

Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación
Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas



Informe final

Efectos de la pérdida de bosque sobre enfermedades arbovirales

Equipo de investigación

Dra. Michelle Bustamante
Coordinadora del Proyecto

Rony Alberto García Anleu
Investigador I

Luis Fernando Guerra Corado
Investigador I

Guatemala, 28 de febrero de 2021

Instituto de Investigaciones del Centro Universitario de Zacapa
Wildlife Conservation Society - Programa para Guatemala
Virginia Tech

Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Dr. Manuel Barrios Izás
Coordinador del Programa de Investigación

Dra. Michelle Bustamante Castillo
Coordinadora del proyecto

MSc. Rony Alberto García Anleu
Investigador I

MSc. Luis Fernando Guerra
Investigador I

Otros colaboradores

MSc. Carlos Montenegro Quiñonez, Centro Universitario de Zacapa
Dr. Manuel A. Barrios Izás, Centro Universitario de Zacapa
Dr. Luis Escobar, Virginia Tech
Dra. Gillian Eastwood, Virginia Tech
Dr. Mathew Miller, University of Oklahoma

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2020. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores. Se libera bajo licencia creative commons 4.0

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 4.8.63.4.41. durante el año 2020 en el Programa Universitario de Investigación de Ciencias Básicas

Índice

Contenido

1. <i>Resumen</i>	6
2. <i>Palabras clave</i>	6
3. <i>Abstract</i>	7
4. <i>Keywords</i>	7
5. <i>Introducción</i>	8
6. <i>Planteamiento del problema</i>	9
8. <i>Delimitación en tiempo y espacio</i>	11
9. <i>Marco teórico</i>	12
10. <i>Estado del arte</i>	14
11. <i>Objetivo general</i>	18
12. <i>Objetivos específicos</i>	18
13. <i>Hipótesis</i>	18
14. <i>Materiales y métodos</i>	18
15. <i>Vinculación, difusión y divulgación</i>	22
16. <i>Productos, hallazgos, conocimientos o resultados</i>	23
17. <i>Análisis y discusión de resultados</i>	35
18. <i>Conclusiones</i>	36
19. <i>Impacto esperado</i>	37
20. <i>Referencias</i>	38
21. <i>Anexos</i>	46

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Coordenadas de los sitios de muestreo</i>.....	17
Tabla 2. <i>Operacionalización de las variables o unidades de análisis</i>.....	19

Índice de Figuras

<i>Figura 1. Esquema simplificado de los impactos de la deforestación.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2. Zonas de pérdida de bosque.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 3. Cambio de la Cobertura Forestal en la Laguna del Tigre.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 4. Índice de vegetación Mejorado (EVI) en Minnesota.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 5. Dendrograma UPMGA de los sitios de muestreo con base en la composición de vectores arbovirales (Diptera: Culicidae).....</i>	<i>21</i>

Efectos de la Pérdida de Bosque Sobre Enfermedades Arbovirales

1. Resumen

La disminución en la biodiversidad es un facilitador directo del aumento de riesgo a enfermedades infecciosas al disminuir el llamado *efecto de dilución*. Así, las enfermedades transmitidas por vectores son particularmente favorecidas por perturbación de los ecosistemas. Petén actualmente sufre una acelerada deforestación que ha alcanzado a la Laguna del Tigre. Los objetivos de esta investigación son (i) determinar la asociación entre un gradiente de deforestación, la presencia de vectores de enfermedades y la diversidad de especies para evaluar el efecto de dilución y (ii) estandarizar un método de biología molecular para determinar la presencia de patógenos de enfermedades vectoriales. En el presente estudio se colectaron mosquitos utilizando trampas BG cebadas, las trampas se colocaron dentro de la selva maya, en el borde de la selva y en casas rurales. A lo largo del gradiente de perturbación en el Parque Nacional Laguna del Tigre se colectaron 845 individuos de Culicidae, entre los que se encuentran los géneros *Aedes* (38%), *Anopheles* (25%), *Coquillettidia* (32%), *Culex* (5%) y *Toxorhynchites* (0.2%). De acuerdo con el análisis de agrupamiento (UPMGA) se puede determinar que no hay segregación en la distribución de los géneros de culicidae entre las áreas selváticas y las áreas degradadas, esto es importante en salud pública debido a que implica que se pueden establecer ciclos virales entre los hospederos selváticos y las poblaciones humanas rurales. Finalmente, se elaboró un protocolo de colecta, retrotranscripción, amplificación y verificación en geles de agarosa.

2. Palabras clave

Conservación; Biodiversidad; Efecto dilución; Laguna del Tigre; Enfermedades tropicales.

3. Abstract

The decrease in biodiversity is a direct facilitator of the increased risk of infectious diseases by reducing the so-called dilution effect. Thus, vector-borne diseases are particularly favored by disturbance of ecosystems. Petén is currently experiencing accelerated deforestation that has reached Laguna del Tigre. Loss of habitat and biodiversity is an ideal scenario to assess whether the dilution effect is consistent with disease vectors in tropical areas. The objectives of this research are (i) to determine the association between a deforestation gradient, the presence of disease vectors and species diversity to evaluate the dilution effect and (ii) to standardize a molecular biology method to determine the presence of vector disease pathogens. Along the disturbance gradient in Laguna del Tigre National Park are 845 individuals of Culicidae, among which are the genera *Aedes* (38%), *Anopheles* (25%), *Coquillettidia* (32%), *Culex* (5%) and *Toxorhynchites* (0.2%). According to the grouping analysis, it can be determined that there is no segregation in the distribution of Culicidae genera between jungle areas and degraded areas, this is important in public health because it implies that viral cycles can be established between the hosts jungle and rural human populations. The study of viruses implies the use of molecular techniques for their detection and quantification, for which a protocol for collection, back transcription, amplification, and verification in agarose gels has been designed.

4. Keywords

Conservation; Biodiversity; Dilution Effect; Laguna del Tigre; Tropical Diseases.

5. Introducción

Globalmente se reconoce que la pérdida y destrucción del hábitat es una de las principales amenazas para la biodiversidad (Sodhi & Ehrlich 2010). Guatemala es parte de Mesoamérica, región que está considerada como uno de los núcleos de alta biodiversidad del mundo (Myers y colaboradores 2000). Este núcleo de biodiversidad también sufre de conflictos entre los esfuerzos por conservación versus la sobrepoblación humana, pobreza y difícil acceso a salud de los asentamientos que rodean las zonas de conservación (Cincottay colaboradores, 2000).

La pobreza y falta de oportunidades en Guatemala facilitan invasiones por asentamientos ilegales en las áreas protegidas. Las invasiones ilegales generan sobreexplotación de las especies silvestres con fines de subsistencia alimenticia o comercio, contaminación, introducción de especies invasoras y pérdida de selva (Deem y colaboradores, 2001; Lepe-López y colaboradores, 2018). La pérdida de cobertura forestal también reduce los servicios ecosistémicos de las áreas naturales.

En Guatemala, la pérdida de cobertura forestal es particularmente dramática en Petén, en donde aún se encuentran los últimos remanentes de bosque nativo de tierras bajas, mientras zonas del sur de Guatemala muestran menor deforestación pues ya se ha reemplazado el bosque nativo por zonas de cultivo. Un estudio reciente en Petén reveló que especies clave de interés para la conservación, como el jaguar (*Pantera onca*), se ven particularmente amenazadas por la pérdida de hábitat (Colcheroy colaboradores, 2011). El jaguar se ha extirpado en casi el 80% de su rango histórico (Wultschy colaboradores, 2016) y esta pérdida de cobertura vegetal no solo afecta a esta especie en Guatemala, sino que interrumpe los esfuerzos internacionales conservación que plantean la generación de corredores verdes en Mesoamérica. De hecho, el flujo genético del jaguar entre el norte y sur de Mesoamérica se ve interrumpido precisamente en Guatemala (Wultschy colaboradores, 2016).

En un contexto de servicios ecosistémicos, la deforestación en Petén puede afectar la calidad de vida de las comunidades humanas. Por ejemplo, se ha demostrado que la deforestación en Petén ha cambiado el microclima local con reducciones de humedad y aumentos de temperatura de

entre 4 y 8 °C de zonas deforestadas comparadas con zonas con cobertura forestal, aumentando los riesgos de sequía (Manoharany colaboradores, 2009). La deforestación también puede afectar negativamente a la salud pública al aumentar la incidencia de enfermedades infecciosas. Enfermedades infecciosas que se favorecen con la deforestación incluyen enfermedades vectoriales como Leishmaniasis, enfermedad de Lyme, *Schistosomiasis*, Malaria, virus del oeste del Nilo, enfermedad de Chagas, Oncocercosis, fiebre Oropuche, entre otras (Patz colaboradores, 2000; Pongsiriy colaboradores, 2009; Romero-Alvarez and Escobar 2017b). Pero, la exploración de estos efectos no ha considerado directamente la hipótesis del efecto de dilución (ver abajo) y poco se sabe de la magnitud de deforestación necesaria para facilitar el apareamiento de enfermedades vectoriales

6. Planteamiento del problema

Según teorías ecológicas, un ecosistema saludable tiene alta biodiversidad y disminuye la incidencia de enfermedades en un fenómeno denominado efecto de dilución (Ostfeld and Keesing 2000; Schmidt and Ostfeld 2001). Es decir, alta biodiversidad, expresada como la presencia de muchas especies silvestres, diluye o disminuye la prevalencia de una enfermedad infecciosa, mientras la disminución de la biodiversidad incrementaría la prevalencia de la enfermedad (Estrada-Peñay colaboradores, 2014). El efecto de dilución puede ser cuantificado a través del establecimiento de la asociación entre el incremento biodiversidad y la prevalencia de un vector o una enfermedad vectorial. De hecho, determinar si la deforestación ha facilitado el aumento de vectores de enfermedades puede permitir desarrollar sistemas de alerta temprana, identificar potenciales sitios de riesgo de transmisión de enfermedades (Romero-Alvarez and Escobar 2017b,a), abastecer adecuadamente centros de salud locales, desarrollar programas de educación específicos y justificar la protección de las áreas naturales bajo el un enfoque de una salud (King 2014). Por ejemplo, la **Figura 1** (modificada de Romero-Alvarez and Escobar 2017a) muestra que en un ecosistema saludable (i.e., sin perturbación a la naturaleza) los vectores se alimentan de una gran diversidad de hospederos silvestres que pueden no ser susceptible a los parásitos transmitidos por los vectores, interrumpiendo el ciclo de la enfermedad (e.g., mosquito alimentándose de iguana; izquierda-abajo **Fig. 1**). Sin embargo, cuando hay perturbación del ecosistema (medio **Fig. 1**) habrá afectos en cascada que pueden ser perjudiciales para la salud humana. La perturbación del ecosistema puede disminuir la

biodiversidad y reemplazar las presas silvestres de los mosquitos por humanos (e.g., asentamiento humano al borde de la selva). Esto aumentaría la transmisión de enfermedades hacia humanos (e.g., mosquito en borde de bosque alimentándose de humano; derecha-abajo **Fig. 1**). Bajo este escenario, la deforestación y asentamientos ilegales en áreas protegidas de Petén son zonas de riesgo para el apareamiento de brotes de enfermedades vectoriales. De hecho, en Petén se han reportado epidemias de Dengue, Chikungunya y Zika virus (Lepe-Lopez y colaboradores, 2017). Sin embargo, no se ha explorado a detalle las zonas y mecanismos ecológicos que pueden facilitar el riesgo de epidemias de enfermedades transmitidas por vectores.

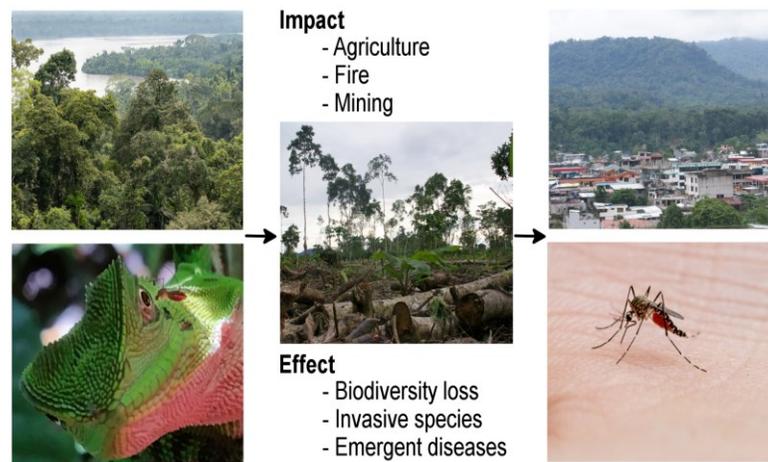


Fig. 1. Esquema simplificado de los impactos de la deforestación.

7. Preguntas de investigación

Esta investigación se basó por cuatro preguntas de investigación: ¿Cuáles son los patrones espaciales y temporales de deforestación en el área protegida Laguna del Tigre? ¿Existe un cambio en la presencia de vectores debido al efecto de borde? ¿La pérdida de bosque aumenta las probabilidades de encontrar enfermedades vectoriales? ¿Hay asociación entre la pérdida de biodiversidad y el aumento de riesgo de enfermedades vectoriales en zonas tropicales? ¿La presencia de una enfermedad vectorial es facilitada por la degradación del hábitat y cambios en las comunidades de vectores? Responder a estas preguntas permitirá cambiar el enfoque actual de conservación en áreas protegidas en Guatemala hacia un enfoque más integral y sostenible que considere la salud de poblaciones humanas más vulnerables. En un contexto más teórico,

nuestros resultados buscan ayudar a clarificar cómo la perturbación de un ecosistema puede estar asociado a enfermedades infecciosas en humanos.

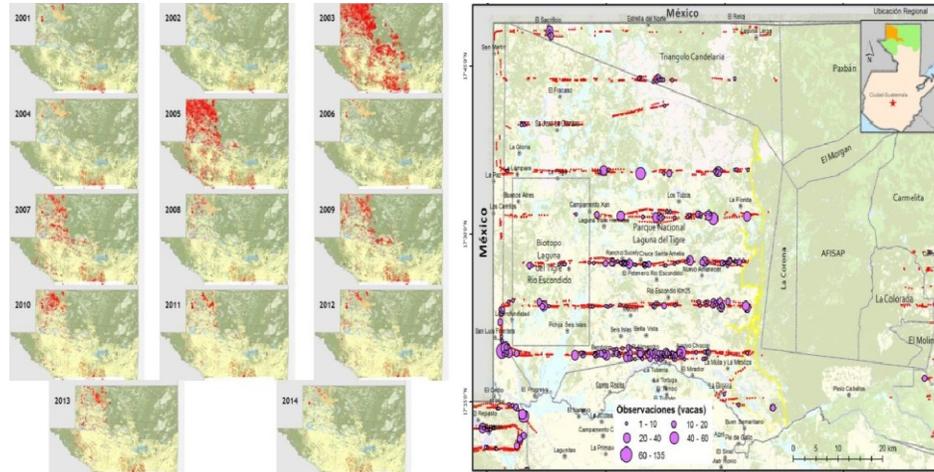


Fig. 2. Zonas de pérdida de bosque. Izquierda: Incendios (rojo) en Petén entre 2001-2014. Derecha: Inserción ilegal de ganado dentro de Laguna del Tigre 2001-2015 (puntos púrpura). Fuente: ADDIN CSL:"Mexico:"Incendios provocados para avance de frontera agrícola: gran peligro para Reserva de Riósfera Maya"

8. Delimitación en tiempo y espacio

Delimitación en tiempo: el estudio se llevó a cabo de febrero a diciembre del 2020, la fase de campo inició en abril y la fase de laboratorio se llevó a cabo en octubre 2020.

Delimitación espacial: en este estudio, la Laguna del Tigre es el escenario ideal para el monitoreo de deforestación en el norte de Guatemala. Las zonas de consistente deforestación en Laguna del Tigre (**Fig. 2**, en azul) fueron evaluadas para determinar la prevalencia de vectores de enfermedades a los cambios de cobertura forestal

9. Marco teórico

Petén sufre actualmente de una acelerada tasa de deforestación incluso dentro de áreas nacionales protegidas (Bray y colaboradores, 2008). La ausencia de literatura científica revisada-por-pares evaluando la pérdida de bosque dentro de áreas protegidas en Guatemala, hace difícil respaldar los esfuerzos por canalizar recursos locales e internacionales para la conservación e investigación. De hecho, el último manuscrito científico basado en un estudio longitudinal de deforestación concluye con que la Reserva de la Biosfera Maya sí protege a la biodiversidad pues no reportó deforestación dentro de sus límites (Sadery colaboradores, 1994).

La deforestación y consecuente pérdida de hábitat y biodiversidad es un facilitador directo del aumento de riesgo a enfermedades infecciosas. Enfermedades vectoriales como Leishmaniasis, enfermedad de Chagas, Malaria, Chikungunya, Zika, y Dengue han sido reportadas en Guatemala. Sin embargo, miembros de este proyecto han encontrado que los reportes epidemiológicos de las instituciones de salud en Guatemala, basados en vigilancia epidemiológica pasiva, en general subestiman la incidencia de enfermedades vectoriales (Escobary colaboradores, 2016), lo que puede resultar en una inadecuada respuesta de las agencias de salud a una epidemia (Romero-Alvarez y colaboradores, 2017). Por lo tanto, es importante generar monitoreo epidemiológico activo de enfermedades vectoriales para generar más y mejor información epidemiológica para Guatemala.

En un enfoque local, al menos 34 asentamientos humanos ilegales se suponen dentro de la reserva Laguna del Tigre (García Anleu, *com. pers.* Marzo 28, 2019). A esto debe sumarse las poblaciones estacionales de campesinos y ganaderos que buscan trabajar la tierra ilegalmente y el tránsito de inmigrantes ilegales hacia Estados Unidos. Estas poblaciones pueden ser consideradas vulnerables por su condición de pobreza, aislamiento geográfico, falta de educación y falta de acceso a salud inmediata. Si la deforestación de Laguna del Tigre facilita la presencia de vectores de enfermedad, las poblaciones humanas dentro de la reserva pueden considerarse en riesgo. Sin embargo, poco se sabe actualmente del riesgo de transmisión de enfermedades en esta zona. Así, un primer paso es determinar la distribución y magnitud del riesgo de enfermedades vectoriales dentro estos cambios al ecosistema de Laguna del Tigre.

En un enfoque global, la reciente y sostenida pérdida de bosque en Laguna del Tigre generan un escenario ideal que permite estudiar como la deforestación afecta la presencia de enfermedades vectoriales. Específicamente, esta investigación determina cómo el efecto de borde está asociado a cambio de biodiversidad y presencia de vectores y patógenos de enfermedades vectoriales. Con esta información, se pretende generar teorías ecológicas que apoyen o contradigan la hipótesis del efecto de dilución en ecosistemas tropicales.

Los virus del Dengue (DENV), Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV) y Fiebre Amarilla se reconocen como virus de alta importancia para la salud humana ya que a pesar de su origen selvático, son capaces de sostenerse en ambientes antropogénicos con infecciones humano-mosquito-humano (Gregory et al., 2017).

El dengue es una de las principales enfermedades virales de mayor importancia transmitidas por mosquitos, especialmente por *Aedes aegypti* y *A. albopictus* (Benedict et al., 2007; Hotta, 1998; Lambrechts et al., 2010; Mitchell, 1995). El DENV pertenece al género *Flavivirus* y se reconocen cuatro serotipos antigénicos diferentes del virus del dengue que se distribuyen a lo largo de los trópicos y subtropicos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) (Chen & Vasilakis, 2011). El virus del Dengue además de hospedarse otros mamíferos tales como primates ó murciélagos (Althouse et al., 2012; Vasilakis et al., 2007, 2011; Vicente-Santos et al., 2017).

El ZIKV fue caracterizado por primera vez en *Aedes africanus* en estudios de arbovirus en el dosel de las selvas africanas, en su ciclo selvático el virus del Zika circula en primates no humanos y especies de *Aedes*. Se han reportado anticuerpos de ZIKV en ovejas, cabras, caballos, vacas, patos, roedores, murciélagos, orangutanes y cárbos (Vorou, 2016). El ZIKV pertenece a la familia Flaviviridae y está compuesto por una una cadena de ARN de alrededor de 11 kb (Alvarez et al., 2005; Kuno & Chang, 2007).

El CHIKV es un *Alfavirus* perteneciente a la familia Togaviridae, está compuesto por una cadena de ARN corta de cerca de 11.8 kb. Este virus fue reportado por primera vez en Tanzania en 1952, en las últimas dos décadas se dispersado por Europa, Asia y América causando

problemas epidemiológicos (Johansson et al., 2014; Schuffenecker et al., 2006). El CHIKV puede transmitirse a través de los mosquitos *A. aegypti* y *A. albopictus*. Su ciclo de vida puede ser enzoótico selvático o bien epidémico urbano. Los hospederos del ciclo selvático incluyen a primates no humanos, roedores y aves, entre otros, y los vectores son especies del género *Aedes* (Apandi et al., 2009; Caglioti et al., 2013; Lambrechts et al., 2010).

La Fiebre amarilla es un *Flavivirus* compuesto por ARN, sus principales vectores son mosquitos de los géneros *Aedes* y *Haemagogus*. La transmisión del virus de la fiebre amarilla puede llevarse a cabo en un ciclo selvático, en un ciclo intermedio o bien en un ciclo urbano. En el ciclo selvático la transmisión se lleva a cabo de los mosquitos de los géneros *Aedes*, *Haemagogus* y *Sabethes* a primates no humanos. El ciclo intermedio ocurre en las Sabanas en donde intervienen mosquitos semidomésticos de *Aedes* y como hospederos humanos o primates no humanos. Y en el ciclo urbano interviene el mosquito *A. aegypti* como vector y los humanos como hospederos.

10. Estado del arte

La deforestación de Petén es un proceso relativamente nuevo, iniciado finales de los años 80's luego del mejoramiento de las carreteras entre Ciudad Guatemala y Petén (Sadery colaboradores, 1994). Esto facilitó el flujo de personas generando parches de asentamientos humanos y una explosiva expansión de la ganadería y agricultura en la zona. En consecuencia, a inicios de la década de los 90's Petén era parte de las zonas con más acelerada deforestación en el mundo (Sadery colaboradores, 1994). Los esfuerzos por reducir la deforestación resultaron en la creación de la Reserva de la Biosfera Maya en 1990 en un acuerdo entre México, Guatemala y Belice. Esta área natural protegió efectivamente a la selva a inicios de los noventa debido principalmente a la inaccesibilidad de la zona (Sadery colaboradores, 1994). Sin embargo, recientemente, el acceso a esta región se ha facilitado y como resultado la Reserva de la Biosfera Maya en la región de Guatemala hoy sufre de una acelerada deforestación similar a la deforestación en áreas no protegidas en la década de los 90's. Según autoridades de conservación en Guatemala, la deforestación en forma de tala o incendios intencionales busca acaparar tierras para generar tierras de cultivo y ganadería (Prensa Libre

2017). De hecho, en los últimos años se ha declarado alerta roja por la deforestación causada por incendios en Laguna del Tigre (Escobar and Cordero 2017) (**Fig. 2, Anexo 2**).

El parque Nacional Laguna del Tigre, zona núcleo de la Reserva de la Biosfera Maya, tiene un poco más de 290,000 hectáreas. Por sus características biogeográficas, esta área protegida debería ser una de las joyas mejor guardadas en temas de conservación en Guatemala. Sin embargo, para esta propuesta nosotros exploramos preliminarmente la tasa de deforestación en el parque Laguna del Tigre entre 2000 y 2015 (**Fig. 3**). Utilizando imágenes de satélite, Landsat 30 mt resolución espacial basadas en información de la estructura de la vegetación (Hanseny colaboradores, 2013), encontramos que en la zona efectiva de protección en Laguna del Tigre (polígono irregular línea blanca en **Fig. 3**) incluyendo el Biotopo Laguna del Tigre en Río Escondido (cuadrado blanco inserto en **Fig. 3**) existe una activa y extensa deforestación dentro de la reserva. La **Figura 3** muestra claramente las zonas sin cambio entre 2000 y 2015 (negro), zonas con deforestación entre 2001-2002 (amarillo) o entre 2014-2015 (azul) denotando un patrón de expansión periférica que abarca toda el área protegida con un especial foco de deforestación en la región del corredor sureste en el área de Paso Caballos (flecha, **Fig. 3**).

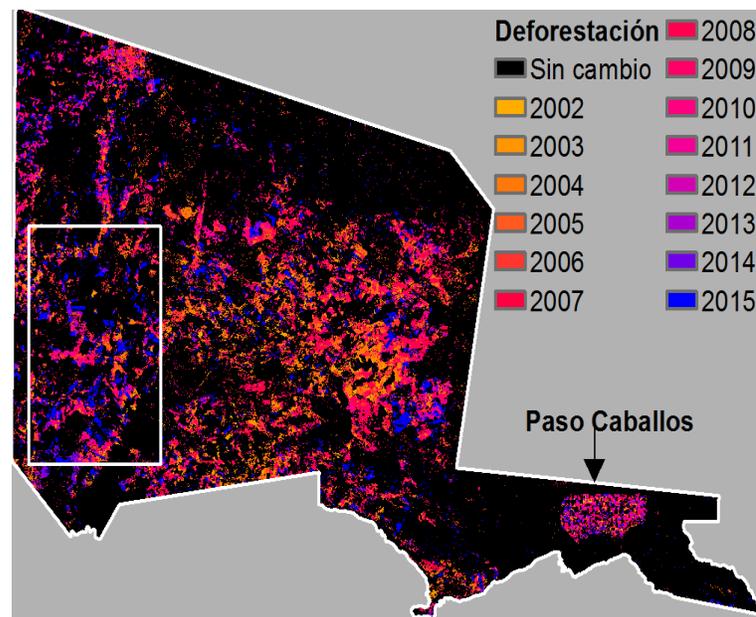


Fig. 3 Cambio de la cobertura forestal en la Laguna del Tigre.

Las imágenes de satélite han permitido estudiar zonas extensas en corto tiempo y a bajo costo. Las variables más utilizadas en ecología incluyen índices de vegetación, pues brindan información sobre la temperatura, humedad del suelo, riqueza y abundancia de fauna, condiciones de suelo y patrones de cambio en el uso del suelo (Horning y colaboradores, 2010). Uno de los índices de vegetación más utilizados por la comunidad científica debido a cobertura temporal e información contenida es el normalized difference vegetation index (NDVI). El NDVI muestra una fuerte asociación con variables bióticas y abióticas (e.g., biodiversidad y precipitación) (Pettorelly y colaboradores, 2005). En años recientes se ha comenzado a utilizar el índice EVI (Enhanced Vegetation Index), que incluye correcciones de ruido atmosférico y más detalle en de cambios sutiles de vegetación en zonas con alta biomasa como Petén (Horning y colaboradores, 2010). La **Figura 4**, tomada de Escobary colaboradores, (*en prep.*) muestra el uso de EVI para comparar cambios en la cobertura forestal en el área protegida Grand Portage en el norte de Minnesota, Estados Unidos. En este estudio, el alto detalle en los valores de EVI permitió desarrollar análisis de series de tiempo para entender como la estructura de la vegetación varía entre primavera (Abril), verano (Julio) y otoño (Octubre), información que es hoy utilizada para la conservación de alces (*Alces alces*), osos negros (*Ursus americanus*) y lobos (*Canis lupus*).

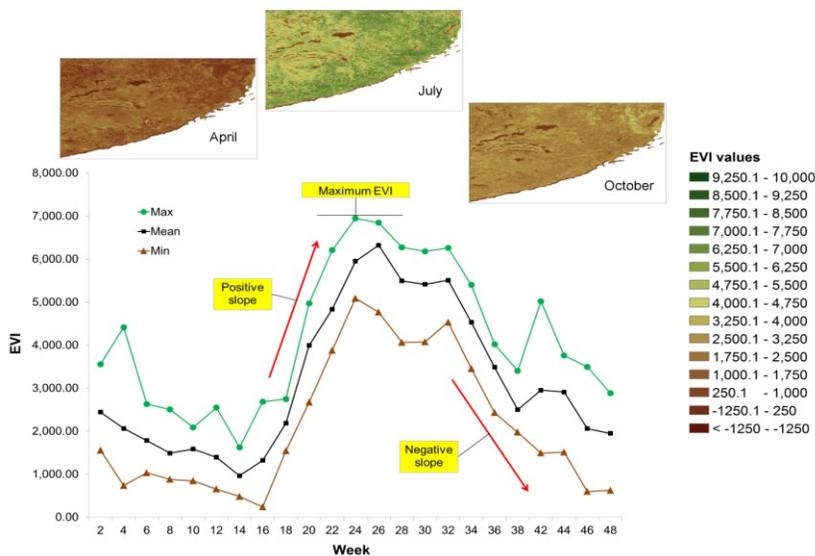


Fig. 4 Índice de Vegetación Mejorado (EVI) en Minnesota.

Miembros de esta investigación, estudiaron los recientes brotes de fiebre Oropuche en Perú (Romero-Alvarez & Escobar, 2017b), una enfermedad viral transmitida a humanos por mosquitos *Culex* y *Culicoides*. Utilizando imágenes de índices de vegetación, encontraron que la pérdida reciente de bosque podría explicar la distribución espacial de los casos de Oropuche. Con esta información, identificaron zonas con deforestación activa para definir con gran detalle las zonas con riesgo de transmisión de fiebre Oropuche. Específicamente, el mayor riesgo de transmisión fue encontrado principalmente a la orilla de uno de los ríos de la zona de estudio. Si bien el estudio de Oropuche fue reactivo, pues fue desarrollado después del reporte de los brotes, esta investigación demostró la factibilidad en el uso de imágenes de satélite para determinar asociación entre deforestación y riesgo de transmisión de enfermedades vectoriales.

11. Objetivo general

Determinar cómo el cambio de paisaje se asocia al riesgo de enfermedades infecciosas transmitidas por vectores.

12. Objetivos específicos

1. Determinar la asociación entre biodiversidad y la presencia de vectores de enfermedades infecciosas a lo largo de un gradiente de deforestación.
2. Estandarizar un método de biología molecular para determinar la presencia de patógenos de enfermedades vectoriales.

13. Hipótesis

Las probabilidades de presencia de vectores y patógenos de enfermedades vectoriales aumentan desde zonas naturales hacia zonas de deforestación.

14. Materiales y métodos

14.1 Enfoque y tipo de investigación:

Esta investigación fue cuantitativa basada en la recolección de datos de campo, análisis de laboratorio, uso de datos de sensores remotos y análisis estadístico descriptivo y predictivo para establecer patrones cambios de cobertura de bosque y biodiversidad, y presencia de vectores y patógenos. Valores de biodiversidad fueron medidos a partir de las especies de mosquitos capturados en las trampas BG Sentinel. Los datos se utilizaron para evaluar la hipótesis de asociación entre distancia a deforestación, biodiversidad y presencia de vectores y sus patógenos. Las especies de vectores colectadas fueron identificadas para asociar la especie con la posible presencia de virus asociados con enfermedades (i.e., Dengue, Chikungunya, Zika).

Indicar el tipo de la investigación: esta investigación fue exploratoria, correlacional y explicativa. Es exploratoria ya que se identificaron vectores y patógenos causantes de enfermedades. Es correlacional porque se determinó si la presencia de vectores y los

posibles patógenos que pueden transmitir está asociada con la pérdida de bosque y biodiversidad y es explicativa porque se generamos modelos que relacionan la pérdida de bosque y biodiversidad y la posible aparición de enfermedades transmitidas por vectores.

14.2 Recolección de información:

Para coleccionar los vectores de enfermedades arbovirales se utilizaron trampas BG Sentinel, las cuales están diseñadas especialmente para este tipo de vectores. Se colocaron con 12 trampas distribuidas de la siguiente forma: cuatro trampas en hábitat conservado, cuatro trampas en hábitat con perturbación intermedia y cuatro trampas en domicilios rurales (tabla 1). Todas las trampas se colocaron a una separación de 100 m.

Tabla 1. Coordenadas de los sitios de muestreo

No	Nombre	Coordenadas
Conservado	IDAEH 2	01906233N 00518455E
Conservado	Zacatal 1	01904099N 00514677E
Conservado	Zacatal 2	01904175N 00514883E
Conservado	Zacatal 3	01904108N 00514609E
Intermedio	IDAEH 1	019606071N 00518376E
Intermedio	Playa El Venado	01905927N 00518404E
Intermedio	Sendero Guacamaya	01905927N 00518404E
Intermedio	Sendero Guacamaya 2	01907013N 00521172E
Perturbado	Paso de Caballos	01909245N 00527369E
Perturbado	Paso de Caballos	01908918N 00528450E
Perturbado	Paso de Caballos	01908784N 00528595E
Perturbado	Paso de Caballos	01908979N 00528203E

14.3 Para investigación cuantitativa:

El número de muestras fue constituido por los vectores colectados en un período de 24 h por trampa. Las trampas BG se colocaron en trayectos de 250 m en donde se colocaron 4 trampas por cada gradiente de bosque (conservado, intermedio y perturbado) dentro del Parque Nacional Laguna del Tigre, durante 6 días. Se anotaron los datos de

georreferenciación de cada trampa y se cambiaron las baterías y bolsas de recolección cada día. Los mosquitos fueron congelados e identificados en el laboratorio

El diseño tomó 2 factores (distancia del bosque y estado de conservación) y cuatro tratamientos que son distancias de colecta al borde del bosque. La primera distancia es dentro del bosque (-50 m), la segunda distancia es en el borde del bosque (0 m) y las otras distancias son fuera del bosque (50 y 200 m). Los niveles del estado de conservación son conservado y perturbado.

14.4 Técnicas e instrumentos:

Identificación de especies: las muestras colectadas fueron identificadas taxonómicamente al nivel de especies preliminarmente en el campo luego ser congeladas. Las muestras fueron identificadas utilizando equipo de entomología y la colección de referencia de CUNZAC

Estandarización de un método de identificación de arbovirus: la extracción, retrotranscripción y amplificación del ARN viral en cADN es un proceso que requiere diferentes cuidados desde la colecta, el transporte y la manipulación en laboratorio. Uno de los elementos clave de la preservación del ARN viral consiste en la congelación de las muestras desde el momento en que se colectan hasta cuando se comienzan a preparar en el laboratorio, en el presente estudio se desarrolla un protocolo de transporte validado en literatura y con el equipo de investigación. Posteriormente se desarrolla un protocolo de eliminación de ARNasas del área de trabajo, este paso de mucha importancia para evitar la degradación del ARN viral durante su manipulación en el laboratorio de Biología Molecular. Posteriormente, se desarrolla un protocolo de extracción del ARN viral que asegura la calidad mediante el uso de controles positivos y negativos y la reducción de formación de aerosoles que puedan contaminar las muestras. Por último, se desarrolla un protocolo que permite detectar positivos y negativos de ARN viral, principalmente para Chikungunya, Flavivirus y Dengue.

14.5 Operacionalización de las variables o unidades de análisis: describa las variables que evaluó por objetivo, describa la forma como las midió, clasificó o cualificó. Presente por cada objetivo las variables que midió o cualificó según el enfoque y tipo de investigación.

Tabla 2. Operacionalización de las variables o unidades de análisis

Objetivos específicos	VARIABLES O UNIDADES DE ANÁLISIS consideradas	Forma de medición, clasificación y cualificación
Objetivo 1.	<p><i>Variable predictora: estado de conservación.</i></p> <p><i>Variable de respuesta: especies de culicidae colectadas.</i></p>	<p><i>Análisis de Agrupamiento UPMGA</i></p>
Objetivo 2.	<p><i>Variable predictora: especies de vectores</i></p> <p><i>Variable de respuesta: especies de patógenos detectadas.</i></p>	<p><i>Protocolo de extracción y detección del ARN viral.</i></p>

14.6 Procesamiento y análisis de la información:

Análisis de los ensambles de culicidae en un gradiente de perturbación

Para el análisis de cómo el grado de perturbación de la selva afecta los ensambles de culicidos se realizó un análisis UPMGA, siguiendo el siguiente protocolo y códigos de programación en lenguaje R (Anexo 2.1).

Patrones de deforestación y sitios de muestreo: Se identificaron sitios con características de paisaje y tasas de deforestación similares, se colectarán imágenes del cuadrante H9V7 del sensor MODIS del satélite Terra productos MOD13Q1 (https://lpdaac.usgs.gov/dataset_discovery/modis/modis_products_table/mod13q1_v006). Posteriormente, se descargaron imágenes EVI a 250 metros de resolución espacial y 16 días (~2 semanas) resolución temporal y valores que van desde -2,000 (roca) hasta valores de 10,000 (selva densa), celdas sin información definidas con el valor -3000 no fueron

incluidas en los análisis. Se descargaron imágenes de las últimas dos décadas en Laguna del Tigre para reconstruir el porcentaje de cobertura de bosque perdido e identificar zonas con patrones de deforestación para establecer un transecto de muestreo. Se utilizó el paquete estadístico R para auxiliar en el manejo y análisis de datos, específicamente los paquetes MODISdownload y raster (R Core Team 2016). Los análisis espaciales fueron desarrollados en el Laboratorio de Ecología y Biogeografía de Enfermedades, del Departamento de Conservación de Peces y Vida Silvestre en Virginia Tech, Virginia, Estados Unidos (ver Apéndice, carta de Luis Escobar, Virginia Tech).

Valores de biodiversidad: se colectaron mosquitos a lo largo de un transecto en donde se establecieron sitios para las capturas de mosquitos con el fin de determinar la riqueza y abundancia de especies. Las trampas se colocaron en sitios conservados 3 km hacia adentro del borde de la selva, en sitios con perturbación intermedia a lo largo del borde de la selva y en sitios perturbados en las casas del área rural de la comunidad de Paso de Caballos. En cada punto de muestreo se colocarán cuatro trampas BG Sentinel con cebo para mosquitos *Culex* y *Aedes* (John W. Hock 2017). Se generaron cuatro subreplicas temporales en cada sitio de muestreo (i.e., cuatro días de muestreo por sitio). Las trampas se revisaron durante la mañana y la tarde. Las capturas fueron realizadas al final de las lluvias (e.g., Noviembre).

15. Vinculación, difusión y divulgación

Este proyecto se desarrolló gracias a la vinculación de cuatro instituciones con enfoque en investigación entomológica (CUNZAC y Virginia Tech), manejo y conservación de la biodiversidad (Wildlife Conservation Society) y estudios avanzados en sensores remotos y ecología de enfermedades (Virginia Tech y Universidad de Oklahoma). Asimismo, se realizó un curso avanzado análisis de datos y modelamiento en Guatemala por parte de Virginia Tech y la visita de un investigador de CUNZAC a Virginia Tech para entrenamiento en detección de patógenos. La colaboración entre WCS, Virginia Tech, Universidad de Oklahoma y CUNZAC ha abierto la puerta para que estudiantes de CUNZAC puedan acceder a oportunidades de tesis, pasantías y Estudios Profesionales Supervisados en temas de conservación, ecología y epidemiología.

16. Productos, hallazgos, conocimientos o resultados

Vectores arbovirales (Diptera: Culicidae)

Las trampas BG se colocaron en la Reserva de la Biosfera Maya en sitios con diferente grado de perturbación antropogénica. En total colectamos 11 individuos del sitio perturbado (Paso Caballos), 631 individuos del sitio intermedio (zona límite de Paso Caballos y el Parque Nacional Laguna del Tigre y río San Pedro) y 203 del sitio conservado (área del Zacatal en el PNLT).

Identificamos 845 individuos de familia *Culicidae* (*Aedes* 299 (38%), *Anopheles* 197 (25%), *Coquillettidia* 255 (32%), *Culex* 40 (5%) y *Toxorhynchites* 2 (0.2%)). Cincuenta y dos individuos no pudieron ser identificados debido a que se dañaron al ingresar por el sistema de las trampas BG.

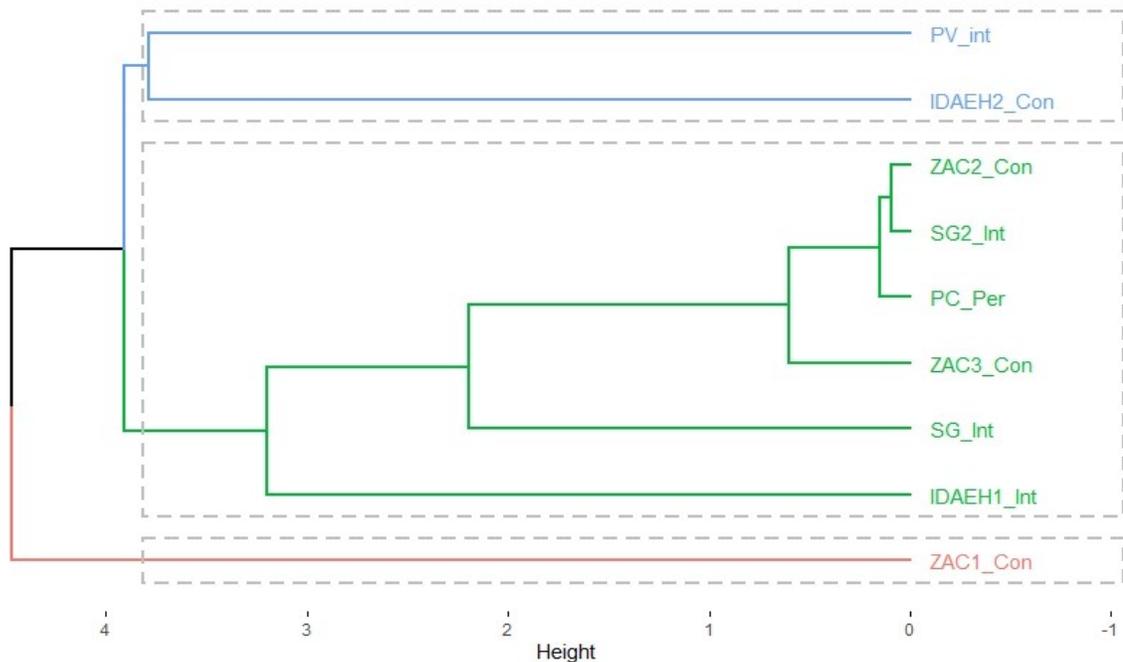


Figura 5. Dendrograma UPMGA de los sitios de muestreo con base en la composición de vectores arbovirales (Diptera: Culicidae). Con: conservado, Int: perturbación intermedia, Per: Perturbado.

De acuerdo con el dendograma de la Figura 5, se forman tres grupos con base a la diversidad de géneros de Culicidae de la Reserva de Biosfera Maya, específicamente en el Parque Nacional Laguna del Tigre. El primer agrupamiento, en celeste, está conformado por una unidad de muestreo en buen estado de conservación y una unidad de muestreo con estado de conservación intermedio. El segundo agrupamiento, en verde, contiene unidades de muestreo con buen estado de conservación, estado intermedio de perturbación y áreas muy perturbadas. Por último, queda una unidad de muestreo solitaria que corresponde a una unidad de muestreo con buen estado de conservación.

Protocolo de colecta de las muestras de vectores arbovirales

Este proceso es crítico debido a que se debe de garantizar la cadena de frío desde que se colecta hasta su almacenamiento y procesamiento en el laboratorio de Biología Molecular. Debido a lo remoto que se encuentra la selva y la distancia (casi 24 horas) y medios de transporte (vehículo 4x4 y lancha) que hay que utilizar para llegar hasta Zacapa es necesario utilizar un sistema que garantice una temperatura menor a -20°C durante varios días. El medio más adecuado para este tipo de transporte son los termos que utilizan nitrógeno líquido y que pueden alcanzar temperaturas de hasta -196°C por varios días, semanas e inclusive meses dependiendo del recipiente.

De acuerdo, a lo discutido con el equipo de investigación y los colaboradores del Virginia Tech y la Universidad de Oklahoma, deberían de emplearse dos tipos de termos de nitrógeno líquido que son de 3 litros para recoger las muestras en campo y de 50 litros para mantener las muestras congeladas en la estación biológica y transportarlos hasta su llegada al laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones del Centro Universitario de Zacapa.

Es importante considerar que deben utilizarse tubos criogénicos libres de ARNasas para guardar las muestras de artrópodos y colocarlas dentro del termo con un código de

identificación que no se borre o caiga, para lo cual se puede utilizar una pluma permanente que se adhiera fuertemente al plástico.

Una vez las muestras llegan al laboratorio de Biología Molecular, deberán de colocarse en cajas de forma ordenada en el ultracongelador a -80°C . Para evitar que las muestras sufran de descongelamiento durante su estancia en el ultracongelador es necesario reservar una estantería de uso exclusivo para estas muestras.

Protocolo de extracción del ARN viral, RT-PCR y visualización

El ARN es un ácido nucleico monocatenario que es muy susceptible a la degradación debido a la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 2 de la pentosa y especialmente a la presencia de ARNasas en el ambiente. De acuerdo con González-Reichey colaboradores, (2010) es necesario dedicar un área del laboratorio y equipo exclusivos para trabajar con ARN, así mismo, es recomendable estar cambiando de guantes durante cada fase para evitar acarrear ARN.

Preparación del área de trabajo

1. Inicialmente se requiere que el proceso de extracción se lleve a cabo una campana de flujo laminar que proteja la muestra, como mínimo una cabina clase II.
2. La campana y el equipo deberán ser descontaminada mediante la utilización de luz ultravioleta durante al menos una hora.
3. Posteriormente se procederá a aplicar una solución para desnaturalizar las ARNasas y el ARN circulante en el ambiente. En el presente estudio se utilizó RNase Away (Sigma Aldrich).
4. Utilice únicamente puntas para pipetas libres de ADNasas

Preparación del kit “MagMAX Viral RNA Isolation Kit”

5. Agregue el Carrier RNA a la solución concentrada de “Lysis/Binding Solution”, mezcle y añada Isopropanol.

6. Agregue 12 mL 100% isopropanol a “Wash Solution 1 Concentrate”, marque que se ha agregado el etanol, mezcle y almacene a temperatura ambiente. **Wash solution 1.**
7. Agregue 44 mL 100% etanol al “Wash Solution 2 Concentrate”, marque que se ha agregado el etanol, mezcle y almacene a temperatura ambiente. **Wash solution 2.**

a. Combine lo siguiente		1 Rxn		10 Rxn		Todo el frasco	
	Lysis/Binding Soln. Concentrate	400	μL	4.4	mL	22	mL
	Carrier RNA	2	μL	22	μL	110	μL
b. Mezcle suavemente y agregue:							
	Isopropanol 100%	400	μL	4.4	mL	22	mL
c. Mezcle bien utilizando el vortex							

8. Prepare el Bead Mix. Cada reacción requiere de 20 μL de Bead Mix. Preparar únicamente lo que se va a utilizar.
 - a. Vortexear el RNA Binding Beads a velocidad moderada para uniformizar la suspensión antes de pipetear.
 - b. Prepare el Bead Mix de acuerdo con el siguiente cuadro, procure añadir un 10% adicional por la merma en el pipeteo. Mezcle bien.

Componente	1 Rxn		10 Rxn		50Rxn	
RNA Binding Beads	10	μL	110	μL	550	μL
Lysis/Binding	10	μL	110	μL	550	μL

Enhancer						
----------	--	--	--	--	--	--

- c. Coloque el Bead Mix en hielo mientras se utiliza.

Maceración de los especímenes

9. Coloque los zancudos dentro de tubos de 2mL y agregue 1.75 mL de diluyente BA-1 (ver González-Reiche y colaboradores, 2010, pp 112).
10. Utilizando un pistilo para tubos cónicos proceda a macerar la muestra a fin de formar un homogenizado.
11. Centrifugar a 13,400 g por 3 minutos a 4°C.
12. Incluir un control de un mosquito que este libre de infección viral.

Protocolo de aislamiento del ARN con el kit “MagMAX Viral RNA Isolation Kit”

Ligamiento del ARN a las Binding Beads

13. Añada 802 μ L de la solución del paso 5 (Lysis/Binding Solution+Carrier RNA+Isopropanol) en un tubo de procesamiento.
14. Agregue 400 μ L del homogenizado de la muestra, con cuidado de no transferir los sólidos del fondo. Cuando agregue la muestra procure sumergir suavemente la punta de la pipeta para no formar aerosoles que puedan causar contaminación cruzada.
15. Mezcle gentilmente en el vortex o golpeando el tubo con el dedo por 30 segundos.
16. Vortexear el Bead Mix para uniformizarlo, pipetee 20 μ L de Bead Mix y agréguelo al tubo de procesamiento.
17. Agite suavemente la muestra por 4 minutos en un vortex para lisar completamente el virus y que el ARN se una a las RNA Binding Beads.
18. Centrifugue rápidamente (2 segs) para colectar el contenido del tubo.
19. Coloque el tubo de procesamiento en una base magnética para capturar las RNA Binding Beads. Deje el tubo en la base magnética por al menos 3 minutos. Cuando la captura este completa se formará un pellet.

20. Aspire el supernadante con precaución sin perturbar el pellet y desacartelo.

Lavado 1

21. Agregue 300 μL de Wash Solution 1 a cada muestra.
22. Vortexee a velocidad moderada por 30 segundos.
23. Centrifugue por 2 segundos para coleccionar el contenido del tubo.
24. Coloque en la base magnética por 3 a 5 minutos hasta que se aclare la solución.
25. Aspire y descarte el sobrenadante.
26. Repita el paso 21 al 25.

Lavado 2

27. Agregue 450 μL de Wash Solution 2 a cada muestra.
28. Vortexee a velocidad moderada por 30 segundos.
29. Centrifugue por 2 segundos para coleccionar el contenido del tubo.
30. Coloque en la base magnética por 3 a 5 minutos hasta que se aclare la solución.
31. Aspire y descarte el sobrenadante.
32. Repita el paso 27 al 31.
33. Seque las Bindig Beads dejando el tubo abierto por 2 minutos hasta que se evapore el alcohol por completo. Si aún queda etanol, extráigalo con cuidado utilizando una pipeta de punta fina y déjelo secar.

Elución

34. Agregue 50 μL (20-100 μL) de Elution Buffer (temperatura ambiente o entre 37-65°C) a cada muestra, agite o vortexee vigorosamente por 4 minutos.
35. Capture las RNA Bindig Beads en la base magnética. El ARN purificado quedará en el supernadante.
36. Transfiera el supernadante, que contiene el ARN, a un tubo de 2.4 mL libre de nucleasas y almacene a -20°C.

Cuantificación del ARN utilizando el Qubit RNA HS Assay Kit

*****Los componentes del kit pueden ser absorbidos por la piel*****

37. Prepare dos tubos para los estándares y un tubo por cada muestra.
38. Prepare la Working Solution. Diluya el Qubit RNA Reagent 1:200 en el RNA Buffer.
Para cada cada estándar y muestra es necesario preparar 200 μL . Vea el ejemplo para 10 muestras.

Componente	1 Rxn		10 Rxn+10%	
	Qubit RNA Reagent	1	μL	11
RNA Buffer	200	μL	2200	μL

39. Prepare tubos de 0.5 mL (tubos PCR) de acuerdo con la siguiente tabla

Volume	Estándares	Muestras
Working Solution	190 μL	180-199 μL
Estándar (kit)	10 μL	----
Muestra	----	1-20 μL
Total en cada tubo	200 μL	200 μL

40. Vortexear los estándares y las muestras de 2 a 3 segundos e incubar a temperatura ambiente por 2 minutos.
41. Seleccionar en el Qubit RNA Assay y calibrar los estándares.
42. Leer las muestras.

Reacción de PCR para Chikungunya

43. A continuación, se muestra el cuadro de la reacción de RT-PCR para un volumen final de 50 μ L para los pares Chik-1 y cChik-4.

	1 Rxn	Concentración final
Verso Enzyme Mix	1 μ L	
2X 1-Step PCR ReddyMix	25 μ L	1X
RT Enhancer	2.5 μ L	
Forward primer (10 μ M)	1 μ L	200 nM
Reverse primer (10 μ M)	1 μ L	200 nM
Template (RNA)	1-5 μ L	1 ng
Water, nuclease-free	18.5-14.5 μ L	
Total volume	50 μ L	

44. A continuación, se muestra el cuadro de la reacción de PCR anidada para un volumen final de 50 μ L para los pares Chik-2 y cChik-3.

	1 Rxn	Concentración final
JumpStart REDTaq	25 μ L	

ReadyMix		
Forward primer (20 μ M)		0.4 μ M
Reverse primer (20 μ M)		0.4 μ M
Template cDNA		1-200 ng
Water, nuclease-free	Aforar a 50 μ L	
Total volume	50 μ L	

Programa de RT-PCR y PCR anidada para Chikungunya

45. A continuación, se describe el programa de RT-PCR para Chikungunya.

RT-PCR Chik-1 y cChik-4			
	Temp.	Tiempo	Número de ciclos
cDNA síntesis*	50°C	30 min	1 ciclo
Verso inactivación	95°C	2 min	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	25 s	35 ciclos
Alineación	64°C	45 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	5 min	1 ciclo

	4°C	Indefinido	
--	-----	------------	--

*La temperatura y tiempo se pueden optimizar (42-57°C por 5-30 minutos)

PCR anidada Chik-2 y cChik-3			
	Temp.	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización	95°C	2 min	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	20 s	30 ciclos
Alineación	56°C	35 s	
Extensión	72°C	20 s	
Extensión final	72°C	5 min	1 ciclo
	4°C	Indefinido	

Reacción de PCR para Flavivirus

46. A continuación, se muestra el cuadro de la reacción de RT-PCR para un volumen final de 50 µL para los pares FU1-f y cFD2-r o FU2-f y cFD3-r.

	1 Rxn	Concentración final
Verso Enzyme Mix	1 µL	
2X 1-Step PCR ReddyMix	25 µL	1X
RT Enhancer	2.5 µL	
Forward primer	1 µL	200 nM

(10 μ M)		
Reverse primer (10 μ M)	1 μ L	200 nM
Template (RNA)	1-5 μ L	1 ng
Water, nuclease-free	18.5-14.5 μ L	
Total volume	51 μ L	

Programa de RT-PCR y PCR anidada para Chikungunya

47. A continuación, se describe el programa de RT-PCR para Flavivirus.

RT-PCR Flavivirus			
	Temp.	Tiempo	Número de ciclos
cDNA síntesis*	50°C	30 min	1 ciclo
Verso inactivación	95°C	2 min	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	30 s	45 ciclos
Alineación	50°C	1 min	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	10 min	1 ciclo
	4°C	Indefinido	

48. A continuación, se presenta una lista de los primers recomendados a utilizar.

Enfermedad	Nombre primer	Posición	Secuencia (5'→3')	Longitud	Fuente
Chikungunya	CHIK-1-f	3746-3765	TAATGCTGAACTCGGGGACC	427 pb	https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2002.00535.x
	cChik-C-r	4151-4172	ACCTGCCACACCCACCATCGAC		
	Chik-2-f	3962-3983	GATCAGGTTAACCGTGCCGACT	172 pb	
	cChik-3-r	4111-4133	CACTGACACAACCTACCACAGTCA		
Flavivirus	FU1-f	8993	TACAACATGATGGGAAAGAGAGAGAA	250 pb	(González-Reiche y colaboradores, 2010)
	cFD2-r	9258	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC		
	FU2-f	9233	GCTGATGACACCGCCGGCTGGGACAC	850 pb	
	cFD3-r	10077	AGCATGTCTTCCGTGGTCATCCA		

17. Análisis y discusión de resultados

Para el norte del Petén se han reportado los géneros *Stegomyia*, *Ochlerotatus*, *Gymnometopa*, *Aedeomyia*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Haemagogus*, *Limatus*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Sabetes*, *Toxorhynchites*, *Trichoprosopon* y *Uranotaenia*. En el municipio de San Andrés en donde se encuentra la Laguna del Tigre se han registrado la mayor parte de estos géneros, a excepción de *Aedeomyia*, *Haemagogus* y *Trichoprosopon* (Diéguez Fernández y colaboradores, 2006). Estos datos son consistentes con los presentados en el presente proyecto en donde se reportan los géneros *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex* y *Toxorhynchites*.

Los mosquitos del género *Aedes* y *Culex* son los principales vectores de virus de la familia *Flaviviridae*, la cual representa una seria amenaza para la salud pública en toda Latinoamérica. Los *flavivirus* tienen una alta prevalencia y diversidad de cepas en las aves, y también causan importantes enfermedades humanas. Por ejemplo, este grupo incluye especies como los virus del dengue (DENV), del Nilo Occidental (WNV) y del Zika (ZIKV). Asimismo, el género *Aedes* es responsable por la transmisión del virus de Chikungunya (CHIKV), perteneciente a la familia *Togaviridae*, que han surgido de las poblaciones silvestres para infectar a los humanos.

Enfermedades como WNV, ZIKV y CHIKV han demostrado la importancia de mantener la vigilancia epidemiológica, ya que luego de un tiempo se convirtieron en endémicas causando un grave impacto a nivel epidemiológico, social y económico. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que, Petén es un departamento con todas las características ambientales para la emergencia y reemergencia de patógenos, donde los géneros de *Aedes* y *Culex* están asociados tanto a zonas bien conservadas como zonas de alta perturbación donde la actividad humana aumenta, demostrando que, los patógenos emergentes y la degradación del medio ambiente están fuertemente relacionadas (Keesing y colaboradores, 2010).

En este sentido, el ejemplo de la teoría del efecto de dilución ilustra de forma interesante las posibilidades, pero también los límites y nuestras carencias de conocimiento, de dicho enfoque. Esta teoría estipula que, para la mayoría de las enfermedades transmitidas por vectores, una alta diversidad de vertebrados debería estar asociada a una baja circulación de un determinado patógeno, ya que la mayoría de estas especies de vertebrados no podrán ser infecciosas (el huésped final) y, por tanto, "diluirán" la transmisión (Roche y Guégan 2011).

El análisis de agrupamiento UPMGA muestra que los géneros de culicidae pueden encontrarse tanto en sitios conservados como perturbados, a pesar de que en el presente estudio no fue posible obtener información a nivel de especies para identificar con precisión las tasas de recambio de especies entre sitios conservados y sitios perturbados, es cierto que algunos virus poseen hospederos de diferentes especies pero del mismo género que permiten una dinámica multihospedero y multivector más compleja (Reeves, 2019), de tal manera que el patógeno puede ampliar los nichos ecológicos a través de los cuales se puede dispersar (Vasilakis y colaboradores, 2011) o bien establecer ciclos selváticos-rurales en donde los primates no humanos suelen ser hospederos virales (Diallo y colaboradores, 2003).

18. Conclusiones

En el presente proyecto se detectaron cinco géneros de Culicidae, entre los que se encuentran *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex* y *Toxorhynchites*. Los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* poseen especies que son transmisoras de enfermedades virales como Dengue, Zika, Chikungunya, virus del Nilo Occidental, encefalitis y fiebre amarilla. La implementación de un protocolo de monitoreo utilizando métodos moleculares es de importancia para detectar virus que generalmente infectan a humanos o bien virus nativos de la Reserva de Biosfera Maya que potencialmente pueden afectar humanos o animales domésticos. El género *Coquillettidia* se encuentra asociados a aves y ganado, sin embargo, puede picar humanos que se introduzcan dentro de su hábitat. Por otra parte, las larvas del género *Toxorhynchites* al alimentarse de otras larvas de mosquitos tienen un potencial alto en el diseño de planes de manejo de mosquitos hematófagos.

El método propuesto de detección de virus para el laboratorio de Biología Molecular del Centro Universitario de Zacapa incorpora aspectos que preservan la integridad del ARN viral desde su recolecta en campo, su traslado al laboratorio, su manejo seguro para la extracción, retrotranscripción del ARN y amplificación del cADN. Este método permite obtener resultados de presencia/ausencia de los virus más no cuantificar la carga viral, para lo cual se requieren de equipos de qPCR.

19. Impacto esperado

Los resultados pueden ayudar a entender el efecto de dilución en una zona tropical. La mayoría de la literatura sobre el efecto de dilución ha sido desarrollada basada en la enfermedad de Lyme en estudios experimentales y de campo en Estados Unidos, específicamente en la costa este. Así, nuestro estudio llenaría un vacío existente en estudio de ecología de enfermedades en latitudes tropicales, asegurando las citaciones de los manuscritos derivados de nuestra investigación.

De forma local, se espera que los productos del estudio ayuden a identificar potenciales amenazas a la salud humana con un especial énfasis en enfermedades vectoriales en poblaciones vulnerables dentro y alrededor de la reserva Laguna del Tigre.

Esperamos que nuestros resultados ayuden a informar futuros planes de manejo y conservación de la selva en Laguna del Tigre. Creemos que publicar un manuscrito en una revista científica, reportando de forma robusta las tasas de deforestación en Laguna del Tigre, puede ayudar informar planes de manejo en el largo plazo.

Consideramos que este estudio formalizará la colaboración entre USAC campus Zacapa (CUNZAC), Wildlife Conservation Society (WCS), Universidad de Oklahoma y Virginia Tech. Otro impacto interno es el mejoramiento de la infraestructura y capital humano de investigadores de CUNZAC a través de la adquisición de equipo y entrenamiento (i.e., la transferencia de tecnología que brindará Virginia Tech). Finalmente, el consorcio WCS, CUNZAC, Universidad de Oklahoma y Virginia Tech ayudará a posicionar a nuestro equipo como un referente internacional en el estudio del efecto del cambio en el uso del suelo sobre enfermedades vectoriales en regiones tropicales y los resultados de nuestro estudio ayudarán

a respaldar una propuesta que busca generar investigación intensa en Guatemala durante cinco años.

20. Referencias

Althouse, B. M., Lessler, J., Sall, A. A., Diallo, M., Hanley, K. A., Watts, D. M., Weaver, S. C., & Cummings, D. A. T. (2012). Synchrony of Sylvatic Dengue Isolations: A Multi-Host, Multi-Vector SIR Model of Dengue Virus Transmission in Senegal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), e1928. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001928>

Alvarez, D. E., Lodeiro, M. F., Ludueña, S. J., Pietrasanta, L. I., & Gamarnik, A. V. (2005). Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. *Journal of Virology*, 79(11), 6631–6643. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.11.6631-6643.2005>

Apandi, Y., Nazni, W. A., Azleen, Z. A. N., Vythilingam, I., Noorazian, M. Y., Azahari, A. H., Zainah, S., & Lee, H. L. (2009). The first isolation of chikungunya virus from non-human primates in Malaysia. In *Journal of General and Molecular Virology* (Vol. 1, Issue 3). <http://www.academicjournals.org/jgmv>

Bray, D. B., Duran, E., Ramos, V. H., Mas, J. F., Velazquez, A., McNab, R. B., Barry, D. & Radachowsky, J. (2008). Tropical Deforestation, Community Forests, and Protected Areas in the Maya Forest. *Ecology and Society*, 13(56), 56.

Benedict, M., Levine, R., Hawley, W., & Lounibos, L. (2007). Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 7.

Caglioti, C., Lalle, E., Castilletti, C., Carletti, F., Capobianchi, M. R., & Bordi, L. (2013). Chikungunya virus infection: an overview. In *NEW MICROBIOLOGICA* (Vol. 36). <http://www.cdc.gov/chikungunya/map/index.html>,

Chen, R., & Vasilakis, N. (2011). Dengue-Quo tu et quo vadis? In *Viruses* (Vol. 3, Issue 9,

pp. 1562–1608). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
<https://doi.org/10.3390/v3091562>

Cincotta, R. P., Wisnewski, J., & Engelman, R. (2000) Human population in the biodiversity hotspots. *Nature*, *404*, 990–2.

Colchero, F., Conde, D. A., Manterola, C., Chavez, C., Rivera, A., & Ceballos, G. (2011) Jaguars on the move: Modeling movement to mitigate fragmentation from road expansion in the Mayan Forest. *Animal Conservation*, *14*, 158–166.

Deem, S. L., Karesh, W. B. and Weisman, & W. (2001) Putting theory into practice: Wildlife health in conservation. *Conservation Biology*, *15*, 1224–1233.

Diallo, M., Ba, Y., Sall, A., Diop, O., & Ndione, J. (2003). Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, senegal, 1999–2000: entomologic findings and epidemiologic considerations. *Emerging Infectious Diseases*, *9*(3), 362-367.
<https://doi.org/10.3201/eid0903.020219..>

Diéguez Fernández, L., Avelar Hernández, C., Zacarías Pérez, R., & Salazar Quiroga, V. (2006). Contribución al estudio de la familia Culicidae de Guatemala: relación y distribución geográfica de las principales especies en la región norte. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, *58*(1), 30–35.

Eastwood, G., Loaiza, J. R., Pongsiri, M. J., Sanjur, O. I., Pecor, J. E., Auguste, A. J., & Kramer, L. D. (2016) Enzootic arbovirus surveillance in forest habitat and phylogenetic characterization of novel isolates of Gamboa virus in Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *94*, 786–793.

- Escobar, L. E., Qiao, H., & Peterson, A. T. (2016) Forecasting Chikungunya spread in the Americas via data-driven, empirical approaches. *Parasites & Vectors*, **9**, 112.
- Escobar, R., & Cordero, H. (2017) Declaran alerta roja departamental por incendios forestales en áreas protegidas. *Prensa Libre*.
- Estrada-Peña, A., Ostfeld, R.S., Peterson, A.T., Poulin, R., & de la Fuente, J. (2014) Effects of environmental change on zoonotic disease risk: An ecological primer. *Trends in Parasitology*, **30**, 205–214.
- Gamazo, C., & Latam, M. (2016) Incendios provocados para avance de frontera agrícola: gran peligro para Reserva de Biósfera Maya. *Lado B*.
- Gregory, C. J., Oduyebo, T., Brault, A. C., Brooks, J. T., Chung, K. W., Hills, S., Kuehnert, M. J., Mead, P., Meaney-Delman, D., Rabe, I., Staples, E., & Petersen, L. R. (2017). Modes of Transmission of Zika Virus. In *Journal of Infectious Diseases* (Vol. 216, Issue suppl_10, pp. S875–S883). Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jix396>
- González-Reiche, A. S., Monzón-Pineda, M. de L., Johnson, B. W., & Morales-Betoulle, M. E. (2010). Detection of West Nile viral RNA from field-collected mosquitoes in tropical regions by conventional and real-time RT-PCR. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **630**. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-629-0_8
- Hansen, M.C.C., Potapov, P. V, Moore, R., & colaboradores (2013) High-resolution global maps of 21st-Century forest cover change. *Science*, **342**, 850–853.
- Horning, N., Robinson, J., Sterling, E., Turner, W., & Spector, S. (2010) *Remote Sensing for Ecology and Conservation*. Oxford University Press, New York.

- Hotta, S. (1998). Dengue vector mosquitoes in Japan: The role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the 1942–1944 dengue epidemics of Japanese Main Islands. *Med Entomol Zool*, 49.
- Johansson, M. A., Powers, A. M., Pesik, N., Cohen, N. J., & Erin Staples, J. (2014). Nowcasting the spread of Chikungunya Virus in the Americas. *PLoS ONE*, 9(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104915>
- John W. Hock (2017) Omni-directional Fay Prince Trap.
- Keesing, F., Belden, L.K., Daszak, P., Dobson, A., Harvell, C. D., Holt, R. D., Hudson, P., Jolles, A., Jones, K. E., Mitchell, C. E., Myers, S. S., Bogich, T. & Richard, S. O. 2010. “Impacts of Biodiversity on the Emergence and Transmission of Infectious Diseases.” *Nature* 468 (7324): 647–52.
- King, L.J. (2014) Comating the Triple Threat: The Need for a One Health Approach. In: *One Health. People, Animals, and the Environment*. (eds R.M. Atlas and S. Maloy). American Society for Microbiology (ASM), Washington.
- Kuno, G., & Chang, G. J. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of Virology*, 152(4), 687–696.
<https://doi.org/10.1007/s00705-006-0903-z>
- Lambrechts, L., Scott, T. W., & Gubler, D. J. (2010). Consequences of the expanding global distribution of *aedes albopictus* for dengue virus transmission. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 4, Issue 5, p. e646). Public Library of Science.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000646>

- Lepe-lópez, M., García-Anleu, R., Fountain-Jones, N.M., Ponce, G., Gonzalez, M., & Escobar, L. E. (2018) Domestic horses within the Maya biosphere reserve: A possible threat to the Central American tapir (*Tapirus bairdii*). *Caldasia*, 40, 188–191.
- Lepe-Lopez, M.A., Davila, M., Canet, M., Lopez, Y., Flores, E., Davila, A., & Escobar, L.E. (2017) Distribución de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en Guatemala 2016. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 4, 1–11.
- Manoharan, V.S., Welch, R.M. and Lawton, R.O. (2009) Impact of deforestation on regional surface temperatures and moisture in the Maya lowlands of Guatemala. *Geophysical Research Letters*, 36, 9–13.
- Mitchell, C. (1995). The role of *Aedes albopictus* as an arbovirus vector. *Parassitologia*, 37.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A. and Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–8.
- Ostfeld, R. S., & Keesing, F. (2000) Biodiversity series: The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Canadian Journal of Zoology*, 78, 2061–2078.
- Patz, J.A., Graczyk, T.K.K., Geller, N. & Vittor, A.Y.Y. (2000) Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *International Journal for Parasitology*, 30, 1395–1405.
- Pettorelli, N., Vik, J.O., Mysterud, A., Gaillard, J.M., Tucker, C.J. & Stenseth, N.C. (2005) Using the satellite-derived NDVI to assess ecological responses to environmental change. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 503–510.
- Pongsiri, M.J., Roman, J.O.E., Ezenwa, V.O., & colaboradores (2009) Biodiversity loss

affects global disease ecology. *BioScience*, 59, 945–954.

Prensa Libre (2017) Narcos provocan incendios forestales en áreas protegidas de Petén. *Prensa Libre*.

R Core Team (2016) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, Austria.

Reeves, W. C. (2019). Mosquito vector and vertebrate host interaction: The key to maintenance of certain arboviruses. In *Ecology and Physiology of Parasites* (pp. 223–231). University of Toronto Press. <https://doi.org/10.3138/9781487595128-013>

Roche, B., and J.-F. Guégan. 2011. “Ecosystem Dynamics, Biological Diversity and Emerging Infectious Diseases.” *Comptes Rendus - Biologies* 334 (5–6).

Romero-Alvarez, D. and Escobar, L.E. (2017a) Oropouche fever, an emergent disease from the Americas. *Microbes and Infection*. DOI: 10.1016/j.micinf.2017.11.013

Romero-Alvarez, D. and Escobar, L.E. (2017b) Vegetation loss and the 2016 Oropouche fever outbreak in Peru. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 112, 292–298.

Romero-Alvarez, D., Peterson, A.T. and Escobar, L.E. (2017) Surveillance fatigue (*fatigatio vigilantiae*) during epidemics. *Revista chilena de Infectología*, 34, 289–292.

Sader, S.A., Sever, T., Smoot, J.C. and Richards, M. (1994) Forest change estimates for the northern Petén region of Guatemala - 1986-1990. *Human Ecology*, 22, 317–332.

Schmidt, K.K.A. and Ostfeld, R.R.S. (2001) Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology*, 82, 609–619.

Schuffenecker, I., Iteman, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M. C., Lavenir, R., Pardigon, N., Reynes, J. M., Pettinelli, F., Biscornet, L., Diancourt, L., Michel, S., Duquerroy, S., Guigon, G., Frenkiel, M. P., Bréhin, A. C., Cubito, N., Desprès, P., ... Brisse, S. (2006). Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Medicine*, 3(7), 1058–1070. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030263>

Sodhi, N.S. and Ehrlich, P.R. (2010) *Conservation Biology for All*, (Vol. 1). Oxford University Press, Oxford.

Vasilakis, N., Cardoso, J., Hanley, K., Holmes, E., & Weaver, S. (2011). Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol*, 9.

Vasilakis, N., Shell, E., Fokam, E., Mason, P., & Hanley, K. (2007). Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge. *Virology*, 358.

Vicente-Santos, A., Moreira-Soto, A., Soto-Garita, C., Chaverri, L. G., Chaves, A., Drexler, J. F., Morales, J. A., Alfaro-Alarcón, A., Rodríguez-Herrera, B., & Corrales-Aguilar, E. (2017). Neotropical bats that co-habit with humans function as dead-end hosts for dengue virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(5), e0005537. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005537>

Vorou, R. (2016). Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: What we know and what we should investigate urgently. In *International Journal of Infectious Diseases* (Vol. 48, pp. 85–90). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.05.014>

Wulsch, C., Caragiulo, A., Dias-Freedman, I., Quigley, H., Rabinowitz, S. and Amato, G. (2016) Genetic diversity and population structure of Mesoamerican jaguars (*Panthera*

onca): Implications for conservation and management. *PLOS ONE*, 11, e0162377.

21. Anexos

21.1 Código de programación en R utilizado para el análisis estadístico

```
###Cargar los datos####  
data<-read.csv(file.choose())  
data<-read.table("D:\\CUNZAC\\DIGI\\Proyectos\\Proyectos 2020\\Vectores  
PNLT\\matriz.csv", sep=',',header=T)  
data  
  
#####Revisar los datos#####  
head(data)  
tail(data)  
str(data)  
  
###Establecer la primera columna para los sitios y no como otra variable####  
rownames(data)<-c(data$X)  
head(data)  
df<-data[,-1] #borra la primera variable  
df<-na.omit(df) #borrar las filas sin valores  
  
#####Escalar para estandarizar los datos#####  
df.scaled<-scale(df)  
df.scaled  
  
#####Crear la matriz de distancias#####  
##method = ("euclidean", "maximum", "manhattan", "canberra", "binary", "minkowsky",  
"pearson", "spearman", "kendall")  
require(stats)  
res.dist<-dist(x=df, method="euclidean")##sin escalar  
res.dist<-dist(x=df.scaled, method="euclidean")
```

res.dist

```
###ver las distancias###
```

```
x<-as.matrix(res.dist)[1:9,1:9]
```

```
x
```

```
round(x,digits=3)#redondear los datos
```

```
#####Agrupamiento Jerarquico#####
```

```
##method=("ward.D", "ward.D2", "single", "complete", "average"(=UPMGA), "msquitty"(=WPGMA),
```

```
##"median"(=WPGMC), "centroid"(=UPGMC))
```

```
require(stats)
```

```
res.hc<-hclust(d=res.dist,
```

```
          method="average")
```

```
plot(x=res.hc)
```

```
#####Dendrograma simple#####
```

```
require(factoextra)
```

```
fviz_dend(x=res.hc, cex=0.7,lwd=0.7)
```

```
###Coloque colores###
```

```
require(scales)
```

```
palette()
```

```
show_col(palette(rainbow(6)))
```

```
###Otras palletes
```

```
#pal_jco= color palettes inspired by plots in journal of clinical oncology
```

```
#palette= There is only one available option "deafault" (10 color palettes)
```

```
#alpha = Transparency level, a real number in (0,1)
```

```
#ggsci= Scientific journal and sci-fi themed color palettes for ggplot2
```

```
require("ggsci")
```

```
show_col(pal_jco(palette=c("default"))(10))
```

```
show_col(pal_jco("default",alpha=0.6)(10))
```

```
fviz_dend(x=res.hc, cex=0.8,lwd=0.8, k=3,  
          k_colors = "jco")
```

```
fviz_dend(x=res.hc, cex=0.8,lwd=0.8, k=3,  
          rect=T,  
          rect_border = "gray",  
          rect_fill=F)
```

```
fviz_dend(x=res.hc, cex=0.8,lwd=0.8, k=3,  
          rect=T,  
          rect_border = "gray",  
          rect_fill=F,  
          horiz = T)
```

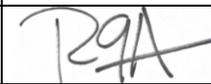
```
fviz_dend(x=res.hc, cex=0.8,lwd=0.8, k=3,  
          rect=T,  
          k_colors="jco",  
          rect_border = "jco",  
          rect_fill=T)
```

```
fviz_dend(x=res.hc, cex=0.8,lwd=0.8, k=3,  
          rect=T,  
          k_colors="jco",  
          rect_border = "jco",  
          rect_fill=T,  
          horiz=T)
```

Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
Dra. Michelle Bustamante Castillo	
Dr. Luis Escobar	
Dra. Gillian Eastwood	

Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
Rony Alberto García Anleu	Investigador Titular I	970062	X		
Luis Fernando Guerra Corado	Investigador Titular I	20151730		X	

Guatemala, 28 de febrero de 2021



Dra. Michelle Bustamante Castillo
Coordinadora del Proyecto de Investigación



Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador del Programa Universitario de Ciencias Básicas



Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas