by *Triatoma*
228 *dimidiata* after intra-domicile insecticide application in the Yucatán peninsula,
229 México. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(3), 253-256.
- 230 Fernández-Cuenca, F. (2004). Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología
231 molecular de las enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y*
232 *Microbiología Clínica*, 22(6), 355-360.
- 233 González-Andrade, F. (2006). Ensayos médicos sobre genética: la genética molecular
234 en la medicina ecuatoriana. Quito: Imprenta Noción.
- 235 Goodwin, G. y Larson, T. (1955). Mammals from Guatemala: with the description of a
236 new little brown bat. *American Museum novitates*, 1744.
- 237 Kim, C., Lee, C., Shin, J., Chung, Y. y Hyung, N. (1997). A simple and rapid method for
238 isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP.
239 *Nucleic Acid Research*, 25, 1085-1086.

240 Lucero, D. E., Morrissey, L. A., Rizzo, D. M., Rodas, A., Garnica, R., Stevens, L.,
241 Bustamante, D. M. y Monroy, M. C. (2013). Ecohealth Interventions Limit
242 Triatomine Reinfestation following Insecticide Spraying in La Brea, Guatemala.
243 *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(4), 630-637.

244 Mejía, A. M. y Triana, O. (2005). Análisis por LSSP-PCR de la variabilidad genética de
245 *Trypanosoma cruzi* en sangre y órganos de ratones. *Biomedica*, 25(1), 76-86.

246 Monroy, M. C. (2003). *Ecology and Control of Triatomine (Hemiptera: Reduviidae)*
247 *Vectors of Chagas Disease in Guatemala, Central America*. Tesis de doctorado.
248 Acta Universitatis Upsaliensis: Suecia.

249 Monroy, C., Bustamante, D. M., Pineda, S., Rodas, A., Castro, X., Ayala, V., Quiñones,
250 J. y Moguel, B. (2009). House improvements and community participation in
251 the control of *Triatoma dimidiata* re-infestation in Jutiapa, Guatemala.
252 *Cadernos de Saúde Pública*, 25, S168-S178.

253 Oliveira, A. M. (1997). Uso de nuevas herramientas para el control de triatominos en
254 diferentes situaciones entomológicas en el continente americano. *Revista da*
255 *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(1), 41-46.

256 Pellecer, M. J., Dorn, P. L., Bustamante, D. M., Rodas, A. y Monroy, C. (2013). Vector
257 Blood Meals Are an Early Indicator of the Effectiveness of the Ecohealth
258 Approach in Halting Chagas Transmission in Guatemala. *The American Journal*
259 *of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(4), 638-644.

260 Poutou, R., Burbano, M., Sierra, S., Torres, K., Carrascal, A. K. y Mercado, M. (2005).
261 Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para

79						1	0		
85						1	1		
86						1	1		
95						1	1		
102				1	0				
104				1	1				
106				1	1				
109				1	1				
128				1	1				
146				1	0				
149				1	0				
168						1	1		
S76						1	1		
S82						1	1		
S83						1	1		
S87						1	1		
S88						1	1		
S93						1	1		
S96						1	1		
S135						1	0		
Pr1							1	1	
Pr1 1:5							1	1	
Pr1 1:10							0	0	

Pr1 1:20							0	-	0	-
-------------	--	--	--	--	--	--	---	---	---	---

277

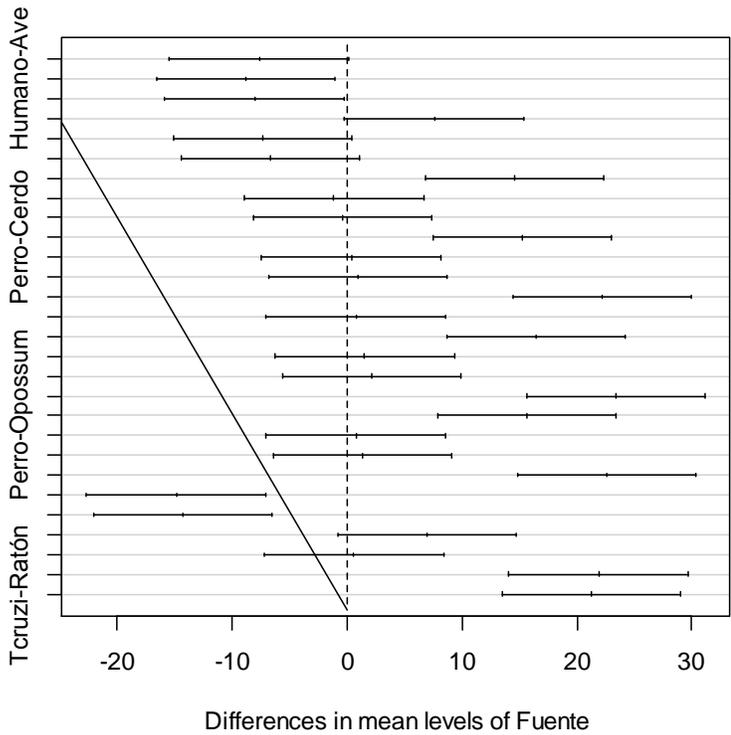
278 Cuadro 2. Protocolos de las fuentes alimenticias utilizados en el termociclador.

Cebador	Primera etapa	Segunda etapa			Ciclos	Tercera etapa
Ave	95°C/2 min.	95°C/30 segs.	55°C/30 segs.	72°C/45 segs.	30	72°C/5 min.
Cerdo	92°C/2 min.	95°C/30 segs.	61°C/30 segs.	72°C/45 segs.	30	72°C/5 min.
Humano	94°C/2 min.	95°C/15 segs.	61°C/1 min.	61°C/1 min.	40	72°C/5 min.
Perro	94°C/2 min.	95°C/30 segs.	60°C/30 segs.	72°C/20 segs.	30	72°C/5 mins.
Rata-ratón	95°C/10 min.	95°C/30 segs.	58°C/30 segs.	72°C/30 segs.	30	72°C/5 min.
T. cruzi	95°C/2 min.	95°C/20 segs.	55°C/10 segs.	72°C/30 segs.	30	72°C/7 min.
Tacuazín						

279

280 Figura 1. Prueba de diferencias significativas honestas de Tukey sobre las fuentes alimenticias.

95% family-wise confidence level



281

282 La figura representa las diferencias encontradas entre las medias, siendo significativas aquellas

283 cuyo rango no pasa por un valor de 0.

284

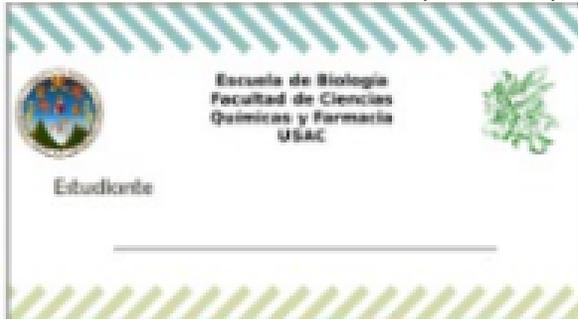
285

286

287 Revista seleccionada: PLOS ONE. <http://journals.plos.org/plosone/>

ANEXOS

Anexo 1. Gafete elaborado para los expositores durante la actividad de INFOUSAC



Anexo 2. Diplomas diseñados para la entrega a los expositores y participantes durante el Seminario de Investigaciones de EDC. A) Diploma entregado a los expositores. B) Diploma entregado a los participantes en la actividad

A)



B)



Lenap

Otorga el presente diploma a:

Alejandra Mejía

Por su participación en la actividad de Preeniversario del LENAP, con el tema: " Usos de técnicas moleculares en el Estudio de la Biodiversidad".

Licda. Antonieta Rodas
Coordinadora

M. Sc. Elizabeth Solorzano
Investigadora

C)

Lenap

25 Aniversario

Cordialmente los invitamos a asistir a las exposiciones de investigaciones sobre aplicaciones de métodos moleculares en estudios de la biodiversidad realizadas en LENAP como preámbulo a las actividades de aniversario.

Expositores:

Dr. Sergio Melgar

MSc. Eunice Enriquez

Licda. Gabriela Amos

Salón audiovisuales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia 7^{er} Nivel 711

31.5.17 10:00 AM



