

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA



Innovaciones en nanotecnología, biotecnología y bioinformática para la
producción masiva de insectos en Guatemala y el control de plagas
agrícolas en la región

Trabajo de graduación en modalidad de **Megaproyecto** presentado por
Isabella García Cáffaro
Nina Alejandra Figueroa de la Torre
Crista Gavarrete García
Mariana Edith López Gordillo
Luisa Fernanda Mejía Rivera

para optar al grado académico de Licenciadas en Bioquímica y Microbiología

y Marieandré González Pennington

para optar al grado académico de Licenciada en Química

Guatemala

2017

Innovaciones en nanotecnología, biotecnología y bioinformática para la
producción masiva de insectos en Guatemala y el control de plagas
agrícolas en la región

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Innovaciones en nanotecnología, biotecnología y bioinformática para la
producción masiva de insectos en Guatemala y el control de plagas
agrícolas en la región

Trabajo de graduación en modalidad de **Megaproyecto** presentado por
Isabella García Cáffaro
Nina Alejandra Figueroa de la Torre
Crista Gavarrete García
Mariana Edith López Gordillo
Luisa Fernanda Mejía Rivera

para optar al grado académico de Licenciadas en Bioquímica y Microbiología

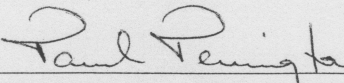
y Marieandré González Pennington

para optar al grado académico de Licenciada en Química

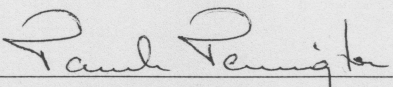
Guatemala
2017

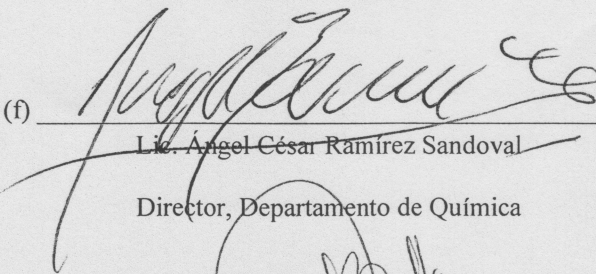
Aprobación del trabajo de graduación « Innovaciones en nanotecnología, biotecnología y bioinformática para la producción masiva de insectos en Guatemala y el control de plagas agrícolas en la región» presentado por Nina Alejandra Figueroa De la Torre, Isabella García Caffaro, Crista Gavarrete García; Marieandré Gonzalez Pennington, Mariana Edith López Gordillo, Luisa Fernanda Mejía Rivera.

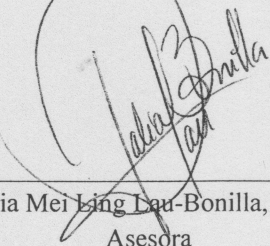
Vo. Bo.:

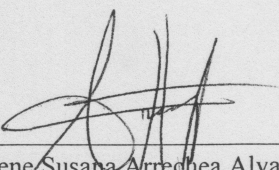
(f) 
Pamela Marie Pennington Aycinena, Ph.D.
Directora, Departamento de Bioquímica y Microbiología

Tribunal Examinador

(f) 
Pamela Marie Pennington Aycinena, Ph.D.
Asesora

(f) 
Lic. Ángel César Ramírez Sandoval
Director, Departamento de Química

(f) 
Dalia Mei Ling Lau-Bonilla, Ph.D.
Asesora

(f) 
Marlene Susana Arrechea Alvarado, Ph.D.
Asesora

Fecha de aprobación: Guatemala, 10 de noviembre de 2017

Índice

Listado de cuadros.....	viii
Listado de figuras.....	ix
Resumen.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. JUSTIFICACIÓN.....	5
IV. MARCO TEÓRICO.....	6
A. Moscas de la fruta.....	6
1. <i>Ceratitis capitata</i>	6
a. Función de la microbiota intestinal.....	7
1) Género bacteriano <i>Klebsiella</i>	8
b. Cascada de determinación sexual.....	9
2. <i>Anastrepha ludens</i>	10
a. Cascada de determinación sexual.....	12
B. Panorama.....	12
1. Mundial.....	12
2. Guatemala y México.....	13
C. Moscamed Guatemala.....	14
1. Producción de mosca estéril.....	14
D. Métodos de control.....	15
1. Control regulatorio.....	15
2. Medios sanitarios.....	15
3. Control químico.....	15
4. Trampas con feromonas.....	16
5. Control biológico.....	16
a. Bacterias y parasitoides.....	16
1) <i>Wolbachia</i>	16
2) <i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	16
b. SIT.....	17
1) Ventajas.....	18
2) Desventajas.....	18
E. BIOTECNOLOGÍA.....	18
1. Silenciamiento de genes.....	18
a. ARN de interferencia.....	19

1)	Mecanismo básico de interferencia	19
2)	Desventajas y ventajas de ARNi	20
b.	Internalización del ARN de doble hebra usando bacterias transgénicas	20
1)	Generación de plantilla de ADN	21
2)	Diseño de vector de clonación	21
3)	Transformación de bacterias	21
4)	Métodos de entrega	22
c.	Evaluación de silenciamiento genético	22
F.	BIOINFOMÁTICA	24
1.	Secuenciación	24
a.	Secuenciación SMRT	25
b.	Secuenciación MiniSeq de Illumina	26
c.	Alineamiento de secuencias	29
2.	rep-PCR (BOX PCR)	29
3.	Genes característicos del género <i>Klebsiella</i>	31
a.	Genes metabólicos	31
b.	Genes de virulencia	31
G.	NANOTECNOLOGÍA	34
1.	Quitina	34
a.	Estructura de la quitina	34
b.	<i>Ceratitis capitata</i> como fuente de quitina	35
c.	Extracción de quitina	35
2.	Quitosano	36
a.	Estructura del quitosano	36
b.	Propiedades fisicoquímicas importantes	37
c.	Desacetilación	38
d.	Aplicaciones	38
V.	METODOLOGÍA	40
A.	Silenciamiento de genes de determinación sexual en <i>Ceratitis capitata</i> y <i>Anastrepha ludens</i>	40
1.	Sitio de estudio	40
2.	Sujetos de estudio	40
3.	Enfoque, diseño y tipo de investigación	40
4.	Tipo y tamaño de muestra	40
5.	Variables	40
6.	Hipótesis	41
B.	Caracterización de <i>Klebsiella oxytoca</i> aislada de ambientes asociados a <i>Ceratitis capitata</i>	46

1. Sitio de estudio.....	46
2. Sujetos de estudio.....	46
3. Enfoque, diseño y tipo de investigación	46
4. Variables.....	46
5. Hipótesis.....	47
C. Producción de quitosano a partir del pupario de mosca de la fruta <i>Ceratitis capitata</i>	50
1. Sitio de estudio.....	50
2. Sujetos de estudio.....	50
3. Enfoque, diseño y tipo de investigación	50
4. Tipo y tamaño de muestra.....	50
5. Variables.....	50
6. Hipótesis.....	51
7. Método	51
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
A. Silenciamiento de genes de determinación sexual en <i>Ceratitis capitata</i> y <i>Anastrepha ludens</i>	55
B. Caracterización de <i>Klebsiella oxytoca</i> aislada de ambientes asociados a <i>Ceratitis capitata</i>	104
C. Producción de quitosano a partir del pupario de mosca de la fruta <i>Ceratitis capitata</i>	135
VII. CONCLUSIONES	147
VIII. RECOMENDACIONES	149
IX. BIBLIOGRAFÍA	151
X. ANEXOS.....	167

Listado de cuadros

Cuadro 1. Genes propios del metabolismo de <i>Klebsiella spp.</i>	31
Cuadro 2. Variables experimentales controladas por el investigador.....	40
Cuadro 3. Variables intervinientes no controladas por el investigador.....	41
Cuadro 4. Variables experimentales controladas por el investigador.....	46
Cuadro 5. Programas a utilizar para el análisis de resultados.....	49
Cuadro 6. Variables experimentales controladas por el investigador.....	50
Cuadro 7. Cantidades de muestras y reactivos utilizados para la extracción de quitina.....	52
Cuadro 8. Condiciones de temperatura y concnetración para la desacetilación.....	53
Cuadro 9. Concentración de arn extraído de larvas estadio L3, pupa y adulto <i>C. capitata</i>	56
Cuadro 10. Concentraciones y purezas de arn extraído de larvas de estado L3, pupas (48 horas antes de emerger) y adulto <i>A. ludens</i>	57
Cuadro 11. Problemas y soluciones enfrentados durante la extracción de ARN.....	61
Cuadro 12. Condiciones de oligos diseñados para PCR convencional del gen <i>transformer</i> y <i>transformer-2</i> de <i>C. capitata</i> y <i>transformer</i> de <i>Anatrepha ludens</i>	62
Cuadro 13. Mayor proporción de clones celestes obtenidos luego de la transformación con el plásmido ligado.....	67
Cuadro 14. Problemas y soluciones enfrentados durante la transformación de <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	68
Cuadro 15. Tamaño de productos de amplificación esperados para los juegos de oligos utilizados.....	72
Cuadro 16. Bajas concentraciones de plásmido ligado obtenido de los clones seleccionados de los genes <i>Cctra</i> , <i>Cctra-2</i> y <i>Altra</i> , suplementado con tet (50µg/ml) + carb (60µg/ml).....	76
Cuadro 17. Problemas y soluciones enfrentados durante la extracción del plásmido correspondiente a cada gen de ambas especies.....	77
Cuadro 18. Fenotipos obtenidos de distintos clones de <i>E. coli</i> XL1-Blue luego del reaislamiento.....	79
Cuadro 19. Altas concentraciones de plásmido ligado obtenido de los clones reaislados suplementado con tet (12.5µg/ml) + carb (100µg/ml).....	80
Cuadro 20. Tamaño de productos de amplificación esperados para los juegos de oligos utilizados para ambas especies.....	82
Cuadro 21. Alto porcentaje de identidad de los clones secuenciados con la secuencia de “ <i>A. ludens</i> mRNA complete cds” (Genbank: EU024509.1).....	86
Cuadro 22. Clones candidatos para la inducción de silenciamiento de los genes <i>Cctra</i> , <i>Cctra-2</i> y <i>Altra</i>	99
Cuadro 23. Condiciones de oligos diseñados para pcr tiempo real de los genes <i>transformer</i> y <i>transformer-2</i> de <i>C. capitata</i> y <i>transformer</i> de <i>Anatrepha ludens</i>	100
Cuadro 24. Evaluación de la calidad del ADN genómico de la extracción de medio sólido de <i>K. oxytoca</i> de fenotipo M (mucoso) y fenotipo NM (no mucoso).	108
Cuadro 25. Resultados de calidad de ADN genómico extraído con DNAzol con y sin tratamiento de lisozima.....	110
Cuadro 26. Resultados de calidad de adn genómico extraído con DNAzol con y con lisozima.....	111
Cuadro 27. Resultados de la segunda prueba de extracción de ADN genómico en mayor concentración.....	112
Cuadro 28. Concentración y pureza de ADN genómico de mucoso-m y no mucoso-nm utilizando 4 diferentes métodos.....	113
Cuadro 29. Comparación de la concentración y pureza del ADN extraído, y las muestras que llegaron a Macrogen corea en el transcurso de 4 – 5 días.....	114
Cuadro 30. Concentración y pureza de ADN obtenidas en la optimización de extracción de ADN genómico de <i>Klebsiella oxytoca</i> de la cepa c-cafetá.....	116
Cuadro 31. Resultados de la calidad de ADN genómico luego de la extracción con DNAzol, lisozima, proteinasa K, ARNasa y tratamiento a 65°C y 80°C para eliminación de nucleasas.....	118

Cuadro 32. Resultados de extracción para mandar a secuenciar a Genewiz en Estados Unidos y por Illumina MiniSeq en Guatemala. Resultados obtenidos del Nanodrop Spectrophotometer.....	119
Cuadro 33. Análisis de identificación de las bacterias y de susceptibilidad o resistencia a antibióticos realizado en el laboratorio clínico DIRAD por la Dra. Dalia Lau.....	121
Cuadro 34. Alineamiento de genoma de <i>K. oxytoca</i> cepa C con genes simbióticos con el programa BLAST de NCBI.	133
Cuadro 35. Alineamiento de genoma de <i>K. oxytoca</i> cepa C con genes metabólicos con el programa BLAST de NCBI.	134
Cuadro 36. Rendimientos de extracción de quitina para pupario de hembra y macho.....	135
Cuadro 37. Rendimiento de conversión de quitina a quitosano con diferentes condiciones de reacción. ...	135
Cuadro 38. Grado de desacetilación para las muestras de quitosano obtenidas mediante distintas condiciones de desacetilación.	137

Listado de figuras

Figura 1. Esquema del proceso de producción de la planta y el área que abarca el componente de caracterización de genes.	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>C. capitata</i> ante dos panoramas climáticos (invierno y verano).	6
Figura 3. Fisiología y diferencias morfológicas de <i>Ceratitits capitata</i> macho y hembra.	7
Figura 4. Cascada de determinación sexual de <i>Ceratitits capitata</i> .	9
Figura 5. Ciclo de vida generalizado de la mosca de la fruta <i>A. ludens</i> .	11
Figura 6. Fisiología y diferencias morfológicas de <i>A. ludens</i> macho y hembra.	11
Figura 7. Planta de producción de mosca del mediterráneo estéril del programa Moscamed.	14
Figura 8. Distribución de la planta de producción masiva de mosca de la fruta <i>Ceratitits capitata</i> y <i>A. ludens</i> .	14
Figura 9. Mecanismo de la técnica SIT.	17
Figura 10. Mecanismos básicos de interferencia.	20
Figura 11. Gráfico proporcionado por PCR tiempo real.	23
Figura 12. Curva estándar.	24
Figura 13. Esquema del proceso de secuenciación por SMRT.	26
Figura 14. Proceso de secuenciación de nueva generación.	27
Figura 15. Esquema del proceso de secuenciación en el equipo Miseq.	28
Figura 16. Esquema del procedimiento de rep- PCR.	30
Figura 17. Genes en común en cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	33
Figura 18. Genes de resistencia a antibióticos en <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	34
Figura 19. Estructura de la quitina.	35
Figura 20. Estructura del quitosano.	37
Figura 21. Diagrama general de metodología a seguir.	42
Figura 22. Ecuaciones planteadas y solución para el crecimiento de cepas de <i>Klebsiella oxytoca</i> .	48
Figura 23. Diagrama general de metodología a seguir.	53
Figura 24. Producción de ADNc libre de contaminación con adn a partir de larvas de <i>A. ludens</i> y <i>C. capitata</i> .	58
Figura 25. Contaminación de ARN con ADN al extraer arn de pupas hebras <i>A. ludens</i> y <i>C. capitata</i> .	58
Figura 26. Tratamiento con DNasa de ARN de adultos de <i>C. capitata</i> y <i>A. ludens</i> produce resultados inconsistentes de ARN libre de ADN genómico.	59

Figura 27. Síntesis exitosa de ADNc de adulto de <i>C. capitata</i> .	59
Figura 28. ARN extraído contaminado con aerosoles ambientales	61
Figura 29. Presencia de productos de amplificación obtenidos en hembra y macho adultos de <i>C. capitata</i> y <i>A. ludens</i> con oligos diseñados para PCR convencional	65
Figura 30. Clones <i>E. coli</i> XL1-Blue obtenidos de la transformación con pGEM-T ligado al producto de PCR touchdown del gen transformer de <i>C. capitata</i> hembra.	66
Figura 31. Clones <i>E. coli</i> XL1-Blue obtenidos de la transformación con pGEM-T ligado al producto de PCR touchdown del gen transformer-2 de <i>C. capitata</i> hembra.	66
Figura 32. Clones <i>E. coli</i> XL1-Blue obtenidos de la transformación con pGEM-T ligado al producto de PCR touchdown del gen transformer de <i>A. ludens</i> hembra.	67
Figura 33. Clones transformados con éxito con el plásmido ligado al gen <i>tra</i> de <i>C. capitata</i> .	69
Figura 34. Clones transformados con éxito con el plásmido ligado al gen <i>tra-2</i> de <i>C. capitata</i> .	70
Figura 35. Clones transformados con éxito con el plásmido ligado al gen <i>tra</i> de <i>A. ludens</i> .	71
Figura 36. Ubicación del fragmento de interés en la orientación adecuada para la producción de ARNdh (delimitado por los promotores T7)	73
Figura 37. Presencia del inserto en la orientación deseada en clones seleccionados correspondientes al gen <i>tra</i> de <i>C. capitata</i>	74
Figura 38. Presencia del inserto en la orientación deseada en clones seleccionados correspondientes al gen <i>tra-2</i> de <i>C. capitata</i>	74
Figura 39. Presencia del inserto en la orientación deseada en clones seleccionados correspondientes al gen <i>tra</i> de <i>A. ludens</i> .	75
Figura 40. Clones de distintos fenotipos obtenidos de un clon del gen <i>Cctra</i> .	78
Figura 41. Presencia del inserto en clones correspondientes al gen <i>Cctra</i> seleccionados del tamaño esperado producido por EcoRI.	83
Figura 42. Presencia del inserto en clones correspondientes a los genes <i>Cctra-2</i> y <i>Altra</i> seleccionados del tamaño esperado producido por EcoRI.	83
Figura 43. Análisis de secuencia de plásmidos obtenidos de los clones secuenciados.	85
Figura 44. SpeI enzima con único sitio de restricción en la secuencia de <i>A. ludens</i> publicada en NCBI	87
Figura 45. Ausencia del producto de digestión por speI del fragmento de interés en clones correspondientes al gen <i>Altra</i>	88
Figura 46: Digestión nula utilizando la enzima SpeI con doble tratamiento del fragmento de interés en clones correspondientes al gen <i>Altra</i>	88
Figura 47. Cuantificación de ARNdh de clones.	90
Figura 48. Tamaño de ARNdh producido por clones de <i>C. capitata</i> gen <i>tra</i> .	94
Figura 49. Tamaño de ARNdh producido por clones de <i>C. capitata</i> gen <i>tra-2</i> .	94
Figura 50. Tamaño de ARNdh producido por clones de <i>A. ludens</i> gen <i>tra</i> .	95
Figura 51. Crecimiento de clones candidatos inducidos con IPTG y no inducidos.	97
Figura 52. Crecimiento de clones candidatos del gen <i>transformer-2</i> inducidos con IPTG y no inducidos.	98
Figura 53. Crecimiento de clones candidatos del gen <i>transformer</i> de <i>A. ludens</i> inducidos con IPTG y no inducidos.	98
Figura 54. PCR touchdown con oligos diseñados para PCR tiempo real para el gen <i>transformer</i> de <i>C. capitata</i> .	102
Figura 55. PCR touchdown con oligos diseñados para PCR tiempo real para el gen <i>transformer-2</i> de <i>C. capitata</i> .	103
Figura 56. PCR touchdown con oligos diseñados para PCR tiempo real para el gen <i>transformer</i> de <i>A. ludens</i> .	103
Figura 57. <i>Klebsiella</i> aislada de la esponja de una jaula siendo un ambiente asociado a <i>C. capitata</i> con la colaboración de Moscamed Guatemala.	104

Figura 58. Purificación y aislamiento de <i>Klebsiella oxytoca</i> del cultivo proporcionado por Moscamed.	105
Figura 59. Aislamiento de <i>Klebsiella oxytoca</i> aislada de <i>Ceratitis capitata</i> .	106
Figura 60. Batería bioquímica de <i>Klebsiella oxytoca</i> aislada de <i>Ceratitis capitata</i> .	106
Figura 61. Gel de integridad 0.5% de ADN genómico extraído de <i>K. oxytoca</i> (M-mucoso, NM-no mucoso y C-cafetal) corrido a 90v x 60cm por 30 minutos	107
Figura 62. Curva de crecimiento de <i>K. oxytoca</i> medido con estándares de MacFarland.	109
Figura 63. Gel de integridad 0.5% corrido a 50 voltios x 60cm por 1.5 horas.	114
Figura 64. Gel de 1%, cargaron 1ul de adn genómico recibido, corrido a 100 voltios, cargaron 0.5ul de muestra y utilizaron escalera de 1kb.	115
Figura 65. Geles de integridad de ADN genómico 0.5% corrido a 50 voltios x 60cm por 1.5 horas.	116
Figura 66. Geles de integridad ADN genómico previo y posterior al envío a Macrogen Corea.	118
Figura 67. Gel de integridad de ADN genómico y su comparación con la extracción de plásmidos.	120
Figura 68. Pruebas de BOX-PCR con variaciones de concentración de ADN genómico y de pruebas con cultivos ON en LB y colonia.	122
Figura 69. Prueba de diferentes variaciones para optimización del BOX-PCR con la cepa M (mucoso).	124
Figura 70. Comparaciones de patrones de bandas del box-pcr para cepas M, NM, C y Kp (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) de ADN y de medio líquido LB de un on a 37°C.	125
Figura 71. PCR in silico realizado con el primer boxair1 y una secuencia de <i>Klebsiella oxytoca</i> .	126
Figura 72. Genoma circular de la cepa M (kom) y su análisis estadístico obtenido del programa CLC Sequence viewer al ingresar la secuencia generada por Illumina.	127
Figura 73. Resultados del análisis de la secuencia de la muestra C de <i>Klebsiella oxytoca</i> obtenida por miniseq de Illumina con la aplicación bacterial analysis pipeline.	128
Figura 74. Espectros FTIR de quitosano de pupario de hembra .	137
Figura 75a. Espectros FTIR de quitosano de pupario de hembra desacetilado a 90 °C con NaOH 40% (p/v).	138
Figura 76. Espectros FTIR de quitosano de pupario de macho.	140
Figura 77. Espectros FTIR de quitosano comercial .	142
Figura 78. Difractogramas de quitina y quitosano de pupario de macho.	144
Figura 79. Difractogramas de quitina y quitosano de pupario de hembra.	145
Figura 80. Termogramas de quitina y quitosano de pupario de hembra (A) y macho (B).	146
Figura 81. Flujo de trabajo para extracción de ARN.	167
Figura 82. Flujo de trabajo para síntesis de ADNc.	167
Figura 83. Flujo de trabajo para PCR de genes específicos y geles de agarosa.	168
Figura 84. Alineamiento de secuencia de gen <i>transformer</i> en <i>C. capitata</i> y <i>A. suspensa</i> .	169
Figura 85. Alineamiento de secuencia de gen <i>transformer-2</i> en <i>C. capitata</i> y <i>A. suspensa</i> .	170
Figura 86. Alineamiento de secuencia de gen <i>transformer</i> en <i>A. suspensa</i> .	171

Resumen

Este trabajo pretende desarrollar procesos innovadores basados en la nanotecnología, biotecnología y bioinformática, apoyando la producción de Mosca del Mediterráneo y Mosca Mexicana estéril en Guatemala, las cuales se exportan para el control de estas plagas agrícolas en México y Estados Unidos. Eso se logrará enfocando la investigación en tres puntos clave: Mejora de producción, caracterización genética de simbioses y manejo integral de residuos. La mejora de la producción de machos estériles en las plantas de cría masiva se realizará al caracterizar los genes de desarrollo sexual *transformer* y *transformer-2*, como blancos potenciales para la eliminación de hembras de *Anastrepha ludens* (*tra*) y *C. capitata* (*tra* y *tra-2*) utilizando la técnica de silenciamiento genético. Se caracterizaron genéticamente cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de ambientes asociados a *Ceratitis capitata*. Para el manejo de residuos se determinó la calidad de productos derivados de pupario como primer paso para la producción de nanopartículas de quitosano y derivados para el tratamiento de aguas residuales (Cuadra, 2018).

La mejora de producción de machos estériles en las plantas de cría masiva de *Ceratitis capitata* y *Anastrepha ludens* se realizó al optimizar la metodología de extracción de ARN de los estadios de *Ceratitis capitata* larva, pupa y adulto para obtener la mayor proporción y calidad de ADNc, diseñar y evaluar los juegos de oligos para cada gen *Cetra*, *Cetra-2* y *Altra* para PCR convencional, clonar los fragmentos de interés en las cepas *E. coli* XL1-BLUE y *E. coli* HT-115 (DE3) y producir ARNdH de estos clones. Por último, diseñar y evaluar los juegos de oligos para cada gen *Cetra*, *Cetra-2* y *Altra* para PCR tiempo real. Este módulo permitió diseñar con éxito los juegos de oligos *Cetra* (A), *Cetra* (B), *Cetra* (C), *Cetra-2* (B), *Altra* (A) y *Altra* (B) para PCR convencional. Los clones de *E. coli* HT-115 (DE3) *Cetra* (A) col. 10BC, col. 10C y *Cetra* (B) col. 25B, col. 25BC se proponen como candidatos para la producción de ARNdH. Por último, se diseñó con éxito un par de oligos, Q_ *Cetra* (2), Q_ *Cetra-2* (2), Q_ *Cetra-2* (3), Q_ *Cetra-2* (4), Q_ *Altra* (1), Q_ *Altra* (2) y Q_ *Altra* (3) para PCR tiempo real ya que permitieron observar un producto de amplificación del fragmento del gen *Cetra* específico para hembra.

La caracterización genética de cepas de *Klebsiella* se realizó al extraer y secuenciar el genoma de cepas. La secuencia obtenida se comparó con los genomas anotados obtendría la secuencia de nucleótidos para compararla con genomas ya anotados de *K. oxytoca*. Esta evaluación permitió determinar los genes metabólicos, simbióticos y posibles factores de virulencia. Adicionalmente, se determinó la presencia de plásmidos y se caracterizó genéticamente las cepas con un método molecular simple. Este módulo permitió optimizar el proceso de extracción de ADN genómico de *Klebsiella oxytoca* y el protocolo de BOX-PCR para *Klebsiella* con el fin de comparar patrones de bandas entre diferentes cepas. Por otro lado, fue posible determinar que la cepa M es una bacteria simbiótica que no presenta genes que codifican factores de virulencia, ni resistencia a antibióticos de usos clínico, indicando que esta es importante para el desarrollo de *C. capitata*. La cepa C no presenta genes que codifican a factores de virulencia, ni resistencia a antibióticos, por lo que no se considera de riesgo biológico.

El manejo integral de residuos al transformar el pupario de *C. capitata* en quitosano se realizó al optimizar el proceso de obtención de quitosano a partir de los desechos de harina de pupario de mosca hembra y macho y el producto obtenido fue caracterizado por medio de espectrofotometría Infrarroja (IR), Difracción de Rayos-X (XRD), Análisis termogravimétrico (TGA) y un análisis morfológico con microscopio electrónico (SEM). Este módulo permitió determinar que las condiciones óptimas para la desacetilación son a 100 °C y con NaOH a 40% (p/v). El producto obtenido con estas condiciones mostró un grado de desacetilación de 98% y no se vio afectada su estabilidad térmica ni su cristalinidad.

I. INTRODUCCIÓN

La familia Tephridae (5,000 especies) causa los mayores daños en plantaciones agrícolas ya que 1,400 especies se alimentan de fruta carnosa y 70 de estas son consideradas plagas. Los cuatro géneros de plagas con mayor importancia mundial son: *Ceratitis*, *Anastrepha*, *Bactrocera* y *Rhagoletis*. Estos géneros son consideradas plagas ya que se han diseminado por el globo terráqueo y han llegado a causar una disminución del 25% en la producción frutícola (Malacrida *et al.*, 2007).

La mosca del mediterráneo, *Ceratitis capitata*, es considerada una plaga por ser capaz de infectar 418 frutas y vegetales (Alphey *et al.*, 2014; CABI, 2016b; Headrick & Goeden, 1996a; Rempoulakis *et al.*, 2016a; Scolari *et al.*, 2014). Las plantas frutales más afectadas son los cítricos, manzanas, peras, duraznos y nectarinas (Oxitec 2016). Se ha demostrado que *Ceratitis capitata* alberga una diversa comunidad de bacterias en su aparato digestivo, la mayoría de las cuales pertenece a los géneros *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. (BEHAR, YUVAL, & JURKEVITCH, 2005). Se ha descrito que la microbiota perteneciente al buble esofágico está comprendida, en su mayoría, por *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter agglomerans*. *Klebsiella oxytoca* es una bacteria simbiótica que se encuentra durante todo el ciclo de vida de la mosca, colabora en la fijación de nitrógeno y en la copula con la elección de pareja (Qureshi, 2016). Actualmente la presencia de *K. oxytoca* en la mosca del mediterráneo es una preocupación para los importadores, específicamente a Estado Unidos, ya que es posible que esta posea genes patogénicos.

La mosca mexicana, *Anastrepha ludens*, es considerada una plaga ya que se encuentra establecida en el noroeste de México en más de 35,000 hectáreas de plantación. En otros países como Guatemala a pesar que no existan estudios específicos para *A. ludens* (F. M. Eskafi, 1988) se conoce que algunas especies de este género (*Anastrepha fraterculus*, *Anastrepha obliqua*, *Anastrepha serpentina* y *Anastrepha suspensa*) infectan alrededor del 98% las frutas exportables (Jenkins & Goenaga, 2008; Oroño, Albormoz, Núñez, Van Nieuwenhove, & Bezdjian, 2006; Ovruski, Aluja, Sivinski, & Wharton, 2000). Los principales hospederos de *A. ludens* son los cítricos, mangos, manzanas y melocotones y ha causado daños valorados en 230 millones de dólares anuales (Aluja, Celedonio-Hurtado, Castillo, Guillen, & Rios, 1996).

La amplia distribución de ambas especies mencionadas, ha motivado la implementación de distintos programas de control, el más exitoso hasta el momento es la técnica del insecto estéril (SIT por sus siglas en inglés) (CABI, 2016b). Esta técnica es un método eco-amigable y sostenible que utiliza radiación gama o rayos X para la esterilización de machos *C. capitata*, *Anastrepha sp.* y *Bactrocera sp.* (Alphey *et al.*, 2006a; FAO/IAEA, 2016b; Gasperi *et al.*, 2002a). Actualmente existen 24 programas que aplican esta técnica para controlar poblaciones y se encuentran localizadas en: Sur África, Marruecos, Tunes, Egipto, Israel, Croacia, Grecia, Tailandia, Australia, Hawaii, Brazil, Argentina, Chile, Perú, Guatemala, México y Florida (FAO/IAEA, 2016a). Durante la producción de cría masiva, se generan desechos de colorantes empleados

en la identificación de machos estériles, desechos de la dieta larval y desechos de pupario y moscas adultos. La planta El Pino Moscamed, Guatemala, planta de producción de biocontroles de mosca de la fruta más grande del mundo, produce semanalmente 1 billón de machos estériles, más del 20% de la producción mundial de biocontroles. Semanalmente se producen 70 kilos de desecho de exoesqueleto de mosca. Anualmente son más de 3,600 kilos de materia que podrían brindar ingresos a la planta si se transformarían en productos de valor agregado.

Desde hace 16 años se han realizado distintos esfuerzos para mejorar la eficiencia del SIT, entre estos esfuerzos se encuentran métodos para la optimización durante la selección de machos por medio de cepas de sexado genético o GSS (por sus siglas en inglés). Sin embargo, este método solamente facilita la selección de machos (Alphey *et al.*, 2006a). El incorporar el método de silenciamiento por medio de la vía oral alimentándolas con bacterias productoras de ARNdh (Li, Zhang, & Zhang, 2011; Pomerantz & Hoy, 2014; Taracena *et al.*, 2015; Whyard, Singh, & Wong, 2009; Yu *et al.*, 2013) permitirá aumentar la producción de machos estériles al doble ya que, las hembras se convertirían en machos. Actualmente se han realizado investigaciones de silenciamiento de genes dentro de la cascada de determinación sexual como: doublesex (*dsex*), transformer (*tra*) y transformer-2 (*tra-2*) en: *Bactrocera sp.*, *Anastrepha sp.* y *C. capitata*. En *C. capitata* se han silenciado exitosamente los genes descritos anteriormente en huevos y mosca adulta para determinar su función. Se ha determinado que *Ccdsx* está regulado por los genes *Cctra* y *Cctra-2* que son necesarios para el empalme del mRNA que promueve el omitir los exones macho-específicos (Pane, Salvemini, Delli Bovi, Polito, & Saccone, 2002; Salvemini *et al.*, 2009). En *A. ludens* no se ha realizado este tipo de estudios ya que existe poca información publicada, pero se han realizado investigaciones parecidas con otras especies del género *Anastrepha* (Schetelig, Milano, Saccone, & Handler, 2012)

Las moscas de la fruta albergan una comunidad diversa de bacterias en su aparato digestivo, la mayoría de las cuales pertenece a los géneros *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* (BEHAR *et al.*, 2005). Los estudios muestran que la microbiota asociada con el bulbo esofágico de *C. capitata* está comprendida, en su mayoría, por *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter agglomerans* (Marchini, Rosetto, Dallai, & Marri, 2002; Yuval, Ben-Ami, Behar, Ben-Yosef, & Jurkevitch, 2013). *Klebsiella oxytoca*, la cual es una bacteria simbiótica presente en el desarrollo de la mosca, desde el huevo hasta la pupa (Aharon *et al.*, 2013). Esta bacteria colabora en la fijación de nitrógeno utilizado por las moscas y juega un papel importante en cuanto a la elección de pareja para copular (BEHAR *et al.*, 2005). *Klebsiella oxytoca* es una bacteria Gram negativa, nombrada Edwin Klebs (microbiólogo alemán), en siglo XIX (Qureshi, 2016). Este es un patógeno oportunista que afecta a al hospedero con un sistema inmune comprometido o debilitado causando diversas enfermedades nosocomiales tanto en adultos como a nivel pediátrico (Qureshi, 2016).

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general

- Apoyar el desarrollo de aplicaciones nanotecnológicas, biotecnológicas y bioinformáticas dentro de las plantas de cría masiva de Mosca del Mediterráneo y Mosca mexicana estéril en Guatemala para el control de plagas agrícolas en la región.

B. Objetivos específicos

Caracterización de los genes de desarrollo sexual *transformer* y *transformer-2* como blanco potencial en la eliminación de hembras en la mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* (Loew) y en la mosca del mediterráneo de la fruta *Ceratitis capitata* (*Tra* y *Tra-2*):

1. Optimizar el proceso de extracción de ARN en moscas adultas, pupas y larvas de las moscas *A. ludens* y *C. capitata*.
2. Producir ADNc a partir de ARN extraído de insectos adultos de *A. ludens* y *C. capitata*.
3. Diseñar y validar por PCR convencional, oligos iniciadores de distintos fragmentos de la secuencia del ADNc de *Altra*, *Cetra* y *Cetra-2*.
4. Transformar la bacteria *E. coli* XL1-BLUE y *E. coli* HT115 (DE3) mediante choque térmico con el fragmento de interés.
5. Evaluar la estabilidad y expresión de ARNd_h producido por la *E. coli* HT115 (DE3) recombinante.
6. Diseñar y validar por PCR convencional, oligos iniciadores de distintos fragmentos de la secuencia del ADNc de *Altra*, *Cetra* y *Cetra-2* para su uso en PCR tiempo real.

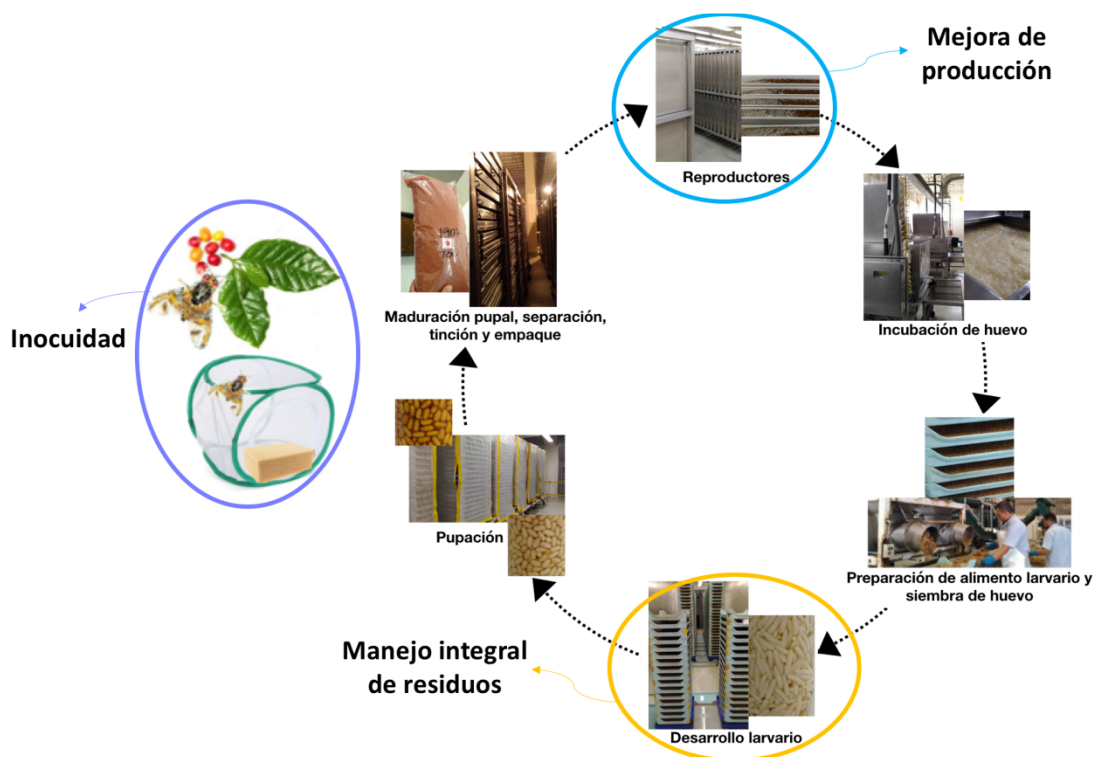
Caracterización genética de cepas de *Klebsiella oxytoca* aisladas de ambientes asociados a *Ceratitis capitata* (Wiedemann), por medio de secuenciación de su genoma, extracción de plásmidos y rep-PCR:

1. Identificar las bacterias aisladas como *Klebsiella oxytoca* con medios diferenciales o selectivos y pruebas bioquímicas.
2. Optimizar el proceso de extracción de ADN genómico y plásmidos de *Klebsiella oxytoca* aisladas de *Ceratitis capitata*.
3. Secuenciar el genoma de *Klebsiella oxytoca* aisladas de *Ceratitis capitata* por SMRT/MiSeq.
4. Comparar los perfiles genéticos de cepas de *Klebsiella* spp. con un método a base de PCR.

Optimización del proceso de producción de quitosano a partir del pupario de mosca de la fruta *Ceratitis capitata*:

1. Determinar de las condiciones óptimas de temperatura y concentración de hidróxido de sodio la para reacción de desacetilación en la obtención de quitosano a partir de pupario de mosca de la fruta.
2. Extraer quitina a partir de pupario de mosca de la fruta hembra y macho por tratamiento de desproteínización, desmineralización y decoloración.
3. Desacetilar la quitina extraída de pupario de mosca de la fruta, por método termoquímico durante una hora probando 4 distintas combinaciones para 2 condiciones de temperatura y 2 de concentración de hidróxido de sodio.
4. Realizar un análisis de la calidad del quitosano obtenido en cada tipo de reacción, según su grado de desacetilación obtenido mediante espectroscopía IR y morfología obtenido mediante microscopía electrónica, análisis termogravimétrico y difracción de rayos-X.

Figura 1. Esquema del proceso de producción de la planta y el área que abarca el componente de caracterización de genes.



III. JUSTIFICACIÓN

Esta investigación tiene como propósito apoyar el desarrollo de aplicaciones nanotecnológicas, biotecnológicas y genómicas para el control de plagas agrícolas en Guatemala. Se eligió trabajar con *Ceratitidis capitata* y *Anastrepha ludens* ya que actualmente estas son las especies trabajadas en la planta Moscamed de Guatemala utilizando la técnica del insecto estéril (SIT, por sus siglas en inglés). Para lo anterior se proponen soluciones para el manejo integral de residuos, caracterización genética de simbioses y mejora de producción.

Se propone aplicar en la planta El Pino, Moscamed, el manejo integral de desechos al utilizar el desecho producido por exoesqueletos de las moscas de la fruta. Esta planta produce anualmente más de 3,600 kilos de materia de mosca de la fruta que se puede aprovechar para sintetizar quitosano, como se realiza en plantas de producción de crustáceos. Este biomaterial podría utilizarse como un producto de valor agregado ya que el quitosano es un producto comercializable con diversas aplicaciones entre las cuales se encuentran: tratamiento de aguas, emulsificante, transporte de drogas y otras aplicaciones biomédicas importantes (Linden *et al*, 2000; Stamford *et al*, 2013; Kumar *et al*, 2014).

Para la mejora de producción de machos estériles en las plantas de cría masiva de *Ceratitidis capitata* y *Anastrepha ludens* se propone aplicar la técnica de silenciamiento de genes (ARNi). Esta técnica es una mejor alternativa comparada con las cepas de sexado genético ya que la masculinización de hembras permite aumentar la producción de *C. capitata* y *A. ludens* o eliminar a las hembras evitando su desarrollo. Además, que la implementación de una cepa de sexado genético toma años al necesitar distintas mutaciones cromosomales para obtener el fenotipo deseado y estable. La implementación de la técnica de ARNi permitiría mejorar no solamente la técnica SIT en moscas sino también en mosquitos ya que una vez evaluada esta tecnología se puede adaptar fácilmente a distintas especies (MOSCAMED, 2016; Rempoulakis *et al.*, 2016b).

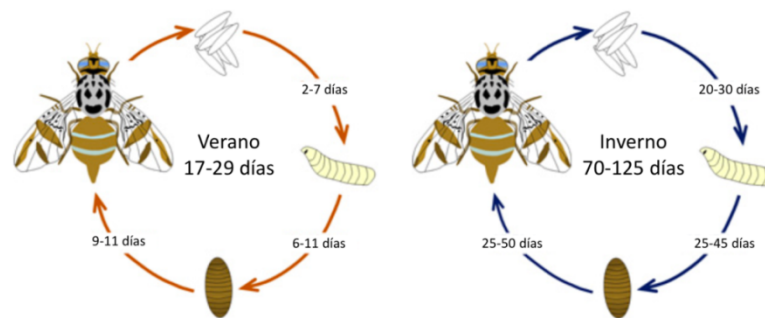
La caracterización genética de bacterias asociadas a *C. capitata* permite determinar si algunas de estas cepas poseen un papel importante en el desarrollo de la mosca de la fruta. *Klebsiella oxytoca* es una bacteria importante en el proceso de desarrollo *C. capitata* ya que es una bacteria simbiótica y se encuentra presente en todo el ciclo de vida (huevo a adulto). La secuenciación y comparación del genoma de *K. oxytoca* con *K. pneumoniae* permite determinar si *K. oxytoca* posee genes de patógenos similares o iguales a los de *K. pneumoniae*. Estos genes codifican para factores de virulencia o confieren resistencia a antibióticos. Si luego del análisis no se encuentran genes de virulencia en *K. oxytoca* esta bacteria se podría seguir utilizando durante el desarrollo de la mosca (Aharon *et al.*, 2013).

IV. MARCO TEÓRICO

A. Moscas de la fruta

1. *Ceratitis capitata*. La mosca del mediterráneo, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) del superorden Endopterygota (Holometabola), orden Dipetera y de la familia Tephritidae es endémica de sub-Sahara de África. Esta ha sido introducida en distintas regiones y en algunas de estas, la mosca del mediterráneo es considerada una plaga (CABI, 2016b). Esta especie es utilizada como especie modelo para el análisis de invasiones y estrategias de control de otras especies de mosca de la fruta (Scolari *et al.*, 2014).

Figura 2. Ciclo de vida de *C. capitata* ante dos panoramas climáticos (invierno y verano).



(Broughton & Perth, 2012)

La mosca del mediterráneo posee un ciclo de vida basado en cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto. El tiempo de transición entre cada estadio se ve afectado por la temperatura ambiental y el hospedero. En verano (24-26°C) puede finalizar el ciclo de vida alrededor de 17 a 29 días, mientras que en invierno (20-22°C) el ciclo se completa entre 70 a 125 días (Moscamed, 2010). Las hembras suelen colocar alrededor de 4 a 10 huevos por ovipositor. Los cuales eclosionan dentro del fruto convirtiéndose en larvas, atravesando tres estadios más. Estas larvas se convierten en pupa tras saltar de la fruta a la tierra para luego convertirse en adulto (Malacrida *et al.*, 2007).

Un adulto de *C. capitata* presenta longitudes entre 4-5mm, una coloración gris en el abdomen con franjas amarillas. En el torax tiene además manchas negras, sus patas son amarillas y sus alas poseen bandas tanto grises como amarillas. Las hembras (derecha) se diferencian de los machos al presentar un mayor tamaño que los machos y un característico ovipositor (Broughton & Perth, 2012).

Figura 3. Fisiología y Diferencias morfológicas de *Ceratitis capitata* macho y hembra.



(Broughton & Perth, 2012)

a. Función de la microbiota intestinal. Se han realizado estudios de la microbiota intestinal de *C. capitata*. Las bacterias que se han encontrado con mayor predominancia son *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pectobacterium*. Estas tres bacterias tienden a ser constantes en el transcurso del ciclo de vida de la mosca, y algunas llegan a ser heredadas de forma vertical. Estas bacterias se conocen como simbióticas, debido a que son capaces de fijar el nitrógeno y degradar la pectina. Esto le permite a la mosca tener acceso al nitrógeno fijado por las bacterias (Aharon *et al.*, 2013).

Otro aspecto, es la importancia de *Klebsiella* en la microbiota al poseer enzimas que ayudan a degradar la celulosa y hemicelulosa para permitir que la mosca de la fruta lo utilice como fuente de carbono para la obtención de energía. Se requiere de la actividad de 3 enzimas especiales para poder liberar una molécula de glucosa de la celulosa: la endo- β -gluconasas (se une al esqueleto de la celulosa para permitir la acción de la segunda enzima), exo- β -gluconasas (atacan el esqueleto de la celulosa para liberar pequeñas cadenas de glucosa (oligosacáridos); finalmente la β -glucosidasa (hidroliza las cadenas cortas de glucosa en sólo unidades de glucosa) (Dantur, Enrique, Welin, & Castagnaro, 2015). Dichas enzimas han tenido un impacto tanto a nivel investigación como su aplicación en la industria. En la industria se sigue buscando enzimas que puedan degradar rápidamente la celulosa y la hemicelulosa de los carbohidratos.

En otra plaga se ha observado la importancia del género *Klebsiella* en la degradación de la celulosa. En Argentina, la especie *Diatraea accharalis* es un insecto considerado una plaga ya que causa daños a la mayoría de plantas. Al invadir al hospedero permite la invasión por otros microorganismos como bacterias y hongos (Dantur *et al.*, 2015). En un estudio de Dantur en el 2015 sobre las larvas de *D. saccharalis*, encontraron una relación entre la microbiota intestinal y la actividad enzimática de degradación de celulosa. Al analizar la microbiota se detectó que estaba compuesta mayormente por *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Microbacterium*, *Bacillus* y *Enterococcus*. Como resultado se determinó que *Klebsiella* y *Bacillus* tuvieron los niveles de celulosa soluble más alto, por lo que poseían una mayor actividad de degradación de celulosa y hemicelulosa. Esta degradación contribuía al insecto para la obtención de glucosa a partir de celulosa. (Dantur *et al.*, 2015).

Se realizaron estudios sobre el comportamiento de los machos estériles y no estériles en atraer a las hembras silvestres. Los machos estériles resultaron ser menos competentes para atraer a las hembras y copular en comparación con los machos silvestres. El método de esterilización (irradiación) llega a afectar la microbiota intestinal de las moscas. Los niveles de *Klebsiella* mostraron ser más bajos en los machos estériles en comparación con los silvestres. En el 2009, Ben Ami, Yuval y Jurkevitch propusieron que al afectar la microbiota intestinal da lugar a especies patogénicas tales como *Pseudomonas*. Ellos comprobaron que al alimentar a *C. capitata* con una dieta rica en *Klebsiella oxytoca* post-irradiación, disminuye la proporción de *Pseudomonas* en el intestino y un mejora la copulación del macho estéril con la hembra (Ami, Yuval, & Jurkevitch, 2009).

1) Género bacteriano *Klebsiella*. *Klebsiella* es un género de bacterias gram negativas, no flageladas, anaerobias facultativas y con cápsula de polisacáridos. Algunas de las bacterias de este género son: *K. mobilis*, *K. ornithinolytica*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis* y *K. variicola*. Sus condiciones óptimas de crecimiento son en agar nutritivo a 37 °C, pH = 7.0, presión osmótica de 1 atm romero.

Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae

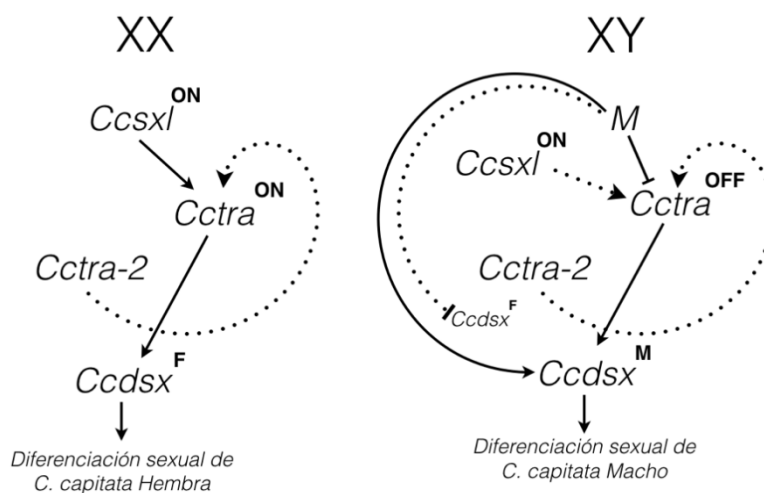
Klebsiella pneumoniae tiene relevancia clínica, ya que es una causa de enfermedades infecciosas oportunistas. Se asocia con el 5% de infecciones nosocomiales, en especial en el tracto respiratorio y urinario. En los 1980s se describieron casos de resistencia a cefalosporinas¹ de tercera generación. A partir de entonces, hay un aumento linear en la resistencia a antibióticos. La mayoría de resistencia se da por la síntesis de β -lactamasas de amplio espectro (siglas en inglés, ESBLs). Estas son derivadas de la lactamasas comunes, que tiene mutaciones en varios aminoácidos del sitio activo, que le dan mayor afinidad y capacidad hidrolítica. Los genes que codifican para estas enzimas están localizados en plásmidos (Asensio *et al.*, 2000).

Klebsiella oxytoca se distingue de *K. pneumoniae* por ser indol positiva y por poder multiplicarse en melecitosa, pero no en 3-hidroxibutarato. En cuanto a genes, *K. oxytoca* se diferencia por 1391 genes. Si se comparan los genomas de ambas bacterias, se encontrarían únicamente 3134 genes en común (Jiang *et al.*, 2014).

¹antibióticos que pertenecen a la familia de beta-lactámicos

b. Cascada de determinación sexual. La determinación sexual ocurre en una etapa temprana del desarrollo, es heredada a todos los linajes celulares e impacta el desarrollo de sistema nervioso. Esto debido a que tanto el desarrollo embrionario como el sexual son el resultado de la interacción entre la información genética maternal y zigótica. Esta determinación sexual es llevada a cabo durante el proceso de transición maternal a zigótica, en donde los embriones integran tanto la regulación post-transcripcional de embriones maternos como la transcripción genómica del cigoto (Bopp, Saccone, & Beye, 2014). La diferenciación entre machos y hembras es reflejada tanto en cambios morfológicos como también en diferenciación de tejidos, gametos y órganos reproductivos (Gabrieli, Falaguerra, Siciliano, Gomulski, & Scolari, 2010).

Figura 4. Cascada de determinación sexual de *Ceratitis capitata*.



(Adaptado de: Gabrieli *et al.*, 2010; Rideout, Billeter, & Goodwin, 2007; Salvemini *et al.*, 2009; Verhulst, van de Zande, & Beukeboom, 2010)

La determinación sexual se encuentra constituida por tres niveles jerárquicos. El proceso de la parte superior es la transducción de señales, luego se encuentra la selección del destino sexual por autorregulación, epigenética y switches genéticos y como último paso esta la ejecución de las señales (Bopp *et al.*, 2014). En la mosca *Ceratitis capitata* la determinación sexual comienza en la primera etapa de embriogénesis, la cual se completa diez horas después de que el proceso de celularización haya comenzado. La determinación ocurre en una cascada en la que se encuentran involucrados los genes *Transformer (tra)*, *Transformer-2 (tra-2)* y *Doublesex (dsx)*. Estos genes codifican proteínas dependientes de las concentraciones, siendo estas proteínas heredadas maternalmente como variantes hembra-específico (Gabrieli *et al.*, 2010).

En la mosca del mediterráneo la cascada de determinación sexual difiere entre machos y hembras a pesar que en ambos sexos cada uno de los genes cumple funciones específicas y similares (Figura 3). La

diferenciación es llevada a cabo debido a la producción de distintos tipos de transcritos formados por splicing del ARNm inmaduro, el cual posteriormente forma ARNm maduro. El mecanismo de splicing es el encargado de determinar el sexo ya que este puede dar lugar a la proteína funcional de hembras y a la proteína incompleta o no funcional presente en machos. En las hembras el primer gen presente en la cascada es el *Sextlethal (sxl)*, el cual se encarga de la activación del gen *tra*. Siendo este último el gen clave de la cascada puesto que genera ARNm maduro que codifica proteínas activas o inactivas. El gen *tra* tiene la capacidad de generar seis tipos de ARNm maduros por medio de splicing del ARNm inmaduro, entre los que se encuentran: proteína activa de hembras, proteínas inactivas de macho y transcritos del gen sin procesar (Gabrieli *et al.*, 2010).

Las distintas formas de splicing, combinación de intrones y exones, son reguladas por los genes co-reguladores: *Csnf, Ccfl(2)*, lo cual se ha observado en la mosca *Drosophila melanogaster* (Salvemini *et al.*, 2009). El gen *Tra* también tiene la función de generar el desarrollo celular de memoria. Este gen se regula por dos mecanismos: autoregulación por concentración y por un loop de auto-regulación. El loop de auto-regulación es formado por el gen *tra-2*, este loop aumenta la producción de proteína activa TRA evitando que se lleve a cabo el splicing masculino (Gabrieli *et al.*, 2010). La presencia de la proteína funcional TRA y la presencia de los cofactores determinan el splicing sexo específico del gen *Dsx* (Salvemini *et al.*, 2009). La expresión de *Dsx* empieza a la hora diez de la embiogénesis en machos y en hembras. Siendo la información del desarrollo de hembras re-iniciado en embriones a través de la reprogramación del splicing del ARNm del gen *tra* y la degradación de *dsx* (Gabrieli *et al.*, 2010)

En machos el primer factor de determinación sexual es el M el cual se encuentra relacionado con el cromosoma “Y”, dicho factor actúa bloqueando directamente o indirectamente la actividad auto catalítica del loop de auto-regulación. Induciendo la traducción de más proteínas TRA inactivas para la generación de splicing macho específico de todos los transcritos del gen *Tra* (Gabrieli *et al.*, 2010).

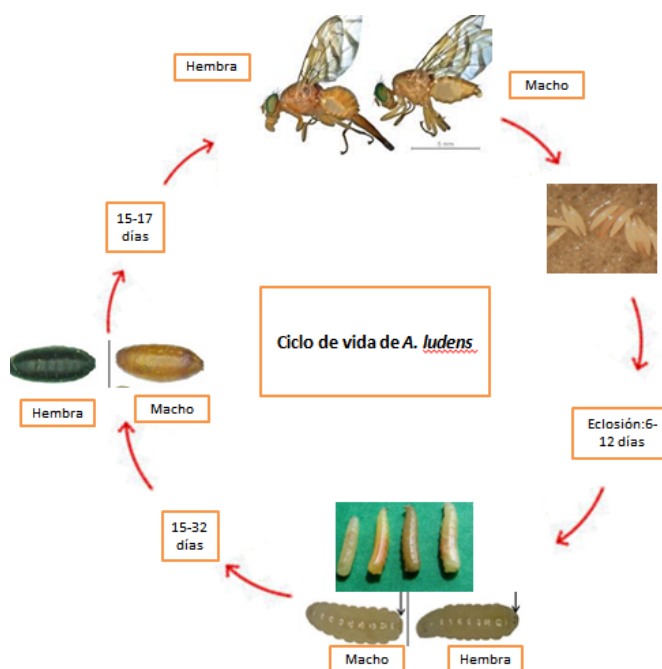
La cascada descrita anteriormente se obtuvo por medio de estudios de silenciamiento genético. Por ejemplo al silenciar el gen *Cctra* en una hembra adulta se observó un cambio a fenotipo masculino XX con cambios en las líneas geminales y somáticas (Pane *et al.*, 2002). También se observó que al silenciar el gen *Cctra-2* en la etapa de embrión se obtiene un fenotipo de adulto XX fértil pseudomacho (Salvemini *et al.*, 2009).

2. *Anastrepha ludens*. La mosca mexicana, *Anastrepha ludens* del orden Diptera y a la familia Tephritidae (Scolari *et al.*, 2014) es originaria de México y se extiende hasta el sur de Costa Rica. Esta especie al igual que *C. capitata*, ha sido introducida en distintas regiones y en algunas de estas es considerada una plaga (CABI, 2016a).

El ciclo de vida de *A. ludens* al igual que la de la mosca del mediterráneo es dependiente de la temperatura ambiental y está formado por cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto. Los huevos son

ovipositados en grupos de diez dentro de la fruta, con preferencia en las frutas que poseen el tejido epidérmico dañado, puesto que son de fácil acceso. Estos eclosionan en un periodo de 6-12 días, convirtiéndose en larvas. Las larvas se movilizan y alimentan dentro del fruto y luego de poseer los nutrientes necesarios se convierten en pupa luego de emerger de la fruta. Luego la pupa se convierte en macho, las hembras adultas pueden llegar a sobrevivir hasta durante 16 meses, mientras los machos no viven más de 12 meses. Un adulto en su vida útil puede depositar alrededor de 1,500 huevos (Sequeira, Millar & Bartels, 2001).

Figura 5. Ciclo de vida generalizado de la mosca de la fruta *A. ludens*.



(Sequeira, Millar & Bartels, 2001)

Figura 6. Fisiología y diferencias morfológicas de *A. ludens* macho y hembra



(Sequeira, Millar & Bartels, 2001)

La mosca adulta de *Anastrepha ludens* posee una longitud de 7 a 11mm. Las hembras (izquierda) es más grande que el macho además de poseer un ovopositor en la parte trasera que es la mitad de su tamaño total de la mosca ya que puede llegar a medir hasta 5mm (Sequeira, Millar & Bartels, 2001).

a. Cascada de determinación sexual. No existe información específica de la cascada de regulación sexual de *A. ludens*. Sin embargo, se conoce que *A. suspensa* posee secuencias altamente conservadas del gen *Ctra*, también se ha encontrado que el proceso de autorregulación (loop de auto-regulación) también se encuentra altamente conservado. Por otro lado, se ha observado que existe una mayor similitud estructural entre *A. suspensa* y *C. capitata* que entre *A. suspensa* y *D. melanogaster* (Schetelig *et al.*, 2012). EN diferentes estudios se ha reportado que varias especies de *Anastrepha* poseen una similitud del 88-90% con respecto a las proteínas TRA. Por lo cual es posible generalizar sobre la función y la secuencia de la proteína TRA y del gen *Altra* (Alvarez, Ruiz, & Sánchez, 2009; Ruiz *et al.*, 2007; Sarno *et al.*, 2010). Se conoce que la proteína TRA en hembras forman un complejo proteico con TRA-2. Este complejo se encarga de direccionar el splicing de *Dsx* permitiendo la formación de la proteína DSX femenina. Se conoce que en *A. obliqua* el gen *Tra* es transcrito en ambos sexos, pero sufre distintos tipos de splicing dependientes del sexo. En hembras se codifica una proteína de longitud completa mientras en macho una proteína truncada (Ruiz *et al.*, 2007).

Al igual que con *Ceratitis capitata* la descripción de la cascada sexual en *Anastrepha* se realiza por silenciamiento genético o por comparaciones de tamaños de proteínas masculinas y femeninas. En un estudio realizado por Schetelig se observó que, al inyectar ARN de doble hebra, específico para el gen *tra* con un tamaño de 134-868pb, en el abdomen de *A. suspensa* se induce el silenciamiento de este gen. Con este silenciamiento se obtuvo un 97-98% de fenotipos masculinos. Cuando se realizó el silenciamiento de los genes *tra* y *tra-2* simultáneamente se observó una mayor eficiencia de masculinización (Schetelig *et al.*, 2012).

B. Panorama

1. **Mundial.** La familia Tephridae “verdaderas moscas de la fruta” se considera como la familia de insectos que causa mayor pérdida en el área agrícola. Esta familia está formada por más de 5,000 especies distribuidas alrededor del mundo. De estas especies 1,400 se alimentan de fruta carnosa (Malacrida *et al.*, 2007), 70 de 1,400 especies son consideradas plagas (Y. Zhang, s/f) y el resto son consideradas potenciales plagas. Las plagas de mayor importancia y por lo tanto las más estudiadas son *Ceratitis*, *Anastrepha*, *Bactrocera* y *Rhagoletis*. Estas especies son consideradas plagas ya que aunque cada género posee su propia distribución natural, algunas especies de estos géneros se han diseminado por el globo terráqueo (Malacrida *et al.*, 2007). Además, causan una disminución del 25% en la producción frutícola, calculadas en US\$ 2.120 millones y US\$ 511 millones en Estados Unidos y México en los años 2014 a 2015 (Vilatuña, *et al.* 2015) (Enkerlin, 2005a; Y. Zhang, s/f).

Como respuesta a la expansión demográfica de plagas y para mejorar la eficiencia de control surge la técnica del insecto estéril (SIT, por sus siglas en inglés). En 1940 se dieron los primeros pasos para aplicar esta tecnología que utiliza radiación para esterilizar a machos que luego son liberados para copular con hembras silvestres, disminuyendo la progenie (Tkachuk, Kim, Savitskiy, & Savitskiy, 2011).

2. Guatemala y México. Centro América al igual que México posee dos de los géneros de mosca de la fruta importantes: *Ceratitis* y *Anastrepha*. Como respuesta a la amenaza que presentan estas especies de mosca de la fruta a estos países se formó un programa de control entre los años 1976-1977, en el que se unieron los gobiernos de Guatemala, México, Estados Unidos junto con Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) y la International Atomic Energy Agency (IAEA). Con estas colaboraciones se creó el programa Moscamed, que implementa la técnica SIT para el control de mosca de la fruta y otras posibles plagas o insectos de importancia (Enkerlin, 2005a)(Rendon & Montoya, 2008).

En 1994 *Ceratitis capitata* fue introducida en Costa Rica, luego se extendió por toda Centro América (Enkerlin, 2005a; Gasperi *et al.*, 2002b). En Guatemala fue reportada el 22 de abril de 1975 en la aldea Trapiche, Asunción Mita, Jutiapa (Moscamed, 2010). Subsecuentemente *C. capitata* colonizó los estados de México, Oaxaca y Chiapas al propagarse por las plantaciones de café en la Sierra Madre. Luego de establecerse en México se convirtió en una amenaza latente para los estados de Campeche, Tabasco y Veracruz. Un estudio de Gutierrez en 1976 estimó que el prevenir el establecimiento de la mosca del mediterráneo en México representaría un ahorro anual de aproximadamente USD 2,000 millones en daños directos englobando la producción de fruta exportable y el costo en insecticidas (Enkerlin, 2005a). A pesar de los esfuerzos realizados *C. capitata* fue detectada en Texas, Florida y California en la segunda mitad del siglo XX (Gasperi *et al.*, 2002b).

Por otro lado, *Anastrepha ludens* ha causado daños valorados en 230 millones de dólares anuales, estos gastos incluyen el costo de restricción de comercialización además de aplicación de insecticidas (Hendrichs, Franz, & Rendon, 1995). Lo anterior se debe a que esta mosca se encuentra establecida en el noroeste de México en más de 35,000 hectáreas de plantación comercial de cítricos, mangos, manzanas y melocotones. Se ha aplicado el método SIT para la erradicación de *A. ludens* en México, con esto fue posible liberar por completo los estados de Chihuahua, Sonora, Baja California Norte y Sur (Enkerlin, 2005a). En Guatemala *A. ludens* infecta alrededor del 98% las frutas exportables, infectando principalmente el pomelo (Fred M. Eskafi, 1988) pero también infectando cítricos como los mangos y naranjas (Aluja *et al.*, 1996). A pesar de esto no existe información que documente el impacto de *A. ludens* en Guatemala, posiblemente por la baja producción y exportación de ambos frutos. A pesar de esto Guatemala realiza el 43% y 23% exportaciones de mango a Estados Unidos y a Honduras, respectivamente. Además, realiza exportaciones del 72% de naranjas a El Salvador y un 22% a Nicaragua (OAE, 2014).

C. Moscamed Guatemala

El Programa de Moscamed Guatemala es la institución encargada de controlar y erradicar a las moscas de la fruta por medio del método del insecto estéril. Moscamed tiene los objetivos de “*proteger las áreas libres de la plaga en Guatemala, mantener el estatus fitosanitario libre de plaga en México, Estados Unidos y Belice; y erradicar la plaga de Guatemala*”. (Moscamed, 2010).

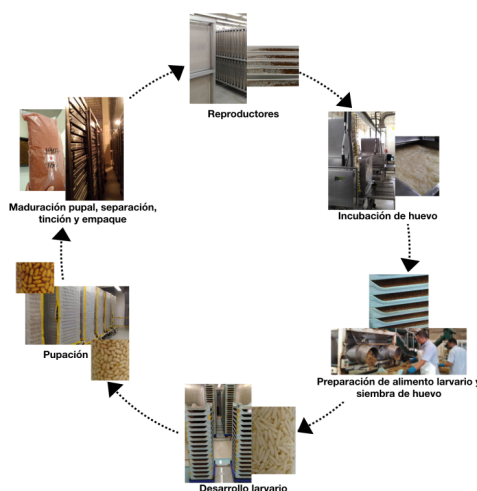
Figura 7. Planta de producción de mosca del Mediterráneo estéril del Programa Moscamed.
Planta Moscamed, ubicada en la laguna del Pino, Barbernes, Santa Rosa, Guatemala



(Moscamed, 2010)

1. Producción de mosca estéril. La cría masiva de *Ceratitis capitata* y *Anastrepha ludens* se realiza en plantas especializadas, las cuales poseen un estricto control que permite el desarrollo óptimo de las moscas. Para lo anterior la planta divide su proceso de acuerdo a parámetros de fase biológica y selección de individuos con mayor pureza (Moscamed, 2010).

Figura 8. Distribución de la planta de producción masiva de mosca de la fruta *Ceratitis capitata* y *Anastrepha ludens*



(Elaboración propia)

La planta de producción se encuentra distribuida en cinco áreas de trabajo. En el área de reproductores se da la copulación y generación de huevos, los últimos son recolectados y trasladados al área de incubación. En esta área los huevos se incuban y oxigenan en agua en condiciones libres de microorganismos patógenos. En el área de preparación de alimento y siembra se realiza la mezcla de los componentes del alimento (harina de maíz, olote de maíz, azúcar, levadura y preservantes) en bandejas y luego se “siembra” la suspensión de huevos en cada bandeja, en *Ceratitis capitata* el GSS permite que se “siembren” únicamente los huevos machos ya que estos son previamente seleccionados al aumentar la temperatura de la suspensión. El área de desarrollo larvario los huevos se convierten en larvas y se desarrollan. Las larvas maduras son trasladadas al área de pupación. Aquí se seleccionan manualmente los machos (pupa de color café) de *Anastrepha ludens*. Por último el área de tinción (con FireOrange) e irradiación es la última etapa en la que las pupas macho son irradiadas para convertirlos en machos estériles (Dyck, Hendrichs, & Robinson, 2005; MOSCAMED, 2016).

D. Métodos de control

1. **Control regulatorio.** El control regulatorio son medidas legales o químicas implementadas para el control de plagas, estos mecanismos se aplican en países como en Estados Unidos y Guatemala. Un ejemplo de las medidas tomadas por este control es la prohibición de la importación de frutas susceptibles a la plaga si no han pasado por un tratamiento post cosecha rigurosos que incluye fumigación, tratamiento con calor (vapor o agua caliente), tratamientos en frío, inmersión en insecticida o irradiación. También existen puestos de cuarentena como otro método de control regulatorio en el interior de Guatemala, estos se encuentran ubicados estratégicamente para formar un cordón fitosanitario dentro de Guatemala, en Petén Canchacán, Poptún, San Luis Petén; Los Olivos, Sayaxché; Vista Hermosa, Alta Verapaz; Pucal y Malacatancito, Huehuetenango y Las Palmas, San Antonio Suchitepéquez (CABI, 2016b; Headrick & Goeden, 1996b).

2. **Medios sanitario.** El control Los medios sanitarios son medios de protección física a la fruta susceptible que evita la ovoposición de las moscas de la fruta, por lo general se colocan materiales como plástico o papel periódico sobre la fruta (CABI, 2016b; Headrick & Goeden, 1996b).

3. **Control químico.** El control Los controles químicos son métodos de control químicos como insecticidas que se colocan como cebos unidos con proteína hidrolizada o aplicados directamente a las cosechas (CABI, 2016b; Headrick & Goeden, 1996b). Este método se utiliza con poca frecuencia ya se ha reportado resistencia a los insecticidas utilizados como el malathion utilizado en cebos (Magaña, Hernández-Crespo, Ortego, & Castañera, 2007).

4. Trampas con feromonas. El control Las trampas con feromonas son utilizadas para atraer a las moscas femeninas y masculinas. Este método es utilizado como método de detección en el Mediterráneo (CABI, 2016b; Headrick & Goeden, 1996b).

5. Control biológico. El control El control biológico es un método que disminuye la cantidad de la población de forma natural disminuyendo a la progenie (SIT) o utilizando enemigos naturales de las plagas como es el caso de los parasitoides, nematodos, hongos y estrategias de quimio-esterilización (CABI, 2016b; Headrick & Goeden, 1996b).

a. Bacterias y parasitoides

1) *Wolbachia*. *Wolbachia* es una alfa proteobacteria intracelular gram negativa endosimbiótica que se encuentra presente en artrópodos y nematodos. Esta es transmitida de manera vertical a través de los huevos, afectando la biología de sus hospederos de distintas maneras (Coscrato, Braz, P Perondini, Selivon, & Marino, 2009; Jamnongluk, Kittayapong, Baimai, & O'Neill, 2002). Esta bacteria puede causar infecciones y modificaciones en el tejido reproductivo como: partenogénesis en avispa, feminización de los machos en isópodos, muerte de escarabajos machos, mariposas y *Drosophila spp.* (Coscrato *et al.*, 2009).

Estas bacterias se han utilizado como método de control biológico ya que la *Wolbachia* posee la capacidad de generar incompatibilidad citoplasmática (IC), los machos infectados son liberados al campo para causar IC en las hembras silvestres al copular, reduciendo las poblaciones. Además se conoce que esta bacteria posee una alta incidencia en distintas especies de *Anastrepha* como *A. fratercula*, *A. amita*, *A. obliqua*, *A. sororcula*, *A. striata*, *A. serpentina*, *A. grandis* en la que posee la misma incidencia que en artrópodos (Coscrato *et al.*, 2009). Es importante mencionar que es necesario realizar investigaciones para determinar el estado de la infección, así como los genotipos de las cepas que permiten una infección exitosa (Karimi & Darsouei, 2014).

2) *Diachasmimorpha longicaudata*. Los parasitoides son conocidos como insectos que se desarrollan en el interior (endoparásito) o exterior de otros organismos (ectoparásito). *Diachasmimorpha longicaudata* es un endoparásito de las moscas de la fruta *B. dorsalis*, *C. capitata* y *Anastrepha spp.* El parasitoides infecta a las larvas dentro de la fruta, especialmente frutas de importancia comercial, ya que esta es atraída por los productos de fermentación causados por daños en el tejido vegetal y detecta a las larvas por medio de sonidos. El parasitoides oviposita de 13 a 24 huevos (razón ideal de infección 4:1 parasitoides a larva) (Montoya *et al.*, 2000; University of Florida, 2014). Con la implementación de este método de control se ha reportado la disminución del 70% de la población de *A. suspensa*. Un factor limitante de esta técnica es la dependencia del tamaño de la población con la eficiencia del método. Otro problema con este método es la relación inversamente proporcional entre la infección de parasitoides y el tamaño del fruto.

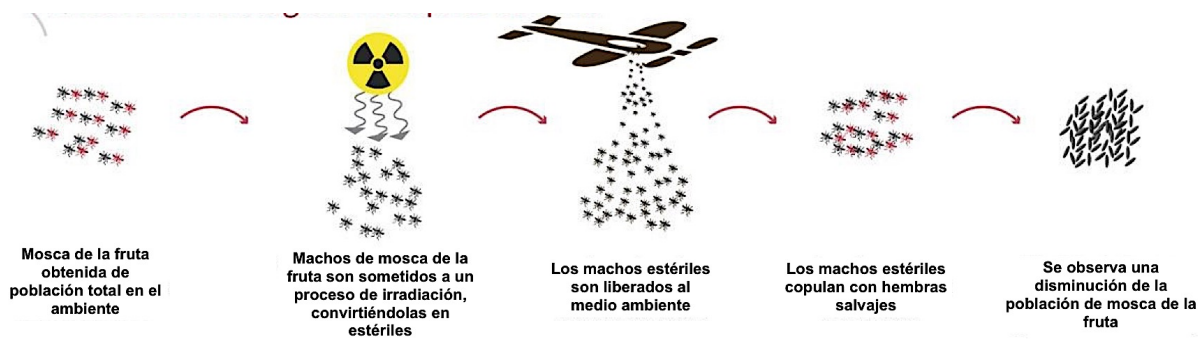
b. SIT. La técnica SIT se desarrolló basada en los trabajos de Knippling (1930) que reportó que las especies económicamente importantes podían ser controladas o erradicadas por manipulación genética (Y. Zhang, s/f) y Serebrovskii y Vanderplank (1940) que propusieron el uso de translocaciones cromosomales como una técnica de esterilización (Tkachuk *et al.*, 2011). De estas ideas surgió la técnica SIT que utiliza la irradiación gamma o rayos X para la generación de insectos machos estériles, que luego son liberados y disminuyen la población (Alphey *et al.*, 2006b; Enkerlin, 2005a). Actualmente esta técnica se aplica con los géneros: *C. capitata*, *Anastrepha ludens* y *Bactrocera sp.*

A través de los años el SIT ha sufrido varias mejoras con el tiempo con la aplicación de ingeniería genética. Algunas de las técnicas de mejora son las cepas de sexado genético, GSS (por sus siglas en inglés) en la cual se generan cepas utilizando translocaciones cromosomales causando mutaciones deseadas (Franz, 2005). Por ejemplo, la producción de la cepa “Tap. 7” de *A. ludens* (hembras de pupa negra) y la producción de la cepa VIENNA 8-1260 de *C. capitata* que posee mutación en el gen *tsl* que transforma a los huevos hembra a sensibles al calor. Estas cepas han permitido la optimización de la separación mecánica realizada con un separador de semillas en ambas especies (López-Arriaga, Montoya, Cancino, Toledo, & Liedo, 2014; Moscamed, 2010). Actualmente existen 24 programas que aplican esta técnica para controlar poblaciones se encuentran en: Sur África, Marruecos, Tunes, Egipto, Israel, Croacia, Grecia, Tailandia, Australia, Hawaii, Brasil, Argentina, Chile, Perú, Guatemala, México y Florida. (Alphey *et al.*, 2006b; FAO/IAEA, 2016b; Gasperi *et al.*, 2002b).

En evaluaciones de eficiencia del SIT se ha observado que esta disminuye el daño causado por las moscas de la fruta en un 80%, este daño representa un 25% de las frutas exportables (FAO/IAEA, 2016b).

Figura 9. Mecanismo de la técnica SIT

La técnica del insecto estéril se basa en la crianza masiva de machos de mosca de la fruta. Estos machos son irradiados y liberados al medio ambiente donde copulan con las hembras silvestres. Estas hembras ovipositan huevos con menor porcentaje de emergencia y viabilidad.



(Dyck *et al.*, 2005)

1) Ventajas. Desde la implementación del SIT como control biológico se han cuantificado los beneficios de la misma. Los beneficios directos de esta técnica son: la reducción del daño causado 80% a las frutas, un aumento del 20% de la producción de productos exportables y el aumento de la costo-efectividad del método. Por último, los beneficios indirectos engloban el aumento de los volúmenes de exportación, ahorro en costos médicos por la exposición a insecticidas, aumento de protección de abejas polinizadoras de las plantas productoras (FAO/IAEA, 2016b).

Algunos beneficios para los países exportadores en los que se ha aplicado la técnica SIT son el aumento de la producción per cápita al año. En el caso específico de específico de *C. capitata* en Centro América en la que se producen 17.2Kg de fruta exportable al año, aumentó la producción per cápita anual a aproximadamente 19kg/año, equivalente a 48,600 toneladas que se encuentran valuadas a USD 25 millones. Actualmente se han certificado áreas libres de *C. capitata* en Guatemala entre las cuales se encuentra Quetzaltenango y Laguna de Retana (Dyck *et al.*, 2005; Enkerlin, 2005b). También ha sido posible erradicación de *A. ludens* en el estado de Chiapas utilizando la estrategia area wide integrated pest managment (AW-IPM). La erradicación se mantuvo por 23 años hasta el año 2004 (Enkerlin, 2005a)

2) Desventajas. La técnica SIT a pesar de poseer grandes ventajas no es totalmente eficiente ya que para realizarla con éxito es necesario cumplir y/o enfrentar lo siguiente: disminución en viabilidad y competencia de machos estériles, riesgo de liberar hembras fértiles, alto costo del método, seleccionar una onda de radiación específica para cada especie, , seguridad estricta al manipular los equipos de radiación con isotopos radioactivos y un peligro ecológico potencial (Tkachuk *et al.*, 2011). Por lo anterior, a partir del año 2000 se han realizado distintos esfuerzos para mejorar la técnica como las cepas de sexado genético y silenciamiento de genes (Franz, 2005).

E. BIOTECNOLOGÍA

1. Silenciamiento de genes. El silenciamiento de genes es el mecanismo por el cual la célula deja de expresar secciones específicas (genes) localizados en el ADN cromosomal (Fire *et al.*, 1998). El silenciamiento de genes es un método natural que se utiliza como protección contra el ARN exógeno y durante la diferenciación sexual por regulaciones epigenéticas y/o como regulación de genes endógenos por regulación a nivel transcripcional o post-transcripcional (Y. Zhang, 2013). El silenciamiento a nivel transcripcional se basa en la modificación de histonas que convierten la euromatina a heterocromatina, lo cual inhibe el proceso de transcripción. El silenciamiento a nivel post-transcripcional se lleva a cabo por el bloqueo o destrucción específica de un ARNm, previniendo la transcripción del gen específico. Las técnicas implementadas con mayor frecuencia en el área de investigación son las basadas en post-transcripción, como lo es el ARN de interferencia por sus siglas en inglés ARNi (Agrawal *et al.*, 2003; Y. Zhang, 2013). Esto debido a que se ha demostrado que muchos organismos tienen la capacidad de generar

ARNi como un mecanismo de defensa, entre esos organismos se encuentran: Moscas, tripanosomas, planarias, hidras, ratas y plantas (Zamore, Tuschl, Sharp, & Bartel, 2000).

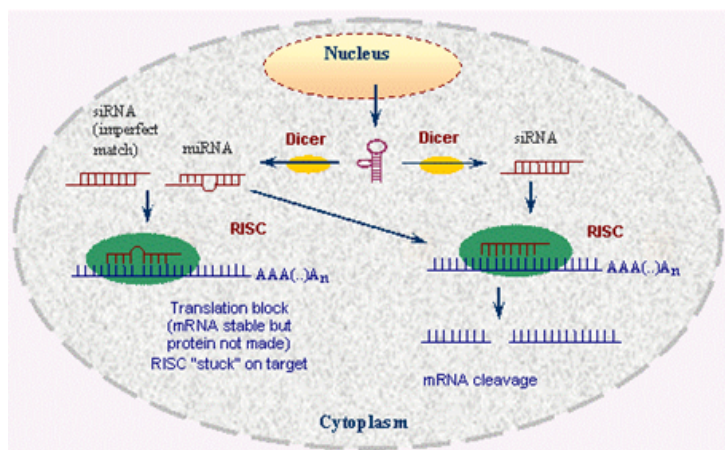
a. ARN de interferencia. El silenciamiento por medio de ARNi, o gene knockdown, es una técnica novedosa que permite utilizar el mecanismo de defensa contra infección celular causada por la introducción de ARN de doble hebra (ARNdh) exógeno (Agrawal *et al.*, 2003; Cladera *et al.*, 2014).

1) Mecanismo básico de interferencia. El mecanismo de ARNi posee dos pasos fundamentales (Figura 8). Antes de empezar el mecanismo es necesario realizar la introducción del ARNdh esta internalización puede ser *in vitro* o producido por la célula (*in vivo*). El primer paso del mecanismo de interferencia involucra a la enzima Dicer una endoribonucleasa tipo III que posee un dominio helicasa amino-terminal, 2 repeticiones en tándem ARNasas III, un dominio PAZ formado de las proteínas PIWI y las proteínas agronauta y zwiille. La enzima Dicer digiere el ARNdh formando un conjunto de ARN pequeño de interferencia (ARNip). Este ARNip posee de 21 a 23 pares de bases con extremos 5'-fosfato y 3'-OH, además de poseer en ambos extremos de 2 a 3 nucleótidos libres. El segundo paso del silenciamiento por medio de ARNi involucra la incorporación del ARNm a una nucleasa multi-componente llamada RISC. Esta nucleasa está compuesta por la proteína agronauta, un dominio altamente conservado PAZ y una helicasa dependiente de ATP. La helicasa dependiente de ATP tiene la función de separar las hebras de ARN exógeno para que la hebra antisentido se una su homólogo de ARNm a silenciar. Luego el RISC reconoce el sitio de unión de la hebra antisentido con el ARNm y realiza un corte de doble hebra. Este ARNm cortado es degradado, inhibiendo el proceso de traducción (Agrawal *et al.*, 2003; Farrel, 2005).

La producción de ARN de doble hebra se realiza utilizando una bacteria transgénica con una mutación para no producir ARNasas *E. coli HT115 (DE3)* y un plásmido con el segmento de interés y dos promotores iguales, estas modificaciones se realizan para que la bacteria sintetice el ARN de doble hebra de interés. Este ARN de doble hebra luego es internalizado por el insecto cuando este ingiera las bacterias o el ARNdh, provocando el silenciamiento de los genes de interés (Taracena *et al.*, 2015). Se recomienda que el dsRNA posea una longitud de por lo menos 26 nucleótidos. En mamíferos se recomienda que el ARN de doble hebra no posea más de 30 pares de bases ya que induce la activación de interferones pertenecientes al sistema inmune que causan la apoptosis celular (Agrawal *et al.*, 2003; Farrel, 2005).

Figura 10. Mecanismos básicos de interferencia.

Los pasos básicos del mecanismo de interferencia de ARNi son dos: el ARN de doble hebra es cortado por la enzima Dicer transformandolo en ARNip. El ARNip se une al complejo RISC causando la degradación del mRNA objetivo y el silenciamiento del gen de interés.



(NCBI, 2014)

2) Desventajas y ventajas de ARNi. Entre sus ventajas se encuentran: el permitir examinar la función de un gen a la vez, su alta especificidad, su amplia aplicabilidad ya que es un mecanismo altamente conservado y es un mecanismo potente ya que para inducir el silenciamiento es necesario una menor concentración de ARN de doble hebra comparado con oligos antisentido (Farrel, 2005).. Las desventajas de este método son: el costo del método ya que es más costoso que los oligos de ARN, la posible respuesta de apoptosis celular si se inserta un ARN de doble hebra mayor a 30 pares de bases en mamíferos, la resistencia de algunas células como neuronas al silenciamiento, baja reproducibilidad, el alto número de ARNip que deben ser diseñados para lograr el silenciamiento (Hammond, Bernstein, Beach, & Hannon, 2000).

b. Internalización del ARN de doble hebra usando bacterias transgénicas. El ARN de doble hebra utilizando la técnica de ARN de interferencia, se ha aplicado ampliamente en el control de plagas agrícolas. Con la implementación de esta técnica se han observado resultados favorables al causar la pérdida de función específica del gen objetivo. En muchos casos, el silenciamiento del gen objetivo resulta en la disminución de la sobrevivencia del mismo aumentando la mortalidad. El aumento de la aplicación de este método ha dado lugar al estudio de muchos genes blanco para desarrollar ARN de doble hebra eficientes (Kim, Park, Kim, & Ling, 2015).

Se ha demostrado que existen distintas cepas bacterianas que pueden transcribir el ARN de doble hebra en cantidades suficientes para obtener una concentración significativa. Estudios han demostrado que la administración de dichas bacterias por vía oral permite la internalización del ARN de doble hebra, convirtiendolo en un método adecuado para inducir el silenciamiento en diversos organismos. (Li *et al.*,

2011; Pomerantz & Hoy, 2014; Taracena *et al.*, 2015; Whyard *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2013). Lo anterior es posible ya que se ha demostrado que existen cepas bacterianas que poseen la habilidad de transcribir ARNdh en suficientes cantidades para causar silenciamiento siembre y cuando estas posean un vector de clonación adecuado (Li *et al.*, 2011; Pomerantz & Hoy, 2014).

1) Generación de plantilla de ADN. Para producir ARN de doble hebra *in vitro* se utilizan como plantilla productos de PCR obtenidos de ADN genómico purificado o ADN codificante, ADNc, el cual se sintetiza a partir de ARN mensajero maduro purificado y la enzima Transcriptasa Reversa (A. Griffiths, Miller, & Suzuki, 2000; Hull & Timmons, 2004).

2) Diseño de vector de clonación. El vector de clonación es un plásmido comercial que es ligado a un producto de PCR del gen de interés. El fragmento de interés debe poseer el gen de interés flanqueado por dos promotores de bacteriófagos iguales, los cuales pueden ser T7, T3 o SP6. Estos permiten la transcripción del inserto en ambas direcciones generando una cadena de ARNm complementaria a la otra y formando así el ARNdh. Los promotores usualmente se encuentran dentro del plásmidocomercial. Cada plásmido posee una combinación de promotores de bacteriófagos, dos promotores idénticos en orientación invertida o un único promotor (Hull & Timmons, 2004; Lisa Timmons, Court, & Fire, 2001).

El plásmido comercial elegido es el pGEM-T, el cual posee una alta eficiencia de ligación al producto de PCR debido a que posee una única tiamina en el 3' terminal en ambos extremos. También posee la ventaja que puede ser seleccionado mediante la técnica azul y blanco, la cual es rápida y conveniente. El vector es de un alto número de copias debido a que posee varios promotores, como T7, flanqueados por varias regiones de clonación múltiple (Promega, 2010b).

3) Transformación de bacterias. Una bacteria es transformada luego de la incorporación del vector de clonación en una bacteria en estado competente. Existen dos técnicas por las cuales se realiza la transformación: shock térmico o electroporación. La bacteria a transformar es *E. coli* HT115 (DE3), ya que produce ARN de doble hebra con eficiencia (Hull & Timmons, 2004). El fenotipo de esta cepa se describe de la siguiente manera: F-, *mcrA*, *mcrB*, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14::Tn10(DE3 lysogen: lavUV5 promoter -T7 polymerase)(Boulier & Jenna, 2009). Esta cepa posee características importantes entre ellas está la expresión de ARN polimerasa T7 bajo el control de un promotor *lac* modificado que permite inducir la producción de ARN de interferencia al tener una exposición a IPTG, análogo a la lactosa. La cepa también se caracteriza por no poseer ARNasa III, permitiendo que se acumule el ARN de doble hebra sin ser degradado. También posee un factor de selección, resistente al antibiótico Tetraciclina (BioScience, s/f; Hull & Timmons, 2004).

Sin embargo, la cepa mencionada anteriormente no posee ningún sistema de confirmación de clonación exitosa, por lo que se recomienda utilizar la cepa *E. coli* NOVA-BLUE que posee una alta

eficiencia de transformación ya que el plásmido es más estable y puede seleccionarse mediante un el sistema azul-blanco. Su fenotipo se describe de la siguiente manera: *endA1 hsdR17 (rK12⁻ mK12⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F' [proA+B+lacIqZΔM15::Tn10]* (Tet^R) (A. J. Griffiths, Gelbart, Miller, & Lewontin, 1999). Se caracteriza por poseer endonucleasas deficientes (*endA1*) que mejora la estabilidad del ADN clonado, impidiendo la destrucción de este por la acción de endonucleasas *EcoK* (*hsdR17*). Por último, posee un represor del operón de lactosa que se encuentra mutado de forma inducible (*lacIqZΔM15*) permitiendo el sistema de selección azul-blanco. Lo anterior hace posible la identificación de las bacterias transformadas al ser estas de color blanco mientras que las no transformadas serán de color azul (Novagen, 2004; Lisa Timmons *et al.*, 2001).

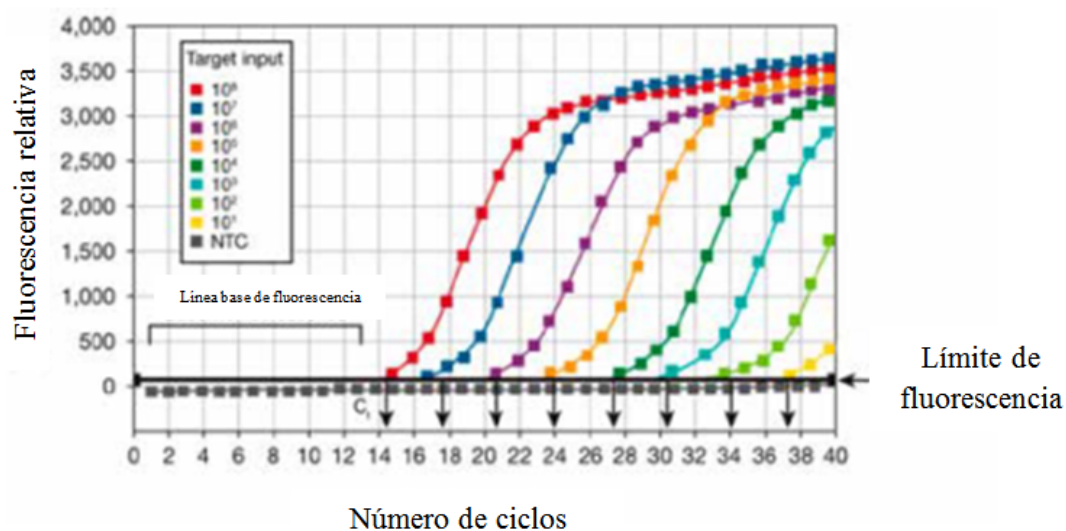
4) Métodos de entrega. Se ha estudiado diversos métodos de entrega del ARN de doble hebra. Se ha demostrado que el ARNi ambiental es altamente eficiente para inducir silenciamiento por medio de inyección del ARN de doble hebra directamente en la cavidad que contiene la hemolinfa del insecto. La microinyección fue implementado por primera vez por Fire y Mello desde los principios de la técnica de ARN de interferencia (Fire *et al.*, 1998). Esta permite cuantificar la cantidad exacta de ARNdh que se introduce al organismo y tejido de interés. Esta técnica debe ser optimizada para cada gen y organismo para obtener resultados reproducibles. La técnica de microinyección no se ha utilizado a gran escala debido a su gran dificultad al realizar la inyección manual a cada organismo (Fire *et al.*, 1998; Hull & Timmons, 2004; Li *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2013).

También es posible inducir el silenciamiento por medio de entrega oral del ARN de doble hebra por medio de alimentar con bacterias generadoras de ARNdh. Estudios de Timmons (L Timmons & Fire, 1998; Lisa Timmons *et al.*, 2001) han demostrado la posibilidad de inducir silenciamiento al introducir el ARNdh por medio de la vía oral, al ingerir las bacterias transgénicas el organismo de interés. Estas bacterias se mezclan con el alimento habitual por lo que son ingeridas y absorbidas causando silenciamiento (Hull & Timmons, 2004; Li *et al.*, 2011; Lisa Timmons *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2013). Actualmente surgió una nueva técnica de entregar el ARNdh al organismo de interés, encapsulado en quitosano. Este compuesto estabiliza y aumenta la biodisponibilidad del ARNdh ingerido ya que la ingesta en larvas es variable (Dragicevic & Maibach, 2016; Kashyap, Xiang, & Heiden, 2015; Yu *et al.*, 2013; X. Zhang, Zhang, & Zhu, 2010).

c. Evaluación de silenciamiento genético. El PCR por sus siglas en inglés polymerase chain reaction es una técnica desarrollada en los años 80s por Kary Mullis que permite la amplificación de una secuencia de ADN copia o genómico al delimitarla utilizando oligos diseñados especialmente (Metzker, Caskey, Metzker, & Caskey, 2009). Actualmente esta técnica es de gran importancia debido a que permite la amplificación de varias secuencias de interés en un tiempo corto. Por lo anterior se utiliza ampliamente en los campos de investigación de ciencias forenses, determinación de la actividad transcripcional de células y tejidos, la identificación de enfermedades infecciosas, entre otros.

Debido a que la técnica de PCR convencional no es apta para aplicaciones cuantitativas, surgió una variación de la técnica generando el PCR tiempo real (q-PCR). Esta nueva técnica permite observar la amplificación del fragmento de interés en tiempo real utilizando fluorescencia. A diferencia de otros métodos el q-PCR presenta una alta sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y amplio rango de cuantificación dinámica (Pfaffl, 2000). Como resultado de la amplificación se observa una gráfica sigmoideal (cantidad de ciclo contra fluorescencia) formado de tres fases: línea base, fase exponencial (aumento de concentración de ADN) y plató que representa el final de la amplificación. El punto de unión entre el umbral y la gráfica se denomina ciclo umbral C_t también conocido como ciclo de cuantificación y se utiliza para calcular la eficiencia del q-PCR así como el número de copias iniciales de la plantilla de ADN. Lo anterior se debe a que se encuentra correlacionado inversamente al logaritmo del número de copias iniciales (Arocho, Chen, Ladanyi, & Pan, 2006; Fillon, 2012; Fisher, 2013; Fleige *et al.*, 2006; Rao, Huang, Zhou, & Lin, 2013; Tevfik, 2006).

Figura 11. Gráfico proporcionado por PCR tiempo real.



(Fisher, 2013)

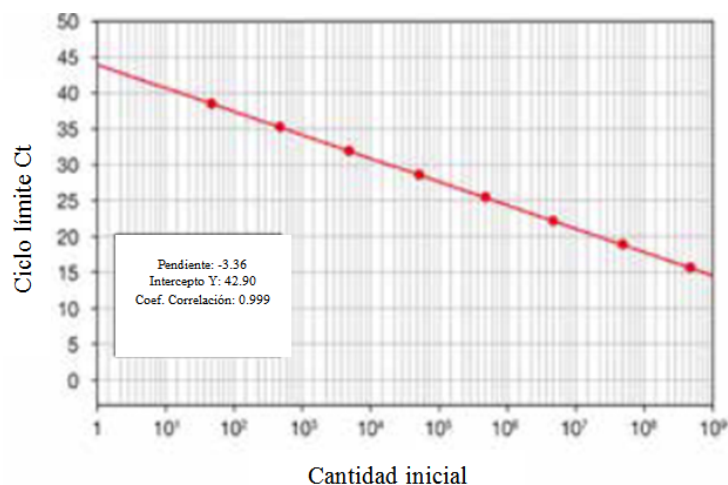
Es posible calcular la eficiencia de la reacción de q-PCR (ecuación 1) al realizar una curva estándar con diluciones de una muestra de concentración conocida, utilizando el valor C_t de cada muestra y el logaritmo de la concentración de las muestras para graficar los resultados. El intercepto en el eje-Y de esta gráfica corresponde al límite teórico superior de detección de la reacción. Idealmente la eficiencia del q-PCR debe ser del 100%, para lo anterior, es necesario que la curva estándar posea una pendiente de -3.32. (Arocho *et al.*, 2006; Fillon, 2012; Fisher, 2013; Fleige *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2013; Tevfik, 2006).

Ecuación 1. Formula de Eficiencia de q-PCR

$$Eficiencia = 10^{(1-pendiente)} - 1$$

(Tevfik, 2006)

Figura 12. Curva Estándar.



(Fisher, 2013)

F. BIOINFOMÁTICA

1. **Secuenciación.** La secuenciación de ADN es el proceso que determina el orden de los nucleótidos en una molécula de ADN. Esta incluye cualquier método o tecnología que se usa para determinar el orden de las cuatro bases – adenina, guanina, citosina y timina – en una hebra de ADN. El conocimiento de la secuencia de ADN se ha vuelto indispensable para numerosos estudios en las áreas de diagnóstico médico, ciencias forenses, biología sistemática y control microbiológico (Hindley & Staden, 1983; Mitchelson, 2007). Actualmente se utilizan métodos de secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés) para secuenciar moléculas de ADN. Estos permiten analizar varias secuencias al mismo tiempo y obtenerlas a bajo costo para análisis posteriores, como la determinación de su similitud (Chin *et al.*, 2013).

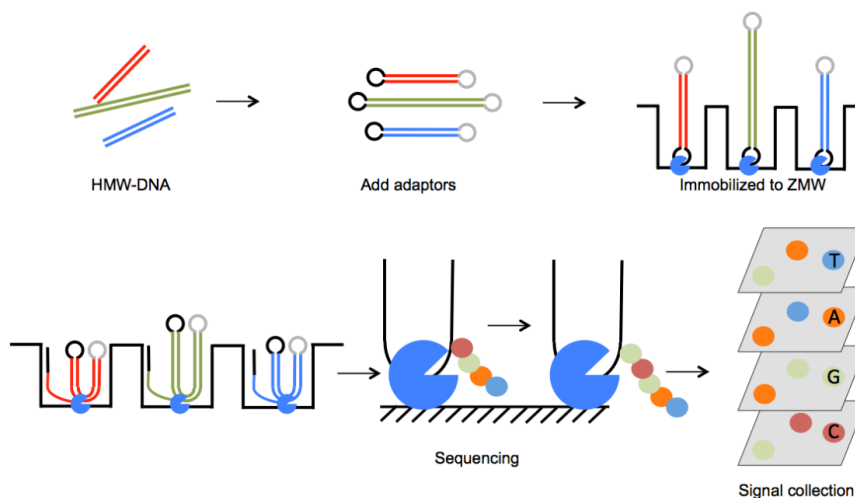
La secuenciación de primera generación, que surgió en 1970s, incluye los métodos de Maxam-Gilbert y Sanger. En el último, cadenas de ADN se sintetizan a partir de una hebra plantilla. La síntesis para cuando se agrega uno de los 4 nucleótidos que no tienen el grupo hidroxilo 3'. Se obtiene, entonces, moléculas cortas de ADN que se separan por tamaño por electroforesis y se infiere su secuencia por una computadora.

Para optimizar el proceso, los nucleótidos se marcaron con proteínas fluorescentes; las moléculas de ADN se separan por capilares y se detectan por excitación con láser. La tecnología de nueva de nueva generación ha reemplazado la tecnología de primera generación. Estos nuevos equipos permiten la secuenciación de muchos fragmentos de ADN simultáneamente. Son más eficientes y rápidos que la tecnología de primera generación. El desarrollo de los equipos de nueva generación se dio gracias a los avances en bioinformática: mayor almacenamiento de datos y facilidad de manipulación y análisis de bases de datos grandes.

a. Secuenciación SMRT. Mientras que la tecnología de nueva generación ofrece mejoras con respecto a la secuenciación Sanger, aún tiene limitaciones. Su *short readlengths* la hace poco adecuada para algunos problemas biológicos, como detección de metilación o determinación de genomas complejos. La tecnología SMRT, desarrollada por PacificBioSciences (PacBio), ofrece un enfoque alternativo para superar esas limitaciones (Rhoads & Au, 2015). La secuenciación de PacBio captura la información –secuencia– durante el proceso de replicación del ADN objetivo. El modelo, llamado SMRTcell, es ADN de una hebra, circular que se produce por adición de *hairpin adaptors* a los extremos de una doble hebra de ADN. SMRT también conocido como “Single Molecule Real Time SequencingTechnology” es un método de secuenciación de nueva generación utilizado para facilitar y agilizar el proceso (Chi; *et. al.* 2013; Roberts 2013). SMRT utiliza nucleótidos fluorescentes como señalizadores mientras se sintetiza cada hebra de ADN. En cada unidad hay nucleótidos marcados con fluorescencia y una polimerasa inmovilizada que se une al adaptador e inicia la replicación. Cuando una base es tomada por la polimerasa, emite luz y se identifica la base. Los pulsos de luz obtenidos de cada SMRTcell son interpretados como una secuencia de bases (Rhoads & Au, 2015). La calidad del fragmento aumenta según el número de veces que se secuencia (Weill Cornell, 2016).

Una de las grandes ventajas es que puede realizar lecturas de la secuencia de un genoma circular (Roberts 2013). La secuenciación SMTR se utiliza para generar secuencias más largas que con tecnología Sanger o inicial de nueva generación; también facilita el ensamblaje y terminación de genomas. Para tamaños comunes de genomas de bacterias (1 – 10 megabases) se puede usar secuenciación larga SMRT en conjunto con lecturas cortas o *shorterreads*. Con este método se generan genomas de alta calidad; sin embargo, se requieren mínimos dos plataformas para poder hacerlo de manera eficiente (Chin *et al.*, 2013).

Figura 13. Esquema del proceso de secuenciación por SMRT.



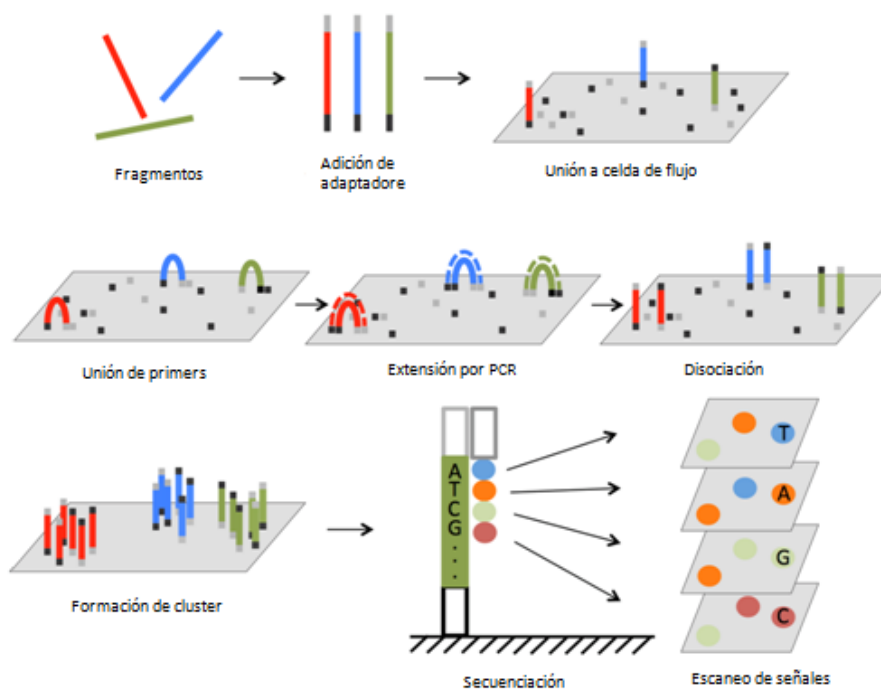
(3402 Bioinformatics Group, 2015)

La librería Bluepippin es un instrumento utilizado para la purificación de fragmentos de ADN que contienen los adaptadores para la secuenciación de nueva generación. Este fue desarrollado por Sage Sciences para facilitar el procesamiento de los fragmentos de ADN para el proceso de secuenciación. Este se basa en la separación de los fragmentos de ADN en un gel de electroforesis por medio de campos pulsados. Del ADN recolectado se establece su tamaño según un programa que posee dicho equipo para registrar cada fragmento según el tamaño deseado. La forma en que estima el tamaño de los fragmentos es por la utilización de un estándar de ADN que se conoce el tamaño y se corre simultáneamente con las muestras. Los fragmentos que detecta varían según la concentración del cassette de utilizado, estos pueden ir de 90 bp a 50 kbp. Los beneficios que aporta este sistema son: rápida y no requiere de mucho esfuerzo en comparación con la purificación por gel que se realiza de forma manual; es reproducible; y alto nivel de recuperación de la muestra con los fragmentos de ADN purificados (Sage Science, 2017). Esta herramienta es utilizada en conjunto con SMRT para obtener mejores resultados en la secuenciación del fragmento o genoma de ADN deseado.

b. Secuenciación MiniSeq de Illumina La tecnología de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés es “Next Generation Sequencing”) produce millones de secuencias cortas que al unirlas forman el genoma. Illumina es una de las plataformas que llega a abarcar más del 70% de la tecnología de NGS (iLLumina, 2016; Stuart M. Brown, 2017). Los equipos de Illumina se basan en secuenciación por síntesis (SBS, por sus siglas en inglés). Se usan cuatro nucleótidos marcados con fluorescencia para secuenciar millones de clúster en una celda. Durante cada ciclo, un solo dNTP se añade a la cadena de ácidos nucleicos. El nucleótido marcado sirve como un terminador de la polimerización. Con la fluorescencia se identifica la base y se corta enzimáticamente, permitiendo la unión de otro nucleótido (Illumina, 2010).

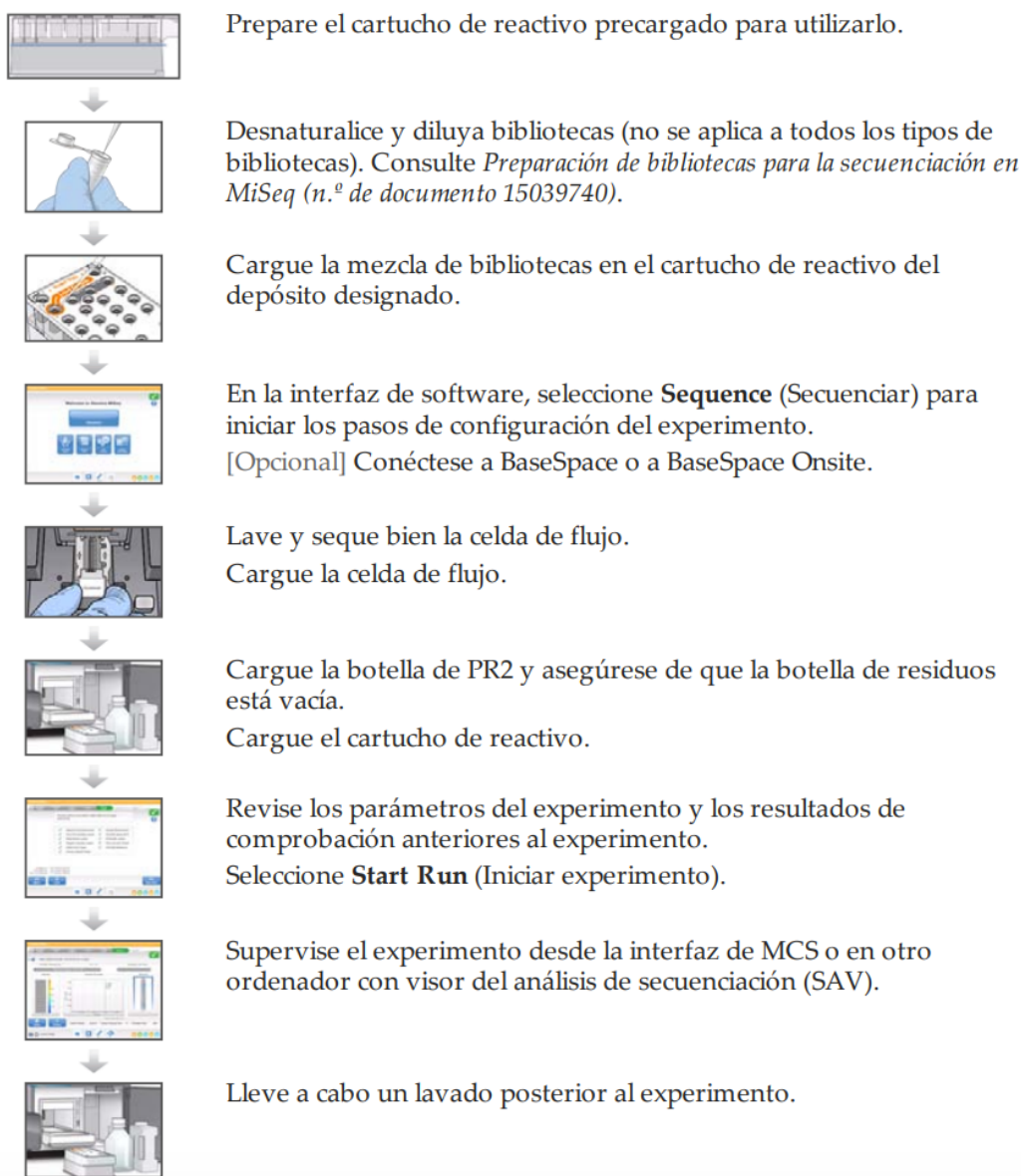
En la Figura 6 se muestra el proceso de secuenciación. El genoma o secuencia de ADN es cortado por procesos enzimáticos, físicos o químicos en pequeños fragmentos. A cada extremo libre del fragmento se le añaden adaptadores que son complementarios a una secuencia de oligonucleótidos en una celda de flujo. Uno de los extremos no unidos a la celda de flujo se une a los primers de la celda. Luego se prosigue con un proceso de PCR que amplifica para obtener la hebra complementaria y la hebra guía. Este paso de síntesis de hebras se hace de forma repetitiva en los dos sentidos del fragmento. El PCR se hace diversas veces para aumentar la señal y facilitar la identificación de cada nucleótido de los fragmentos (3402 Bioinformatics, 2017). Durante cada ciclo, un solo dNTP se añade a la cadena de ácidos nucleicos. El nucleótido marcado sirve como un terminador de la polimerización. Con la fluorescencia se identifica la base y se corta enzimáticamente, permitiendo la unión de otro nucleótido (Illumina, 2010).

Figura 14. Proceso de secuenciación de nueva generación.



(3402 Bioinformatics Group, 2015)

Figura 15. Esquema del proceso de secuenciación en el equipo MiSeq.



(Illumina, 2015).

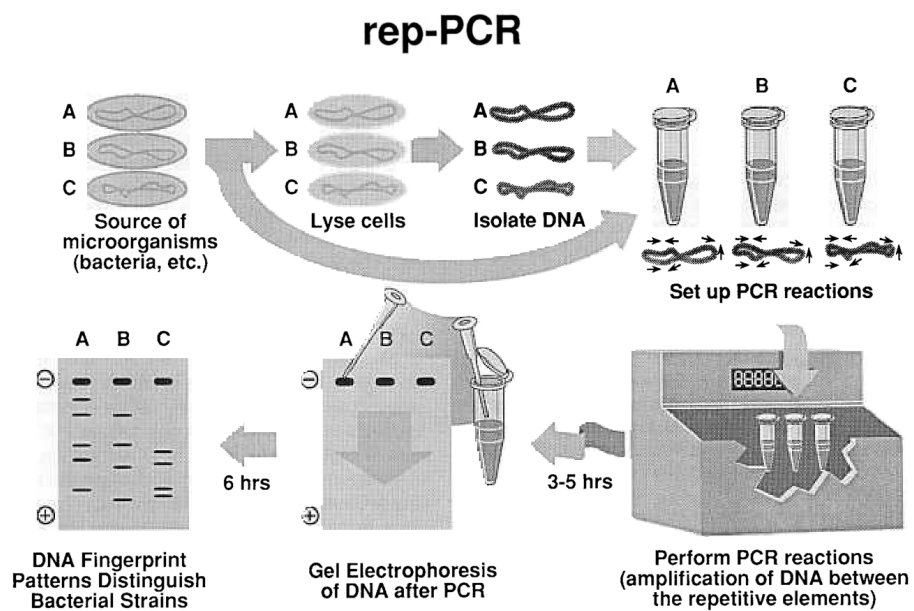
Las lecturas de cada secuencia pueden ir de 25 a 250 pares de bases. La especificidad de los oligonucleótidos y adaptadores permiten la secuenciación paralela de diversos fragmentos (Hadfield & Eldridge, 2014).

c. Alineamiento de secuencias. El alineamiento de diversas secuencias de ADN, ARN o proteína es uno de los análisis más utilizados para la comparación de diversas especies, detección de mutaciones, entre otras. Actualmente, se utiliza para poder determinar la evolución de una especie, relación filogenética entre diversos organismos, y otorgar una inferencia histórica de relación entre los genes y la especie. Permite mostrar la evolución del ADN en el transcurso del tiempo tomando en cuenta deleciones e inserciones en el genoma (S. Kumar & Filipski, 2007; Rosenberg, 2009). El alineamiento permite asegurar la similitud entre dos secuencias, determinar grupos funcionales en las secuencias, comparar genes y sus productos (proteínas usualmente) y buscar homología en la secuencia. La homología se refiere al análisis de secuencias de proteínas y ADN de forma computacional para determinar si pertenecen a un ancestro en común. La homología tiende a confundirse con la similitud el cual es un término cuantitativo sobre la igualdad ente dos componentes (Bioinformatics at COMAV, 2016; Rosenberg, 2009). Por lo tanto, en esta investigación según el objetivo no se desea determinar la homología, sino que la similitud entre el genoma de *K. oxytoca* y el de *K. pneumoniae*. Existen dos tipos de alineamientos, el local y el global. En el local las secuencias se alinean en las zonas similares. El global en cambio alinea a las secuencias completamente (Bioinformatics at COMAV, 2016).

2. rep-PCR (BOX PCR). Los avances en técnicas moleculares han permitido estudiar la estructura de las comunidades microbianas y su interacción con otros seres vivos o su ambiente. Una de las técnicas usadas para determinar relación genómica es el rep-PCR. Se basa en la amplificación por PCR de secuencias de ADN situadas entre secuencias repetidas específicas en genomas procariotas. Existen varias clases de secuencias repetidas y se denominan elementos BOX, REP y ERIC (Wolska & Szweda, 2012).

La amplificación de estos elementos repetidos genera una serie de fragmentos de ADN de diferente tamaño. La separación de estos fragmentos en geles de agarosa da lugar a “huellas dactilares de ADN”. El rep-PCR puede realizarse de ADN purificado o colonias bacterianas individuales. En ciertos casos, se prefiere usar ADN porque permite máxima reproducibilidad (Ghosh, Verma, Mengoni, & Tripathi, 2004; Louws *et al.*, 1998; Rodrigues, Sakata, Comasseto, Bicego, & Pellizari, 2009).

Figura 16. Esquema del procedimiento de rep-PCR.



(Healy *et al.*, 2005)

3. Genes característicos del género *Klebsiella*

a. Genes metabólicos

Cuadro 1. Genes propios del metabolismo de *Klebsiella* spp.

Gen	Función	Literatura
<i>citB – citG2</i>	Fermentación de citrato	(Bott, Meyer, & Dimroth, 1995; T. H. Hazen <i>et al.</i> , 2014; Schwarz & Oesterhelt, 1985)
<i>ureaABCDEFGF</i>	Ureasa	(Tracy H Hazen <i>et al.</i> , 2014; M. H. Lee <i>et al.</i> , 1993)
<i>lacZ, lacY, lacI</i>	Genes de fermentación de lactosa	(Wilson E. Buvinger & Monica Riley, 1985)
<i>kata, katG, katE</i>	catalasa	(Tracy H Hazen <i>et al.</i> , 2014; Jacek Switala, Barbara L. Triggs-Raine, & Peter C. Loewen, 1990)
<i>malt</i>	Regulador maltosa	(Michaelis, Chapon, D 'enfert, Pugsley, & Schwartz, 1985)
<i>pulA</i>	Pululanosa: degradación de almidón (starch-debranching)	(Michaelis <i>et al.</i> , 1985)
<i>pho box: phoRBAEM</i>	Regulación de fosfato, se activan cuando hay escasas de fosfato	(T.-Y. Lee, Makino, Shinagawa, Amemura, & Nakata, 1989)

(Elaboración propia)

b. Genes de virulencia. Los factores de virulencia son moléculas (*gene products*) que contribuyen a la patogenicidad de un microorganismo. Incluyen toxinas bacterianas, proteínas de la superficie celular, enzimas hidrolíticas y carbohidratos de la membrana celular. La siguiente tabla muestra los diferentes tipos de factores, según la función que realizan (Cross, 2008).

Cuadro 1. Función y tipos de factores de virulencia en bacterias

Funciones	Tipos
Colonizar y establecerse en un hospedero particular	Factores de adherencia: muchas bacterias patogénicas colonizan la mucosa usando <i>pili</i> para adherirse a las células.
Evadir el sistema inmune del hospedero	Cápsulas: algunas bacterias están cubiertas por cápsulas que las protegen de opsonización y fagocitosis.
Inmunosupresión: inhibir la respuesta inmune del hospedero	Inhibición de producción de citosinas proinflamatorias
Entrar y salir de las células del hospedero (solo para patógenos intracelulares)	Factores de invasión: son componentes de la superficie celular que le permiten a las bacterias invadir las células del hospedero. Normalmente están codificados en plásmidos.
Obtener nutrientes del hospedero	Sideroforas: son factores de unión de hierro que permiten a las bacterias a competir con el hospedero por hierro.
Causar daños en el hospedero	<p>Endotoxinas: las toxinas (<i>lipopolysaccharide endotoxins</i>) de bacterias Gram negativo pueden causar fiebre, cambios en presión arterial, inflamación, etc.</p> <p>Exotoxinas: incluyen toxinas y enzimas secretadas por bacterias patogénicas. Pueden tener efectos citotóxicos, neurotóxicos o enterotóxicos.</p>

(Peterson, 1996)

El uso de técnicas genómicas y de biología molecular ha permitido la identificación de factores de virulencia que pueden ser objetivo de nuevas terapias. Estos factores deben ser evaluados en estudios *in vitro* e *in vivo* para determinar su prevalencia en aislados bacterianos. Con el aumento de bacteria resistente a múltiples antibióticos y una disminución de la gama de antibióticos, los investigadores deben conocer todos los posibles factores de virulencia para desarrollar nuevas terapias (Cross, 2008).

Se han realizado varios estudios para determinar si la virulencia de *Klebsiella pneumoniae* es dado por ciertos genes. En uno de ellos, los autores querían determinar si la virulencia se veía afectada al mutar el gen *htrA*. Este codifica para una proteasa y está involucrado en la síntesis de LPS y CPS (*capsular polysaccharide*). Se observó que la mayoría de mutantes sin ese gen eran susceptibles a calor, estrés oxidativo y medicamentos. También hubo casos en que bacterias Gram negativo con mutaciones de *htrA* causaron enfermedades atenuadas en animales (Cortes, de Astorza, Benedi, & Alberti, 2002).

Otro gen estudiado es el gen *uge*. Este codifica para una UDP galacturonate 4-epimerasa. Cepas mutantes KT3412 and KT3412 con el plásmido pGEMT (sin gen *uge*) no produjeron infección en el tracto urinario de ratas (Regue *et al.*, 2004).

Las bacterias del género *Klebsiella* también pueden contener genes de resistencia. En un artículo del 2011, Kumar et al compararon los genomas de tres cepas distintas de *K. pneumoniae* y determinaron los genes de virulencia o resistencia en común (Fig. 12 y 13). Entre los genes en común se encuentran los factores de virulencia de transporte de hierro, síntesis de cápsula y elementos extracromosomales o plásmidos (V. Kumar *et al.*, 2011).

Figura 17. Genes en común en cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Biological role category ^b	No. of genes	Proportion (%) of total no.
Transport and binding proteins	674	18.56
Energy metabolism	530	14.60
Regulatory functions	363	10.00
Cell envelope	325	8.95
Hypothetical	243	6.69
Cellular process	186	5.12
Protein fate (secretion, trafficking, folding, etc.)	184	5.07
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	176	4.85
Central intermediary metabolism	175	4.82
Protein synthesis	167	4.60
DNA metabolism	147	4.05
Amino acid biosynthesis	114	3.14
Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides	80	2.20
Fatty acid and phospholipids metabolism	69	1.90
Transcription	47	1.29
Signal transduction	45	1.24
Mobile and extrachromosomal element functions	11	0.30
Unclassified	95	2.62
Total	3,631	

(V. Kumar *et al.*, 2011).

Figura 18. Genes de resistencia a antibióticos en *Klebsiella pneumoniae*.

Group ^a	No. of genes ^b						Other <i>Klebsiella</i> spp. ^c
	1162281	JH1	MGH	NTUH	Rh	342	
Aminoglycoside acetyltransferase	0	0	4	0	0	0	130
Aminoglycoside phosphotransferase	1	0	1	0	0	0	15
Beta-lactamase	3	1	4	1	1	2	915
Chloramphenicol acetyltransferase	1	0	1	0	0	0	33
Drug-insensitive DHFR	1	0	0	0	0	0	70
Specific demethylase	1	1	1	1	1	1	3
Efflux pump	12	11	13	11	11	11	44
Pentapeptide repeat	1	0	0	0	0	0	49
Sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase	1	0	1	0	0	0	60
Ribosomal protection protein	0	0	0	0	0	0	1
Undecaprenyl pyrophosphate phosphatase	1	1	1	1	1	1	2
Unclassified	2	2	2	2	2	2	4
Total	24	16	28	16	16	17	1,326

^a Antibiotic resistance gene categories were adapted from the ARDB and identified by TBLASTN searches.

^b Species name abbreviations are the same as those in Table 2.

^c Other *Klebsiella* sp. hits from the GenBank database.

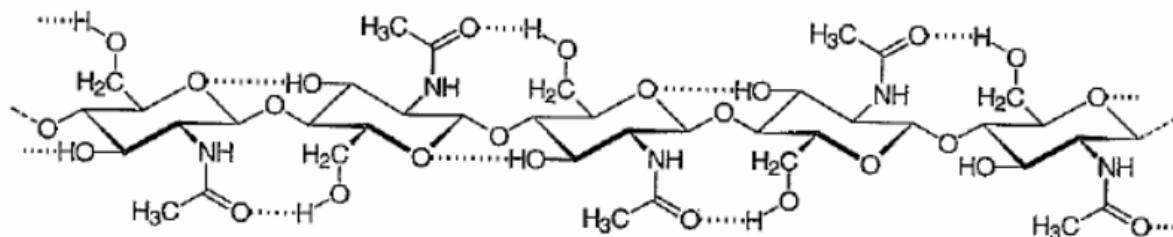
(V. Kumar *et al.*, 2011).

G. NANOTECNOLOGÍA

1. Quitina. La quitina es el biopolímero que da la estructura al exoesqueleto de insectos, crustáceos, artrópodos e incluso a la pared celular de algunos hongos, de manera que es uno de los biopolímeros más abundantes. Su estructura porosa y alto peso molecular le permiten absorber agua (Ramírez, *et al* 2010), sin embargo, es muy poco soluble en agua y tiene baja reactividad. Esto provoca que sus aplicaciones sean limitadas, sin embargo, el quitosano, uno de sus derivados tiene múltiples aplicaciones (Sastosque, *et al* 2007). Esto provoca que la demanda de quitina este en constante aumento (Pillai & Chandra 2009). Actualmente se obtiene de crustáceos criados industrialmente, sin embargo, el aumento en su demanda ha hecho necesaria la búsqueda de otras fuentes para su producción industrial.

a. Estructura de la quitina. Cada monómero de la quitina es una aldosa, la 2-Acetilamina-2-desoxi--D- (+)-Glucosa. (Rinaudo 2006), su estructura puede verse en la Figura 19. También se puede apreciar que los monómeros se mantienen unidos por enlaces glucosídicos que se forman con la pérdida de un agua y enlace de los grupos alcohol y carbonilo. (Devia 1980). Como puede apreciarse en la Figura 19, los monómeros también interactúan mediante dos puentes de hidrógeno, esto reduce la libertad de rotación del polímero (Wang. *et al* 1991), esto es lo que provoca la baja solubilidad de la quitina en agua (Einbu 2007).

Figura 19. Estructura de la quitina.



Einbu, A. (2007). Characterization of chitin and a study of its Acid-Catalysed Hydrolysis. Thesis for the degree of philosophiae doctor, Trondheim Norwegian.

Algunos monómeros de la cadena están desacetilados, siendo monómeros de quitosano y no de quitina, de manera que la quitina es un copolímero. Su calidad puede medirse respecto su grado de acetilación, es decir, la proporción de monómeros que tienen el enlace acetilo (Pacheco 2013).

b. *Ceratitis capitata* como fuente de quitina. Cada El exoesqueleto de los insectos está compuesto por una cutícula que recubre su cuerpo y puede soportar grandes presiones sin romperse o deformarse. La cutícula está compuesta por tres capas, la epicutícula, la capa de cemento y la cuticulina que es la parte interior. Esta última es la formada por una matriz fibrosa de quitina (Hillerton, 1984). Aquí las propiedades de dureza e insolubilidad en agua de la quitina son de suma importancia. Se conocen al menos 20 proteínas que forman parte de la cutícula de *Ceratitis capitata* y son el segundo componente más abundante de la cutícula (Chen & Mayer, 1985).

c. Extracción de quitina. Cada Habitualmente se usa caparazones de cangrejo y de camarón para extraer quitina, pero se ha extendido las aplicaciones a escarabajos, hongos, gusanos de seda, entre otros. Este proceso de extracción consiste en tres etapas, la desmineralización, desproteínización y decoloración. Debido a que los insectos tienen menos material inorgánico que los crustáceos y esto facilita el proceso de desmineralización (Ruiz-Herrera1975).

- Desproteínización: En la desproteínización química se busca romper el polímero, esto se complica por los enlaces entre la quitina y las proteínas. Se ha hecho con varios reactivos, comúnmente se utiliza NaOH en concentraciones desde 0.125 hasta 15.0 M, a temperaturas de hasta 160 °C. Se debe tener precaución de no exagerar las condiciones de la reacción, ya que tratamiento alcalino provoca la hidrólisis de los enlaces glucosídicos, disminuyendo su peso molecular (Younes 2015). También se puede usar el método biológico enzimático, donde principalmente se utilizan proteasas derivadas de bacterias o vísceras de peces; como la alcalasa, pesina, papaína, pancreatina, devolcasa y tripsina por su

capacidad de eliminar las proteínas, sin que haya una desacetilación y despolimerización significativas (Khanafari 2008).

- Desmineralización: Se eliminan los minerales que pueda haber. Se puede utilizar HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH o HCOOH (Percot 2003) para la desmineralización química. Lo más común es utilizar HCl. En esta etapa también se debe cuidar que las condiciones provoquen la despolimerización por ruptura de los enlaces glucosídicos (Poole-Warren 2016). La intensidad del tratamiento varía con respecto a las propiedades del material que se está trabajando, por ejemplo: el grado de mineralización, tiempo de extracción, temperatura, tamaño de las partículas, concentración de ácido y naturaleza del mineral (Percot 2003).

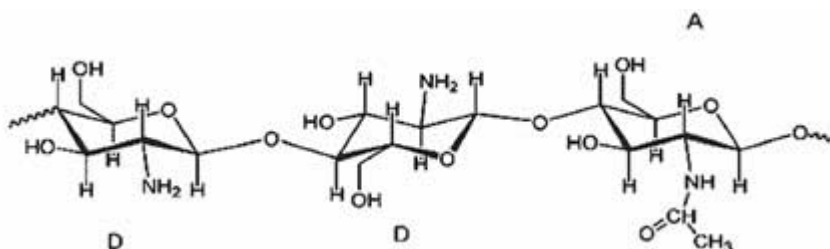
Se ha reportado que a temperaturas más altas se acelera la reacción debido a que el solvente puede penetrar mejor la quitina, pero también hay mayor ruptura de enlaces (Truong, et al 2007). Existe una relación importante entre el tamaño de la partícula y la penetración de la quitina, a mayor área superficial, mejor es la penetración (Mariqus-Duval 2008). Se debe de tomar en cuenta que condiciones muy agresivas, como lo son temperaturas muy altas, tiempos más largos, concentraciones muy fuertes y partículas muy pequeñas afectan las propiedades y calidad del extracto de quitina.

El método biológico utiliza microorganismos proteolíticos y el producto final tiene mayor peso molecular que al usar el tratamiento químico. También ofrece mejor reproducibilidad, menor consumo energético y de solvente, pero se ve limitado para para escala de laboratorio (Khanafari 2008).

2. Quitosano. Luego de obtener la quitina, se debe desacetilar para obtener quitosano. Esto puede lograrse mediante dos vías: la primera es mediante una reacción química y la segunda mediante una reacción bioquímica. Las condiciones a las que se lleve a cabo cualquiera de estas reacciones afectará el producto final en su peso molecular y grado de desacetilación (Rashid *et al* 2011). Sin embargo, a diferencia de la quitina en el quitosano lo que se busca es desacetilar la mayor cantidad de monómeros posibles evitando romper los enlaces glucosídicos para mantener un peso molecular alto. Se considera quitosano cuando el porcentaje de desacetilación está entre 85 y 99% (Tsaih & Chen, 2003).

a. Estructura del quitosano. Debido a que el grado de desacetilación es tan grande a comparación de la quitina, el quitosano solo puede formar la mitad de los puentes de hidrógeno que puede formar la quitina. Esto aumenta su solubilidad en agua y ácidos y disminuye su rigidez, ya que la molécula tiene más libertad de rotación (Acosta, *et al* 1993). A diferencia de la quitina el quitosano es altamente reactivo, esto se debe a que los grupos amino están protonados (Aranz, *et al* 2009).

Figura 20. Estructura del quitosano.



Einbu, A. (2007). Characterization of chitin and a study of its Acid-Catalysed Hydrolysis. Thesis for the degree of philosophiae doctor, Trondheim Norwegian.

b. Propiedades fisicoquímicas importantes

- **Peso molecular:** la viscosidad y solubilidad dependen de él, de manera que afecta su calidad y posibilidad de usarse para distintas aplicaciones. Se ve afectado por la diversidad estructural y las interacciones moleculares (Tsaih & Chen 2003). Se puede determinar por viscosimetría, dispersión de Rayleigh de la luz y cromatografía de permeabilidad en gel.
- **Grado de desacetilación:** Es la proporción de grupos aminos libres en relación a los grupos acetilo, afecta directamente la solubilidad y la bioactividad del producto (Khan 2002). Puede determinarse por titulación potenciométrica, espectroscopia IR, cromatografía líquida, resonancia magnética nuclear, espectroscopia UV-Visible, entre otros.
- **Viscosidad:** Al disolverse en ácidos puede medirse la viscosidad de las soluciones, esta dependerá del peso molecular, grado de acetilación y al igual que la viscosidad de cualquier compuesto de la temperatura, pH, fuerza iónica y solvente. Se usa como una medición indirecta para aproximar el peso molecular (Park 2002). Para ello se usa la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada

Ecuación 2. Fórmula de viscosidad intrínseca.

$$[\eta] = KM^\alpha$$

Dónde:

$[\eta]$ es la viscosidad intrínseca

M es el peso molecular

K y α dependen del solvente

Esto medirá la viscosidad intrínseca, de manera que se debe extrapolar hasta una concentración de cero (Khan 2002).

- Solubilidad: El quitosano no es soluble en agua, pero es soluble en algunos solventes orgánicos y ácidos (Park 2002). Esto se debe a la protonación del grupo amino, que en la quitina está acetilado, de manera que depende directamente del grado de desacetilación (Rinaudo 2006).

c. Desacetilación. Se utilizan los métodos químicos con mayor frecuencia por su bajo costo y su sostenibilidad para producción en masa. Tiene una energía de activación de 48.76 kJ/mol at 25–120 °C (Ahlafi et al, 2013). El método químico puede hacerse en medio ácido o alcalino, pero se utiliza el alcalino debido a que los enlaces glucosídicos se ven más afectados en medio ácido (Hajji, *et al* 2014). Para este proceso se disuelve la quitina en una solución de NaOH por unas horas. Factores como la concentración de NaOH, tiempo de reacción y temperatura afectan el grado desacetilación y el peso molecular del producto final (Tsaih & Chen, 2003).

El método biológico es una forma controlada y no degradable, pero el producto obtenido es de muy buena calidad (Tsigos, *et al* 2000). Se logra por medio de la catálisis de la hidrólisis de los enlaces N-acetamido. Varios hongos e insectos han mostrado presencia de esta enzima. Las más comunes son aquellas que se encuentran en *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans* y *Colletotrichum lindemuthianum*. El grado de acetilación que puede alcanzar es de hasta 97% (Yunes, Rinaudo 2015).

d. Aplicaciones. Se utiliza en la manufactura de productos de distintas áreas económicas, como lo son la agricultura, biotecnología, farmacia, alimentos, tratamiento de aguas, entre otras. La demanda de quitosano por parte de estas industrias ha ido en aumento y se espera que continúe haciéndolo en los siguientes años, de manera que se espera una tendencia de crecimiento en el mercado de quitosano a nivel mundial (Grand View Research 2016). Algunos de sus usos en las diversas industrias son:

- Farmacia: En la fabricación de medicinas se utiliza para mejorar la absorción y desintegración de droga y la dilución de tabletas. Tiene efectos sobre la salud de las personas: absorbe y compacta las grasas, por lo que ayuda a perder peso y a mejorar los niveles de colesterol; se ha visto un efecto positivo en el tratamiento de úlceras y lesiones (Poole-Warren 2016); aumenta el contenido de calcio, por lo que ayuda a endurecer los huesos y previene la formación de placa en los dientes. También se utiliza para fabricar cosméticos, como hidratante, emulsificante, emoliente, espesante y para formar películas (Younes, Rinaudo 2015).
- Biotecnología: Estudios han demostrado la posibilidad de usar quitosano para la liberación de ingredientes activos, por ejemplo, en la liberación de vacunas e insulina. Esto se debe a que tiene la capacidad de adherirse a las mucosas (Tsigos, *et al* 2000). Se ha utilizado en reconstrucción de la piel, muy útil en quemaduras debido a sus propiedades humectantes y antisépticas (Younes, Rinaudo 2015).

- Alimentos: En la industria alimenticia, se aplica como estabilizador, agente coagulante, preservante, clarificador, como fibra dietética, en remoción de taninos, cromatografía, espesante y para reutilización de proteínas. Debido a que ha aumentado la demanda de preservantes, coagulantes y estabilizadores, también lo ha hecho la demanda de quitosano (Grand View Research 2016).
- Tratamiento de aguas: Se usa para remover colorantes y metales (Grand View Research 2016).
- Nanotecnología: El tamaño reducido de las nanopartículas de quitosano aumenta su área superficial, reactividad, estabilidad térmica y traslocación celular (Rauf, 2017). Debido a esto, se han estudiado para distintas aplicaciones, sobre todo en biomedicina y tratamiento de agua. En biomedicina, por ejemplo, se ha observado que la biodisponibilidad mejora significativamente al usar nanopartículas de quitosano y no solo quitosano, de manera que es altamente recomendado para transporte de drogas. Del mismo modo, en tratamiento de agua se ha reportado su utilidad para la detección de metales pesados en bajas concentraciones. Otras aplicaciones de quitosano que se han probado con nanopartículas son: como agente antibacterial, en preservación de alimentos, regeneración celular de la piel (Soutter, 2017).

4. METODOLOGÍA

A. Silenciamiento de genes de determinación sexual en *Ceratitis capitata* y *Anastrepha ludens*

1. Sitio de estudio. El presente estudio se llevará a cabo en la ciudad de Guatemala, Guatemala en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG): Laboratorio del Departamento de Bioquímica y Microbiología, Laboratorio del Centro de Estudios en Biotecnología y Laboratorio de Enfermedades Parasitarias Transmitidas por Vectores.

2. Sujetos de estudio. Los sujetos de estudio serán Mosca de la fruta *Ceratitis capitata* hembra y macho producidas en la Planta Moscamed localizada en la Laguna del Pino. Así como la mosca *Anastrepha ludens* hembra y macho producidas en la Planta Moscamed, San Miguel Petapa.

3. Enfoque, diseño y tipo de investigación. Esta investigación tiene un enfoque cuantitativo y un diseño de experimento verdadero.

4. Tipo y tamaño de muestra. Se realizaron tres replicas biológicas para obtener la curva de expresión del gen evaluado. Cada réplica es un grupo de aproximadamente 10 moscas adultas obtenidas del área de filtrado genético en un día determinado.

5. Variables

Cuadro 2. Variables experimentales controladas por el investigador.

Nombre	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Interrelación	Unidades de medición
Presencia de inserto	Estado presente del inserto del gen de interés ligado al plásmido clonado en una cepa de <i>E. coli</i> .	Cualitativa	Nominal	Independiente	1. Presente 2. Ausente
Producción de ARNdh	Cantidad de ARNdh producido	Cuantitativa	Continua	Independiente	ng/ml

Continuación Cuadro 2. Variables experimentales controladas por el investigador.

Nombre	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Interrelación	Unidades de medición
Estadio de mosca	Estadio en del cual se obtiene el material genetico	Cualitativa	Nominal	Independiente	1. Larva 2. Pupa 3. Adulto

Cuadro 3. Variables intervinientes no controladas por el investigador.

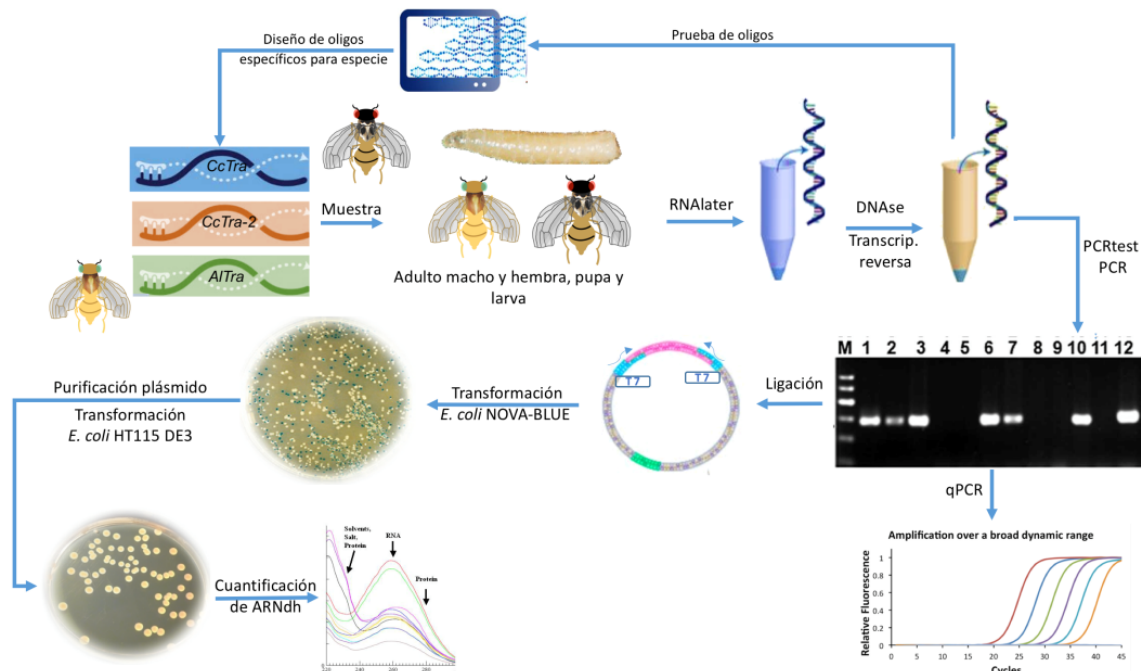
Nombre	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Interrelación
Estabilidad genética de la cepa utilizada	Presencia de mantener genotipos por medio de la presencia de los mismos genes sin mutación en cada individuo	Cualitativa	Nominal	Interviniente
Amplificación del inserto de interés con los primers diseñados	Funcionamiento de los primers para amplificar el fragmento de interés	Cualitativa	Nominal	Interviniente
Estabilidad del fragmento de interés	Permanencia del fragmento en el plásmido determinado	Cualitativa	Nominal	Interviniente
Toxicidad del fragmento de interés	Posibilidad de que el inserto no permita el crecimiento de la bacteria	Cualitativa	Nominal	Interviniente

6. Hipótesis

Hipótesis nula: No será posible expresar ARNdh del gen *transformer* y *transformer-2* de *Ceratitis capitata* (*tra* y *tra-2*) y *Anastrepha ludens* (*tra*) en la bacteria *E. coli* HT115 (DE3)

Hipótesis alternativa: Será posible expresar ARNdh del gen *transformer* y *transformer-2* de *Ceratitis capitata* (*tra* y *tra-2*) y *Anastrepha ludens* (*tra*) en la bacteria *E. coli* HT115 (DE3)

Figura 21. Diagrama general de metodología a seguir



Diseño de oligos para PCR

Los oligos para *C. capitata* se diseñaron luego de determinar la ubicación de los intrones dentro de la secuencia de interés: ARNm de la proteína TRA de *Ceratitits capitata* (GenBank: AF434936.1) o ARNm de la proteína TRA-2 de *Ceratitits capitata* (GenBank: NM_001279408.1). Esto se realizó al alinear, utilizando Clustal Omega, la secuencia de interés con la secuencia del genoma de *Ceratitits capitata* (GenBank: NW_004523847.1). Los oligos para *Cctra-2* se diseñaron en la secuencia codificante utilizando la herramienta “OligoAnalyzer Tool”. Por otro lado, los oligos para *Cctra* se diseñaron luego de realizar un alineamiento de la secuencia de interés (GenBank: AF434936.1) con ARNm de la proteína TRA de *Anastrepha suspensa* (GenBank: JN597286.1) junto con las variantes masculinas y femeninas: ARNm de la primera variante de la proteína TRA macho específica M1 del gen *tra* de *Ceratitits capitata* (GenBank: AF434937.1), ARNm de la segunda variante de la proteína TRA macho específica M2 del gen *tra* de *Ceratitits capitata* (GenBank: AF434938.1) y ARNm de la proteína TRA de *Anastrepha suspensa* (GenBank: JN597286.1). Se localizaron las secuencias conservadas entre *Anastrepha suspensa* y *Ceratitits capitata* y se diseñaron los oligos, utilizando la herramienta “OligoAnalyzer Tool”, sobre los fragmentos conservados que se encuentran entre intrones.

Los oligos para *A. ludens* se diseñaron alineando la secuencia del gen de *Altra* de *A. ludens* (secuencia de ADNc copia) (GenBank: EU024509.1), secuencias de *A. suspensa*: M1 “transformer male-specific transcript variant M1 (tra) mRNA (GenBank: JN597288.1), M2 “transformer male-specific transcript variant M2 (tra)

mRNA” (GenBank: JN597287.1), M3 “transformer male-specific transcript variant M3 (tra) mRNA” (GenBank: JN597289.1) y la secuencia femenina “female-specific transcript variant (tra) mRNA” (GenBank: JN597286.1). Para el análisis de las regiones codificantes se utilizó la herramienta “OligoAnalyzer Tool”.

Todos los oligos se eligieron de acuerdo a los siguientes parámetros: ΔG cercano a 0 o positivo, la menor cantidad o nulidad de formación de homodímeros/heterodímeros con uniones en sus extremos 3' y de formación de GC clamp (GC en extremo 3'). Como control se utilizó el oligo del gen de actina (Taracena et al., 2015) por lo que se analizó mediante el alineamiento de los genomas con la secuencia del oligo proporcionados por el Dr. Carl Lowenberg de Simon Fraser University, Vancouver, Canadá.

Extracción, calidad y análisis de ARN

Las muestras de *C. capitata* (60 hembras adultas, 60 machos, 32 larvas L3, 32 larvas L2, 32 pupas jóvenes de 6 días hembras, 32 machos, 32 pupas de 9 días hembras y 32 machos) se colectaron en la planta del Pino de Moscamed, Guatemala. Las muestras de *A. ludens* (43 hembras adultas y 39 machos, 15 larvas en estadio larval L3 y 12 pupas macho y 12 hembras) se colectaron en la planta Moscamed Petapa, Guatemala. Las muestras fueron colectadas en ARNlater como se describe en el SOP 1.1.

Para estandarizar los métodos utilizados para cada estadio se realizaron extracciones de ARN de las muestras (larvas, pupa y mosca adulta) con TRIzol marca Ambion. Esta extracción y la cuantificación se realizó según el procedimiento descrito en el protocolo (Teal, Gomez-Simuta, Dueben, Holler, & Olson, 2006). El ARN extraído se trató por 1 hora con RQ1 ARNasa y se verificó la presencia de contaminación de ADN genómico en el ARN extraído por medio de un PCR de actina (concentración de 10pmol/ml) con el termociclador Mastercycler Personal (Promega, 2010a, 2016). Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1.5% con bromuro de etidio en un transiluminador UV Epichemi3 Darkroom (UVP Bioimaging Systems).

Síntesis y análisis de ADNc y ligación en plásmido

Una vez obtenido el ARN tanto de las muestras *C. capitata* como de *A. ludens*, se analizaron las concentraciones y purzas (razón A260/A280 y razón A260/A230), las cuales fueron medidas con el equipo nanodrop (Thermo Scientific). Las muestras que presenten pureza mayor a 1.5 fueron utilizadas para realizar la síntesis de transcripción reversa a partir de 1 μ g de ARN con el kit GoScript Reverse Transcription System marca Promega según el protocolo del proveedor sin modificaciones (Life Technologies, 2010). Se verificó la síntesis de ADNc por medio de un PCR de actina (concentración de 10pmol/ml) con el termociclador Mastercycler Personal (Promega, 2010a, 2016). El producto de PCR visualizó en un gel de agarosa 1.5% con bromuro de etidio en un transiluminador UV Epichemi3 Darkroom (UVP Bioimaging Systems).

Luego de estandarizar las extracciones y síntesis de ADNc se realizó un PCR touchdown del ADNc con los oligos previamente diseñados específicos para los genes *Cctra*, *Cctra-2* y *Altra* (concentración de 10pmol/ml) con el termociclador Mastercycler Personal (Promega, 2010a, 2016). Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1.5% con bromuro de etidio en un transiluminador UV Epichemi3

Darkroom (UVP Bioimaging Systems). Luego cada producto fue ligado al plásmido pGEM-T easy vector agregando 50ng (1ul pGEMT): 3ul de producto de PCR de fragmento *tra* y *tra-2* correspondiente a cada especie de mosca, 5ul de buffer de ligación y 4ul de ligasa T4 (SOP 1.6) (Promega, 2009a, 2010b).

Transformación de *E. coli* XLI-BLUE

Se prepararon células competentes *E. coli* XLI-BLUE y se transformaron según el protocolo 24 de Sambrook (Promega, 2009a, 2010b), la agitación horizontal se realizó en una incubadora marca MaxQ 4000 (Barnstead Lab-Line). Se sembraron 100µl en placas previamente preparadas de agar LB suplementadas con tetraciclina [12.5ug/ml], carbenicilina [100ug/ml], IPTG [0.1mM] y X-gal [40ug/ml] y se incubaron a 37°C por 12 horas. Para verificar la transformación e identificar la permanencia del inserto se realizó un PCR de colonias con los oligos M13, localizados dentro del plásmido para cada uno de los genes. Luego, se extrajeron los plásmidos con el kit Pure Yield Plasmid Miniprep System (Promega, 2009b; Sambrook, J; Russell, 2011), los productos se cuantificaron utilizando un Nanodrop marca Thermo Fisher y se enviaron a Macrogen USA para confirmar la secuencia insertada en cada plásmido con los oligos M13 F y M13 R.

Análisis de secuenciación de plásmidos

Los electroferogramas obtenidos de Macrogen USA se limpiaron y se realizaron secuencias consenso con el programa Mega7 y CodonCode Aligner. Para todas las secuencias obtenidas se localizaron los resultados de la secuenciación R y el reverse complement del resultado de la secuenciación F. Para confirmar la presencia del inserto y su orientación, se buscó las secuencias correspondientes a los oligos F y R, promotor T7 y un fragmento de la secuencia de una enzima de restricción localizada en el plásmido (SpeI).

Para las secuencias en las que no fue posible obtener una secuencia consenso o identificar la presencia del inserto, se realizó un alineamiento de la secuencia del gen de interés con el programa Clustal Omega y se identificó la identidad de la secuencia utilizando la herramienta Blast. Para las secuencias que no fue posible confirmar la presencia del inserto y orientación

Transformación de *E. coli* HT115 (DE3) e inducción de producción de ARNdh

Se prepararon células competentes *E. coli* HT115 (DE3), estas fueron transformadas y asiladas en placas de agar LB + carbenicilina [100 µg/mL] +Tet [12.5 µg/mL] incubadas “overnight” a 37°C. Las células transformadas exitosamente se cultivaron en medio líquido “overnight” y luego se indujeron con IPTG (0.4mM) por 2 horas, se extrajo ARN utilizando TRIzol y se trataron con ARNasa A. Luego se cuantificó utilizando espectrofotometría el ARNdh generado y se realizó un gel de integridad para determinar el tamaño del ARNdh producido.

Evaluación de toxicidad del inserto

La toxicidad de cada uno de los insertos se evaluó en *E. coli* HT115 (DE3), estas se sembraron en diluciones seriadas ($1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-8}$) de células inducidas y no inducidas en placas suplementadas con

carbenicilina [100 µg/mL] +Tet [12.5 µg/mL]. Las placas se inocularon con 10µl de cada dilución. Las placas se incubaron a 37°C por 12 horas. Luego se observó el crecimiento para determinar si existe toxicidad del inserto.

Diseño de oligos para PCR tiempo real

Los oligos de q-PCR se diseñaron utilizando la herramienta “OligoAnalyzer Tool”. Estos se eligieron de acuerdo a los parámetros ΔG cercano a 0 o positivo, la menor cantidad o nulidad de formación de homodímeros/heterodímeros con uniones en sus extremos 3' y formación de GC clamp (GC en extremo 3'). Para amplificar un fragmento de entre 90bp y 170bp. Además, estos oligos se localizan entre intrones y no contenidos dentro de un fragmento amplificado por los oligos diseñados para PCR específicos de cada gen.

Los oligos para el gen *Cctra* se diseñaron luego de realizar un alineamiento de las secuencias de interés utilizando Clustal Omega: ARNm de la proteína TRA de *Ceratitidis capitata* (GenBank: AF434936.1) y el genoma *Ceratitidis capitata* (GenBank: NW_00453847). Los oligos diseñados para el gen *Cctra-2* y *Altra* no se diseñaron entre intrones debido a que el gen *Cctra-2* no posee intrones y existe poca información del genoma de *A. ludens*. A pesar de esto los oligos se diseñaron en una región que se encontrara fuera de la región de amplificación de los oligos utilizados en clonación.

Se realizó una prueba de los oligos de tiempo real diseñados (concentración de 10pmol/ml) utilizando un PCR touchdown del ADNc obtenido de adultos machos y hembras. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1.5% con bromuro de etidio en un transiluminador UV Epichemi3 Darkroom (UVP Bioimaging Systems).

*Nota: El procedimiento detallado de cada paso se encuentra en Anexos en los SOPs 1:1 a 1:8

B. Caracterización de *Klebsiella oxytoca* aislada de ambientes asociados a *Ceratitis capitata*

1. **Sitio de estudio.** El presente estudio se llevará a cabo en la ciudad de Guatemala, Guatemala en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG): Laboratorio del Departamento de Bioquímica y Microbiología, Laboratorio del Centro de Estudios en Biotecnología y Laboratorio de Enfermedades Parasitarias Transmitidas por Vectores.

2. **Sujetos de estudio.** Los sujetos de estudio serán aislado bacterianos de la Planta Moscamed localizada en la Laguna del Pino.

3. **Enfoque, diseño y tipo de investigación.** Esta investigación tiene un enfoque cuantitativo y un diseño de experimento verdadero.

4. Variables

Cuadro 4. Variables experimentales controladas por el investigador.

Variable	Definición	Clasificación por naturaleza	Nivel de medición	Clasificación por interrelación	Escala de medición
ADN genómico	Grado de pureza de ADN genómico extraído	Cuantitativa	Continua	Dependiente	Absorbancia a 260nm, 280nm y 320nm 260/280 260/320
ADN genómico	Concentración de ADN extraído con dnazol	Cuantitativa	Continua	Dependiente	Cálculo a partir de absorbancia 250 mg/μl
Presencia de bandas	Bandas definidas observadas en gel de electroforesis	Cualitativa	Nominal	Dependiente	Sí No
Número de bandas	Cantidad de bandas definidas observadas en gel de electroforesis	Cuantitativa	Discreta	Dependiente	$0 \leq \text{número}$

Continuación Cuadro 4. Variables experimentales controladas por el investigador.

Variable	Definición	Clasificación por naturaleza	Nivel de medición	Clasificación por interrelación	Escala de medición
Tamaño de plásmido	Pares de bases a que equivale la banda en el gel de electroforesis	Cuantitativa	Discreta	Independiente	Comparación con escalera de peso molecular
Similitud entre genomas	Genes en común entre las dos secuencias	Cuantitativa	Continua	Independiente	Porcentaje de similitud en alineamiento

5. Hipótesis**Hipótesis alternativa:**

- *Klebsiella oxytoca* aislada de ambientes asociados a *Ceratitidis capitata* presenta menos del 95% de similitud con genomas de *Klebsiella oxytoca* ya anotados en bases de datos.
- *Klebsiella oxytoca* no contiene plásmidos

Hipótesis nula:

- *Klebsiella oxytoca* aislada de ambientes asociados a *Ceratitidis capitata* presenta igual o más del 95% de similitud con genomas de *Klebsiella oxytoca* ya anotados en bases de datos.
- *Klebsiella oxytoca* contiene plásmidos

Aislamiento e identificación de bacterias como *Klebsiella oxytoca*.

Las muestras de *Klebsiella oxytoca* provenientes de ambientes asociados a *Ceratitidis capitata* fueron proporcionadas por Mosamed. Para la identificación, se usaron medios selectivos para enterobacterias: agar sangre y agar MacConkey. De este último se tomaron colonias para pruebas de identificación colorimétrica – Gram – así como pruebas bioquímicas para las cuales se requirió inoculación en medio tripticosa soya. El ID se confirmó usando una *Gram-negative ID card* (BioMerieux Francia, reference number 21341) en el Sistema VITEK® 2 system (Biomérieux, Francia) y se realizó test de susceptibilidad a antibióticos en el mismo Sistema con una *AST card* para enterobacterias. El procedimiento detallado se encuentra en el procedimiento operacional estándar 2:1 (SOP) de la sección de Anexos.

Asimismo, se realizó una curva de crecimiento en colaboración con Boris Llamas y Jeffrey Flores. Para esta se comparó un cultivo ON con estándares de MacFarland cada 20 minutos por 3 horas. Luego ellos,

determinaron si la bacteria se comporta según la ley de crecimiento natural – exponencial – o se adaptan más a una función logística. La imagen siguiente muestra las funciones utilizadas.

Figura 22. Ecuaciones planteadas y solución para el crecimiento de cepas de *Klebsiella oxytoca*.

<p style="text-align: center;">Ley de Crecimiento Natural</p> $\frac{dP}{dt} = kP$ $\int \frac{dP}{P} = \int k dt$ $P = Ae^{kt}$ $P(0) = Ae^{k \cdot 0} = A \therefore A = P_0$ $P(t) = P_0 e^{kt}$	<p style="text-align: center;">Función Logística</p> $\int \frac{dP}{P(a - bP)} = \int dt$ $\frac{1}{P(a - bP)} = \frac{A}{P} + \frac{B}{(a - bP)}$ $\ln \left \frac{P}{a - bP} \right = at + aC$ $\frac{P}{a - bP} = C_1 e^{at}, \text{ donde } C_1 = \frac{P_0}{a - bP_0}$ $P(t) = \frac{aP_0}{bP_0 + (a - bP_0)e^{-at}}$
---	---

Extracción y secuenciación de ADN

Después de la identificación y obtención de colonias de *K. oxytoca*, se extrajo el genoma completo tratando el cultivo con lisoenzima (12.6 ug/ml), proteinasa K (20 mg/ml) y ARNasa (4 mg/ml) seguido de precipitación con DNAzol de Thermo Fisher (SOP 2:2). Adicionalmente se realizó una incubación a 65°C por 1 hora y 80°C por 10 min para eliminación de nucleasas. Luego de la extracción, se determinó la pureza y concentración del ADN con espectrofotómetro UV marca UNICO (absorbancia a 260nm y 280nm) y se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0.5 – 0.8% x 60cm para determinar su integridad, a 50 voltios por 90 minutos. Cada muestra de ADN se tiñó con Gel Red 100X para visualizar las bandas en un transiluminador.

Los genomas que cumplieron con los requisitos se enviaron al laboratorio del Dr. Javier Ceja-Navarro en *National Berkeley Lab*, donde se realizó un control de calidad previo al envío a GENEWIZ.

De igual manera, se procedió a la extracción de ADN genómico con el kit QIAamp® DNA Mini, según el protocolo para bacterias y tejido del fabricante. Las muestras se enviaron al Laboratorio de Biología Molecular de la Asociación de Salud Integral, donde labora la Dra. Dalia Lau-Bonilla para realizar la secuenciación con MiniSeq de Illumina.

Extracción e identificación de plásmidos

La extracción de los plásmidos se realizó por lisis alcalina con el kit QIAGEN maxi kit (SOP 2:3). Luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 – 1.5% x 60cm para determinar la presencia y número de los plásmidos. De igual manera, la tinción de las muestras se realizó con Gel Red 100X. Los geles se corrieron a 40 voltios por 1 hora.

Prueba biomolecular para cepas *Klebsiella* spp.

Con el genoma extraído de *K. oxytoca* se realizó BOX PCR (rep-PCR) para obtener patrones de bandas. Los patrones de “huella genómica” generados pueden ser útiles para diferenciar y comparar las distintas cepas de *Klebsiella* aisladas de *Ceratitis capitata*. El procedimiento se basó en estudios y sugerencias del Dr. Javier Ceja del Lawrence Berkeley National Laboratory y de la Dra. Dalia Lau de la Universidad del Valle de Guatemala (SOP 2:4). El oligonucleótido utilizado fue BOXAIR 5’ CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3’. Para la amplificación se usaron GoTaq Green Mastermix 1X, MgCl₂ 7.5mM, Bovine Serum Albumine (BSA) de Promega 4ug, primer 1.25mM y agua libre de nucleasas. La amplificación se realizó en un termociclador APOLLO-BIORAD según el programa: desnaturalización 94°C por 5min; 30 ciclos: 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto; extensión final 72°C; y Hold 4°C.

Análisis de datos

La secuencia obtenida por MiniSeq de Illumina se analizó con *Bacterial Analysis Pipeline application* del *Center for Genomic Epidemiology* de la Universidad Técnica de Dinamarca (<https://cge.cbs.dtu.dk/services>). El análisis realizado fue de “re-secuenciación”, es decir, el genoma obtenido se comparó con genomas ya anotados en bases de datos.

Cuadro 5. Programas a utilizar para el análisis de resultados.

Programa	Funciones
NCBI	<ul style="list-style-type: none"> - Alineamiento de diversas secuencias y de genomas grandes. - Establecer partes conservadas - Comparación con genomas ya secuenciados
MegAlign Pro	<ul style="list-style-type: none"> - Alineamiento de secuencias - Inferencia de árboles filogenéticos y distancia evolutiva - Homología
CLC sequence viewer	<ul style="list-style-type: none"> - Alineamiento de secuencias - Árbol filogenético - Secuencias conservadas - Diseño de primers

(Elaboración propia)

C. Producción de quitosano a partir del pupario de mosca de la fruta *Ceratitis capitata*

1. **Sitio de estudio.** Las muestras se obtuvieron de la planta El Pino, de la laguna el Pino, Barberena, Santa Rosa, Guatemala. La investigación se realizó en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala.

2. **Sujetos de estudio.** La investigación se aplicó a muestras de harina de pupa de mosca hembra y macho frío de *Ceratitis capitata* obtenidas de la planta El Pino.

3. **Enfoque, diseño y tipo de investigación.** La investigación tiene un enfoque cuantitativo. Es de tipo correlacional debido a que busca la relación entre las condiciones de temperatura y concentración durante la desacetilación y el rendimiento y calidad del producto obtenido. Es un diseño experimental en donde se mantendrá fija la variable del tiempo y se variarán las variables de concentración de solución y temperatura de reacción para la desacetilación de la quitina para determinar bajo que combinación de condiciones se obtiene quitosano de mejor calidad.

4. **Tipo y tamaño de muestra.** Las muestras fueron tomadas de la planta de producción El Pino, por lo que la Ing. Dyna Melgar fue quien las extrajo, tamizó y pulverizó. Se tomaron las muestras de harina por muestreo aleatorio.

5. Variables

Cuadro 6. Variables experimentales controladas por el investigador.

Variable	Definición	Clasificación por naturaleza	Nivel de medición	Clasificación por interrelación	Escala de medición
Temperatura de desacetilación	Temperatura la que se lleva a cabo la reacción de desacetilación	Grados centígrados determinados por termómetro	Cuantitativa continua	Independiente	Razón
Concentración de NaOH en desacetilación	Concentración de NaOH usado para la reacción de desacetilación	Porcentaje de peso de NaOH en volumen de solución determinados por una balanza y un balón aforado	Cuantitativa continua	Independiente	Razón

Continuación Cuadro 6. Variables experimentales controladas por el investigador.

Variable	Definición	Clasificación por naturaleza	Nivel de medición	Clasificación por interrelación	Escala de medición
Concentración de NaOH en desacetilación	Concentración de NaOH usado para la reacción de desacetilación	Porcentaje de peso de NaOH en volumen de solución determinados por una balanza y un balón aforado	Cuantitativa continua	Independiente	Razón
Porcentaje de rendimiento	Razón porcentual entre la cantidad de quitina obtenida y la esperada	Porcentaje	Cuantitativa continua	Dependiente	Razón
Transmitancia en el espectro IR	Espectro IR de 4,000 a 400 cm^{-1}	Transmitancia a distintos números de onda determinados por un espectrofotómetro IR	Cualitativo	Dependiente	
Grado de desacetilación	Razón de absorbancia a 1655 y 3450 cm^{-1}	Cociente de la absorbancia obtenida con el espectro en 1655 y 3450 cm^{-1}	Cuantitativa continua	Dependiente	Razón
Morfología	Morfología de la superficie	Observables con un microscopio electrónico	Cualitativa	Dependiente	Nominal

6. Hipótesis. Las condiciones de desacetilación que brindaran un mejor rendimiento sin afectar la calidad del quitosano producido, son las combinaciones de 100 °C y 45% NaOH y 90 °C y 40% NaOH.

7. Método. La planta del Pino de Moscamed Guatemala proveerá la muestra de exoesqueletos de mosca, larva y pupa en forma de harina (falta determinar el tamaño de la partícula). El proceso de extracción

de quitina se divide en tres partes: desproteínización, desmineralización y decoloración. Luego se procederá a la conversión de quitina a quitosano.

Extracción de quitina

a. Desmineralización: Se pesaron 4 muestras de harina de pupario de macho y 4 de hembra según se desglosa en el Cuadro 8. Las muestras se sometieron a un tratamiento ácido, con exceso de HCl 0.25 M a una proporción de 1:30 peso-volumen, detallado en la Tabla no. XX, durante 15 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante. El sólido recuperado se lavó con agua destilada hasta eliminar el ácido y neutralizar (Percot et al, 2003).

b. Desproteínización: Se unieron las 4 partes y se trató la harina desmineralizada con 30 mL de solución NaOH 1M por cada gramo, como se detalla en el Cuadro 8, durante 24 h a 70 °C con agitación vigorosa. Se utilizó un sistema de reflujo para evitar que se evapore la solución. La muestra recuperada y se lavó con agua destilada hasta alcanzar pH 7 (Percot et al, 2003).

c. Decoloración: Se decoloró ambas muestras con una solución de hipoclorito de sodio comercial (marca Magia Blanca) durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación constante (Mirón, et al 2017) como se indica en el Cuadro 8. Se usó extracción debido a que se liberan gases en el proceso.

Cuadro 7. Cantidades de muestras y reactivos utilizaod para la extracción de quitina.

Tipo de muestra	Masa de pupario inicial (± 0.001 g)	Volumen de HCl 0.25 M usado en la desmineralización (± 0.5 mL)	Volumen de NaOH 1M usado en la desproteínización (± 0.5 mL)	Volumen de hipoclorito de sodio comercial usado en la decoloración (± 0.5 mL)
Hembra	2.312	65 mL	70 mL	25 mL
	2.054	60 mL		
	2.578	80 mL		
	2.127	60 mL		
Macho	3.795	110 mL	90 mL	2 lavadas de 25 mL
	3.824	110 mL		
	3.504	105 MI		
	3.616	110 MI		

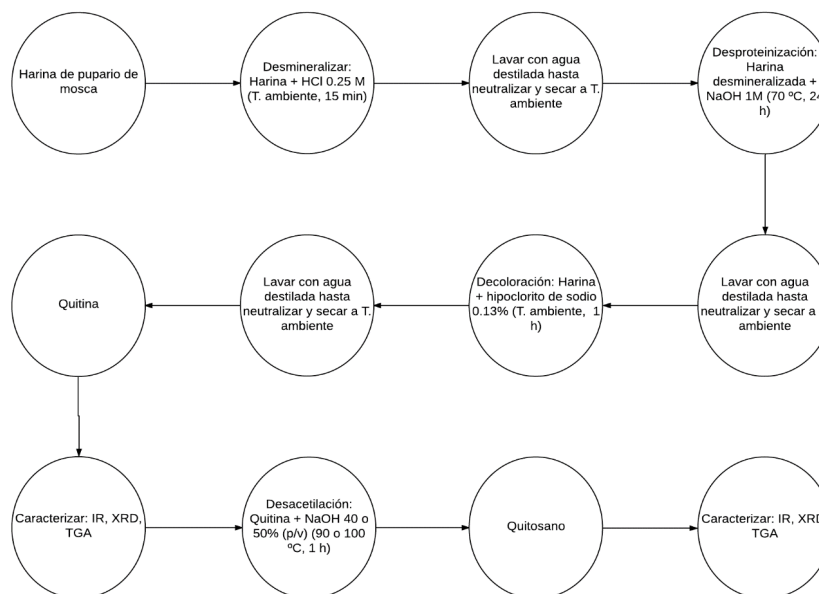
Conversión de quitina a quitosano

Desacetilación: Se separó la masa de quitina obtenida para cada muestra, 1.576 ± 0.001 g de hembra y 3.177 ± 0.001 g de macho, en 4 muestras de aproximadamente 0.350 g para las muestras de hembra y 0.501 g para las muestras de macho. Se agregó NaOH a razón de 15 mL/g a las muestras de quitina y se calentó con reflujo durante una hora. Las condiciones de concentración y temperatura se variaron como se muestra a continuación y según la patente estadounidense número US 8,318,913 B2 de Agratech International, Inc:

Cuadro 8. Condiciones de temperatura y concentración para la desacetilación.

T/C	40% (p/p)	45% (p/p)
90-100	Tc	tC
100-110	Tc	TC

Figura 23. Diagrama general de metodología a seguir



Caracterización y evaluación del producto.

a. **Caracterización:** Se hizo un barrido de $4,000$ a 400 cm^{-1} por medio de espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier. Se usó un estándar de quitosano comercial de camarón en polvo, desacetilado

>75% marca Sigma Aldrich para comparar el espectro identificando las bandas características (Liu, *et al.* 2012).

b. Grado de desacetilación: Se evaluó el grado de desacetilación por medio de espectrofotometría IR, para ello se comparará la transmitancia de las bandas en 1655 y 3450 cm^{-1} según propuesto por Liu, *et al.* 2012, usando la siguiente ecuación:

$$\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times 100$$

(Ecuación 2)

Se usó quitosano de camarón Código 101816984, marca Sima Aldrich como estándar.

c. Difracción de rayos X: Se usó un difractómetro de rayos-X (XRD) (PANalytical modelo Empyrean, a 45kV, 40mA, 2 θ con un ángulo de escaneo de 5.0038 a 84.9928 y una temperatura de 25°C), para un barrido continuo desde 5.0038 a 84.9928° de rotación, con una longitud de onda $K\alpha_1 = 1.54060$, $K\alpha_2 = 1.54443$ y $K\beta = 1.39225$ y a 25 °C.

d. Análisis TGA: Se utilizó un analizador termogravimétrico (TGA/DSC) (Sarte System), para hacer un análisis de 25-1000 °C con una rampa de 10 °C/min y una atmósfera inerte de nitrógeno con flujo de 20 mL/min.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Silenciamiento de genes de determinación sexual en *Ceratitis capitata* y *Anastrepha ludens*

Para el estudio de la expresión de los genes *transformer*, *transformer-2* en *C. capitata* y *transformer* en *A. ludens* fue necesario optimizar el proceso de extracción de ARN y síntesis de ADNc en los estadios: larval L3, pupa y adulto. Como se observa en el Cuadro 9 en *C. capitata* se obtuvieron concentraciones de 30.69 ng/ μ l a 467.2 ng/ μ l. La mayor concentración de ARN se obtuvo del estadio adulto de *C. capitata*, 395.2 ng/ μ l, con una pureza de 0.98 (ARN puro con razón 260/280 \sim 2.0); y una medida de pureza secundaria de ácidos nucleicos de 0.715 indicando la presencia de contaminación, probablemente fenol obtenido durante la separación de la fase orgánica, TRIzol y acuosa (pureza secundaria de ácidos nucleicos con razón 260/230 \sim 2.0 a 2.2) (Thermo Scientific, 1975). Para el estadio larval L3 se obtuvo una concentración de ARN de 197.4 ng/ μ l con una pureza aceptable de 1.94 y una medida de pureza secundaria de ácidos nucleicos de 1.25 indicando la presencia de contaminación, probablemente fenol. La menor concentración de ARN se obtuvo de la pupa, 180.25 ng/ μ l con una pureza 1.82 y una medida de pureza secundaria de ácidos nucleicos de 0.52 indicando la presencia de contaminación, probablemente fenol.

En el Cuadro 10 se presentan las concentraciones obtenidas de ARN en los tres estadios de *A. ludens*. En adultos se obtuvo la mayor a concentración de ARN (se obtuvo una concentración de 550ng/ μ l y 62. 2 ng/ μ l en hembras y machos, respectivamente). Sin embargo la pureza para el ARN de hembra se encuentra por debajo de 1.5 indicando que la muestra se encuentra posiblemente contaminada con proteínas no se eliminadas durante el proceso de extracción. En el proceso de extracción de larva L3 la concentración de ARN fue de 288.5ng/ μ l con una pureza de 1.64 debido a que la pureza se encontraba cercano al valor esperado de 2, la muestra fue considerada aceptable. Sin embargo esta presentó contaminación por fenol como se observa en la medida de pureza secundaria de ácidos nucleicos de 0.37. Por último para pupa se

En cuanto a la extracción realizada en pupa, la concentración de ARN fue de 61.0ng/ μ l con una pureza de 1.62 (Cuadro 10), debido a que la pureza se encontraba por debajo de 2, pero muy cercano a dicho valor, la muestra fue considerada como aceptable. Sin embargo presentó contaminación de fenol.

La menor concentración de ARN se obtuvo de la pupa en ambas especies (*C. capitata* y *A. ludens*) siendo estas de 180.25 ng/ μ l y 61.0ng/ μ l, respectivamente. Por otro lado, estas muestras poseían una pureza aceptable de 1.82 y 1.62 y una medida de pureza secundaria de ácidos nucleicos de 0.52 y 0.30 indicando la presencia de contaminación, probablemente fenol. Es probable que la composición de la pupa, específicamente la quitina, haya disminuido la concentración del ARN extraído ya que se cree que la quitina interfiere en la separación de la fase orgánica y acuosa. Debido a que se obtuvo la concentración más baja

de ARN en pupa, se realizó una extracción de ARN eliminando la interferencia de la quitina al disectar la muestra. Como se observa en los cuadros 9 y 10 luego de la disección se obtuvo menor concentración de ARN, menor razón de pureza y menor pureza secundaria de ácidos nucleicos. Esto probablemente se deba a la degradación del ARN durante la disección y la probable introducción de contaminación durante el proceso, a pesar que este se realizó utilizando materiales estériles y bajo campana de flujo laminar. Las muestras de pupas disectadas fueron descartadas luego del proceso de cuantificación.

Cuadro 9. Concentración de ARN extraído de larvas estadio L3, pupa y adulto *C. capitata*.

Muestra	ng/μl	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
<i>C. capitata</i> larva L3	197.4	1.94	1.25
<i>C. capitata</i> macho Pupa	196.5	1.90	0.64
<i>C. capitata</i> hembra Pupa	164.0	1.74	0.40
<i>C. capitata</i> macho Pupa disectada	39.05	0.66	-3.80
<i>C. capitata</i> hembra Pupa disectada	30.69	0.75	-4.05
<i>C. capitata</i> macho Adulto	467.2	1.170	1.346
<i>C. capitata</i> hembra Adulto	323.2	0.804	0.083

Cuadro 10. Concentraciones y purezas de ARN extraído de larvas de estado L3, pupas (48 horas antes de emerger) y adulto *A. ludens*.

Muestra	ng/μl	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
<i>A. ludens</i> larva L3	288.5	1.64	0.37
<i>A. ludens</i> hembra Pupa	61.0	1.62	0.22
<i>A. ludens</i> hembra Pupa disectada	42 - 56	0.91	0.30
<i>A. ludens</i> macho Adulto	62.2	0.156	0.62
<i>A. ludens</i> hembra Adulto	550	1.368	1.125

En la Figura 26 se presentan resultados inconsistentes de ARN libre de ADN genómico con el tratamiento de DNasas es posible que esto se deba a una mayor presencia de ADN genómico contaminante en la muestra. No se recomienda tratar la muestra dos veces ya que este tratamiento causa que parte el ARN se degrade. Debido a lo anterior se utilizaron muestras libres de ADN genómico, tratados una única vez con DNasas, para sintetizar ADNc con éxito. Fue posible comprobar que el ARN tratado se encontraba libre de ADN genómico al realizar un PCR con oligos de actina, gen expresado de forma constitutiva (Taracena *et al.*, 2015). Se observa en las figuras 24, 25 y 27 que el PCR de ARN no presenta producto de amplificación, mientras que se observa un producto de amplificación del fragmento de actina (154pb) para el ADNc sintetizado.

Figura 24. Producción de ADNc libre de contaminación con ADN a partir de larvas de *A. ludens* y *C. capitata*.

Productos de PCR de actina amplificados a partir de ADNc y ARN de larva estadio L3 hembra y macho de *C. capitata* y *A. ludens* tratado con DNasa. Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 20 V/cm por 30min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con bromuro de etidio a 300nm.

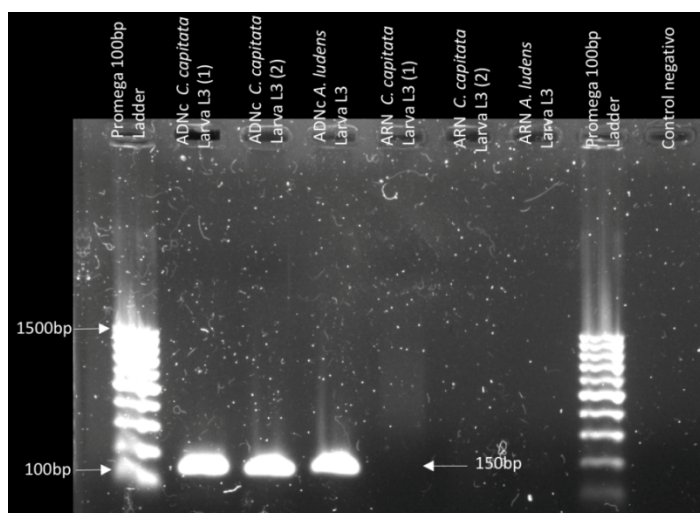


Figura 25. Contaminación de ARN con ADN al extraer ARN de pupas hebras *A. ludens* y *C. capitata*

Productos de PCR de actina amplificados a partir de ADNc y ARN de pupa e *C. capitata* (Amarillo) y *A. ludens* (Azul) tratado con DNasa. Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 20 V/cm por 30min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con bromuro de etidio a 300nm

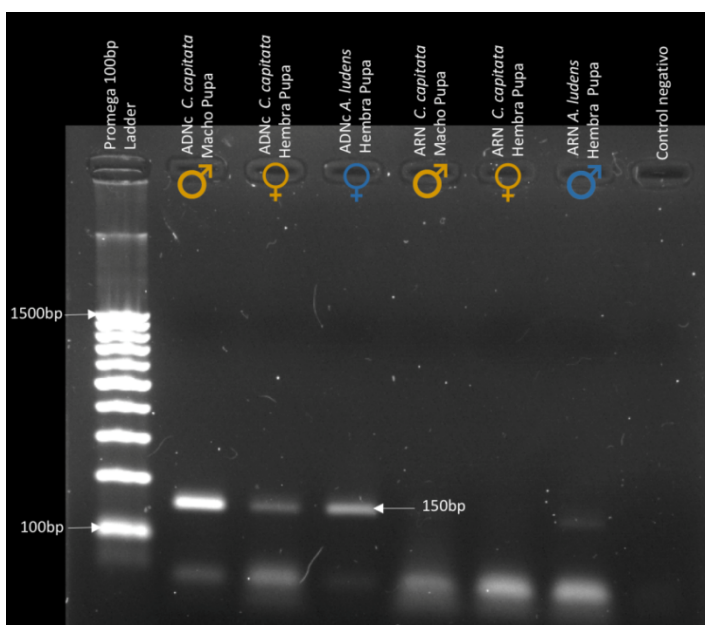


Figura 26. Tratamiento con DNasa de ARN de adultos de *C. capitata* y *A. ludens* produce resultados inconsistentes de ARN libre de ADN genómico

Productos de PCR de actina amplificados a partir de ARN de adulto de *C. capitata* (Amarillo) y *A. ludens* (Azul) tratado con DNasa. Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 20 V/cm por 30min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con bromuro de etidio a 300nm

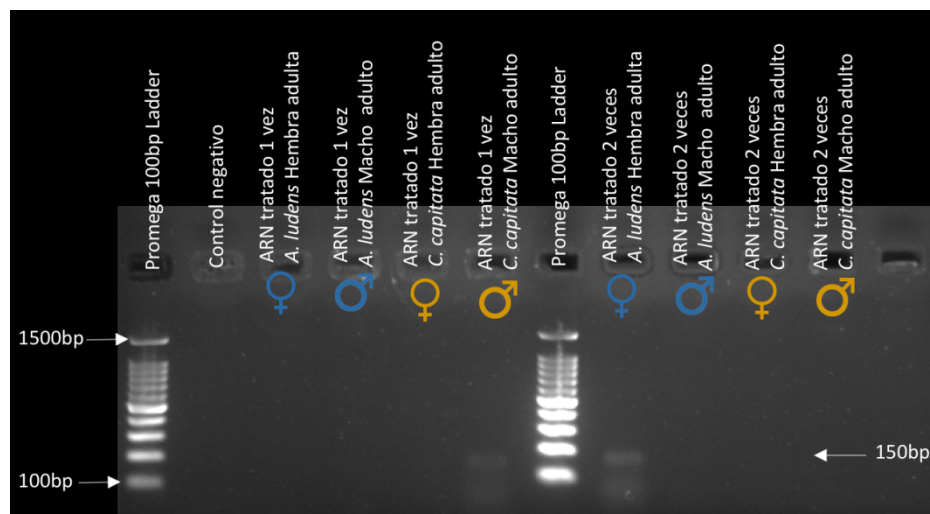
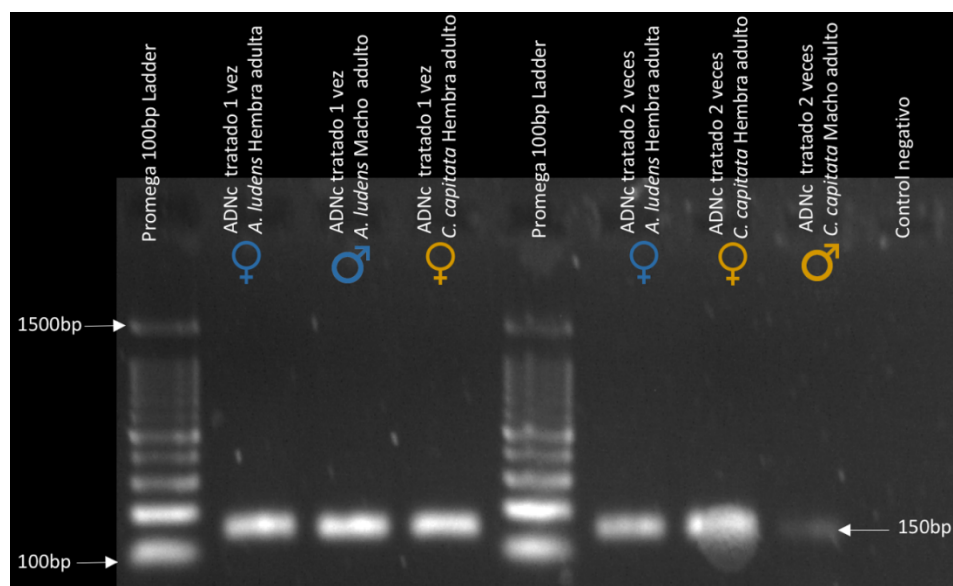


Figura 27. Síntesis exitosa de ADNc de adulto de *C. capitata*.

Productos de PCR de actina amplificados a partir de ADNc obtenido de adulto de *C. capitata* (Amarillo) y *A. ludens* (Azul). Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 20 V/cm por 30min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con bromuro de etidio a 300nm



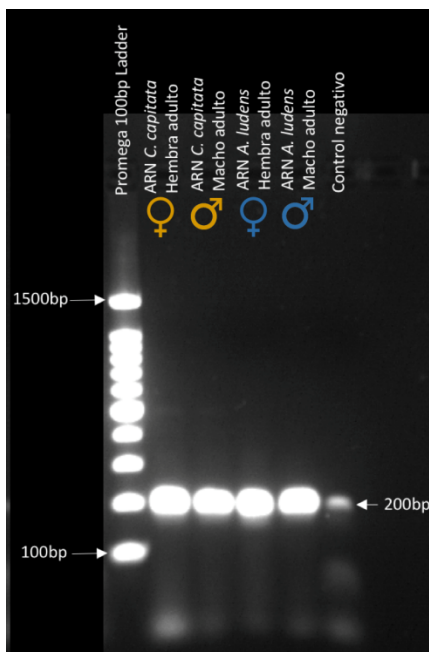
Como se observa en la Figura 28, luego de realizar un PCR con oligos de actina del ARN tratado con DNasas es posible observar que existe un producto de amplificación de aproximadamente 200pb en todas las muestras incluyendo el control negativo, además de que se observa un barrido en la parte inferior de todas las muestras. Esto es un indicio que el ambiente se encontraba contaminado con aerosoles, probablemente aerosoles de productos de PCR realizados anteriormente (Cuadro 11). Para evitar la contaminación de las muestras, se procedió a implementar un flujo de trabajo unidireccional durante el proceso de extracción de ARN y síntesis de ADNc (ver diagramas en Anexos, figura 81 - 83). La implementación de este flujo de trabajo permitió disminuir la contaminación de ADN genómico en el ARN extraído debido a que se delimitaron áreas de trabajo, materiales y equipos utilizados. Los laboratorios se separaron según el equipo disponible en cada uno: El Laboratorio del Departamento de Bioquímica y Microbiología (LBQM) se utilizó para el trabajo con ARN y ADNc, el Laboratorio del Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) se utilizó para la realización de PCR y el trabajo con geles de agarosa. Todo el equipo y materiales que no entraron en contacto con la plantilla (ARN / ADNc) se le denominó “limpio” mientras que el que entró en contacto con la plantilla (ARN / ADNc) se le denominó “sucio”.

Las extracciones de ARN se realizaron dentro de una campana de extracción “sucias” tratada previamente con cloro al 10% para eliminar ácidos nucleicos, con etanol al 70% para esterilizar y con RNaseZap para eliminar ARNasas. Las centrifugaciones necesarias se realizaron en una centrifuga fría de tubos de 1.5ml. El Master Mix para el tratamiento con DNasa se realizó en una campana de flujo laminar “limpia” y la plantilla de ARN se agregó en una campana de extracción “sucias”. La reacción se colocó en el termociclador “sucio” en el LBQM. El ARN tratado se analizó por PCR con oligos de actina para determinar la presencia de ADN genómico. El Master Mix se realizó en una campana de flujo laminar “limpia” y se colocó la plantilla de ARN en una campana de extracción “sucias”. La reacción se realizó en un termociclador “limpio” del CEB. El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1.5% y se almacenó a 4°C en el CEB. Por último, el ARN extraído fue cuantificado en Nanodrop y preservado a -80°C.

El Mastermix para la síntesis de ADNc se realizó en el LBQM en una campana de flujo laminar “limpia” y la plantilla (ARN) se agregó en una campana de extracción “sucias”. La reacción se colocó en un termociclador “sucio” para su conversión (ARN a ADNc). El ADNc se analizó por PCR con oligos de actina para comprobar su síntesis. El Master Mix se realizó en una campana de flujo laminar “limpia” y se colocó la plantilla (ADNc) en una campana de flujo laminar “sucias”. La reacción se realizó en un termociclador “limpio” del CEB. El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1.5% y se almacenó a 4°C en el CEB. Por último, el ADNc se preservó a -80°C en una caja separada al ARN.

Figura 28. ARN extraído contaminado con aerosoles ambientales

Productos de PCR de actina amplificados a partir de ARN obtenido de adultos de *C. capitata* (Amarillo) y *A. ludens* (Azul). Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 20 V/cm por 30min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con bromuro de etidio a 300nm



Cuadro 11. Problemas y soluciones enfrentados durante la extracción de ARN.

Problema	Descripción	Solución del problema
ARN extraído contaminado con ADN	Luego de realizar PCR de actina se observa que el ARN posee ADN contaminante	Implementar un flujo de trabajo para extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN extraído de *C. capitata* y *A. ludens* adultos machos y hembras se utilizó para generar productos del gen *Cctra*, *Cctra-2* y *Altra* utilizando los oligos diseñados, ver Cuadro 12. Estos oligos cumplen con las recomendaciones de tamaño, GC clamp, ΔG de hairpins, ΔG homodimers y ΔG heterodimers (Farrel, 2005; Promega, 2013; Ye *et al.*, 2012). Además, a todos los oligos Forward (F) se les añadió el promotor T7 en los extremos 5', para permitir la inducción de la transcripción de ARNdh.

Los oligos de *C. capitata* se diseñaron dentro de secuencias de proteínas conservadas entre *C. capitata* (GenBank: AF434936.1) y *A. suspensa* (GenBank: JN597286.1) del gen *transformer-2* y para la variante femenina del gen *transformer*, ver figuras 29 a 32. Este diseño aumenta la probabilidad de obtener un

producto de amplificación debido a que es poco probable que ocurra una mutación en estas regiones. Solamente fue posible diseñar dos juegos de oligos para el gen *Cetra* entre intrones, *Cetra* (A) y *Cetra* (B); estos permiten determinar si el ADNc se encuentra contaminado con ADN genómico (Hurteau & Spivack, 2002; Ye *et al.*, 2012). Debido a que no existe suficiente información de secuencias de *A. ludens*, no fue posible establecer las áreas conservadas del gen *transformer* en *A. ludens*. Por lo anterior los oligos se diseñaron siguiendo los lineamientos descritos anteriormente, Figura 33.

Cuadro 12. Condiciones de oligos diseñados para PCR convencional del gen *transformer* y *transformer-2* de *C. capitata* y *transformer* de *Anatrepha ludens*

Pareja	T _m (°C)	%GC	ΔG (Kcal/mol) Homodímeros más bajo	ΔG (Kcal/mol) Heterodímeros más bajos	MM producto (pb)
<i>Ceratitis capitata</i> (gen <i>transformer</i>)					
Cetra (A)	58.6	40.9	-4.95	-3.61	252
	58.8	47.4	-3.61		396 Contaminación con ADN genómico
Cetra (B)	58.6	40.9	-4.95	-6.75	379
	60.6	52.6	-6.75		524 Contaminación con ADN genómico
Cetra (C)	58.8	47.4	-3.61	-7.31	165
	60.6	52.6	-6.75		
Cetra (D)	58.5	42.9	0.52	-4.95	263
	58.6	40.9	-0.11		
<i>Ceratitis capitata</i> (gen <i>transformer-2</i>)					
Cetra-2 (A)	60.2	42.9	-3.9	-6.3	354
	59.8	47.6	-6.3		

Continuación Cuadro 12. Condiciones de oligos diseñados para PCR convencional del gen *transformer* y *transformer-2* de *C. capitata* y *transformer* de *Anastrepha ludens*

Pareja	T _m (°C)	%GC	ΔG (Kcal/mol) Homodímeros más bajo	ΔG (Kcal/mol) Heterodímeros más bajos	MM producto (pb)
Cctra-2 (B)	62.9	52.4	-3.55	-5.02	400
	62.2	52.4	-5.02		
<i>Anastrepha ludens</i> (gen <i>transformer</i>)					
Altra (A)	56.4	31.8	-6.3	-5.36	352
	58.3	42.9	-6.77		
Altra (B)	60.5	45.5	-6.76	-5.12	492
	60	42.9	-5.13		

Como se observa en la Figura 34 se realizó un PCR touchdown para ADNc que permitió obtener un producto de amplificación para cada juego de oligos diseñados en este estudio para los genes *Cctra*, *Cctra-2* y *Altra*. El PCR realizado con muestras de ADNc obtenido de *C. capitata* macho o hembra, con los juegos de oligos Cctra (A), Cctra (B) y Cctra (C) permitió visualizar la presencia de productos de amplificación del tamaño esperado. Estos productos se observaron tanto en muestras de macho como de hembra, aun cuando los oligos se diseñaron únicamente para la variante femenina del gen *Cctra* (ver alineamiento de figuras 29 a 30 basado en secuencias publicadas en GenBank).

La amplificación tanto en machos como en hembras indica que estos fragmentos se expresan en ambos sexos, es posible que se haya observado amplificación ya que esta región puede pertenecer a una variante masculina no descrita (M3). Los resultados obtenidos de PCR son confiables ya que el control negativo de cada juego de oligos no presentó ningún producto de amplificación.

Los resultados de PCR touchdown de ADNc, obtenido de *C. capitata* macho o hembra, Figura 34 (identificados de color azul), muestran que dos juegos de oligos diseñados para el gen *Cctra* [Cctra (A) y Cctra (B)] amplifican la región deseada. Para estos juegos se observó un producto de amplificación en

hembras y dos productos de amplificación en machos (Figura 34). Los dos productos de amplificación en machos, luego de eliminar contaminación de ADN genómico, sugieren que en machos ocurre una variación en el número de copias (CVN) de este gen. Esta CVN al incorporar un intrón podría ser la causa de la transcripción de la proteína TRA no funcional en machos. Se ha observado que una CVN puede provocar una variación estructural que se desencadene un cambio en el fenotipo. En *Drosophila melanogaster* se han observado varias CVN (Zhou, Lemos, Dopman, & Hartl, 2011), en específico que la duplicación del gen *Bar* afecta el campo de visión de estas moscas (Bridges, 1939). Debido a lo anterior se recomienda realizar más estudios acerca de esta posible CVN realizando un q-PCR de cuantificación relativa utilizando Taqman.

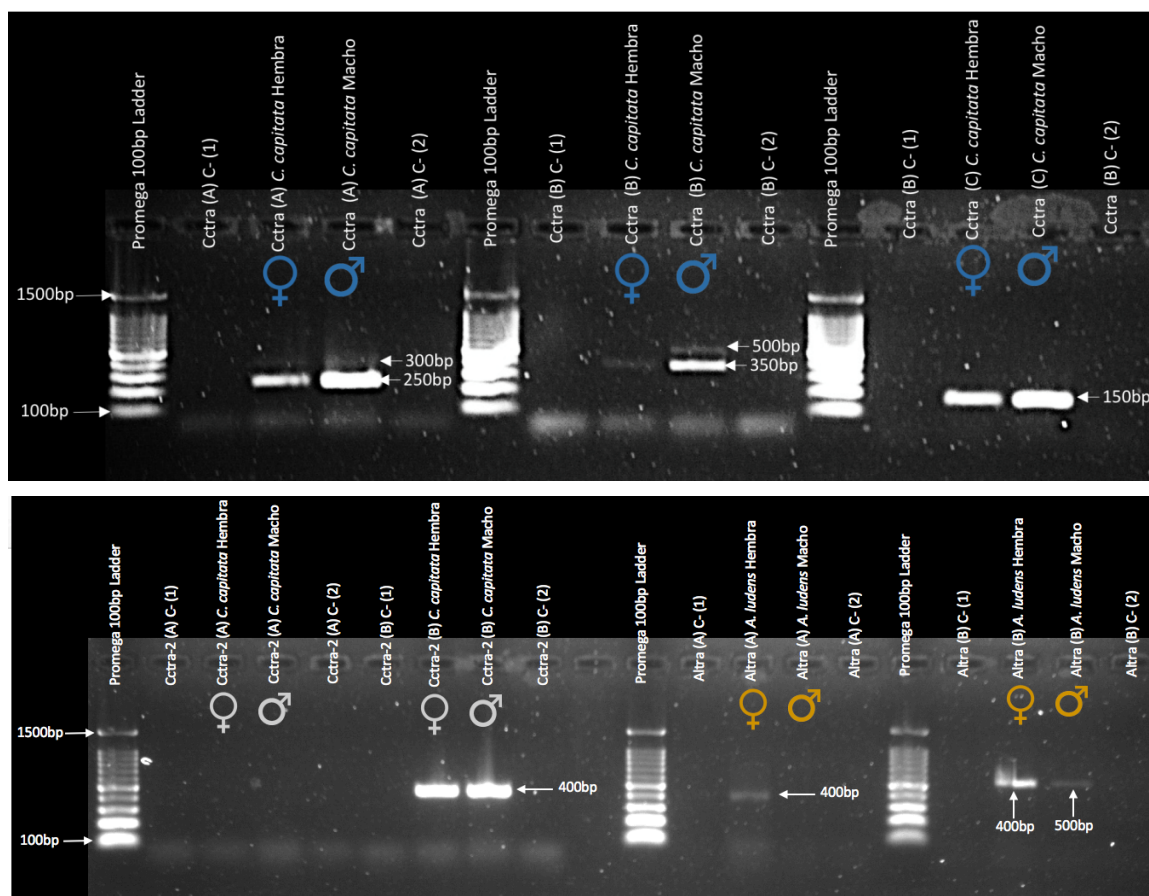
Para el juego de oligos Cctra (C) se obtuvo un producto de amplificación en hembras y en machos de 150bp que concuerda con el producto de amplificación esperado (165pb), Cuadro 12. Debido a que este juego de oligos no se diseñó entre intrones no es posible determinar si este fragmento al igual que los amplificados anteriormente posee una CVN.

Por otro lado, la Figura 29 (identificados de color gris), muestra que luego de un PCR touchdown de ADNc, obtenido de *C. capitata* macho o hembra, muestran que un juego de oligo diseñados para el gen *Cctra-2*, Cctra (B), producen un producto de amplificación (400pb) cercano al tamaño esperado de 450pb, en ambos sexos. Este resultado era lo esperado ya que la literatura reporta que el gen *Cctra-2* es determinante para el desarrollo sexual tanto en hembras como machos (Salvemini *et al.*, 2009). No se observó producto de amplificación utilizando el juego de oligos Cctra-2 (A). Por lo anterior, se recomienda realizar pruebas de optimización de PCR.

Se realizó un PCR con muestras de ADNc de *A. ludens* macho o hembra utilizando los oligos Altra (A) y Altra (B). En la Figura 29 (identificado de color anaranjado) se observa que para ambos juegos de oligos se obtuvo un producto del tamaño deseado, 352pb 492pb, respectivamente. El juego de oligos Altra (A) presentó un único producto de amplificación en ADNc de hembra con un tamaño de 400pb, esto sugiere que dicho fragmento se encuentra en un área codificante específica de hembras o bien, en un área que ocurre “splicing” alternativo en el fragmento de ADNc de machos. Mientras el juego de oligos Altra (B) presentó productos de amplificación tanto en macho como en hembra de aproximadamente 500pb. Lo anterior indica que este fragmento se encuentra en machos y hembras de *A. ludens*. Es importante mencionar que se observa una mayor integridad, definición e intensidad del producto de amplificación de hembra, indicando que los productos de PCR se encuentran en una alta concentración. Se esperaba observar la presencia de ADNc del gen *transformer* de *A. ludens* en macho y hembra. Según la literatura, en Tefritidos este gen se expresa tanto en hembras como en machos bajo las mismas condiciones cambiando únicamente la traducción de su proteína. Traduciendo para machos una proteína no funcional, mientras que para hembras una proteína funcional (Ruiz *et al.*, 2007). Los pozos correspondientes a los controles negativos para ambos juegos de oligos, no presentaron ninguna banda, por lo cual se establece que los resultados son confiables.

Figura 29. Presencia de productos de amplificación obtenidos en hembra y macho adultos de *C. capitata* y *A. ludens* con oligos diseñados para PCR convencional

Productos de PCR Touchdown del gen *transformer* y *transformer-2* a partir de ADNc de adulto de *C. capitata* y *Anastrepha ludens* para PCR convencional. Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 5.5 V/cm por 30min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con bromuro de etidio a 300nm



Los productos obtenidos del PCR touchdown de los genes *Cctra*, *Cctra-2* y *Altra* en muestras de *C. capitata* hembra y *A. ludens* hembra se ligaron al plásmido comercial pGEM-T. Es importante mencionar que, aunque el inserto del gen *transformer* producido por los oligos diseñados se exprese tanto en hembras como en machos, ver Figura 29, su silenciamiento no debería de afectar el fenotipo del macho, dado que este produce una proteína TRA no funcional (Gabrieli *et al.*, 2010; Rideout *et al.*, 2007; Salvemini *et al.*, 2009; Verhulst *et al.*, 2010).

Los productos de ligación mencionados anteriormente, se utilizaron para transformar las células competentes *E. coli* XL1-BLUE en placas de LB suplementadas con Tetraciclina (50µg/ml), Carbenicilina (60µg/ml), IPTG (0.8M) y X-Gal (2%). La selección de las colonias se realizó utilizando la técnica de tamizaje azul-blanco que permite elegir las colonias transformadas con el producto de ligación (colonias blancas) (Novagen, 2004; Lisa Timmons *et al.*, 2001). Con este tamizaje fue posible observar que con el gen

Cetra-2 se obtuvo mayormente clones blancos mientras que con el gen *Cetra* y *Altra* presentaron una mayor proporción de clones celestes y azules que blancos, figuras 30 - 32 y cuadros 13 y 14. Es posible que lo anterior se deba a que se realizó la ligación con el producto de PCR sin purificar permitiendo que el plásmido incorpore “primer-dimers” y otros productos secundarios de la reacción. También es un indicador que el fragmento se encuentra en el plásmido pero no interrumpiendo el operón de lactosa o bien que el plásmido se re circularizó sin el fragmento (Brown, 2010) o que algunos insertos producidos por los juegos de oligos [*Cetra* (B) y *Cetra* (C)] son múltiplo de tres la colonia tome un color celeste debido a que la secuencia no contiene codones stop en el ORF (Promega, 2010b).

Figura 30. Clones *E. coli* XL1-BLUE obtenidos de la transformación con pGEM-T ligado al producto de PCR Touchdown del gen *transformer* de *C. capitata* hembra.

Clones *E. coli* XL1-BLUE reaislados de transformación original en placas de LB suplementadas con Tet (50µg/ml) + Carb (60µg/ml) + IPTG (0.8M) + X-Gal (2%). A. Clones obtenidos con el juego de oligos *Cetra* (A) por medio de PCR. B. Clones obtenidos con el juego de oligos *Cetra* (B) por medio de PCR. C. Clones obtenidos con el juego de oligos *Cetra* (C) por medio de PCR.

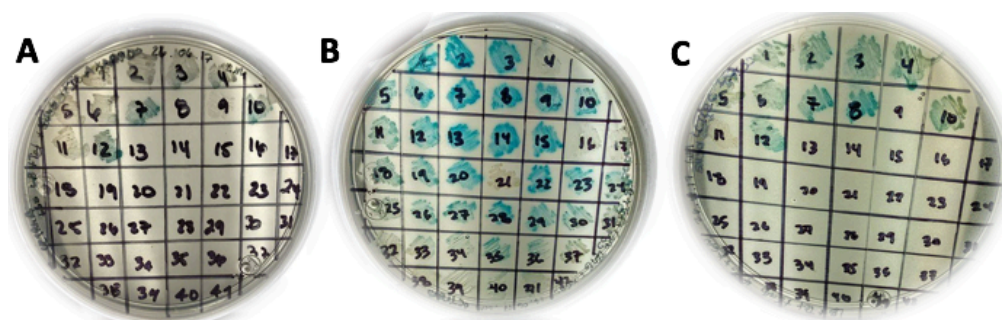
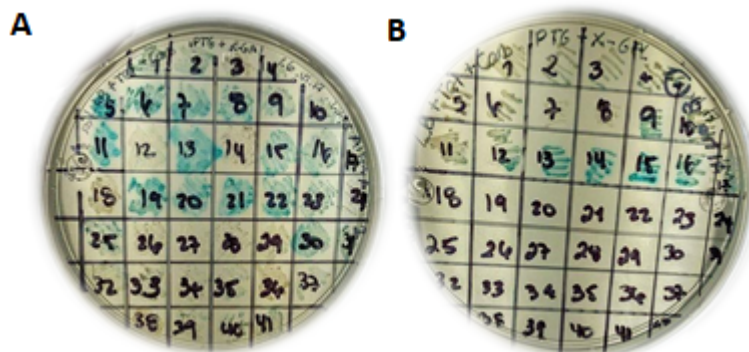


Figura 31. Clones *E. coli* XL1-BLUE obtenidos de la transformación con pGEM-T ligado al producto de PCR Touchdown del gen *transformer-2* de *C. capitata* hembra.

Clones *E. coli* XL1-BLUE reaislados de transformación original en placas de LB suplementadas con Tet (50µg/ml) + Carb (60µg/ml) + IPTG (0.8M) + X-Gal (2%). A. Clones obtenidos con el juego de oligos *Cetra-2* (B) por medio de PCR.



Figura 32. Clones *E. coli* XL1-BLUE obtenidos de la transformación con pGEM-T ligado al producto de PCR Touchdown del gen *transformer* de *A. ludens* hembra.



Cuadro 13. Mayor proporción de clones celestes obtenidos luego de la transformación con el plásmido ligado.

Proporción de fenotipos de clones de *E. coli* XL1-BLUE obtenidos luego de transformar con pGEM-T ligado con producto de PCR Touchdown en placas de LB suplementadas con Tet (50µg/ml) + Carb (60µg/ml) + IPTG (0.8M) + X-Gal (2%). El número entre paréntesis muestra el número de colonias obtenidas con ese fenotipo, el porcentaje representa el porcentaje de colonias que poseían ese fenotipo.

Color de colonia	C+	Cctra A	Cctra B	Cctra C	Cctra-2 B
Blanca	18.1% (13)	9.1% (1)	16.6% (7)	9.1% (1)	92.9% (39)
Celeste	58.3% (42)	72.7% (8)	45.2% (19)	81.8% (9)	4.8% (2)
Azul	23.6% (17)	18% (2)	38.1% (16)	9.1% (1)	2.38% (1)
Total de colonias en placa	72	11	42	11	42

Cuadro 14. Problemas y soluciones enfrentados durante la transformación de *E. coli* XL1-BLUE.

Problema	Descripción	Solución del problema
Mayor proporción de colonias no transformadas según tamizaje azul-blanco	Se obtuvo una mayor proporción de colonias celestes y azules que colonias blancas.	Se tamizaron colonias de distintos fenotipos para evaluar la presencia del inserto de interés.

Para realizar la identificación de los clones que presentan verdaderamente el plásmido con el inserto del gen de interés (*Cctra*, *Cctra-2* y *Altra*), se realizó un tamizaje comparando el tamaño del plásmido de cada clon con los controles (pGEM-T sin inserto y con inserto: colonia blanca), ver figuras 33 - 35. Debido a que se obtuvo una gran cantidad de clones con distintos fenotipos, se le asignó a cada uno un código que consta de dos partes: Nombre del juego de oligos utilizados para producir el inserto del plásmido y un número correlativo de colonia.

Por medio del tamizaje azul-blanco se eligieron 66 clones *Cctra*, 42 clones del gen *Cctra-2* y 51 clones *Altra*, figuras 34 a 35. De estos se eligieron 20 clones del gen *Cctra* [*Cctra* (A) col. 9 a 12; *Cctra* (B) col. 8, 10, 21, 23, 26, 28, 29, 31, 33, 35, 38, 40; y *Cctra* (C) col. 5, 6, 11, 12] figura 33, 10 clones del gen *Cctra-2* [*Cctra-2* (B) col. 1, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 23, 36], Figura 34, 8 clones del gen *Altra* [*Altra* (A) col. 3, 14, 18, 34, 35, 38; y *Altra* (B) col. 7, 8], Figura 35. Debido a que no se observa con claridad los dos controles en algunos geles, se procedió a elegir algunos clones de *Cctra* y *Cctra-2*, según el criterio del investigador.

Figura 33. Clones transformados con éxito con el plásmido ligado al gen *tra* de *C. capitata*.

Electroforesis de lisis celular de bacterias *E. coli* XL1-BLUE transformadas con plásmido pGEM-T ligado con el producto de PCR Touchdown del gen *transformer* de *C. capitata*. Los clones transformados con éxito con el plásmido ligado están identificados por una estrella azul. A. Clones Cctra (A); B. Clones Cctra (B); C. Cctra (C). Condiciones: gel de agarosa 0.8% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 3.70 V/cm por 90min. Escalera Promega Ladder 1kb. Visualización con tinción post-corrída con bromuro de etidio a 300nm

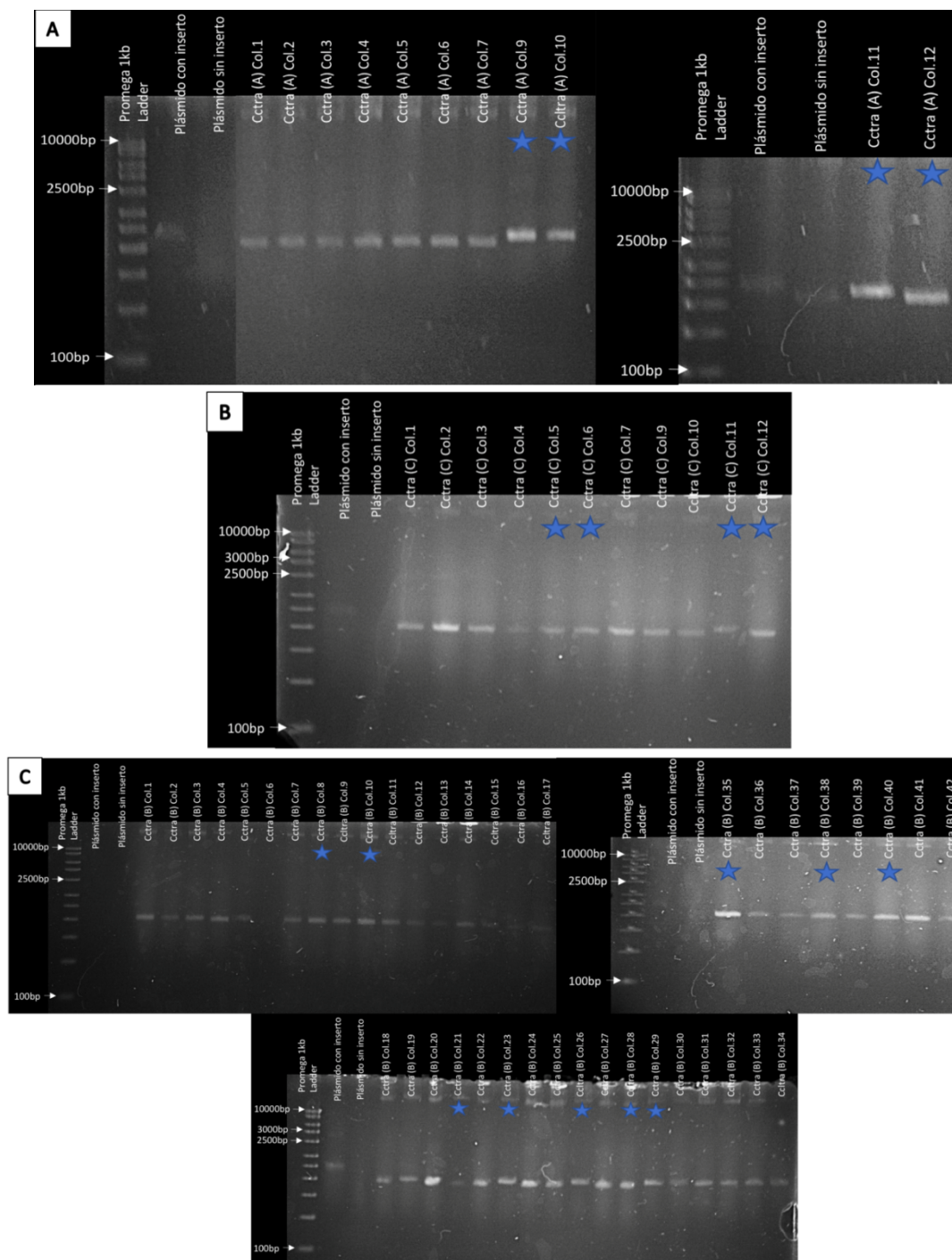


Figura 34. Clones transformados con éxito con el plásmido ligado al gen *tra-2* de *C. capitata*.

Electroforesis de lisis celular de bacterias *E. coli* XL1-BLUE transformadas con plásmido pGEM-T ligado con el producto de PCR Touchdown del gen *transformer-2* de *C. capitata*. Los clones transformados con éxito con el plásmido ligado están identificados por una estrella gris. A. Clones Cctra-2 (B) colonias 1 a la 17; B. Clones Cctra-2 (B) colonias 18 a la 34. C. Clones Cctra-2 (B) colonias 35 a la 42. Condiciones: gel de agarosa 0.8% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 3.70 V/cm por 90min. Escalera Promega Ladder 1kb. Visualización con tinción post-corrída con bromuro de etidio a 300nm

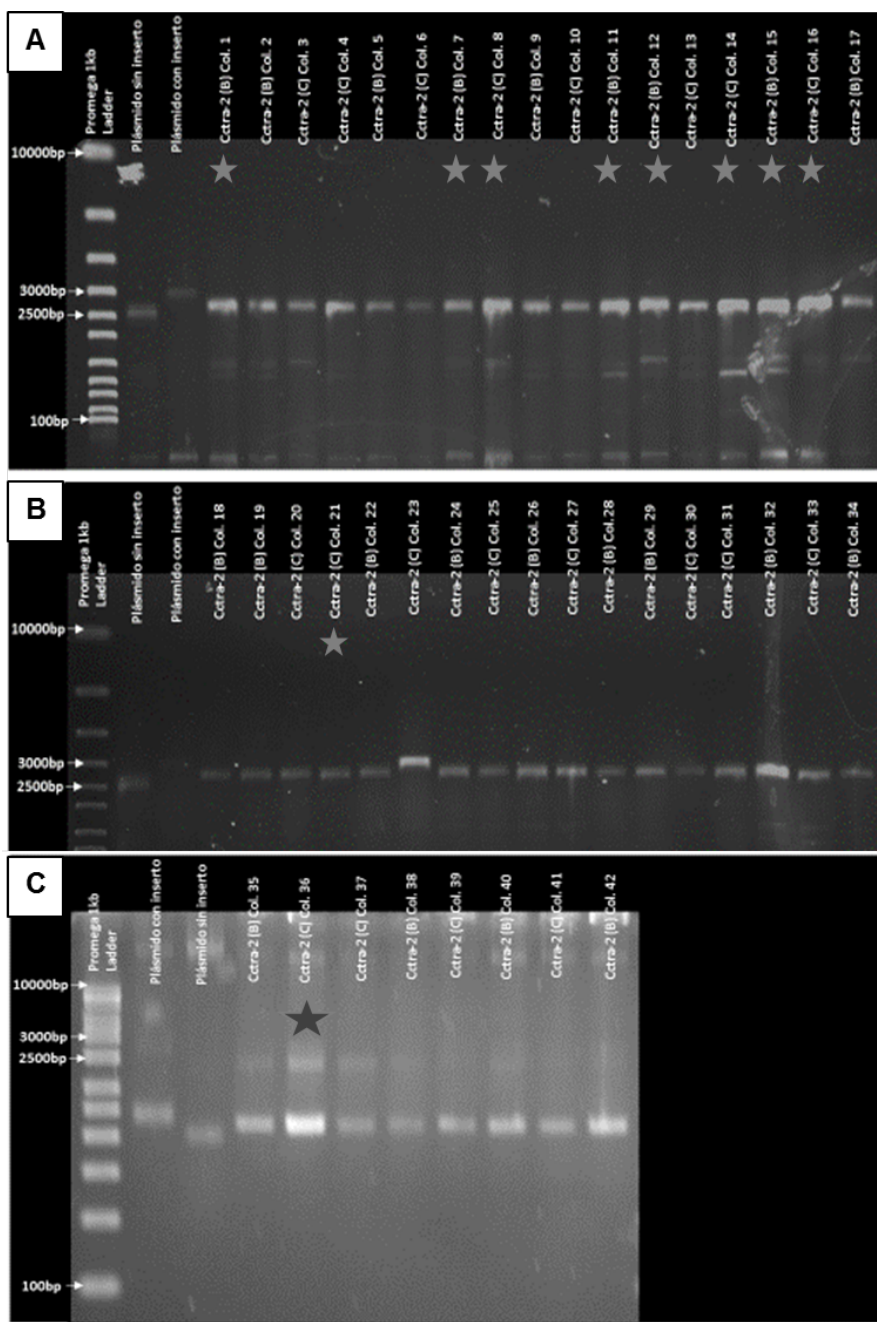
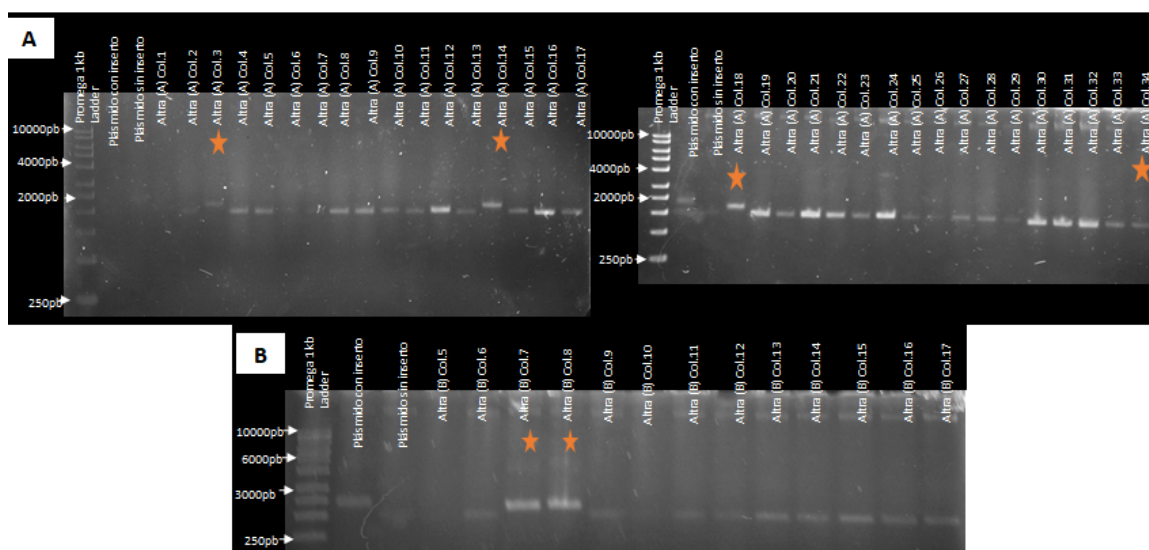


Figura 35. Clones transformados con éxito con el plásmido ligado al gen *tra* de *A. ludens*.

Electroforesis de lisis celular de bacterias *E. coli* XL1-BLUE transformadas con plásmido pGEM-T ligado con el producto de PCR Touchdown del gen *transformer* de *A. ludens*. Los clones transformados con éxito con el plásmido ligado están identificados por una estrella anaranjada. A. Clones Altra (A); B. Clones Altra (B); Condiciones: gel de agarosa 0.8% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 3.70 V/cm por 90min. Escalera Promega Ladder 1kb. Visualización con tinción post-corrída con bromuro de etidio a 300nm



Para determinar cuáles de los clones seleccionados de *Cctra*, *Cctra-2* y *Altra*, poseen el inserto en la orientación deseada (promotor T7 del inserto en dirección contraria al promotor T7 del plásmido), se realizó PCR de colonias (figuras 37 - 39) con el oligo M13R y los oligos R correspondientes a cada inserto, según el caso. Si el inserto se encuentra en la orientación deseada se observará un producto de amplificación, de lo contrario no habrá producto de amplificación. Lo anterior se debe a que el oligo R del inserto actuará como oligo Forward cuando este se encuentre más alejado del oligo M13R; y el oligo R actuará como oligo Reverse cuando este se encuentre en una posición más cercana al oligo M13R.

Para los clones *Cctra*, se observan 4 clones que poseen productos de amplificación cercanos al tamaño esperado y por lo tanto poseen el inserto en la orientación deseada, ver Cuadro 15 y Figura 37. Para *Cctra* (A) col. 10 y 11, se obtuvo un producto de amplificación de 400pb y se esperaba uno de 443pb. Para *Cctra* (B) col. 25 y 26, se obtuvo varios productos de amplificación probablemente causados por contaminación amplificada por el oligo M13R. A pesar de esto, se identificó que uno de los productos de amplificación posee un tamaño cercano al esperado: 611pb, tamaño esperado 570pb (Cuadro 16). Para *Cctra* (C) col. 5 y 6, se obtuvo un producto de amplificación de 646pb y 625pb, respectivamente; cuando se esperaba un producto de amplificación de 356pb (Cuadro 15). Esto indican una duplicación en el inserto, que se puede deber la inserción de dos productos de interés dentro del plásmido en lugar de solamente uno.

Fue posible identificar que 4 clones *Cctra-2* que poseen productos de amplificación cercanos al tamaño esperado, ver Cuadro 15 y Figura 38. Se obtuvo un producto de amplificación de 600pb para el clon *Cctra-2* col.12, se esperaba uno de 606pb. Los clones *Cctra-2* col. 14 y 15 presentaron dos productos de amplificación de 590pb y 625pb, se esperaba un producto de 606pb. El clon *Cctra-2* col. 23 presenta un producto de amplificación de 645pb, cercano al tamaño esperado de 606pb. Debido a que el control negativo presenta un producto de amplificación de 590pb, es probable que el producto de amplificación de 590pb fuera causado por contaminación.

En la Figura 39 se observan que 2 clones *Altra* poseen productos de amplificación cercanos al tamaño esperado (*Altra* col. 3 y 14) y por lo tanto poseen el inserto en la orientación deseada. Para *Altra* (A) col. 3 y 14, se obtuvo un producto de amplificación de 583pb y 534pb, respectivamente, se esperaba un producto de 563pb (Cuadro 16). Para los clones obtenidos con el juego de oligos *Altra* (B) col. 7 y 8, presentaron un producto de amplificación menor, 550pb, al esperado de 703pb (Cuadro 15). Lo anterior indica que el fragmento ha perdido bases en un área no definida del proceso, por lo cual fueron descartados del proceso experimental. Tanto el control negativo dos del juego de oligos *Altra* (A), pozo 8, como el control negativo uno del juego de oligos *Altra* (B), pozo 9, presentaron un producto de amplificación indicando que existe contaminación. Esta pudo ser introducida durante el proceso de preparación de la reacción de PCR o durante el proceso de cargado del gel. Por lo anterior se recomienda realizar nuevamente el PCR de colonias y el gel para establecer que los resultados obtenidos son confiables.

Cuadro 15. Tamaño de productos de amplificación esperados para los juegos de oligos utilizados

Juego de oligos utilizada	Tamaño de inserto gen (bp)	Tamaño de producto de PCR con oligo M13R (pb)
Cctra (A)	252	443
Cctra (B)	379	570
Cctra (C)	165	356
Cctra_2 (B)	420	606
Altra (A)	372	563
Altra (B)	512	703

Figura 36. Ubicación del fragmento de interés en la orientación adecuada para la producción de ARNdH (delimitado por los promotores T7)

Este diagrama representa la orientación deseada del fragmento de interés dentro del plásmido. La región en rojo corresponde al fragmento del gen de interés perteneciente a los genes *tra* de *C. capitata*, *tra-2* de *C. capitata* o *tra* de *A. ludens*. La región azul representa la localización del oligo M13R que se utilizó para realizar el PCR de colonias. El oligo R representa al oligo reverse utilizado para crear el fragmento del gen de interés, este oligo también se utilizó para realizar el PCR de colonias. Las regiones verdes representan la localización de los promotores T7 (codificado por el plásmido y codificado por el fragmento de interés).

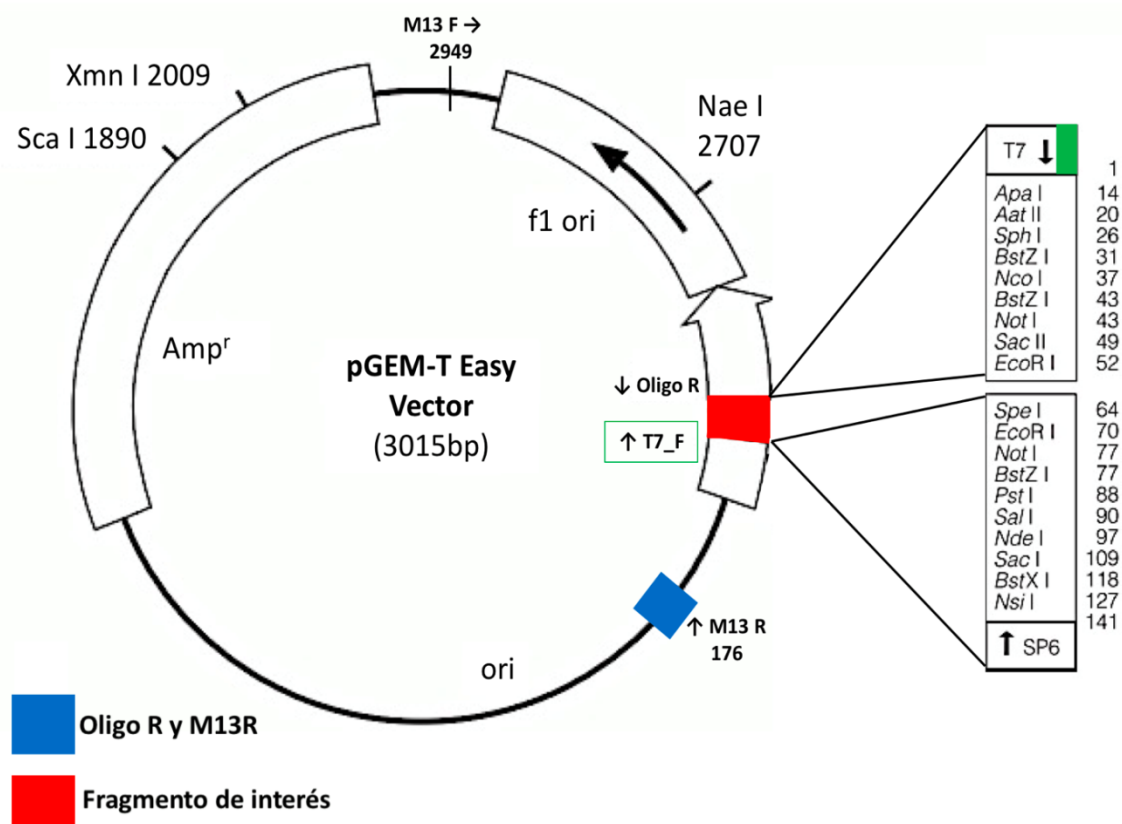


Figura 37. Presencia del inserto en la orientación deseada en clones seleccionados correspondientes al gen *tra* de *C. capitata*

Productos de PCR de colonias con plásmido pGEM-T ligado al gen *transformer* de *C. capitata* hembra utilizando el oligo M13R y el oligo R del gen *transformer* utilizado para cada ligación. Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 3.70 V/cm por 90min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con bromuro de etidio a 300nm

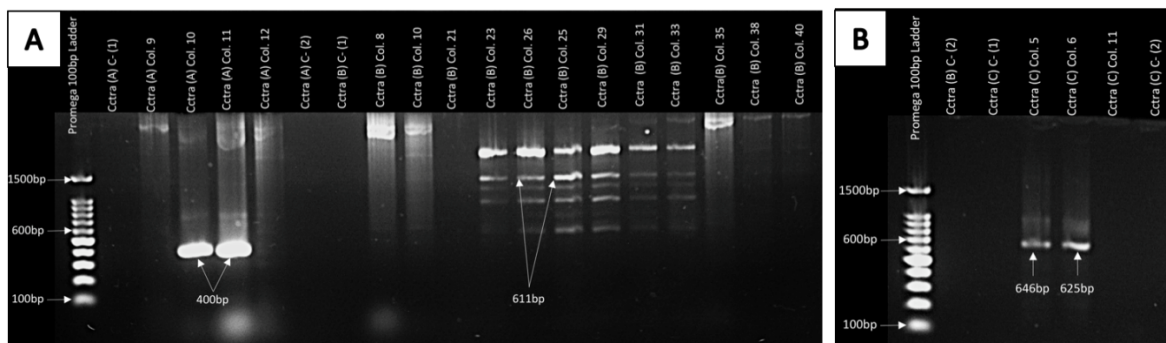


Figura 38. Presencia del inserto en la orientación deseada en clones seleccionados correspondientes al gen *tra-2* de *C. capitata*

Productos de PCR de colonias con plásmido pGEM-T ligado al gen *transformer-2* de *C. capitata* hembra utilizando el oligo M13R y el oligo R del gen *transformer-2* utilizado para cada ligación. Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 3.70 V/cm por 90min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con bromuro de etidio a 300nm

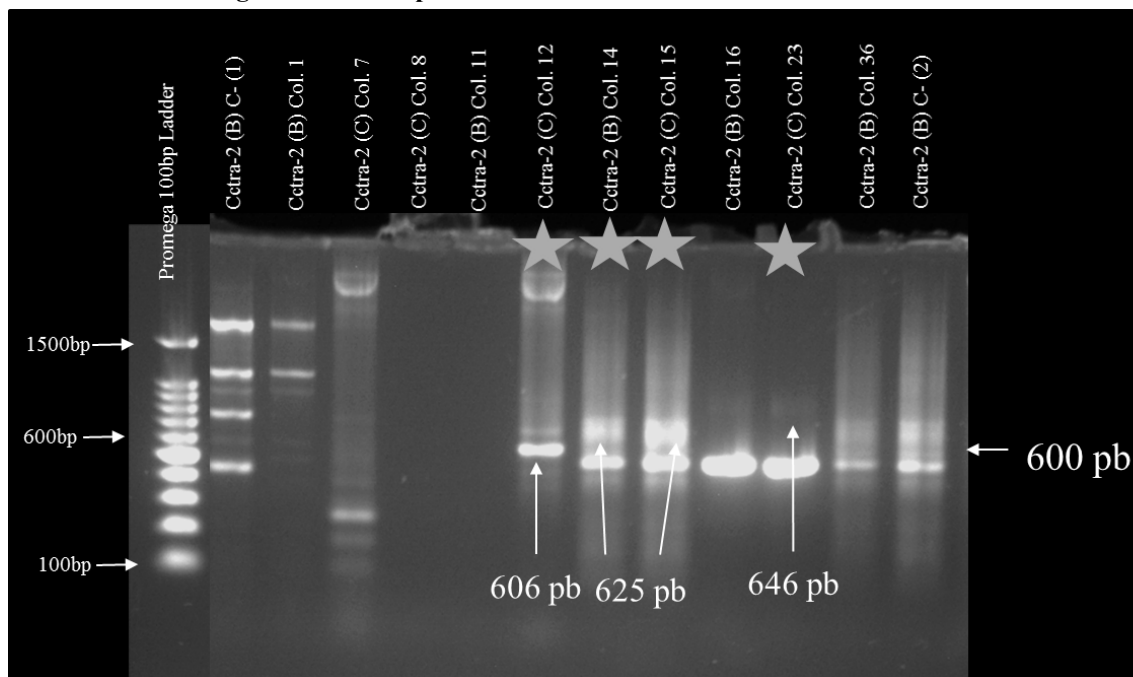
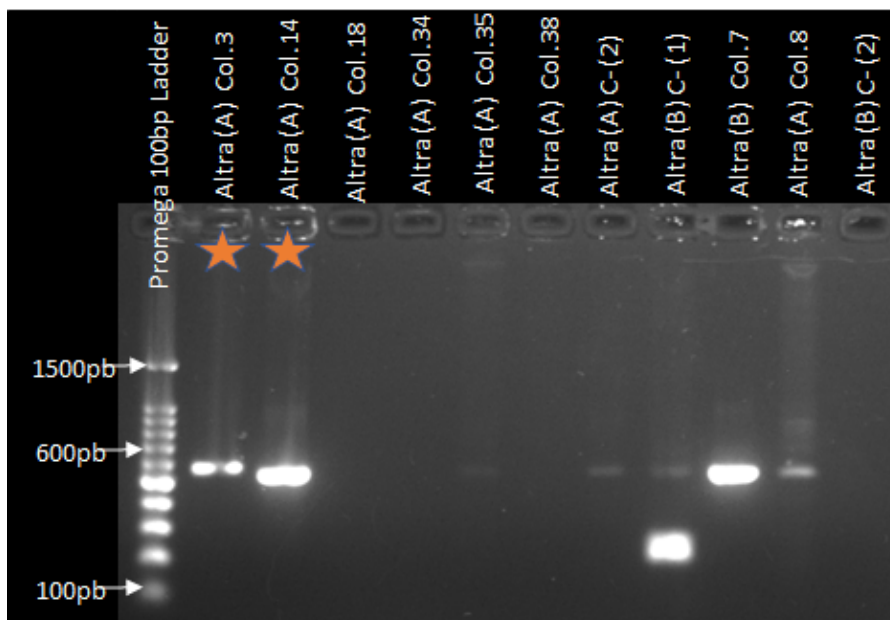


Figura 39. Presencia del inserto en la orientación deseada en clones seleccionados correspondientes al gen *tra* de *A. ludens*.

Productos de PCR de colonias con plásmido pGEM-T ligado al gen *transformer* de *A. ludens* hembra utilizando el oligo M13R y el oligo R del gen *transformer* utilizado para cada ligación. Los clones transformados que podrían tener el inserto en orientación adecuada están identificados por una estrella anaranjada. Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 3.70 V/cm por 90min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con bromuro de etidio a 300nm



Se procedió a purificar el plásmido de los clones *Cetra*, *Cetra-2* y *Altra*, que poseían un producto de amplificación del tamaño esperado. Para la purificación se utilizó un cultivo overnight suplementado con Tet 50 μ g/ml y Carb 60 μ g/ml. Se observó que, no importando la cantidad de cultivo overnight utilizado, se obtenía una concentración de plásmido menor a 100ng/ μ l, ver Cuadro 16. La baja concentración de plásmido obtenida se atribuye al uso de una mayor concentración de Tet (50 μ g/ml) de la recomendada para *E. coli* XL1-BLUE (12.5 μ g/ml). Este error se cometió debido a que se creía que la resistencia en *E. coli* XL1-BLUE era causada por un plásmido de control restrictivo, cuando en realidad la resistencia se encuentra dentro del cromosoma (Novagen, 2004; Lisa Timmons *et al.*, 2001). Esto indujo la formación de biofilm. El biofilm impidió lisar todas las células disminuyendo el número de plásmido purificado. Además, su consistencia gomosa impidió la formación de pellet, dificultando la obtención del sobrenadante con el plásmido purificado, ver Cuadro 17.

Cuadro 16. Bajas concentraciones de plásmido ligado obtenido de los clones seleccionados de los genes *Cetra*, *Cetra-2* y *Altra*, suplementado con Tet (50µg/ml) + Carb (60µg/ml). Parámetros de calidad de plásmido extraído de colonias en LB líquido suplementado con Tet (50µg/ml) + Carb (60µg/ml)

Muestra	ng/µl	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
Cetra (A) col. 10	7.7	1.78	0.84
	7.8	1.58	0.82
Cetra (A) col. 11	10.2	1.63	0.92
	10	1.65	0.89
Cetra (B) col. 25	19.2	1.64	1.05
	18.9	1.76	1.06
Cetra (B) col. 26	3.2	1.31	0.97
	2.7	1.84	0.98
Cetra-2 (B) col. 12	12.4	1.55	0.81
	12.8	1.58	0.89
Cetra-2 (B) col. 14	6.3	1.42	0.72
	5.2	1.6	0.72
Cetra-2 (B) col. 15	2.1	1.3	0.36
	1.5	1.38	0.28
Cetra-2 (B) col. 23	9.1	1.56	1.08
	8.9	1.66	1.06

Continuación Cuadro 16. Bajas concentraciones de plásmido ligado obtenido de los clones seleccionados de los genes *Cctra*, *Cctra-2* y *Altra*, suplementado con Tet (50µg/ml) + Carb (60µg/ml).

Muestra	ng/µl	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
Altra (A) col. 3	3.70	1.76	-4.89
	3.71		
Altra (A) col. 14	1.68	1.84	5.40
	1.65		

Cuadro 17. Problemas y soluciones enfrentados durante la extracción del plásmido correspondiente a cada gen de ambas especies

Problema	Descripción	Solución del problema
Baja concentración de plásmido extraído	Se obtiene una concentración de plásmido menor a 100ng/µl.	Disminuir la concentración de Tetraciclina en el medio de 50µg/ml a 12.5µg/ml.
	Luego de agregar el buffer de lisis se forma un pellet con consistencia gomosa.	Utilizar menor concentración de medio de cultivo (8ml) para disminuir la formación de biofilm.

Por lo anterior, se reformuló el medio con las concentraciones finales de antibiótico, a fin de reaislar los clones seleccionados con placas de LB suplementados con Tet (12.5µg/ml), Carb (100µg/ml), IPTG (0.8M) y X-Gal (2%), ver Figura 40. Para los clones del gen *Cctra*, luego de reaislar se obtuvieron distintos fenotipos de un solo: celestes, azules, blancos con punto celeste y blancos (Cuadro 18). Por lo anterior, se procedió a seleccionar, reaislar y recodificar cada clon según su fenotipo. El código se modificó únicamente para los clones *Cctra* de la siguiente manera: Además de nombre del juego de oligos utilizados para producir el inserto del plásmido y un número correlativo de colonia se agregó el fenotipo del clon siguiendo la siguiente nomenclatura: B para blanco, C para celeste y BC para blanco con punto celeste.

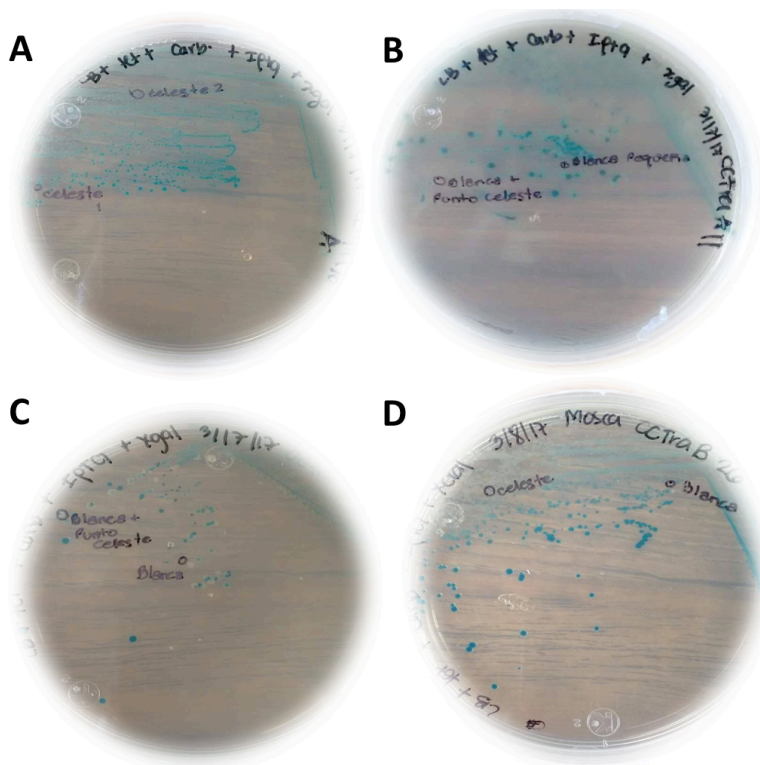
Luego del reaislamiento se obtuvo fenotipos uniformes y se procedió a realizar la extracción del plásmido junto con los clones *Cctra-2* y *Altra* reaislados en las placas con la concentración adecuada de antibióticos. Para estos dos genes el reaislamiento produjo clones con el mismo fenotipo que los clones originales, clon blanco. Las concentraciones de plásmido obtenidas luego del reaislamiento mejoraron considerablemente.

Para los clones *Cctra* se obtuvo concentraciones de 96.35 ng/μl hasta 232.6 ng/μl, con una pureza de 1.82 a 1.86 (ADN puro con razón 260/280 ~ 1.8); y una medida de pureza secundaria de ácidos nucleicos de 1.92 a 2.25 (pureza secundaria de ácidos nucleicos con razón 260/230 ~ 2.0 a 2.2), indicando una baja o nula presencia de contaminación (Thermo Scientific, 1975), ver Cuadro 19. Por otro lado, para los clones *Cctra-2* se obtuvo concentraciones de 67.6 ng/μl hasta 110 ng/μl, con una pureza de 1.82 a 1.83; y una medida de pureza secundaria de ácidos nucleicos de 1.88 a 2.22, indicando ausencia de contaminación por fenol.

Para los clones *Altra* se obtuvo un rango de concentraciones de plásmido entre 120ng/μl hasta 140ng/μl, con una pureza de 1.80 a 1.85; y una medida de pureza secundaria de ácidos nucleicos de 1.72 a 1.92, indicando una baja o nula presencia de contaminación.

Figura 40. Clones de distintos fenotipos obtenidos de un clon del gen *Cctra*.

Clones *E. coli* XL1-BLUE reasilados en placas de LB suplementadas con Tet (12.5μg/ml) + Carb (100μg/ml) + IPTG (0.8M) + X-Gal (2%) de clones originales del gen *Cctra* (Figura 35) en placas de LB suplementadas con Tet (50μg/ml) + Carb (60μg/ml) + IPTG (0.8M) + X-Gal (2%). A. Clon de la colonia 10 obtenidos con el juego de oligos *Cctra* (A) por medio de PCR. B. Clon de la colonia 11 obtenidos con el juego de oligos *Cctra* (A) por medio de PCR. C. Clon de la colonia 25 obtenidos con el juego de oligos *Cctra* (B) por medio de PCR. D. Clon de la colonia 26 obtenidos con el juego de oligos *Cctra* (B) por medio de PCR.



Cuadro 18. Fenotipos obtenidos de distintos clones de *E. coli* XL1-BLUE luego del reaislamiento

Fenotipos de clones de los genes *Cetra*, *Cetra-2* y *Altra* luego de reasilar una clon original en placas de LB suplementadas con Tet (12.5µg/ml) + Carb (100µg/ml) + IPTG (0.8M) + X-Gal (2%)

Fenotipo	
Cetra (A) col. 10 Azul	Clon celeste pequeño
	Clon pequeño blanco con punto celeste en el medio
Cetra (A) col. 11 Azul	Clon mediano blanco con punto celeste en el medio
	Clon blanco pequeño
Cetra (B) col. 25 Blanco	Clon blanco grande
	Clon grande blanco con punto celeste en el medio
Cetra (B) col. 26 Blanco	Clon blanco pequeño
	Clon celeste
Cetra-2 col. 12	Clon blanco pequeño
	Clon blanco grande
Cetra-2 col. 14	Clon blanco pequeño
	Clon blanco grande
Cetra-2 col. 15	Clon blanco pequeño
	Clon blanco grande
Cetra-2 col. 23	Clon blanco pequeño
	Clon blanco grande
Altra (A) col. 3	Clon blanco
Altra (A) col. 14	Clon blanco

**Cuadro 19. Altas concentraciones de plásmido ligado obtenido de los clones reaislados suplementado con Tet (12.5µg/ml) + Carb (100µg/ml).
Parámetros de calidad de plásmido extraído de clones de los genes *Cctra*, *Cctra-2* y *Altra* en LB líquido suplementado con Tet (12.5µg/ml) + Carb (100µg/ml)**

Muestra	ng/µl	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
Cctra (A) col. 10BC	224.3	1.84	2.2
	240.9	1.84	2.19
Cctra (A) col. 10C	215.4	1.84	2.24
	224.6	1.85	2.24
Cctra (A) col. 11BC	144.2	1.83	2.15
	148.9	1.84	2.15
Cctra (A) col. 11B	188.1	1.84	2.04
	210.6	1.83	1.98
Cctra (B) col. 25BC	228.8	1.85	2.34
	231.7	1.86	2.33
Cctra (B) col. 25B	95.2	1.82	1.98
	97.5	1.84	1.92
Cctra (B) col. 26B	115.5	1.82	1.98
	118.8	1.81	1.97

Continuación Cuadro 19. Altas concentraciones de plásmido ligado obtenido de los clones reaislados suplementado con Tet (12.5µg/ml) + Carb (100µg/ml).

Muestra	ng/µl	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
Cctra (B) col. 26C	197.8	1.85	2.25
	201.6	1.84	2.23
Cctra-2 (B) col. 12	103.6	1.82	2.08
	107.5	1.81	2.05
Cctra-2 (B) col. 14	77.8	1.81	1.88
	78.8	1.81	1.89
Cctra-2 (B) col. 15	66.4	1.83	2.22
	68.8	1.82	2.16
Cctra-2 (B) col. 23	108.6	1.80	1.99
	111.4	1.82	1.99
Altra (A) col. 3	124.6	1.83	1.74
	125.3	1.81	1.74
Altra (A) col. 14	132.5	1.82	1.92
	134.4	1.83	1.88

Se realizó una digestión, con EcoRI, enzima que presenta sitios de reconocimiento dentro del plásmido ubicados en los extremos del fragmento de interés, para verificar la presencia del inserto al obtener un producto de digestión del tamaño esperado. Todos los los controles negativos (plásmidos sin digestión) presentaron las bandas correspondientes en la parte superior del gel, ya que su conformación circular

dificulta la migración. Con este método fue posible determinar que de los clones *Cetra*, solamente los clones *Cetra* (A) poseen un producto de digestión de 260pb Figura 41, cercano al tamaño esperado de 270pb, ver Cuadro 20, indicando que los clones *Cetra* (A) col. 10BC, 10C, 11BC, 11B poseen el fragmento de interés dentro del plásmido. Los plásmidos de los clones *Cetra* (B) no presentan un producto de digestión indicando que estos perdieron el inserto o se encuentra recombinado dentro del genoma de la bacteria. Tomando en cuenta que el inserto *Cetra* (B) contiene al inserto *Cetra* (A), ver Figura 41, manejamos dos hipótesis del porque no se observó digestión en los clones *Cetra* (B): Su tamaño incide directamente en su estabilidad (el inserto producido por el juego de oligos *Cetra* (B) es 127 pares de bases más grande, o 50% mayor que el inserto producido por el juego de oligos *Cetra* (A)). La exposición del clon a una mayor concentración de Tetraciclina (50 µg/ml) produjo mutaciones en el plásmido, impidiéndole a la enzima de restricción EcoRI, identificar la secuencia de reconocimiento y cortar el ADN en el lugar indicado.

Luego de la digestión con la enzima EcoRI fue posible determinar que todos los clones *Cetra-2* y *Altra* seleccionados por medio de PCR de colonia poseen un producto de 20) digestión de 400 pb y 300 – 400bp repectivamente (Figura 42), lo cual es cercano al valor esperado de 400pb y 373pb, Cuadro 20. Esto indica que los clones *Cetra-2* col. 12, 14 y 23 y *Altra* col. 3 y 14 poseen el fragmento de interés.

Cuadro 20. Tamaño de productos de amplificación esperados para los juegos de oligos utilizados para ambas especies

Juego de oligos utilizada	Tamaño de inserto gen (bp)	Tamaño de inserto gen digerido con EcoRI (bp)
<i>Cetra</i> (A)	252	270
<i>Cetra</i> (B)	379	397
<i>Cetra-2</i> (B)	400	400
<i>Altra</i> (A)	372	390

Figura 41. Presencia del inserto en clones correspondientes al gen *Cctra* seleccionados del tamaño esperado producido por EcoRI.

Electroforesis de digestión con EcoRI de plásmido ligado en clones *E. coli* XL1-BLUE. Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 20 V/cm por 30min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con tinción post corrida con bromuro de etidio a 300nm

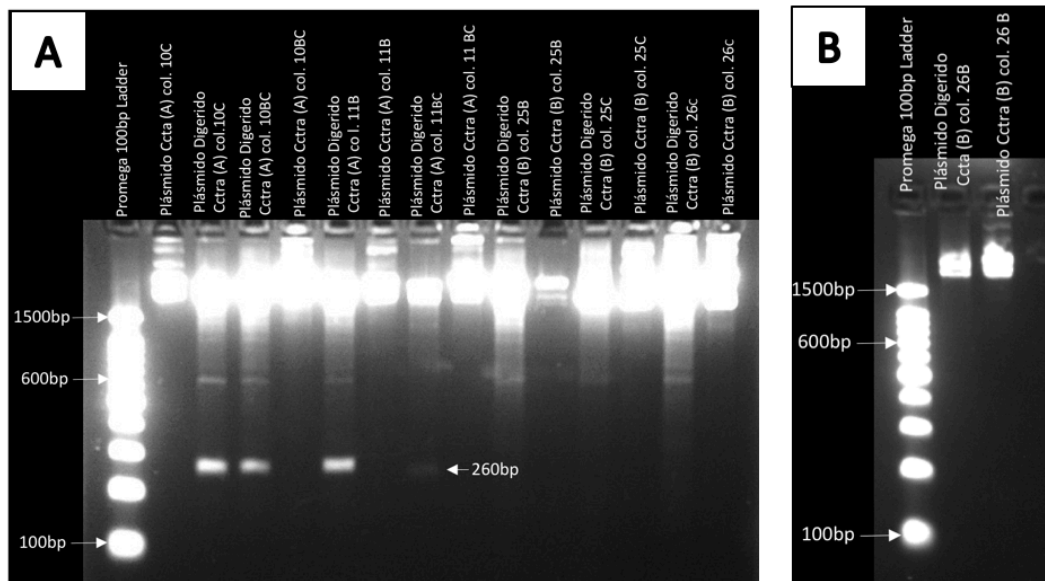
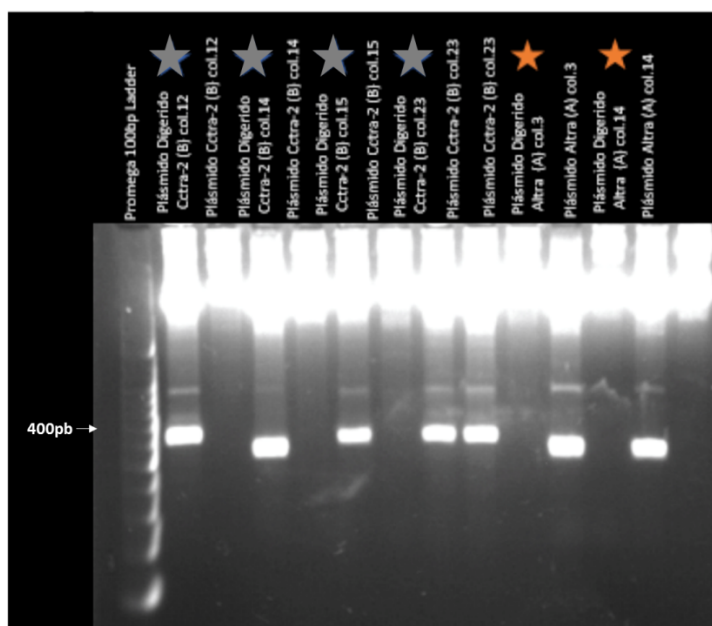


Figura 42. Presencia del inserto en clones correspondientes a los genes *Cctra-2* y *Altra* seleccionados del tamaño esperado producido por EcoRI.

Electroforesis de digestión con EcoRI de plásmido ligado en clones *E. coli* XL1-BLUE correspondientes a los genes *Cctra-2* (Estrellas grises) y *Altra* (Estrellas anaranjadas). Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 20 V/cm por 30min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con tinción post corrida con bromuro de etidio a 300nm



Todos los plásmidos elegidos luego de la digestión, menos el obtenido del clon Cctra-2 col. 14 por su baja concentración (Cuadro 19), se secuenciaron en Macrogen USA, a pesar que no se observó producto de digestión en los clones Cctra (B). En los resultados obtenidos se identificaron tres secuencias importantes por plásmido: La secuencia de reconocimiento de SpeI, para determinar la orientación del inserto dentro del plásmido, la secuencia del promotor T7 junto con el oligo F y la secuencia del oligo R respectiva al fragmento de interés.

Luego del análisis de la secuencia de los plásmidos fue posible determinar que cuatro de ocho plásmidos pertenecientes al clon *Cctra*, poseen una secuencia de inserto similar a la publicada en GenBank (GenBank: AF434936.1); y se encuentran en la orientación adecuada para la producción de ARNdh (inserto flanqueado por dos promotores T7) (Agrawal *et al.*, 2003; Farrel, 2005), ver Figura 46. El análisis de las secuencias de los plásmidos Cctra (B) permitió confirmar la hipótesis de que existe una mutación en el sitio de reconocimiento de EcoRI, razón por la cual no se observó producto de digestión en Cctra (B) aun cuando el inserto se encuentra dentro del plásmido (ver Figura 43). Además, según el análisis de estas secuencias, es posible descartar todos los clones producidos por el juego de oligos Cctra (B), como candidatos para la producción de ARNdh debido a dos factores: Se desconoce la orientación del inserto ya que la secuencia SpeI no se encontró o se encuentra altamente mutada e intercalada con el oligo F. Además, se cree que el oligo F perdió el promotor T7 debido a los numerosos procesos de reaislamiento realizados o bien a la inestabilidad del promotor T7 dentro el plásmido. Por lo anterior, los clones que se proponen como candidatos para la producción de ARNdh debido a la orientación del inserto, la ausencia de mutaciones y por poseer una secuencia consenso cercana a la publicada en GenBank (GenBank: AF434936.1) son: Cctra (A) col. 10C, col. 10BC, col. 11B y col. 11BC.

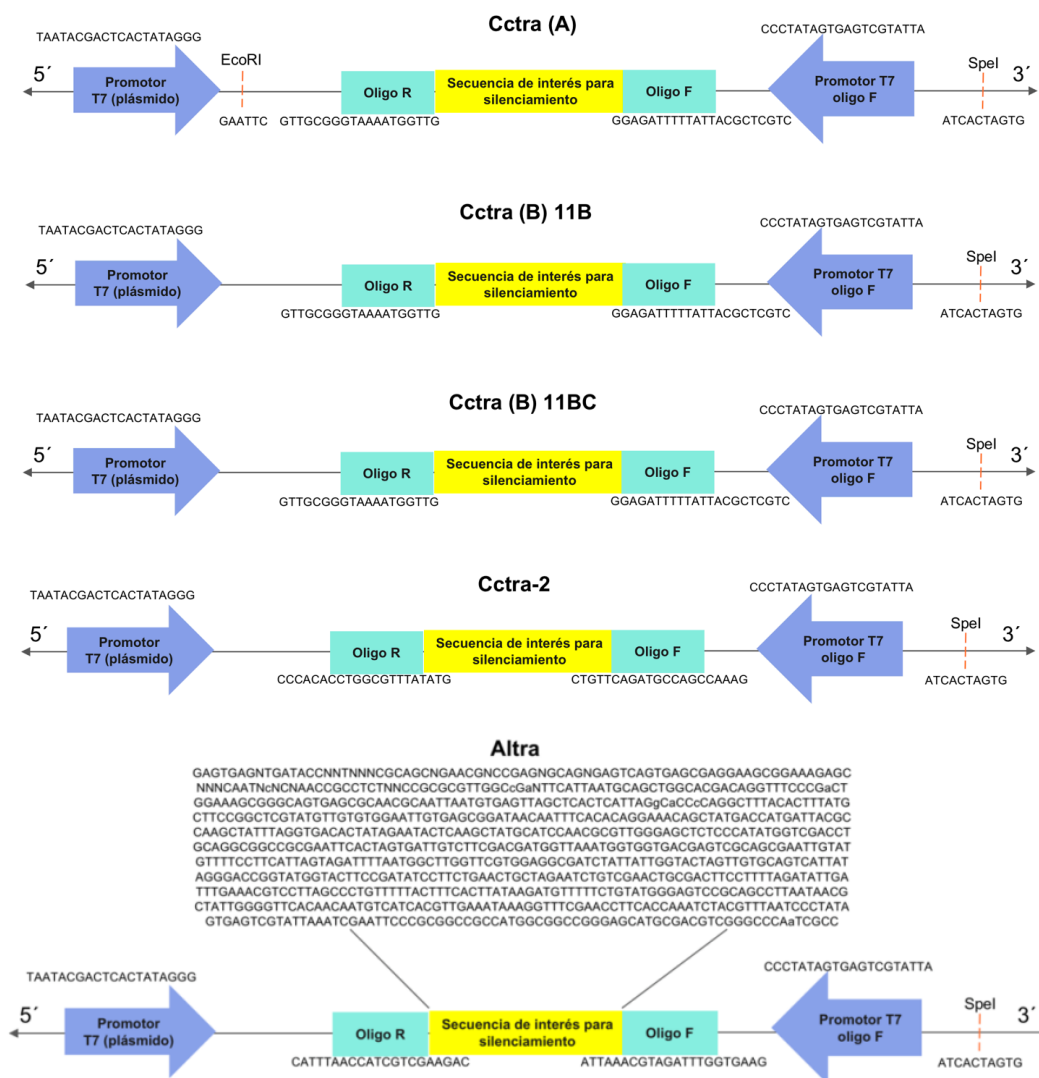
El análisis de las secuencias obtenidas de los plásmidos pertenecientes a los clones Cctra-2 permitió determinar que el clon Cctra-2 col. 12, posee el fragmento de interés en la orientación deseada, ver Figura 43. No fue posible analizar la secuencia obtenida del clon Cctra-2 col. 23 debido a la baja calidad de la misma. Por lo anterior se proponen como candidato para la producción de ARNdh al clon Cctra- 2 col. 12.

Los resultados de la secuenciación de los plásmidos pertenecientes al clon *Altra* no fueron 100% confiables debido a que contienen bases nitrogenadas sin identidad y varias bases en las que se realizó cambios manuales en la secuencia, utilizando la herramienta Mega7. Por lo anterior, no fue posible determinar si el fragmento de interés se encuentra en la orientación deseada al identificar los promotores T7 del plásmido o del oligo “Forward” en los dos clones *Altra* col. 3 y 14. La calidad de la secuencia se le atribuyó a una posible contaminación, alto contenido de CG lo que posiblemente provocó que la Taq polimerasa durante la secuenciación no funcionara de manera correcta. Además, es importante mencionar que solamente existe una secuencia publicada correspondiente al gen *Altra*, lo cual dificulta los análisis.

A partir de las secuencias resultados obtenidos para el clon *Altra* no es posible determinar la orientación del fragmento de interés. Por lo anterior, se utilizó la herramienta Blast para determinar la identidad de las

secuencias de los clones limpios (clon 14F, clon 3R y clon 3F). Fue posible identificar que la identidad de los clones Altra col. 3F, 3R y 14F es “*A. ludens tra* mRNA, complete cds” (GenBank: EU024509.1) con un porcentaje de identidad del 97%, 98% y 99%, respectivamente (Cuadro 21). No fue posible determinar la identidad de la secuencia del clon Altra col. 14R debido a la calidad de la misma.

Figura 43. Análisis de secuencia de plásmidos obtenidos de los clones secuenciados. Los diagramas muestran el análisis de los resultados de secuenciación obtenidos utilizando los oligos M13R y M13R para los clones *Cctra* y *Cctra-2*. Los diagramas del clon *Altra* es una ilustración de la orientación que el inserto debe poseer. Se muestra la posición de secuencias clave.



Cuadro 21. Alto porcentaje de identidad de los clones secuenciados con la secuencia de “*A. ludens* mRNA complete cds” (GenBank: EU024509.1).

Identificación del clon	Organismo con el que se identifica	Porcentaje de identidad
Altra col. 14 Forward	<i>Anastrepha ludens</i> (Tra) mRNA, complete cds	97%
Altra col. 3 Reverse	<i>Anastrepha ludens</i> (Tra) mRNA, complete cds	98%
Altra col. 3 Forward	<i>Anastrepha ludens</i> (Tra) mRNA, complete cds	99%

Como alternativa para determinar la orientación del fragmento de interés en el clon Altra, se realizó una digestión utilizando la enzima de restricción SpeI que posee sitios de reconocimiento en el plásmido y en la secuencia del fragmento publicada en NCBI (GenBank: EU024509.1), Figura 44. En esta figura es posible determinar que el plásmido digerido posee solamente un producto de digestión que posiblemente corresponden a linealización del plásmido, no se observó un producto de digestión del tamaño esperado de 110pb, Figura 45. Debido a que la enzima de restricción se encontraba fuera de su fecha de caducidad, es posible que la enzima realizara un corte parcial. Para descartar esta opción, se adicionó 1µl más de enzima a cada tubo, 10µl de buffer de enzima y las muestras fueron incubadas 1 hora adicional, a 37°C. En la Figura 46 se observa que las muestras no presentaron ningún corte adicional. Los productos de digestión observados pueden ser las distintas conformaciones adquiridas por los plásmidos de manera natural (Brown, 2010). Luego de analizar este resultado se localizaron los sitios de restricción en las secuencias de los clones Altra col. 3F, 3R y 14F (Figura 50B, C y D). No fue posible encontrar la secuencia SpeI posiblemente porque esta se encuentra altamente mutada e intercalada con el oligo F. Por lo anterior para confirmar la orientación del fragmento de interés, se recomienda procesar y secuenciar la muestra nuevamente.

Figura 44. SpeI enzima con único sitio de restricción en la secuencia de *A. ludens* publicada en NCBI
 Se presenta el diagrama de los sitios de restricción de diversas s enzimas tanto de la secuencia publicada para el gen *Altra* en NCBI, GenBank: EU024509.1 (Fig. 50A) como la obtenida luego de la secuenciación del plasmido proveniente del clon de interés: *Altra* col. 14 “forward” (Fig. 50B), *Altra* col. 3 “reverse” (Fig. 50C) y *Altra* col. 3 “forward” (Fig. 50D). Todas las secuencias obtenidas experimentalmente fueron previamente limpiadas con MEGA7.

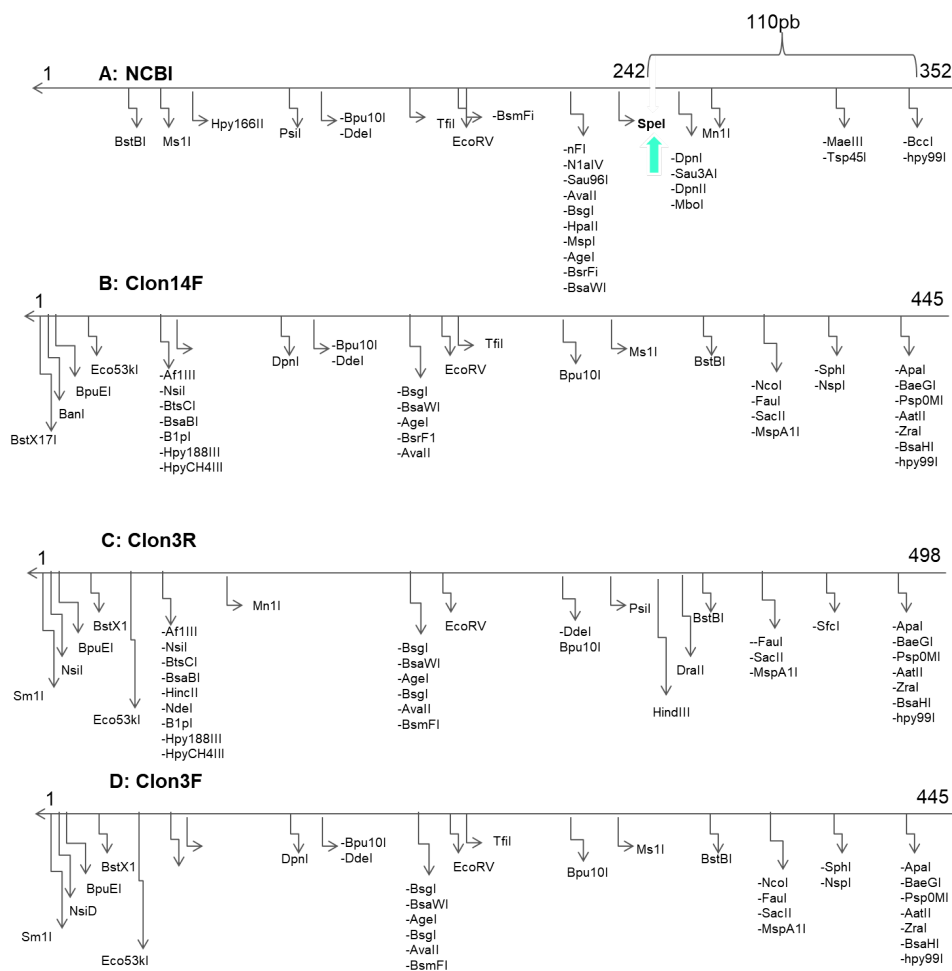


Figura 45. Ausencia del producto de digestión por SpeI del fragmento de interés en clones correspondientes al gen *Altra*

Gel de electroforesis de digestión implementando 1 μ l de enzima e incubado por una hora a 37°C. Condiciones de corrida: gel 1.5% de agarosa (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X y a 100 vts (20vts/cm). Visualizado con bromuro de etidio a 300nm. Escalera de peso molecular 100pb.

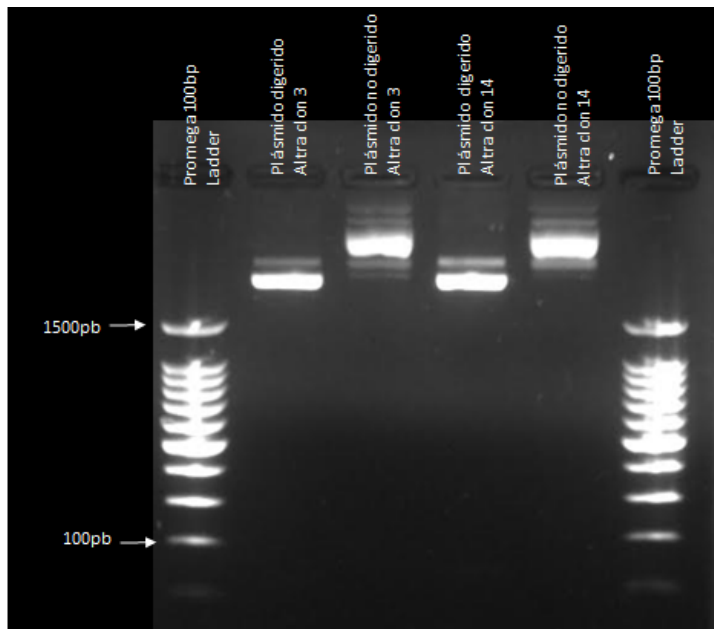
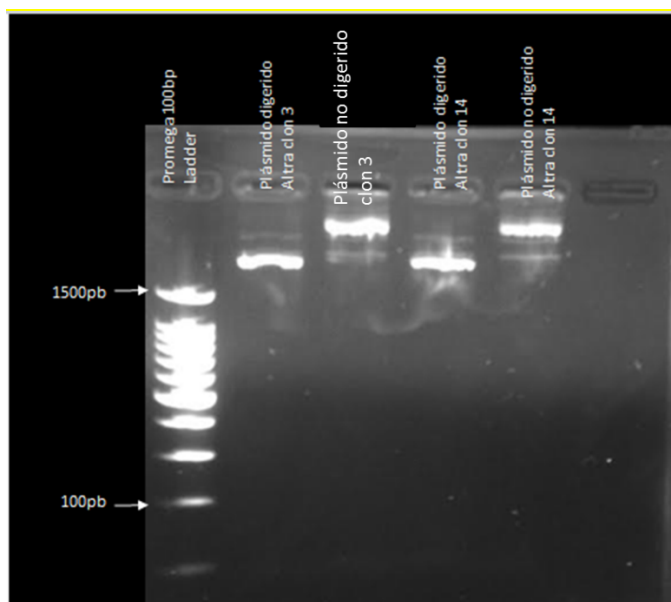


Figura 46: Digestión nula utilizando la enzima SpeI con doble tratamiento del fragmento de interés en clones correspondientes al gen *Altra*

Gel de electroforesis del producto de digestión anterior, adicionando 1 μ l de enzima más y 10 μ l de buffer de enzima e incubado por una hora más a 37°C. Condiciones de corrida: gel 1.5% de agarosa (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X y a 100 vts (20vts/cm). Visualizado con bromuro de etidio a 300nm. Escalera de peso molecular 100pb (Promega).

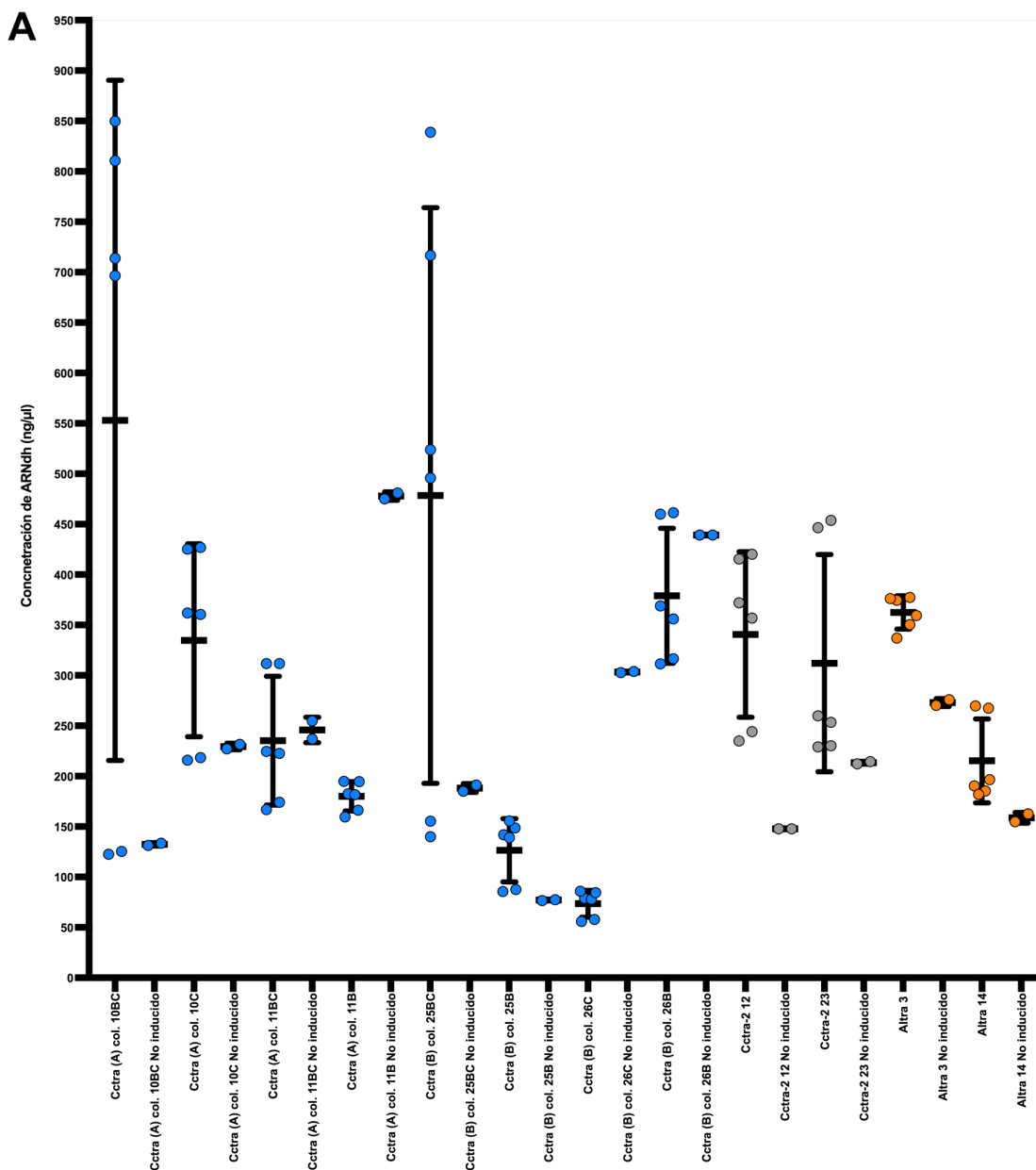


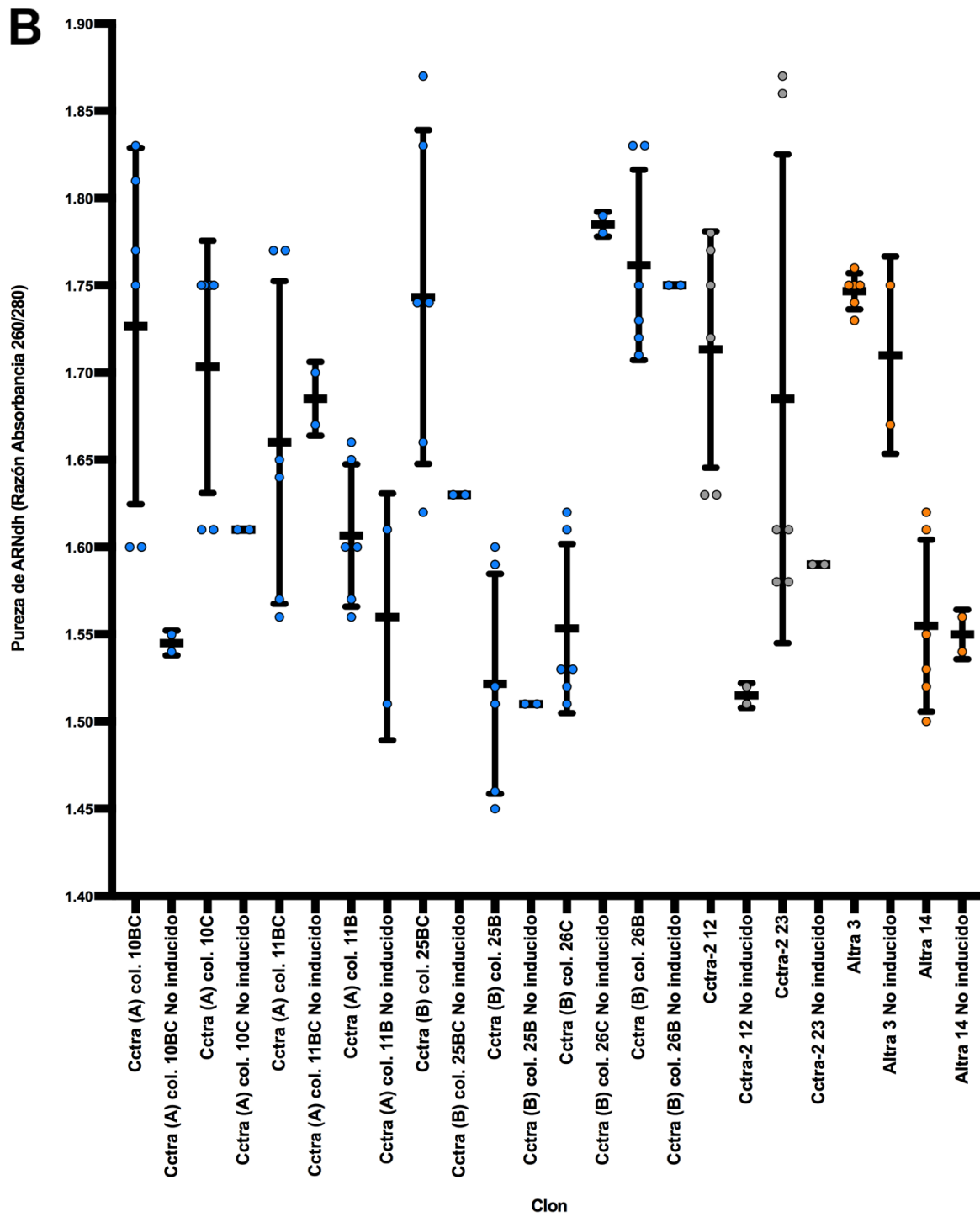
Para confirmar la producción de ARNdh, todos los clones se indujeron con IPTG. Se cuantificó el ARNdh producido, se evaluó el tamaño del ARNdh y se determinó la toxicidad del inserto. Debido a que los clones no inducidos no se trabajaron en triplicado, no es posible establecer si existe o no una diferencia significativa estadísticamente entre la producción de ARNdh de los clones inducidos y no inducidos. Por otro lado es importante mencionar que el proceso experimental fue realizado con bacterias con un OD_{600} en entre 0.627-0.704 (fase estacionaria) en lugar de un OD_{600} 0.4 (fase exponencial), es posible que esta variable haya influido en los resultados obtenidos.

La Figura 47 azul, muestra que los clones *Cctra* inducidos, *Cctra* (A) col. 10BC y *Cctra* (B) col. 25BC, producen una alta concentración de ARNdh (~ 700 ng/ μ l) comparado con sus respectivos controles no inducidos y con los demás clones, con una pureza aceptable cercana a 2 y una pureza secundaria de ácidos nucleicos que indica que existe contaminación probablemente proveniente del fenol (Thermo Scientific, 1975). La producción de ARNdh por el clon *Cctra* (B) col. 25BC indica que, no se perdió el promotor T7 del oligo F, como se creía en un principio. Lo anterior, permite considerar a este clon como candidato para la inducción del silenciamiento del gen *Cctra*. Los clones *Cctra-2*, Figura 53 gris, *Cctra-2* col. 12 y 23 producen una mayor concentración de ARNdh de (~ 300 ng/ μ l) que sus respectivos controles no inducidos, con una pureza aceptable cercana a 2 y una pureza secundaria de ácidos nucleicos que indica que existe contaminación probablemente proveniente del fenol (Thermo Scientific, 1975).

La Figura 47 anaranjado muestra que en ambos clones *Altra* col. 3 y 14, no existe diferencia entre la concentración de ARNdh producido por las células inducidas (362.43ng/ μ l y 215.27ng/ μ l) y las no inducidas (273.15 ng/ μ l y 158.75 ng/ μ l). Estos poseen una pureza aceptable cercana a 2 y una pureza secundaria de ácidos nucleicos que indica que existe contaminación probablemente proveniente del fenol (Thermo Scientific, 1975).

Figura 47. Cuantificación de ARNdh de clones.
Concentración y parámetros de calidad de ARNdh extraído de clones. Clones de Cctra en color azul, Cctra-2 gris y Altra anaranjado. A. Concentración de ARNdh en ng/μl. B. Pureza de ARNdh obtenido de los clones. C. Pureza secuenciaria de ácidos nucleicos.





volatilización. Por lo anterior, se recomienda volver a realizar la extracción de ARNdh producido por los clones y esperar a que el etanol se evapore por completo.

Fue posible determinar que clones *Cctra* producen distintos tamaños de ARNdh, 250pb, 500pb a 900pb (Figura 48). Estos productos poseen un tamaño menor al esperado de 250bp y diversos tamaños mayores al esperado. Los clones *Cctra* (B), *Cctra* (A) col. 11B y *Cctra-2* col. 12 produjeron un producto de menor tamaño que el esperado debido a una posible mutación causada por el reaislamiento y cultivo de los clones luego de la secuenciación de los mismos. Existen productos de mayor tamaño al esperado debido a que no se diseñó el fragmento de interés con terminadores independientes de RHO. Lo anterior causó que la polimerasa T7 amplificara un fragmento más grande que el esperado (Farnham & Platt, 1981). No fue posible determinar el tamaño del ARNdh de todos los clones producidos por el juego de oligos *Cctra* (A), probablemente debido a la presencia de trazas de etanol.

Los clones *Cctra-2* producen ARNdh de 200pb y 400pb (figura 49). Estos productos producen distintos tamaños de ARNdh. Estos productos poseen un tamaño menor al esperado, el tamaño esperado de 400pb y/o tamaños mayores al esperado. El clon *Cctra-2* col. 23 produce un ARNdh del tamaño esperado, a pesar que presenta una banda leve indicando que existen trazas de etanol en la muestra. Este mismo clon presenta productos de un mayor tamaño al esperado entre 600pb y 650pb. Este fenómeno es causado por la ausencia de terminadores independientes de RHO luego del fragmento de interés (Farnham & Platt, 1981). El clon *Cctra-2* col. 12 produce un ARNdh de 200pb, menor al tamaño esperado, esto se puede deber a una degradación del ARNdh (Scientific, s/f) o a una mutación. Este clon productos de un mayor tamaño al esperado al igual que el clon *Cctra-2* col. 23.

Los clones *Altra* (*Altra* col. 3 y 14) producen distintos tamaños de ARNdh de 200pb y 500pb a 800pb (Figura 50). Estos productos poseen un tamaño menor al esperado de 372bp y diversos tamaños mayores al esperado. Estos fenómenos también se observaron en algunos clones *Cctra*, se cree que un tamaño menor al esperado es causado por una degradación del ARNdh (Scientific, s/f) o a una mutación; mientras que un tamaño mayor al esperado es causado por la ausencia de terminadores independientes de RHO luego del fragmento de interés (Farnham & Platt, 1981).

Durante todo el proceso experimental se esperaba que únicamente los clones inducidos produjeran ARNdh o que produjeran una mayor concentración que los no inducidos. Esto se debe a que la cepa de *E. coli* utilizada, *E. coli* HT-115 (DE3), produce polimerasa T7, en mayor cantidad, en presencia de un inductor del promotor de lactosa, IPTG (García *et al.*, 2015). Debido a que algunos clones inducidos y no inducidos producen concentraciones de ARNdh similares, se recomienda realizar pruebas de inducción con distintas concentraciones de IPTG, puesto que en estudios anteriores se ha comprobado que la cepa utilizada produce ARNdh en ausencia de IPTG (Kamath, Martínez-Campos, Zipperlen, Fraser, & Ahringer, 2001). También se recomienda utilizar otro sistema de expresión de ARNdh como el promotor de arabinosa (Khlebnikov *et al.*, 2000).

Figura 48. Tamaño de ARNdh producido por clones de *C. capitata* gen *tra*.
Electroforesis de ARNdh extraído de clones candidatos *E. coli* HT-115 (DE3) Inducidos con IPTG (I) y no inducido con IPTG (NI). Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 20 V/cm por 30min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con tinción post corrida con bromuro de etidio a 300nm.

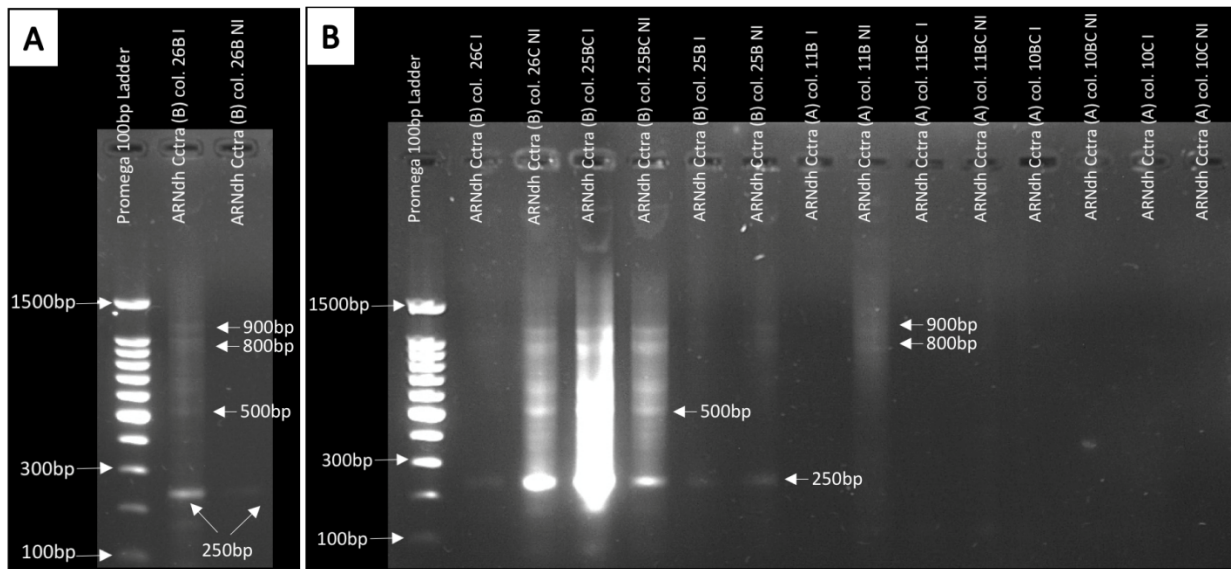


Figura 49. Tamaño de ARNdh producido por clones de *C. capitata* gen *tra-2*.
Electroforesis de ARNdh extraído de clones candidatos *E. coli* HT-115 (DE3) pGEM-T-*Cctra-2* 12 y 23 inducidos con IPTG (I) y no inducido con IPTG (NI). Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 20 V/cm por 30min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con tinción post corrida con bromuro de etidio a 300nm.

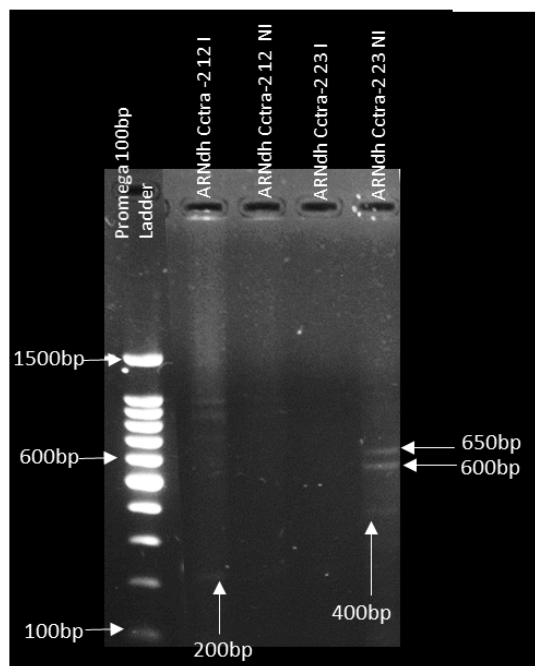
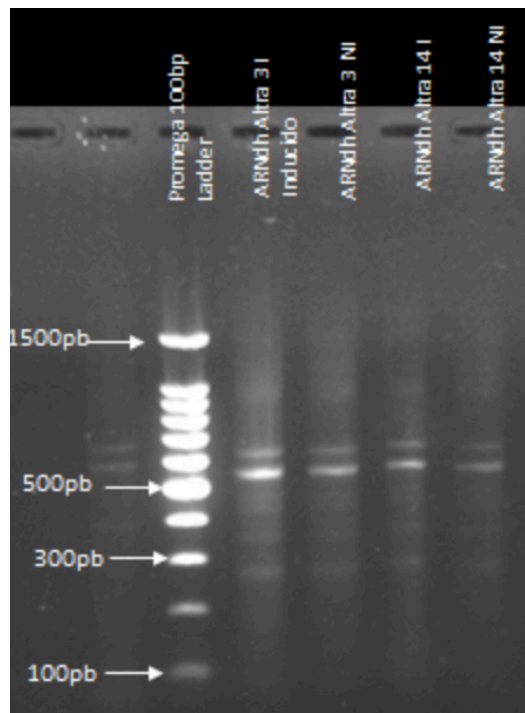


Figura 50. Tamaño de ARNdh producido por clones de *A. ludens* gen tra.
Electroforesis de ARNdh extraído de clones candidatos *E. coli* HT-115 (DE3) pGEM-T-*Altra* 3 y 14
inducidos con IPTG (I) y no inducido con IPTG (NI). Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en
“buffer” de corrida TBE 1X a 20 V/cm por 30min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con
tinción post corrida con bromuro de etidio a 300nm.



La toxicidad del inserto se evaluó al sembrar diluciones seriadas de los clones inducidos y no inducidos en una placa de LB suplementada con Tet (12.5 µg/ml) y Carb (100 µg/ml), ver figuras 51 - 53. Si el inserto causaba efectos tóxicos para cada clon, se esperaba observar un menor crecimiento en los clones inducidos. Luego de analizar la dilución 1×10^{-8} , fue posible determinar que los insertos probablemente tóxicos son los generados por los clones Cctra (B) col. 25BC y Cctra-2 col. 12. Debido a que se observa una mínima diferencia de crecimiento entre los clones inducidos y no inducidos, se cree que la producción del inserto (compuesto no necesarios para el crecimiento del clon), representa una carga metabólica que disminuye la tasa de crecimiento (Malakar & Venkatesh, 2012). Se recomienda realizar el análisis basado en OD₆₀₀ para determinar crecimiento mediante medidas cuantitativas y confirmar los resultados.

En diversos estudios que utilizan clones de *E. coli* para la producción de proteínas, se ha reportado una concentración no cuantificable de proteínas y un nivel de producción variable entre muestras (Vethanayagam & Flower, 2005). Lo anterior concuerda con lo observado en la producción de ARNdh de este estudio, ver Cuadro 22.

Se observó que los clones Cctra (A) col. 11B, col. 11BC y Cctra (B) col. 26B, col. 26C, al ser inducidos, presentan un mayor crecimiento y una menor o igual concentración de ARNdh que los no inducidos. Esto indica que, en un sistema no inducido, existe suficiente producción del inserto debido a mutación dentro del

cromosoma de *E. coli* HT-115 (DE3), que causa la pérdida del funcionamiento del promotor T7. Según Vethanayagam & Flower, 2005 esta mutación se encuentra en el promotor *lacUV5* y se debe a numerosos procesos de reaslamiento. También, es posible que la concentración de IPTG utilizada para la inducción es muy baja para producir una diferencia significativa en la producción de ARNdh.

Se obtuvo que los clones, Cetra (A) col. 10BC, col. 10C y Cetra (B) col. 25B, Cetra-2 col. 23, Altra col. 3 y 14 que, al ser inducidos, presentan un mayor crecimiento y una mayor producción de ARNdh que los no inducidos. Esto sugeriría que los clones son más aptos ya que la inducción con IPTG estimula el metabolismo de fuentes alternas de carbono. Se obtuvo clones, Cetra (B) col. 25BC, Cetra-2 col. 12 que, al ser inducidos, presentan un menor crecimiento y una mayor concentración de ARNdh que el clon no inducido. Esto sugiere que el clon produce de forma eficiente el ARNdh debido a que, probablemente, la cepa no posee una mutación en el promotor *lacUV5*. Por lo anterior, se proponen como candidatos para la producción de ARNdh a los clones Cetra (A) col. 10BC, col. 10C y Cetra (B) col. 25B, col. 25BC, Cetra-2 col. 12 y 23, Altra col. 3 y 14. Debido a los resultados obtenidos en la electroforesis, figuras 57 - 59, y a la probabilidad de que exista una mutación en el promotor *lacUV5*, se recomienda volver a realizar este análisis con clones recién transformados con el plásmido de interés y límite.

Figura 51. Crecimiento de clones candidatos inducidos con IPTG y no inducidos.
 Clones *E. coli* HT115 (DE3) reasilados en placas de LB suplementadas con Tet (12.5µg/ml) + Carb (100µg/ml) se utilizó inducido con IPTG (I) y no inducidos (NI). Las letras indican el par de clones inducidos y no inducidos.

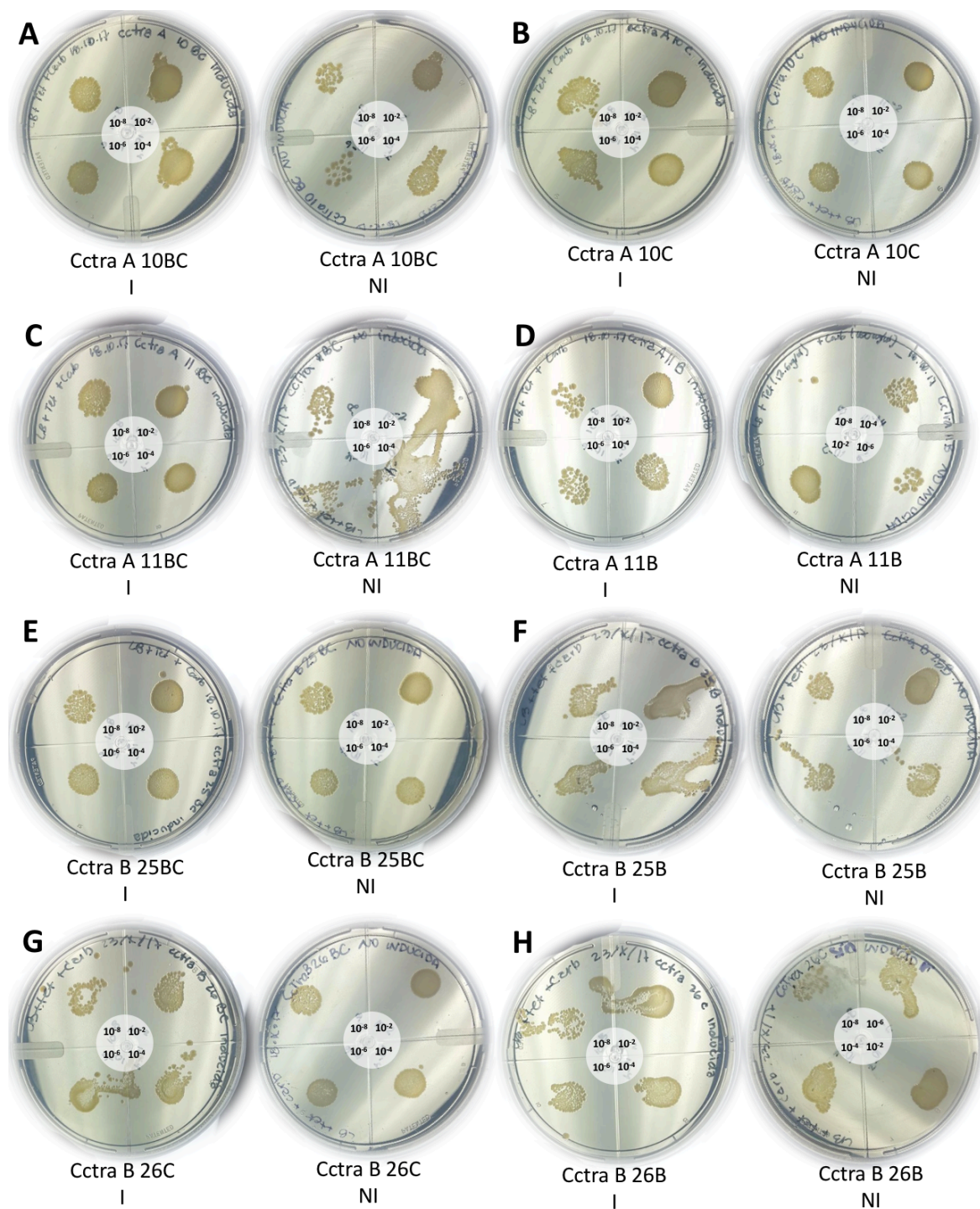


Figura 52. Crecimiento de clones candidatos del gen *transformer-2* inducidos con IPTG y no inducidos.

Clones *E. coli* HT115 reasilados en placas de LB suplementadas con Tet (12.5µg/ml) + Carb (100µg/ml) se utilizó inducido con IPTG (I) y no inducidos (NI).

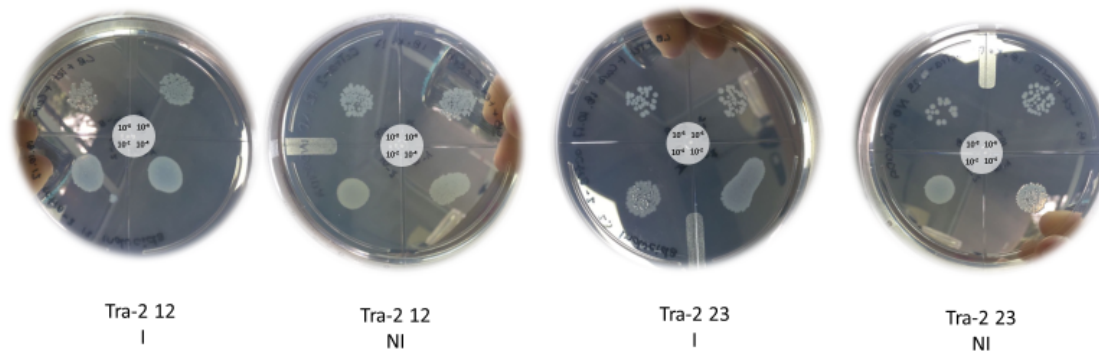
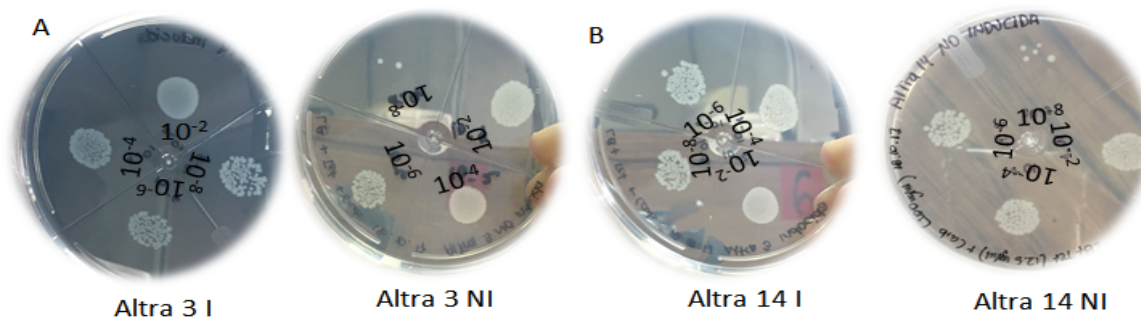


Figura 53. Crecimiento de clones candidatos del gen *transformer* de *A. ludens* inducidos con IPTG y no inducidos.

Clones *E. coli* HT115 reasilados en placas de LB suplementadas con Tet (12.5µg/ml) + Carb (100µg/ml) se utilizó inducido con IPTG (I) y no inducidos (NI).



Cuadro 22. Clones candidatos para la inducción de silenciamiento de los genes *Cctra*, *Cctra-2* y *Altra*

	Clones inducidos poseen un mayor crecimiento que clones no inducidos	Clones inducidos poseen un menor crecimiento que clones no inducidos
Clones inducidos producen mayor concentración de ARNdh	Cctra (A) col.10BC Cctra (A) col. 10C Cctra (B) col. 25B Cctra-2 col. 23 Altra col. 3 Altra col. 14	Cctra (B) col. 25BC Cctra-2 col. 12
Clones inducidos producen menor o igual concentración de ARNdh que clones no inducidos	Cctra (A) col. 11BC Cctra (A) col. 11B Cctra (B) col. 26B Cctra (B) col. 26C	

Se diseñaron oligos de PCR tiempo real para que, en un futuro, se evalué el cambio en la expresión de cada uno de los genes, *Cctra*, *Cctra-2* y *Altra*, en hembras luego de alimentarlas con ARNdh producido por los clones propuestos. Estos oligos se diseñaron para cumplir con las recomendaciones de tamaño, GC clamp, ΔG de hairpins, homodimers y heterodimers (Farrel, 2005; Promega, 2013; Ye *et al.*, 2012), ver condiciones de oligos en Cuadro 23. Para optimizar el silenciamiento, todos los oligos se diseñaron para amplificar un fragmento no mayor a 200bp (Taracena *et al.*, 2015), fuera del área amplificada por los oligos creados en este estudio para PCR convencional. De esta forma se evita un error en la cuantificación de la expresión del gen al realizar q-PCR, en cada una de las especies y genes, ver Anexos figuras 84 - 86.

Cuadro 23. Condiciones de oligos diseñados para PCR tiempo real de los genes *transformer* y *transformer-2* de *C. capitata* y *transformer* de *Anatrepha ludens*

Pareja	Nombre	Secuencia oligo (5'→3')	T _m (°C)	%GC	ΔG (Kcal/mol) Homodímeros más bajos	ΔG (Kcal/mol) Heterodímeros más bajos	MM producto (pb)
<i>Ceratitis capitata (gen transformer)</i>							
q-Cetra (1)	qCcTraF _365	CACCCTTCACAA GAGAATCTTAAC	60.5	41.7	-1.85	-5.12	109
	qCcTraR _451	GTTCCCTACTTC ATAGACGAGAT	59.6	39.1	-1.85		
q-Cetra (2)	qCcTraF _542	ACTCTTCACCAC CAACTAACC	61.1	47.6	2.62	-3.61	154
	qCcTraR _673	GTTATGTCATCC AAGTTTCGTCG	61	43.5	0.45		
<i>Ceratitis capitata (gen transformer-2)</i>							
q- Cetra-2 (1)	qCcTra- 2F_395	ATGTCACGTTCC CGTTC	58.3	52.9	-6.3	-4.95	113
	qCcTra- 2R_487	TGTTGCGTTGTA TAAACACTC	58.3	38.1	-1.38		
q- Cetra-2 (2)	qCcTra- 2F_750	GGCGTGAACGT GAATATAATG	58.7	42.9	-6.3	-4.95	126
	qCcTra- 2R_855	TACGGCTTCGAT CATATCGAC	60.7	47.6	-8.24		
q- Cetra-2 (3)	qCcTra- 2F_899	GCACGTTATTAG AACTGTTCC	58.3	42.9	-6.3	-5.24	121
	qCcTra- 2R_998	GAATTTTTGGCG AATCAACATC	58.6	36.4	-5.36		
q- Cetra-2 (4)	qCcTra- 2F_873	GTAGTCGTTCCCT ATTCGCCA	60.5	50	-3.61	-5.19	147
	qCcTra- 2R_998	GAATTTTTGGCG AATCAACATC	58.6	36.4	-5.36		

Continuación Cuadro 23. Condiciones de oligos diseñados para PCR tiempo real de los genes *transformer* y *transformer-2* de *C. capitata* y *transformer* de *Anastrepha ludens*

Pareja	Nombre	Secuencia oligo (5'→3')	T _m (°C)	%GC	ΔG (Kcal/mol) Homodímeros más bajos	ΔG (Kcal/mol) Heterodímeros más bajos	MM producto (pb)
<i>Anastrepha ludens</i> (gen <i>transformer</i>)							
q-Altra (1)	qAltraF_39	CAGATTGAACAA AGTGTGCC	58.9	45.0	-3.90	-6.84	94
	qAltraR_88	CGTTTAATAACC ACTTCACTGC	59.8	39.1	-4.85		
q-Altra (2)	qAltraF_42	TGCCTACCACAT ACCAACC	60.4	52.6	-3.14	-5.09	114
	qAltraR_148	CTAAATCCACGC ACACCATAAC	60.6	45.5	-3.61		
q-Altra (3)	qAltraF_926	GTGTGCCTACTG GTTCTATTC	59.4	47.6	-3.14	-5.25	136
	qAltraR_997	GGGTTCAACA ATGTCATC	58.4	45.0	-3.43		

Se realizó un PCR touchdown de los oligos diseñados para q-PCR (ver figuras 54 - 56), con este fue posible determinar que los oligos específicos para determinar la expresión del gen en hembras son: q_Cetra (2) [qCetraF_542 y q_CetraR_673], q_Cetra-2 (2) [qCetraF_750 y qCetra-2R_855] y q_Altra (3) [qAltraF_926 y qAltraR_997] ya que presentaron un producto cercano al tamaño esperado de 154pb, 126pb y 136pb, respectivamente, Cuadro 23. La intensidad observada del producto de amplificación producido por el juego de oligos q_Cetra (2), figura 60, indica que el producto se encuentra en una baja concentración por lo que es necesario optimizar el PCR para este juego de oligos. Por otro lado, se observa que el producto de amplificación producido por el juego de oligos q_Cetra-2 (2) y q_Altra (3), figuras 60 y 61, indica que el producto se encuentra en una alta concentración. A pesar de esto se observan distintos productos de amplificación para el juego de oligos q_Altra (3), esto indica que el juego de oligos no es específico para la región deseada en el rango de temperaturas de 63°C a 56°C. Es posible que esto ocurra debido al alto contenido de bases CG y repeticiones en la secuencia.

Los oligos que poseen un producto de amplificación tanto en machos como en hembras son: q_Cetra-2 (3) [qCetraF_899 y qCetra-2R_998], q_Cetra-2 (4) [qCetraF_873 y qCetra-2R_998] q_Altra (1) [qAltraF_39 y qAltraR_88] y q_Altra (2) [qAltraR_42 y qAltraR_148] ya que presentaron un producto cercano al tamaño esperado de 121pb, 147pb, 94pb y 114pb, respectivamente, Cuadro 23. Las parejas de oligos q_Cetra-2 (3), q_Cetra-2 (4), q_Altra (1), q_Altra (2) produjeron un producto de amplificación con mayor concentración en hembras, figura 55 - 56, indicando que es posible que este gen se encuentre en mayor proporción en hembras que en machos. Debido a que algunos controles negativos se encontraban contaminados, se recomienda volver a realizar el PCR touchdown con los oligos elegidos.

Figura 54. PCR Touchdown con oligos diseñados para PCR tiempo real para el gen *transformer* de *C. capitata*.

Productos de PCR Touchdown del gen *transformer* a partir de ADNc de adulto de *C. capitata* para cuantificar expresión del gen por medio de Q-PCR. Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en "buffer" de corrida TBE 1X a 20 V/cm por 30min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con bromuro de etidio a 300nm.

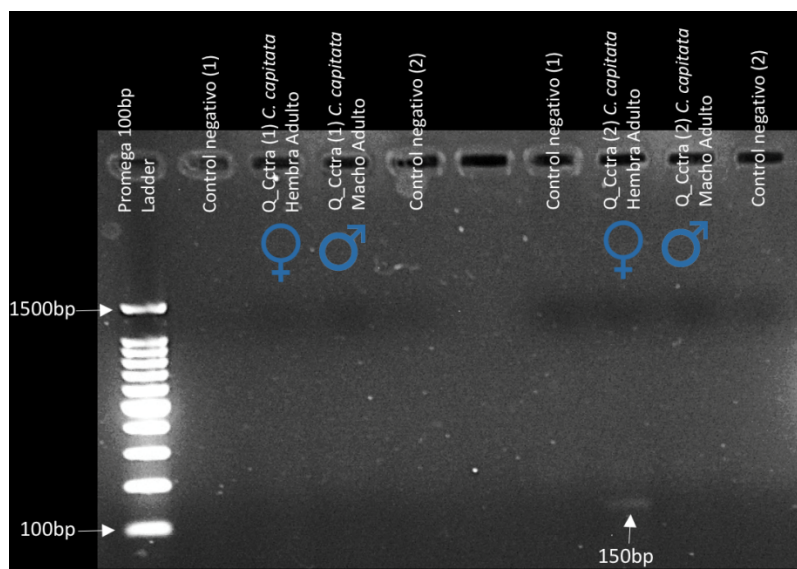


Figura 55. PCR Touchdown con oligos diseñados para PCR tiempo real para el gen *transformer-2* de *C. capitata*.

Productos de PCR Touchdown del gen *transformer-2* a partir de ADNc de adulto de *Ceratitis capitata* para cuantificar expresión del gen por medio de Q-PCR. Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 20 V/cm por 30min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con bromuro de etidio a 300nm.

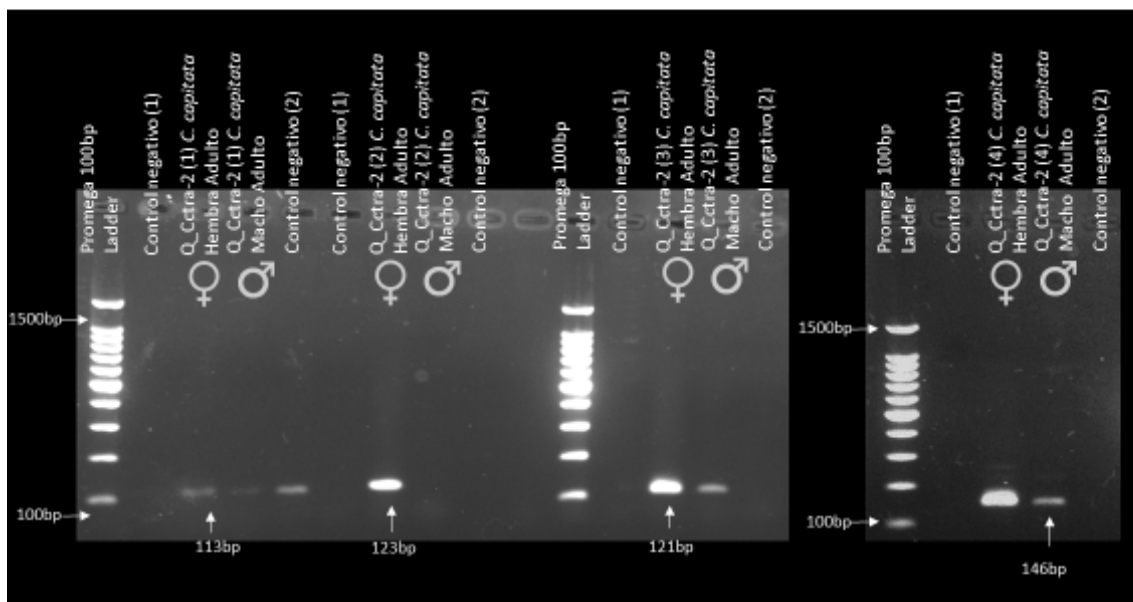
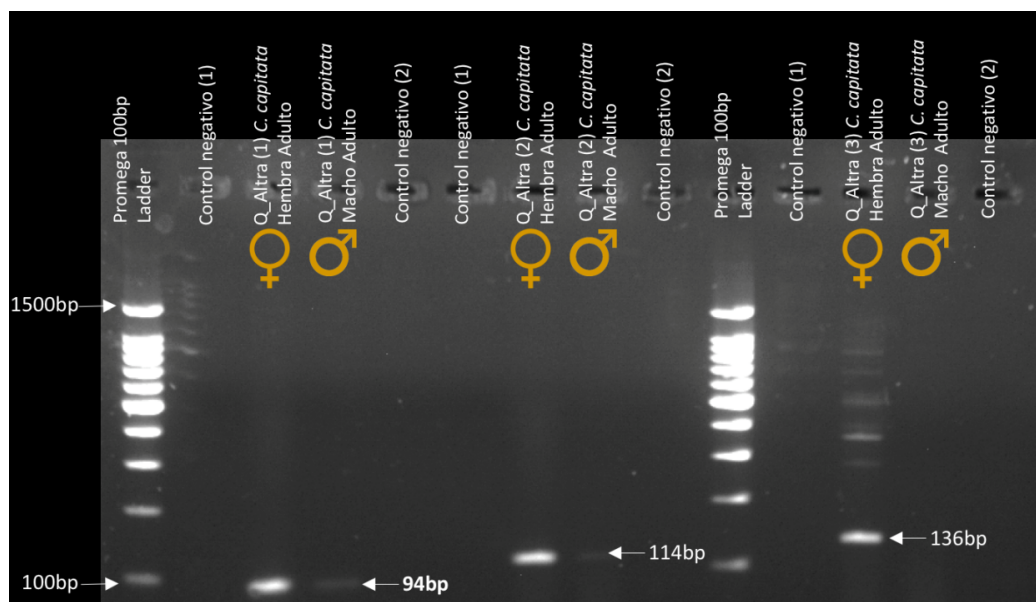


Figura 56. PCR Touchdown con oligos diseñados para PCR tiempo real para el gen *transformer* de *A. ludens*.

Productos de PCR Touchdown del gen *transformer* a partir de ADNc de adulto de *A. ludens* para cuantificar expresión del gen por medio de Q-PCR. Condiciones: gel de agarosa 1.5% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X a 20 V/cm por 30min. Escalera Promega Ladder 100bp. Visualización con bromuro de etidio a 300nm.



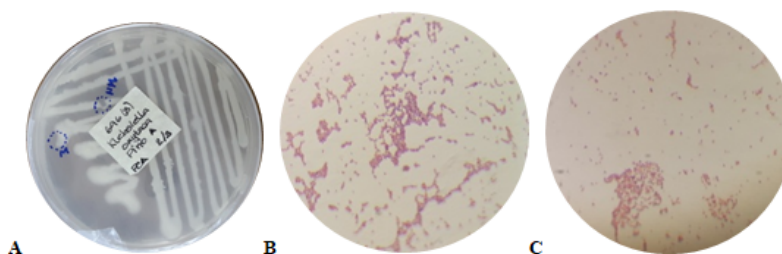
B. Caracterización de *Klebsiella oxytoca* aislada de ambientes asociados a *Ceratitis capitata*

Análisis microbiológico para el aislamiento de *Klebsiella oxytoca*

Las muestras iniciales fueron un aislado presuntivo de *Klebsiella* sp., de un ambiente asociado a *C. capitata* en medio nutritivo. Esto fue realizado con la colaboración de Moscamed Guatemala. Se obtuvieron 2 aislados, el primero provenía de la esponja de jaulas donde se encontraba *C. capitata*; y el segundo provenía de hojas de café de los cafetales donde se detectó la presencia de *C. capitata*.

Figura 57. *Klebsiella* aislada de la esponja de una jaula siendo un ambiente asociado a *C. capitata* con la colaboración de Moscamed Guatemala.

A. caja Petri con el estriado original de *Klebsiella*; B. tinción de Gram del estriado sin mucosidad denominado como No-Mucoso (NM); C. tinción de Gram del estriado que mostraba mucosidad denominado como Mucoso (M). Las tinciones de Gram se observaron en lente de inmersión (1000X) con aceite de inmersión

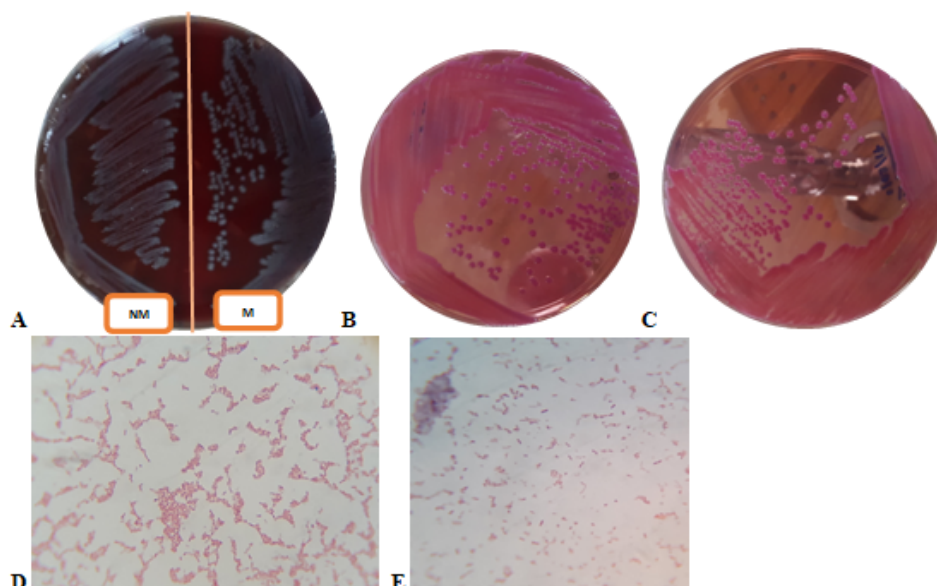


Según el estriado obtenido de la esponja, se observaron dos tipos de fenotipos bacterianos de *Klebsiella* (figura 57A) en la placa de cultivo bacteriano de *C. capitata*. Uno de los fenotipos era M (mucoso) y otro era NM (no mucoso)². Esto significa que las colonias M tenían una mayor expresión de cápsula en comparación con las colonias NM. Para corroborar si lo anterior es cierto, se debe de realizar un PCR tiempo real para cuantificar la expresión del gen que codifica a la cápsula el cual es *cps*. El gen *cps* es considerado uno de los de virulencia más importante. Actualmente se ha determinado que entre diferentes cepas existe una variabilidad capsular dada por polimorfismos. Estos polimorfismos son resultado de la variabilidad de la secuencia del promotor *cps* (Wen, Liu, Qu, & Zhang, 2016; Wu, Lin, Hsieh, Yang, & Wang, 2011). A partir de que se identificaron estos dos fenotipos, se realizaron los experimentos a continuación para ambas bacterias. En (figura 57B-C) se observan las tinciones de Gram aplicadas a las colonias NM y M. En ambas tinciones se observaron bacilos y coco-bacilos (entiéndase por bacilos cortos) Gram negativo (rosados) (Qureshi & Bronze, 2017) y cocos Gram positivo (morados). Las bacterias Gram negativo corresponden a

² En el transcurso de la discusión se va a factores referir a no mucoso como NM o como N para diferenciarlo del mucoso que es M.

Klebsiella (Qureshi & Bronze, 2017), por otra parte los cocos Gram positivos corresponden a contaminación. Debido a estos resultados se optó por purificar el cultivo antes de realizar las extracciones de ADN.

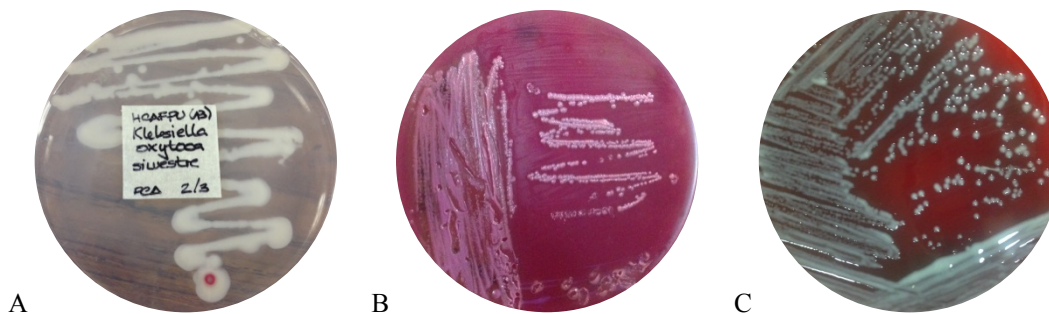
Figura 58. Purificación y aislamiento de *Klebsiella oxytoca* del cultivo proporcionado por Moscamed. A. caja petri con el estriado de *Klebsiella*; B. tinción de Gram de colonias aisladas de MacConkey No-Mucoso (NM); C. tinción de Gram de colonias aisladas de MacConkey Mucosa (M); D. tinción de Gram de colonias aisladas de MacConkey No-Mucoso (NM); E. tinción de Gram de colonias aisladas de MacConkey Mucosa (M). Las tinciones de Gram se observaron en lente de inmersión (1000X) con aceite de inmersión.



En el medio de cultivo Agar Sangre (figura 58A) para las colonias M (mucosas) y NM (no mucosas) se observa la formación de cápsula, propio de *Klebsiella*. Para la purificación del cultivo y aislamiento de *Klebsiella* se utilizó un medio MacConkey que es diferencial y selectivo. MacConkey es selectivo debido a que sólo crecen las Enterobacterias (Gram negativo) por la presencia de sales biliares y el cristal violeta del medio. Por ende, las bacterias Gram positivo no pueden crecer. También es diferencial ya que separa a las especies que son fermentadoras de lactosa de las que no lo son por un viraje de pH que produce cambios de coloración en el medio y en las colonias (SIGMA-ALDRICH, 2017a). En el medio MacConkey (figura 58B-C) muestra colonias rosadas mucosas de bacterias Gram negativo fermentadores de lactosa (Qureshi & Bronze, 2017). Para analizar la pureza y morfología del cultivo, se realizó la tinción de Gram de colonias aisladas (figura 58D-E) que muestra coco-bacilos y bacilos Gram negativo. El siguiente paso era caracterizar la colonia con pruebas bioquímicas.

Figura 59. Aislamiento de *Klebsiella oxytoca* aislada de *Ceratitis capitata*.

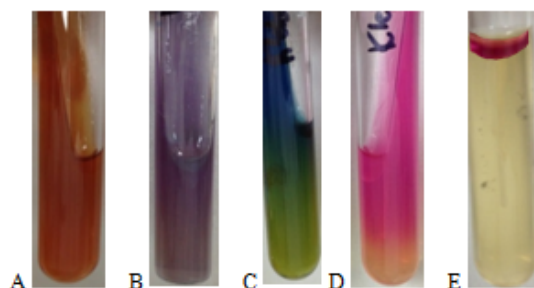
A) muestra recibida en medios B) bacteria aislada en agar MacConkey y C) en agar sangre.



Al segundo aislado obtenido de la hoja del café de los cafetales se le nombró como C³. De la muestra inicial (figura 59A) se tomó una asada y se sembró en agar MacConkey y sangre. Como se esperaba, en el medio MacConkey se obtuvieron colonias rosadas, brillantes y mucosas y en agar sangre, se obtuvieron colonias blanquecinas brillantes (Asensio *et al.*, 2000). Del primer medio se realizó una tinción Gram para confirmar la presencia de bacilos Gram negativos.

Figura 60. Bateria bioquímica de *Klebsiella oxytoca* aislada de *Ceratitis capitata*

A) TSI, B) LIA, C) citrato, D) urea, E) SIM no móvil.



Se utilizaron pruebas de batería microbiológica para la evaluación del metabolismo de la *Klebsiella* de las tres cepas estudiadas, M, NM y C (figura 60). En el medio TSI se obtuvo un resultado A/A + - (ácido/ácido con gas) por lo que es fermentador de glucosa, lactosa y sacarosa, aparte, es productora de gas (Podschn and ullmann 1998). En la prueba LIA se obtuvo K/A - - (alcalino/ácido) por lo que descarboxila la lisina, por el fondo amarillo significa que fermenta la dextrosa. Se obtuvo un resultado positivo para citrato, urea (contiene la enzima ureasa), rojo de metilo, prueba de indol y positivo para prueba OF (fermentador y oxidación con y sin aceite) por lo que es anaerobio facultativo siendo un fermentador (Podschn and ullmann 1998). Se obtuvo un resultado negativo para Voges Proskauer al no producir diacetil por ser una

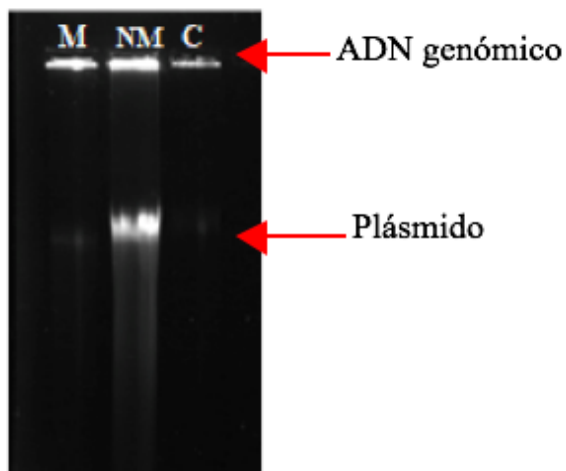
³ La C corresponde a cafetales según la primera letra de la palabra. Esto indica que el aislado proviene de la hoja del café a diferencia de las que provienen de la esponja que son M y NM. La C se utilizará en el transcurso de los resultados y discusión.

Enterobacteria. Resultó negativo para motilidad en SIM que era lo que se esperaba ya que no tienen flagelo (Alves, da Silva Dias, Dias De Castro, Riley, & Meurer Moreira, 2006). En el artículo de Alves y colaboradores (2006), realizaron una caracterización por reacciones bioquímicas a diferentes cepas de *Klebsiella* y luego una caracterización por PCR. Descubrieron que la prueba biomolecular (PCR) diferían de la forma en que se habían clasificado las especies de *Klebsiella* por pruebas bioquímicas. En conclusión existe una variabilidad genética entre cepas que sean de la misma especie por lo que se requiere realizar diversas pruebas tanto microbiológicas como moleculares para clasificación taxonómica de las cepas (Alves *et al.*, 2006). Por los resultados bioquímicos obtenidos, se pueden clasificar a las cepas M, NM y C como *K. oxytoca*, pero se requiere de una prueba molecular para corroborar dicha clasificación debido a la variabilidad de los resultados obtenidos con los reportados en la literatura.

Optimización de extracción de ADN genómico

Ya teniendo la identificación de las muestras M, NM y C como *Klebsiella oxytoca*, se procedió a la extracción del ADN genómico. Como se menciona en Metodología, se realizó con el reactivo DNazol; este es específico para ADN genómico y presenta mejores resultados que otros reactivos (Ligozzi & Fontana, 2003). No se utilizó un kit con purificación en columna, porque los volúmenes de resuspensión son muy bajos y para enviar a secuenciar por SMRT se requieren mínimo 100ul (Fishbain, Sinyavskiy, Riederer, Hujer, & Bonomo, 2012; Guo *et al.*, 2015). Se realizó la primera extracción a partir de colonias aisladas en medio MacConkey basado en el protocolo de DNazol ((ThermoFisher, 2016). Se utilizaron 20 colonias pequeñas para la extracción. Los resultados se observan en la Figura 61 y Cuadro 24.

Figura 61. Gel de integridad 0.5% de ADN genómico extraído de *K. oxytoca* (M-mucoso, NM-no mucoso y C-cafetal) corrido a 90V x 60cm por 30 minutos



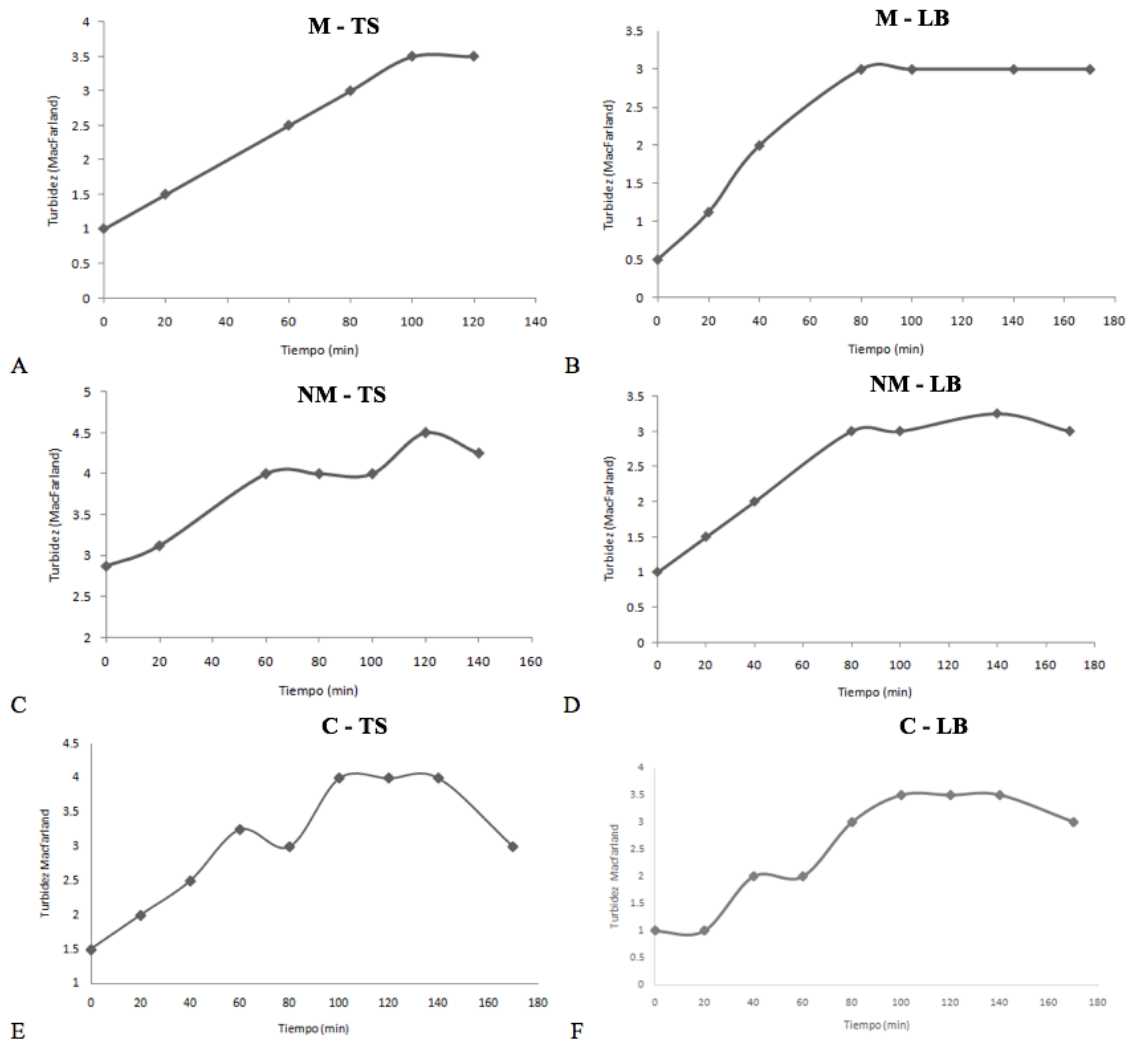
Cuadro 24. Evaluación de la calidad del ADN genómico de la extracción de medio sólido de *K. oxytoca* de fenotipo M (mucoso) y fenotipo NM (no mucoso). Los resultados fueron obtenidos de medición en espectrofotómetro UV-VIS UNICO.

Muestra	<i>K. oxytoca</i> M (mucosa)		<i>K. oxytoca</i> NM (no mucosa)		<i>K. oxytoca</i> C (cafetal)
	1	2	1	2	1
Replica					
Concentración de ADN ($\mu\text{g/ml}$)	9.400	9.979	11.26	6.714	4.679
Pureza (A 260/280)	1.989	1.976	2.005	1.952	1.740
Concentración de proteína ($\mu\text{g/ml}$)	4.835	6.308	4.182	5.689	NA

En la Figura 61, se muestra que la integridad del ADN genómico es la deseada. Se observan dos bandas de ADN genómico en el gel, la que se encuentra en el pozo correspondería a ADN genómico que no migró por su peso molecular y la segunda banda que migró por lo que puede ser ADN genómico o un plásmido. En el Cuadro 24 se obtuvo una concentración entre $6\text{ng}/\mu\text{l}$ y $11\text{ng}/\mu\text{l}$ aproximadamente. La pureza de A269/280 es aproximadamente 2.0 lo que indica que es aceptable, pero presenta contaminación por proteínas. Posiblemente se debe a la cápsula la cual intervino en el proceso de lisis celular ya que se realizó a partir de una colonia en medio sólido. Para evitar dicha contaminación se descartó la opción de extraer de medio sólido y se optó por la de medio líquido. Se realizó una curva de crecimiento de *K. oxytoca* fenotipo M, NM y C en medio LB (Luria-Bertani) y Trypticase de Soya (TS).

Figura 62. Curva de crecimiento de *K. oxytoca* medido con estándares de MacFarland.

A. crecimiento fenotipo M en tripticasa de soya (TS); B. crecimiento de fenotipo M en medio LB; C. crecimiento de fenotipo NM en tripticasa de soya (TS); D. crecimiento de fenotipo NM en medio LB. E. crecimiento de fenotipo C en tripticasa de soya (TS); F. crecimiento de fenotipo C en medio LB



En la Figura anterior (Figura 62) se observan los resultados de la curva de crecimiento de *K. oxytoca* fenotipo mucoso, fenotipo no mucoso y C de cafetal en medio LB y Tripticasa de Soya. La curva de crecimiento se asemeja más a la Función Logística en comparación a la Ley de Crecimiento Natural (Figura 22 en Metodología). Esas gráficas y ecuación pronosticadas (Figura 22) fueron realizadas por Jeffrey Flores y Boris Llamas en la clase de Ecuaciones Diferenciales de la Universidad del Valle de Guatemala. Esto se debe a que, según la ecuación de la Función Logística, esta toma en cuenta la limitación de nutrientes, mientras que la Ley de Crecimiento Natural (según su ecuación, Figura 22 en Metodología) muestra una cantidad de nutrientes constante. A parte, la Función Logística sólo toma en cuenta el factor de nutrientes,

por lo que se recomendaría realizar otra ecuación tomando añadiendo factores tales como aireación (oxígeno), desechos secretados por las bacterias que resultan tóxicos, entre otros.

El fenotipo mucoso (M) en medio tripticasa de soya (Figura 62A) llega a la fase estacionaria luego de 100 minutos, en medio LB (Figura 62B) llega en 80 minutos. El fenotipo no mucoso (NM) alcanza la fase estacionaria en medio tripticasa de soya (Figura 68C) en 120 minutos y en LB (Figura 62D) en 80 minutos. Con estos resultados se determinó que en 60 minutos las bacterias no alcanzan la fase estacionaria por lo que la producción de cápsula va a ser menor (Pöhlmann-Dietze et al., 2000), mejorando así la calidad y pureza de la extracción de ADN genómico. Para la cepa C-cafetal se observó que se dio crecimiento más rápido en medio LB; a los 80 minutos llegó a fase estacionaria (Figura 62F). En cambio, en medio tripticasa soya tarda 100 minutos en llegar a fase estacionaria (Figura 62E). En varios artículos (Angel *et al.*, 2012; Da Silva, De Araújo, Silva, & Guimarães, 2005; Joainig *et al.*, 2010) que trabajaron con *K. oxytoca*, también realizaron curvas de crecimiento:

- En Angel *et al.* (2012), la curva se realizó con densidad óptica a 600nm y se evaluó consumo de glicerol. El tiempo para llegar a fase estacionaria fue de 20 horas.
- En Da Silva *et al.* (2010), la cepa usada llegó a fase estacionaria en aproximadamente 10 horas. El tiempo variaba unos minutos según la concentración de glucosa en el medio.
- En Joainig *et al.* (2010), las bacterias llegaban a fase estacionaria luego de 12 horas. La curva se realizó por *countplateagar* y no medio líquido.

En todos ellos se observa que el tiempo para alcanzar la fase exponencial es mayor al obtenido para la cepa M, NM y C. Se puede concluir que las tres cepas tienen un crecimiento más rápido que otras cepas de *K. oxytoca* estudiadas.

Cuadro 25. Resultados de calidad de ADN genómico extraído con DNazol con y sin tratamiento de lisozima.

La concentración y pureza fue obtenida por Nanodrop espectrofotómetro

Muestra	Concentración ng/μl	Pureza A260/280	Pureza A260/230
M (con lisozima)	60.9	1.87	0.32
NM (con lisozima)	63.7	1.87	0.29
M1 (sin lisozima)	2.7	10.70	0.01
NM1 (sin lisozima)	4.1	5.31	0.01
M2 (sin lisozima)	11.8	1.84	0.36
NM 2 (sin lisozima)	16.4	2.04	0.29
C (con lisozima)	193.8	1.49	0.42
C (sin lisozima)	2.7	4.19	0.42

(Elaboración propia)

En el Cuadro 25, se muestran los resultados en base a una extracción de medio líquido obtenido de la incubación por 60 minutos de una alícuota ON (colonia incubada en medio LB a 37°C por 15 horas) en

medio LB. Los 60 minutos fueron utilizados según la curva de crecimiento discutida anteriormente. Se realizó una prueba con y sin 2mg/ml de lisozima. La lisozima es una enzima con actividad antibacteriana que afecta el peptidoglicano de la pared celular. Por ello, es muy eficiente para bacterias Gram positivo, pero no para Gram negativo debido a que la membrana externa de lipopolisacárido protege al peptidoglicano. Sin embargo, se han realizado modificaciones para utilizar lisozima en bacterias Gram negativo realizando una incubación a 50°C por 20 minutos o a una mayor temperatura por menor tiempo. Otra modificación diferente a la incubación es la adición de un conjugado como un detergente que permitirá la lisis celular (Hisham Radwan Ibrahim, Akio Kato, & Kunihiko Kobayash, 1991). Lo que permite esta enzima es facilitar la lisis celular siendo más efectiva la extracción de ADN genómico en combinación con el DNAzol al ser incubado a 65°C. Según los resultados, tanto para el fenotipo M (mucoso) como NM (no mucoso) y C (cafetal) se obtuvo una mayor concentración de ADN y una mejor pureza con la adición del tratamiento de lisozima al protocolo de DNAzol en comparación con la falta de adición de lisozima. El procedimiento de adición de lisozima se tomó del protocolo *Chromosomal DNA from Borreliae* (Barbour 10/84). A partir de ello, se determinó extraer grandes cantidades de ADN genómico para mandar a secuenciar a MacroGen en Corea. Según las especificaciones de MacroGen, se requiere una mínima cantidad de 16µg de ADN genómico con una pureza A260/280 entre 1.7-2.0 (MacroGen, 2017).

Cuadro 26. Resultados de calidad de ADN genómico extraído con DNAzol con y con lisozima. La concentración y pureza fue obtenida por Nanodrop espectrofotómetro

Muestra	Concentracion ng/µl	Pureza A260/280	Pureza A260/230	Muestra	Concentracion ng/µl	Pureza A 260/280	Pureza A 260/230
M	157.7	1.67	0.83	NM	199.6	1.61	0.82
	146.8	1.71	0.84		178.5	1.69	0.84
	155.5	1.73	0.87		181.5	1.71	0.84
M1	37.5	1.61	0.20	NM1	55.7	1.52	0.28
	34.2	1.68	0.16		42.8	1.70	0.21
	36.6	1.66	0.16		42.4	1.73	0.19
M2 2	102.3	1.48	0.48	NM2 2	79.6	1.63	0.22
	75.8	1.61	0.43		87.5	1.60	0.22
	70.9	1.72	0.39		90.2	1.61	0.22
M3	47.0	1.58	0.19	NM3	31.9	1.86	0.20
	45.5	1.66	0.17		35.9	1.82	0.20
	51.3	1.63	0.17		36.8	1.80	0.18
M4	486.7	1.37	0.45	NM4	78.1	1.73	0.36
	620.3	1.36	0.49		75.0	1.79	0.35
	742.5	1.39	0.42		82.4	1.77	0.33
M5	59.5	2.02	0.37	NM5	60.6	1.52	0.31
	64.5	2.05	0.35		59.0	1.53	0.30
	68.3	2.04	0.34		72.7	1.50	0.30
M6	40.4	1.52	0.29	NM6	58.2	1.64	0.21
	31.8	1.67	0.23		61.3	1.65	0.19
	39.2	1.59	0.25		61.5	1.69	0.17

(Elaboración propia)

Se realizó la extracción de ADN genómico con DNAzol y lisozima a partir de 100ml de cultivo bacteriano luego del transcurso de 1 hora. Por cuestiones de capacidad de de los materiales y los equipos, se tuvo que dividir el volumen bacteriano en 7 diferentes tubos para obtener el ADN genómico. Según el Cuadro 26, para las muestras M (mucoso) no se obtuvo la pureza deseada y sólo en tres se cumplió con la concentración requerida. En el caso de NM (no mucoso) las concentraciones de ADN genómico eran muy bajas para mandar a secuenciar y la pureza A260/280 era muy baja indicando contaminación con reactivos como fenoles (In *et al.*, 2009), estos pueden afectar en la secuenciación del genoma (Geneaid, 2017; ThermoFisher Scientific, 2017). Debido a ello, se descartaron estas muestras y se prosiguió con la optimización del proceso para extraer una mayor cantidad de ADN.

Cuadro 27. Resultados de la segunda prueba de extracción de ADN genómico en mayor concentración.

La cuantificación de ADN fue realizada con el QuantiFluor Promega. En el gel de integridad 0.5% se corrió a 50 voltios x 60cm y se cargaron 1ug de ADN genómico en cada pozo. E es la escalera de 1kpb NOVAGEN Perfect DNA ladder

Muestra	Concentración ng/ul	Gel de integridad
M – gancho	8.88	
NM – gancho	20.2	
M – botón celular1	66.3	
NM – botón celular1	Más bajo que el blanco	
M – botón celular2	46.0	
NM – botón celular2	Más bajo que el blanco	
C - gancho	227.0 (Pureza A _{260/280} es 1.863)	

En el Cuadro 27 se muestran los resultados para la extracción de ADN genómico purificado como botón celular y con gancho. El referirse al gancho es una forma de hacer un garfio con una pipeta Pasteur y lentamente recolectar el ADN genómico (esto se realiza enrollando el ADN al gancho). Con el botón celular se pueden precipitar impureza, pero con el gancho el ADN sale más puro que es el objetivo de este proceso para poderlo secuenciar. Las muestras ADN que se obtuvieron con botón celular se descartaron ya que podían contener contaminación, a parte unos de los resultados de botón celular obtuvieron una baja concentración de ADN (más bajo que el blanco según lo indicado en el QuantiFluor). En el gel de integridad se utilizaron ADN's genómicos extraídos con el gancho. Para M-mucoso, NM-no mucoso y C-cafetal en el gel de integridad salen sin degradación (sin barrido), sin embargo, la concentración de ADN no es la adecuada siendo menor a 50ng/ul. Por otra parte, para C-cafetal la concentración es de aproximadamente de 230ng/ul con una pureza de 1.863 que es la ideal ya que cumple con los requerimientos estipulados por Macrogen. método

Cuadro 28. Concentración y pureza de ADN genómico de mucoso-M y no mucoso-NM utilizando 4 diferentes métodos.

Método A corresponde a medio líquido ON con DNAzol; **método B** es cultivo líquido ON con DNAzol y lisozima; **método C** son colonias de medio sólido MacConkey con DNAzol; y **método D** son colonias de medio sólido con DNAzol y lisozima.

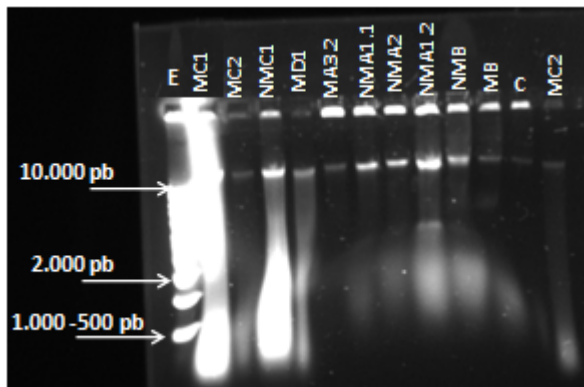
Muestra	Metodo	Concentracion ng/ull	Pureza A260/280	Volumen ul
MC1	C	49.79	2.166	300
MC2	C	62.20	1.722	400
NMC1	C	82.28	2.291	300
NMC2	C	8.16	3.869	200
MD1	D	78.49	1.794	200
MA3.2	A	51.40	2.062	500
NMA1.1	A	86.89	1.801	400
MA3	A	33.67	1.829	400
MA2	A	9.63	1.755	400
NMA2	A	53.38	1.978	400
NMA1.2	A	107.1	1.814	500
MA2.2	A	27.94	1.672	500
MA1	A	15.81	1.294	200
NMB	B	102.8	1.942	500
MB	B	179.9	1.922	500

(Elaboracion propia)

Se realizó una repetición de extracción optimizando el protocolo de DNAzol para M y NM: el método A es la extracción de ADN a partir de un ON (medio líquido) con DNAzol; método B es a partir de ON con lisozima 2mg/ml y DNAzol; método C es a partir de colonias de *K. oxytoca* en medio MacConkey con DNAzol; y el método D es a partir de colonias en medio MacConkey con DNAzol y lisozima 2mg/ml. Se realizó este experimento con el fin de comparar la calidad de ADN extraído (concentración y pureza) de los cuatro métodos. En el Cuadro 28 se observó que por concentración de ADN genómico y pureza se descartaron las muestras con una concentración menor a 50ng/ul y una pureza A 260/280 que no se encontrara dentro del rango solicitado por MacroGen (MacroGen, 2017) 1.7 a 2.0. Las muestras aceptadas fueron cargadas en el gel de integridad que se muestra a continuación.

Figura 63. Gel de integridad 0.5% corrido a 50 voltios x 60cm por 1.5 horas.

Método A corresponde a medio líquido ON con DNazol; **método B** es cultivo líquido ON con DNazol y lisozima; **método C** son colonias de medio sólido MacConkey con DNazol; y **método D** son colonias de medio sólido MacConkey con DNazol y lisozima. E es la escalera de 1kpb NOVAGEN Perfect DNA ladder



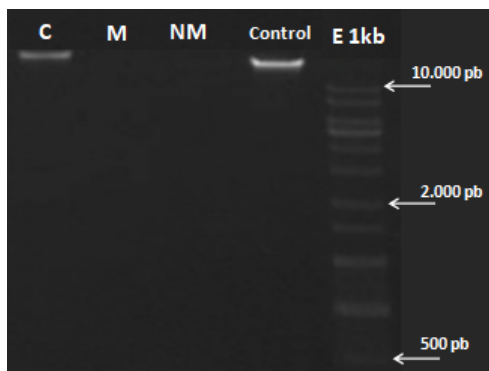
En la Figura 63 se muestra el gel de integridad que corresponde al Cuadro 29. En el gel se muestran en los pozos (2, 3, 4, 5, 9, 10 y 13) un barrido que indica degradación de ADN (Geneaid, 2017; ThermoFisher Scientific, 2017) y los otros pozos donde las bandas de ADN son tenues. Las muestras aceptadas para enviar a secuenciar por SMRT a Macrogen fueron el pozo 7 (método A para NM-no mucoso (NMA1.1)) y pozo 11 (método B para M- mucoso (MB)). Se concluye que los mejores métodos según la concentración, pureza e integridad del genoma eran de una extracción de medio líquido (ON a 37°C). La muestra NM resultó mejor sin lisozima en comparación con M que resultó mejor con lisozima) (Gosiewski *et al.*, 2014).

Cuadro 29. Comparación de la concentración y pureza del ADN extraído, y las muestras que llegaron a Macrogen Corea en el transcurso de 4 – 5 días.

Muestra	Muestra al salir de la Universidad		Muestras al llegar a Macrogen	
	Concentración ng/μl	Pureza 260/280	Concentración ng/μl	ADN μg
NM con método A	86.89	1.801	1.702	0.502
M con método B	179.9	1.922	1.582	0.546
C	~300	1.896 1.858	26.00	5.20

(Elaboración propia)

Figura 64. Gel de 1%, cargaron 1ul de ADN genómico recibido, corrido a 100 voltios, cargaron 0.5ul de muestra y utilizaron escalera de 1kb.

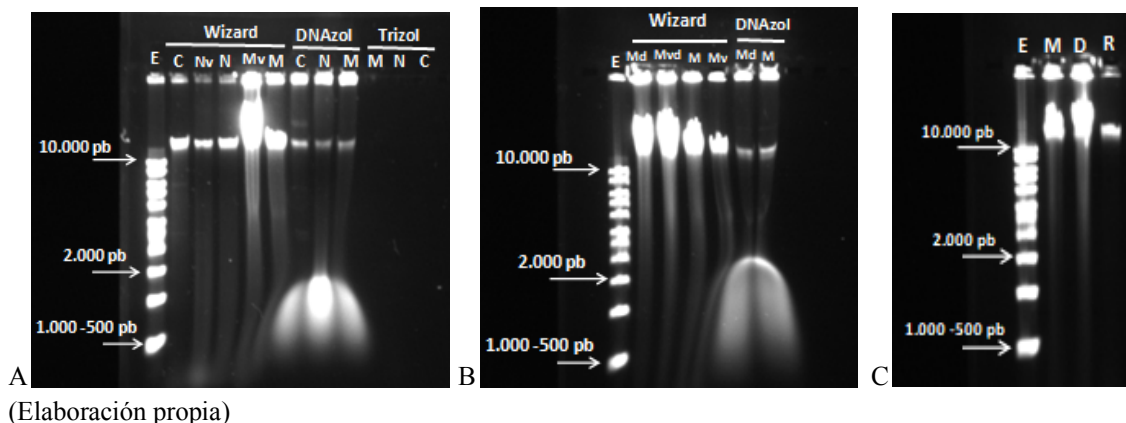


Según el Cuadro 29 y Figura 64, se concluye que el ADN se degradó al ser transportado desde las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala hasta Macrogen, Corea. Posiblemente por la temperatura del ambiente hubo una activación de las nucleasas por lo que estas degradaron el ADN en el transcurso de 4 días (Geneaid, 2017; ThermoFisher Scientific, 2017). En el gel debido a que se cargó muy poca muestra no se puede definir si hay presencia de barrido por degradación de nucleasas o por otras razones. Por ello, se tomó como si la muestra hubiera sido degradada por nucleasas para poder aplicar diversos tratamientos con el fin de desactivarlas.

Como solución, se realizó una extracción de ADN genómico por tres métodos diferentes: DNAzol con lisozima y proteinasa K; Wizard Genomic Purification Kit Promega® para ADN genómico; y Trizol® para ADN. La proteinasa K se adicionó junto con la lisozima ya que del envío anterior se sospecha de degradación de ADN genómico por nucleasas. La proteinasa K es una serina proteasa que degrada diversas proteínas en su estado nativo cortando aminoácidos en su cadena lateral si esta es un sulfúrico, anillo aromático y c-terminal de sitios hidrofóbicos (BioLabs, 2017b; Takara, 2017). Esta enzima incluso puede actuar en presencia de detergente y de buffers con EDTA. Esta proteína es muy utilizada en biología molecular para la limpieza de reacciones enzimáticas parando la reacción al hidrolizar los enlaces peptídicos de la enzima; y también para lisis celular (BioLabs, 2017b; SIGMA-ALDRICH, 2017b). Este tiene un pH óptimo de 7.5 a 8.0. También si se trata de incubaciones muy largas se puede autodigerir por lo que no sería una fuente de contaminación al extraer el ADN genómico (SIGMA-ALDRICH, 2017b). Tiene una actividad óptima entre 20-60°C por lo que se puede incubar a altas temperaturas al igual que la lisozima para obtener mejores resultados en la extracción de ADN genómico (BioLabs, 2017b; SIGMA-ALDRICH, 2017b). A las muestras de DNAzol al agregar el buffer TE para resuspender el ADN, se realizó una incubación a 65°C por una hora y a 80°C por 10 minutos para desactivación de nucleasas. Usualmente a 65°C se desnaturalizan, pero en ciertos casos se da la presencia de enzimas resistentes por lo que se incubó a 80°C (BioLabs, 2017a; Lundin *et al.*, 2015; Sun, Huang, Qi, Qiu, & Dai, 2015).

Figura 65. Geles de integridad de ADN genómico 0.5% corrido a 50 voltios x 60cm por 1.5 horas.

A. Gel de integridad que compara los diferentes métodos de extracción realizados (DNAzol con lisozima y proteinasa K; Wizard; y Trizol). B. Gel de integridad del ADN genómico sometido a una simulación de viaje por 4 días. C. Gel de integridad de ADN genómico comparando el Wizard que fue sometido a la simulación de viaje por 4 días con la alícuota que permaneció a 4°C durante ese tiempo. Escalera 1kpb NOVAGEN Perfect DNA ladder.



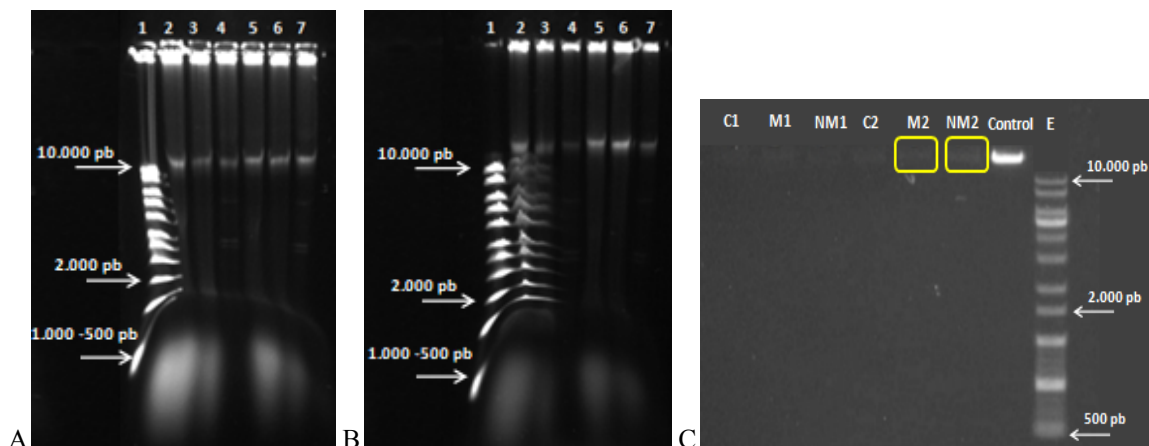
Cuadro 30. Concentración y pureza de ADN obtenidas en la optimización de extracción de ADN genómico de *Klebsiella oxytoca* de la cepa C-cafetal.

Extracción	Medio de cultivo	Tratamientos	Concentración (ng/ul)	A _{260/280}	A _{260/230}	
		DNAzol	410.000	2.060	1.150	
5	LB líquido	comparación	Wizard	710.000	1.960	0.035
		Trizol	32.900	1.450	1.340	
6	LB líquido	comparación	DNAzol	609.300	1.75	no se midió
		Wizard	466.000	1.81	no se midió	
7	LB líquido	lisozima, ARNasa y proteinasa K	128.650	2.029	no se midió	

En las extracciones 5 y 6 (Cuadro 30), se compararon otros reactivos y kits para determinar si había diferencia y era recomendable cambiar el reactivo o método de extracción del ADN genómico. En cuanto a concentración de ADN, se obtuvo mayor cantidad con Wizard (710 ng/ul), seguido de DNAzol (410 ng/ul), y por último Trizol (32.9 ng/ul). Según los resultados de las tres diferentes extracciones (figura 65-A) se pudo determinar que no se logro obtener ADN genómico con Trizol, sin embargo con Wizard y DNAzol (modificado) sí. En Wizard según el protocolo utiliza vortex, pero debido a que el ADN genómico es delicado se realizó una prueba con vortex y otra sin vortex. Mv, Nv corresponden a los tubos Wizard de los cuales se extrajo con vortex y los tubos sin “v” de Wizard son los que no se aplicó el vortex. Para C no se realizó la prueba con vortex, solo sin vortex para evaluar su integridad al finalizar la extracción. Como siguiente paso se realizó la prueba de simulación de envío del paquete con alícuota de ADN genómico M-mucoso (como prueba) (figura 65-B) de: Wizard sin vortex con DNASTable Plus (M), Wizard sin vortex y con DNASTable Plus (Md), Wizard con vortex sin DNASTable Plus (Mv), Wizard con vortex y DNASTable Plus (Mvd), DNAzol con DNASTable Plus (Md) y DNAzol sin DNASTable Plus (M). El DNASTable Plus es un reactivo utilizado para que el ADN pueda mantenerse a temperatura ambiente sin ser degradado (Biomatrica, 2013). La simulación del envío duró 4 días con una temperatura interna de 16°C aproximadamente y una externa entre 28 a 32°C y con 10 paquetes de hielo en una caja de duroport. Como resultado (figura 65-B) se observa que hay un barrido en las muestras de Wizard indiferentemente del vortex/sin vortex y; con o sin DNASTable Plus. Para una mejor visualización de los resultados se corrió un gel de integridad (figura 65-C) comparando una muestra de ADN genómico extraído con Wizard sin vortex que estuvo a 4°C durante los 4 días (R), Wizard sin DNASTable (M) y Wizard con DNASTable (D). En dicho gel se observa que un barrido en las muestras de Wizard que estuvieron los 4 días en la simulación siendo diferentes a la que permaneció a 4°C. En cambio, las muestra de DNAzol permanecieron casi igual luego del transcurso de los 4 días, por lo que la proteinasa K funcionó desactivando las nucleasas evitando la degradación del ADN genómico. En ese punto uno recomendaría cambiar el método usar el kit Wizard. Sin embargo, se usó el ADN extraído con Wizard para realizar un PCR y se observó degradación del ADN. Se descartó usar ese kit para la extracción, porque el ADN no podría ser utilizado después para secuenciación y rep-PCR. Esto re-confirmó la elección inicial de utilizar DNAzol para la extracción. A partir de ello, se decidió que la mejor técnica para enviar a secuenciar en con DNAzol modificado (con tratamiento con lisozima y proteinasa K e incubación a 65°C y 80°C), por otra parte, se observa una nube debajo de las muestras de DNAzol que corrieron. Por ello, se aplicó adicionalmente a la siguiente extracción, un tratamiento con RNAasa para eliminar el ARN como contaminante.

Figura 66. Geles de integridad ADN genómico previo y posterior al envío a Macrogen Corea.

A. Gel de integridad de ADN genómico 0.5% a 50 voltios x 60 cm por 1.5 horas antes de incubación a 80°C. **B.** Gel de integridad de ADN genómico 0.5% a 50 voltios x 60cm por 1.5 horas después de incubación a 80°C. **C.** Gel de integridad 1% a 100 voltios, cargaron 0.5ul de ADN genómico recibido con una escalera de 1kb NOVAGEN Perfect DNA ladder.



(Elaboración propia)

Cuadro 31. Resultados de la calidad de ADN genómico luego de la extracción con DNazol, lisozima, proteinasa K, ARNasa y tratamiento a 65°C y 80°C para eliminación de nucleasas.

Muestra	Concentración (ng/μl)	Concentración (ng/μl) con DNastable Plus	Pureza A 260/280	DNA (μg)	Volumen (μl)
M1	383.5	306.8	2.0	134.2	437.5
NM1	318.9	255.1	2.0	111.6	437.5
M2	262.8	No aplica	1.9	92.0	350.0
NM2	230.5	No aplica	1.9	80.7	350.0
C1	260.63	208.5	2.1	91.22	437.5

(Elaboración propia)

En la Figura 66 se observan los resultados de la extracción de ADN genómico con los diversos tratamientos anteriormente mencionados. En el Cuadro 31 se presentan los resultados correspondientes a los geles de arriba (Figura 66 A-B) La concentración se encuentra entre lo aceptado por Macrogen y la cantidad de ADN también. A pesar de los tratamientos con ARNasa se siguió observando en el gel de

integridad (Figura 66A) un nublado al final donde se sospecharía de presencia de etanol. Por ello se realizó un proceso de evaporación del etanol incubando a 80°C los tubos eppendorf con la tapadera abierta por una hora. Como resultado de esa evaporación se obtuvo el segundo gel de integridad (Figura 66B) donde la intensidad del nublado al final del gel disminuyó pero no se logró eliminar. A pesar de ello, estas fueron las muestras que se les añadió DNASTable Plus y se enviaron a MacroGen Corea. Los resultados que reportó MacroGen (Figura 66C) mostraron que no había presencia de ADN genómico y que tanto el volumen como la concentración de este disminuyeron significativamente. Sin embargo, en la Figura 66C se muestra una leve presencia de bandas en el gel correspondientes a la muestra Mucoso 2 (M2) y No mucoso 2 (NM2). Con ello, surgió la hipótesis de que el ADN debido al trayecto de 4 días que realiza y en el avión donde varía la temperatura este pudo congelarse y quedarse pegado en los tubos. Ya que no se muestra un barrido en el gel, esto significa que no se degradó el ADN genómico sino que este se quedó congelado a las paredes del tubo. Como solución, se optó por realizar una nueva extracción de ADN genómico de M y NM y mandar a secuenciar a Genewiz de Estados Unidos y por Illumina Miniseq en el laboratorio de la Dra. Dalia Lau-Bonilla en Guatemala.

Extracción final de ADN genómico y comparación para determinación de presencia o ausencia de plásmidos

Cuadro 32. Resultados de extracción para mandar a secuenciar a Genewiz en Estados Unidos y por Illumina MiniSeq en Guatemala. Resultados obtenidos del Nanodrop Spectrophotometer.

Muestra	Concentración (ng/μl)	Concentración con DNASTable Plus (ng/μl)	Pureza A 260/280	DNA (μg)	Volumen (μl)
M	136.6	109.28	2.01	40.98	375
NM1	142.35	113.88	2.21	42.71	375
NM2	152.7	122.16	2.14	45.81	375
C2	208.5	194.60	1.86	72.98	375

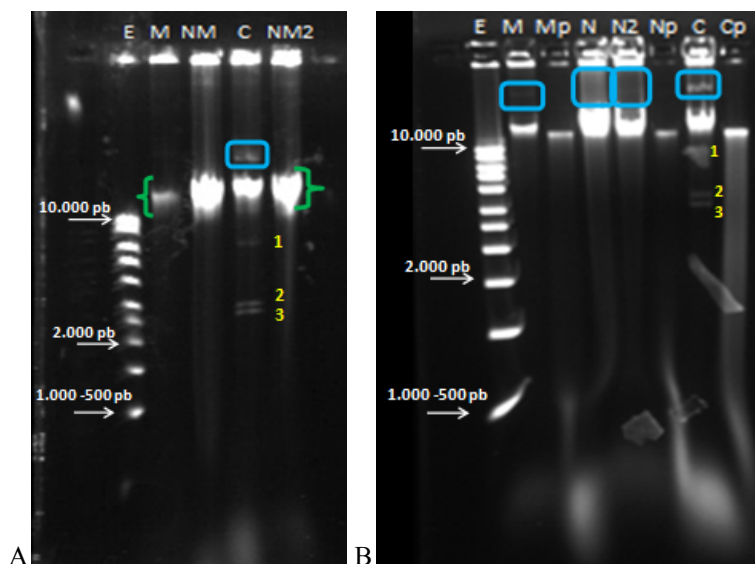
(Elaboración propia)

En el Cuadro anterior (Cuadro 32) se muestra los resultados de la extracción realizada. Se puede observar que la concentración reportada es alta para poder mandar a secuenciar a Estados Unidos. Sin embargo, la pureza no es la óptima, sin embargo sigue siendo aceptable. Esto puede deberse a la presencia de proteína que se encontraba junto con el ADN al realizar el gancho. La diferencia entre NM1 y NM2 es que para la primera se partió de un volumen de 4ml de cultivo ON ya que el crecimiento de este es más lento en

comparación con el M y C. En cambio para el NM2 se aplicó el mismo protocolo que para M y C. Según los resultados se puede decir que al aumentar la cantidad de muestra inicial la pureza y calidad de extracción se ve afectada. Por lo que el máximo de volumen recomendado para esta extracción según SOP 2:2 es 2ml. Estas muestras son las que se mandaron al laboratorio de Berkeley Estados Unidos para que con la colaboración del Dr. Javier Ceja realizaran una muestra de calidad para poder secuenciar en Genewiz.

Figura 67. Gel de integridad de ADN genómico y su comparación con la extracción de plásmidos.

A. gel de integridad sin los plásmidos a 0.5% corrido a 50 voltios x 60cm por 1.5 horas. B. gel de integridad de 1% de ADN genómico con plásmidos corrido a 50 voltios x 60cm por 1.5 horas. Mp corresponde a extracción de plásmidio de mucoso, NMP a extracción de plásmido no mucoso y Cp a extracción de plásmido cafetal. Escalera de 1kpb NOVAGEN Perfect DNA ladder.



(Elaboración propia)

En los gels de arriba el primero (Figura 67A) corresponde al gel de integridad del ADN genómico del Cuadro 33. En los corchetes verdes se observan bandas que se sospechaba que correspondían al ADN genómico de *Klebsiella*. Sin embargo, en el cuadro celeste se observa otra banda que migra hacia donde está la banda en corchetes lo que hace que se sospeche que es el ADN genómico que migra. Por ello se decidió aumentar la concentración del gel a 1% con el fin de determinar si es plásmido o ADN genómico la banda entre corchetes. Para ello simultáneamente se corrió con la extracción de plásmido (Figura 67B). En ese gel se observan bandas entre el pozo y la banda “sospechosa” por lo que se cree que esa banda no es plásmido como se creía desde la figura 61. Al secuenciar se pudo determinar que esa banda corresponde a ADN genómico y no plásmido. En los pozos correspondientes a la extracción de plásmido sólo se observa una banda que podría ser de ADN genómico por lo que el kit no realizó una extracción adecuada de plásmido.

Por otra parte, según el otro objetivo de este trabajo era determinar ausencia o presencia de plásmidos en las diferentes cepas de *Klebsiella*. En los dos geles (Figura 67) en la cepa C, se observó la presencia de tres plásmidos. Mientras que en las cepas trabajadas hay ausencia de estas. Por lo que se concluye que estas cepas carecen de plásmidos y que tanto M y NM son diferentes a C. Según el Cuadro 33, sobre análisis de las bacterias por el Laboratorio Clínico DIRAD, se observó en las tres cepas (M, NM y C) que corresponden a *K. oxytoca* y que muestran resistencia sólo a ampicilina. Esta resistencia posiblemente se encuentra en el ADN genómico ya que las tres cepas lo tienen indiferentemente de la presencia o no de plásmidos. Por lo que los plásmidos de la cepa C le otorgan otras características.

Cuadro 33. Análisis de identificación de las bacterias y de susceptibilidad o resistencia a antibióticos realizado en el Laboratorio Clínico DIRAD por la Dra. Dalia Lau.

<i>Klebsiella oxytoca</i> M (Mucoso)	Ampicilina 16 R Piperacilina/Tazobactam<=4 S Cefazolina<=4 S Cefoxitina<=4 S Ceftazidima<=1 S Ceftriaxona<=1 S Cefepima<=1 S Ertapenem <=0,5 S	Imipenem <=0,25 S Amicacina<=2 S Gentamicina <=1 S Ciprofloxacino <=0,25 S Levofloxacino <=0,12 S Tigeciclina<=0,5 S Nitrofurantoína 32 S Trimetoprima/Sulfametoxazol<=20 S
<i>Klebsiella oxytoca</i> NM (No mucoso)	Ampicilina 16 R Piperacilina/Tazobactam<=4 S Cefazolina<=4 S Cefoxitina<=4 S Ceftazidima<=1 S Ceftriaxona<=1 S Cefepima<=1 S Ertapenem <=0,5 S	Imipenem <=0,25 S Amicacina<=2 S Gentamicina <=1 S Ciprofloxacino <=0,25 S Levofloxacino <=0,12 S Tigeciclina<=0,5 S Nitrofurantoína 32 S Trimetoprima/Sulfametoxazol<=20 S

Continuación Cuadro 33. Análisis de identificación de las bacterias y de susceptibilidad o resistencia a antibióticos realizado en el Laboratorio Clínico DIRAD por la Dra. Dalia Lau.

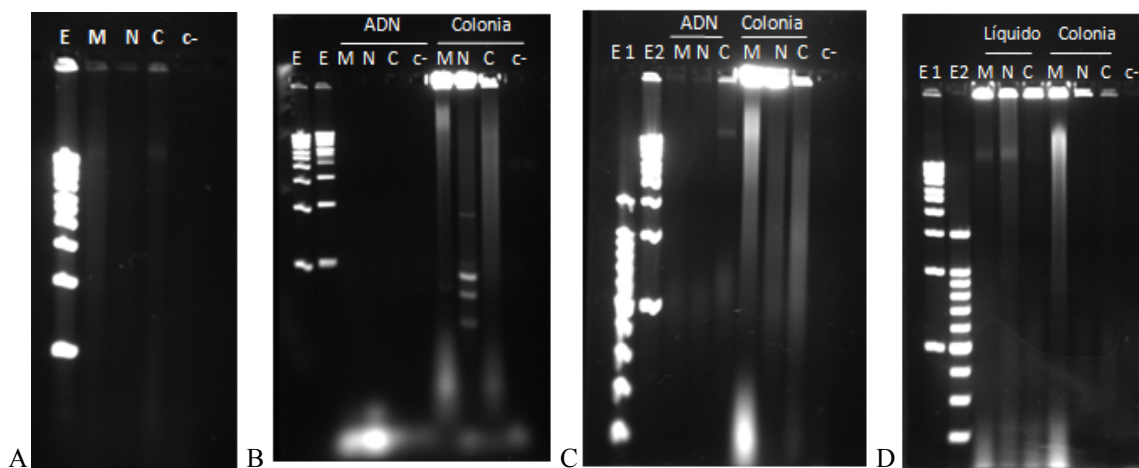
<i>Klebsiella oxytoca</i> C (cafetal)	Ampicilina 16 R	Imipenem <=0,25 S
	Piperacilina/Tazobactam<=4 S	Amicacina<=2 S
	Cefazolina<=4 S	Gentamicina <=1 S
	Cefoxitina<=4 S	Ciprofloxacino <=0,25 S
	Ceftazidima<=1 S	Levofloxacino <=0,12 S
	Ceftriaxona<=1 S	Tigeciclina<=0,5 S
	Cefepima<=1 S	Nitrofurantoína 32 S
	Ertapenem <=0,5 S	Trimetoprima/Sulfametoxazol<=20 S

(Elaboración por Laboratorio Clínico DIRAD)

BOX PCR: Huella de identificación genética para cepas de *Klebsiella oxytoca*

Figura 68. Pruebas de BOX-PCR con variaciones de concentración de ADN genómico y de pruebas con cultivos ON en LB y colonia.

A. BOX-PCR con 50ng/μl de ADN. B. 10ng/μl de ADN y PCR de colonia en medio MacConkey. C. BOX-PCR de 35ng/ul de ADN y PCR de colonia en medio MacConkey. D. BOX-PCR de colonia en medio MacConkey y medio líquido ON en LB. Escalera de 1kpb NOVAGEN Perfect DNA ladder. Gel de electroforesis 1.5% agarosa corrido a 75V x 60cm.



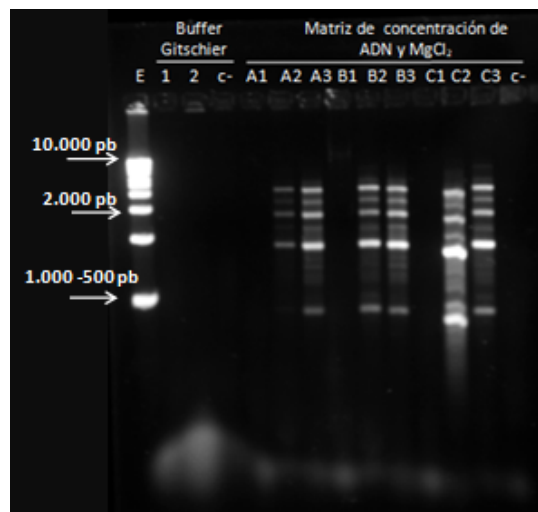
(Elaboración propia)

Otro objetivo de este trabajo era optimizar y realizar una prueba costo-efectiva biomolecular para la caracterización de cepas de *Klebsiella*. Para ello se utilizó el BOX-PCR que amplifica las secuencias de los genes BOX (boxA-C) que se encuentran de forma intergenética en el genoma (Bruijn, Lupski, & Weinstock, 1998; Chang Bioscience, 2004; Marques, Marchaison, Gardan, & Samson, 2008; Olive & Bean, 1999). La diferencia del tamaño de estas secuencias y su localización generan un patrón característico como una huella digital que ayuda a caracterizar diferentes cepas bacterianas de la misma especie. En la figura 68A, se observa la primera prueba de PCR según lo recomendado por el Dr. Javier Ceja del Laboratorio de Berkeley, Estados Unidos. Como se puede observar, no hubo amplificación en el PCR sino que solo presencia de ADN en los pozos lo que indicaría que la reacción se saturó y no se pudo llevar a cabo. En el siguiente paso la concentración se disminuyó a 10ng/μl y se decidió realizar simultáneamente un PCR de colonia (Figura 68B). Como resultado no hubo amplificación en los pozos correspondientes a ADN genómico y en los de colonia se saturó la reacción por lo que no amplificó, sin embargo en el N (que corresponde a NM) se observan unas bandas que podrían ser el patrón. Se decidió aumentar la concentración de ADN genómico en un intermedio entre 10ng/μl y 50ng/μl (Figura 68C). Como resultado tampoco se vio amplificación en el ADN genómico y en el colonia se saturó la reacción por lo que no amplificó. Con ello, se decidió no utilizar ADN genómico sino que probar con medio líquido de un cultivo ON (Figura 68D). El resultado fue lo mismo que en los otros geles, no se obtuvo presencia de bandas, sólo saturación de la reacción por una alta concentración de ADN en los pozos.

A partir de estas variaciones y sin tener un resultado positivo, se decidió analizar la temperatura de fusión (T_m por sus siglas en inglés) del primer utilizado en este proyecto (CTACGGCAAGGCGACGCTGACG). Se calculó el T_m del primer según la página de Promega que utiliza Green GoTaq Master Mix o Colorless GoTaq Master Mix (Promega, 2017), que es lo que se está utilizando en este trabajo. Como resultado se obtuvo que el porcentaje de CG's es de 68% y el T_m de 73°C (Promega, 2017). Debido a la alta concentración de CG's el T_m resulta alto. A partir de ello surgió realizar variaciones de concentración de ADN genómico, concentración de cloruro de magnesio y replicar el procedimiento de un artículo que utiliza el buffer Gitschier para un BOX-PCR de *Klebsiella* y que obtuvo resultados positivos (Ayin, M., Schlub, Yasuhara-Bell, & Alvarez, 2015).

Figura 69. Prueba de diferentes variaciones para optimización del BOX-PCR con la cepa M (mucoso).

Se replicó el PCR del artículo de Ayin y colaboradores (2015) utilizando el buffer Gitschier y se realizó una matriz vaciando concentraciones de ADN. A corresponde 5ng/ul, B a 10ng/ul y C a 20ng/ul) y MgCl₂ (1 corresponde a 1.5mM, 2 a 7.5mM y 3 a 10mM de concentración de cloruro de magnesio). Escalera de 1kpb NOVAGEN Perfect DNA ladder. Gel de electroforesis 1.5% agarosa corrido a 75V x 60cm.

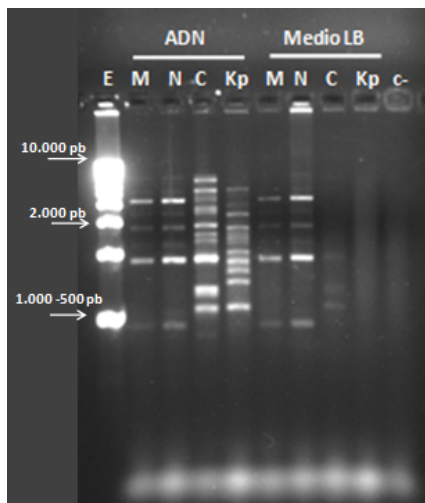


(Elaboración propia)

Se corrió un PCR con variaciones de concentración de ADN y de cloruro de magnesio utilizando una temperatura de anillamiento de 60°C en vez de 54°C (según el protocolo del Dr. Javier Ceja). Como resultado (Figura 69) no hubo presencia de patrón de bandas ni en el 1 que corresponde a ADN genómico y 2 que corresponde a medio LB ON. Cabe resaltar que ese PCR dura alrededor de 7 horas y al finalizar se encontraron los tubos derretidos con un poco del producto. Por lo que para aplicarse a futuro, no es recomendable replicar dicho protocolo. Para la matriz sí se lograron obtener bandas de patrón para la cepa M (mucosa). Estos patrones se lograron al añadir una concentración extra de cloruro de magnesio a la reacción de PCR. El cloruro es un cofactor de la ADN polimerasa lo que permite que funcione. Cuando la polimerasa se va a unir a la hebra de ADN para la replicación, esta requiere de iones de magnesio para poder remover los protones de hidrógenos del azúcar de los nucleótidos (University of Washington, 2004). El cloruro de magnesio aparte de ser importante por ser un cofactor del la polimerasa, sus variaciones de concentración modifican la amplificación en un PCR afectando la especificidad y sensibilidad de la reacción. Una alta concentración de este aumenta la eficiencia de la amplificación en el PCR, sin embargo se reduce la especificidad de este. Cuando la concentración es baja, la especificidad es alta, pero el producto de PCR es menor (Schmidt, Stiverson, Angen, Yu, & Schmidt, 2014). Debido a que el primer utilizado no es específico para *Klebsiella*, pudieron obtener amplificaciones al aumentar la cantidad de cloruro de magnesio.

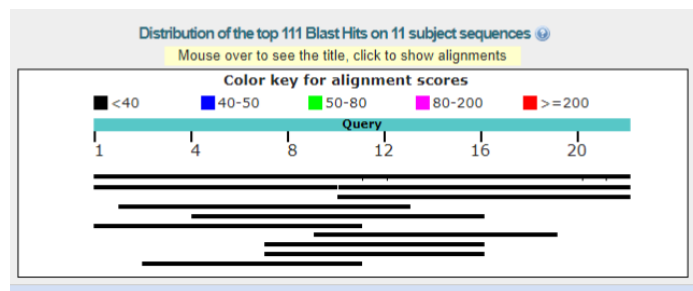
A partir de la matriz se escogió la combinación de concentración de ADN y de cloruro de magnesio con las concentraciones de 10ng/μl y 7.5mM respectivamente. Se confirmó que el reactivo limitante era el cloruro de magnesio y no la cantidad de ADN agregada.

Figura 70. Comparaciones de patrones de bandas del BOX-PCR para cepas M, NM, C y Kp (*Klebsiella pneumoniae*) de ADN y de medio líquido LB de un ON a 37°C. La escalera utilizada es de 1kpb NOVAGEN Perfect DNA ladder. Gel de electroforesis 1.5% agarosa corrido a 75V x 60cm.



Se realizó otro BOX-PCR para comparar las diferentes cepas de *Klebsiella oxytoca* obtenidas de *C. capitata* (M, NM y C) y *K. pneumoniae* de *A. ludens* donada por la Dra. Dalia Lau. Este BOX-PCR fue generado según lo concluido de los resultados de la Figura 70. Se puede ver en la Figura 70 que el patrón de bandas de M y N (NM) es idéntico por lo que se concluye que se trata de la misma cepa bacteriana. A partir de esto se escogió la cepa M para realizar la secuenciación. También se puede ver que hay tres diferentes patrones de bandas entre M-NM, C y Kp. Entre Kp y las otras cepas se esperaba debido a que esta es un *K. pneumoniae* y las otras según las pruebas bioquímicas son *K. oxytoca*. Por otra parte, la diferencia entre M-NM y C es marcada lo que muestra que puede ser que bioquímicamente correspondan a *K. oxytoca*. Para M y NM se observan 7 bandas definidas. La muestra C tiene un patrón distinto, es decir, es una cepa distinta, se observan 10 bandas. El número de bandas obtenido para la cepa C concuerda con los resultados obtenidos en un PCR in silico (Figura 71). Para determinar si se trata de *K. oxytoca* u otra especie se debe secuenciar y analizar el genoma de estas cepas para tener una información concluyente. En la sección de microbiología de estos resultados, se mencionó que en estudios encontraron que cepas de *Klebsiella* que bioquímicamente se clasifican en una especie, molecularmente se encuentran dentro de otra, por lo que es difícil realizar la clasificación de este género (Alves *et al.*, 2006).

Figura 71. PCR in silico realizado con el primer BOXAIR1 y una secuencia de *Klebsiella oxytoca*.

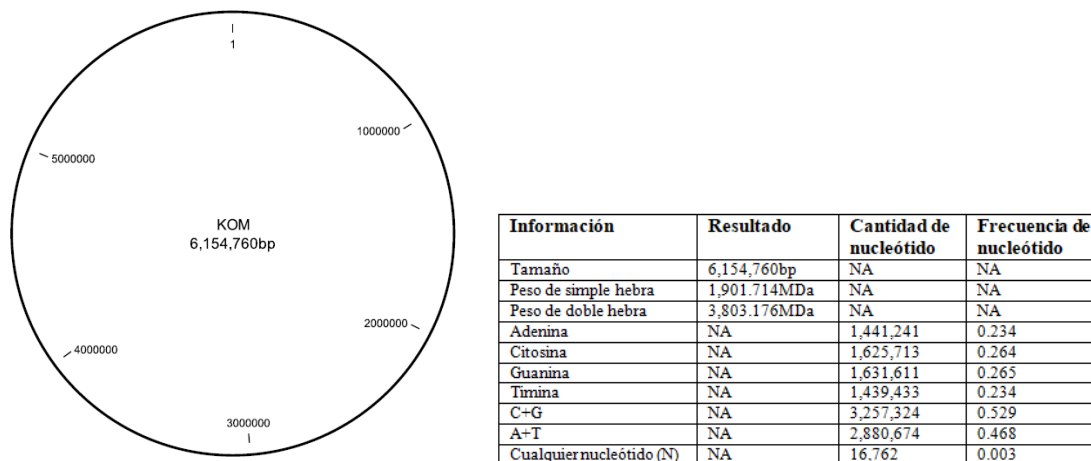


Conforme a esta optimización se realizó un presupuesto del costo de extracción, amplificación y corrida del gel para 10 muestras saliendo en un total de \$92.00 aproximadamente. Para el costo de mano de obra, se asumió que sería realizado por un técnico con sueldo base de Q4000.00 y el 40% extra de prestaciones (aguinaldo, bono 14, vacaciones e indemnización). El cálculo de consumo de energía eléctrica se realizó para el consumo del termociclador, cámara de electroforesis, campana de flujo laminar y congelador. Se usó el costo de Q1.4 por kWh (con los cargos de IVA, cargos fijos y tasa municipal) de la ciudad capital. Se observa que el costo por reacción (\$24.00) es relativamente bajo: menos de \$25 por reacción (sólo en corrida de PCR). Si se compara con un análisis químico de agua que llega a costar \$135, el análisis de bacterias por técnicas moleculares resulta más barato. La identificación por BOX-PCR sí es una opción costo-efectiva que puede ser aplicada por Moscamed para mantener un control de los aislamientos de *Klebsiella* spp. que realizan periódicamente.

Secuenciación del genoma de *Klebsiella oxytoca*

Se hizo una secuenciación de los genomas de la cepa C (cafetal) y de la cepa M (mucosa), no de la NM (no mucosa) debido a que en el BOX-PCR tuvieron el mismo patrón genético concluyendo que son la misma cepa. Las secuencias genómicas fueron analizadas en el programa Bacterial Analysis Pipeline Version 1.0.4 de ILLUMINA (figura 20 en Metodología) donde se realizó un alineamiento con una base de datos del programa (Illumina – MLST (Multilocus Sequence Type)) para determinar la especie a la cual pertenece. Como resultados de este análisis se encontró que el genoma de M pertenece a la especie *Klebsiella oxytoca* con un tamaño de 6,154,760 pares de bases (Figura 72). Como se puede observar, el genoma está compuesto en su mayoría por citocina y guanina que le otorgan mayor estabilidad al genoma por el triple enlace que forman estos nucleótidos en comparación con el doble enlace que forma la adenina con la guanina. Según este programa la cepa M no presenta genes patogénicos. A parte del análisis que realizó el programa al genoma, se realizó un alineamiento del genoma con genes identificados como patogénicos, simbióticos y metabólicos.

Figura 72. Genoma circular de la cepa M (KOM) y su análisis estadístico obtenido del programa CLC sequence viewer al ingresar la secuencia generada por ILLUMINA.



(Elaboración propia en el programa CLC Sequence Viewer)

Para la cepa C también se confirma que es una *Klebsiella oxytoca* según la Figura 73. Se acepta la hipótesis nula 1 que mencionaba que el porcentaje de similitud entre el genoma secuenciado y los ya anotados en bases de datos sería igual o mayor a 95. Las características del genoma de la muestra C son: el tamaño de su genoma es de aproximadamente 352 millones de pares de bases; no presenta genes de virulencia según lo encontrado en *Escherichiacoli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* *Listeria*; y se identificaron 2 replicones de plásmidos con un porcentaje de identidad mayor al 90: Col(MGD2) y Col(Ye4449). El genoma de la muestra C tiene un tamaño diferente a otros genomas ya secuenciados y descritos en artículos (Fouts *et al.*, 2008; T. H. Hazen *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2011; Soler Bistué *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2014). Esto sugiera que se trata de una cepa diferente de *K. oxytoca*. Por ello, se procederá a anotar el genoma en la base de datos NCBI.

Figura 73. Resultados del análisis de la secuencia de la muestra C de *Klebsiella oxytoca* obtenida por MiniSeq de Illumina con la aplicación Bacterial Analysis Pipeline

Basic Statistics

Genome Size (bp)	Number of Contigs	N50 ¹
352229267	3332495	145

¹The N50 value is the size of the shortest contig in the set of longest contigs that together cover at least 50% of the total Genome Size

Species

Klebsiella oxytoca

Multilocus Sequence Type (MLST)

MLST is performed for all species that according to <http://pubmlst.org/data/> have an MLST scheme

Sequence Type: Unknown ST (MLST Scheme: *Klebsiella oxytoca*)²

Gene	%Identity	Alignment Length ³	DB Allele Length	Gaps	Best Match
gapa	100	151	450	0	gapa_10
infb	100	151	318	0	infb_14
mdh	100	151	477	0	mdh_16
pgi	100	151	432	0	pgi_13
phoe	100	151	420	0	phoe_10
rpob	100	151	501	0	rpob_12

Resistance Genes

Resistance genes are identified regardless of the identified species

No resistance genes found

- - - - -

Plasmid Replicons

Plasmid replicons are identified for Enterobacteriaceae and gram positive bacteria

Plasmid replicon	%Identity	DB Allele/Alignment Length	Contig ID	Position in Contig	Note	Accession no.
Col(MGD2)	90.82	136/98	MN00426:4:000H2CV5F:1:12103:5058:17871	10/1/0107 12:00:00 AM		NC_003789
Col(Ye4449)	98.4	194/125	MN00426:4:000H2CV5F:1:123104:12939:4999	10/1/0134 12:00:00 AM		FJ696405

Cuadro 33. Alineamiento de genes involucrados en metabolismo de *K. oxytoca* contra el genoma secuenciado por IUMINA Miniseq de la cepa M. El alineamiento fue realizado con la opción de “poca similitud”. Las filas con una coloración gris son los genes obtenidos como resultado de un criterio de alineamiento de “alta similitud”.

Gen(es)	Tamaño (pb)	Función	Localización	Fuente de la secuencia		Identidad (%)	Acceso	Valor-E	Tamaño alineado
				Organismo	Cepa				
citB citA ltrA ureA ureD	4304 1305	Fermentación de citrato Ureasa	Genoma Genoma	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella</i> spp.	U31464.1 NA	79 82	Query_123473 Query_123472	0 9e-152	2156 451
lacZ	547	Genes de fermentación de lactosa	Genoma	<i>Klebsiella</i> spp.	UIWRF1097	75	Query_123471	4e-74	305
katG	2181	Catalasa	Genoma	<i>Escherichia coli</i>	K-12 substr. MG1655	83	Query_123469	1e-130	407
katE	3466					76	Query_123479	0	1060
malT	2706	Regulador maltosa Operón de maltosa	Genoma	<i>Escherichia coli</i>	K-12 substr. MG1655	78	Query_123470	0	1904
pulA	3291	Pululanosa: degradación de almidón	Genoma	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GXAS-38	89	Query_123474	0	769
pho	1296	Regulación de fosfato, se activan cuando hay escasos de fosfato	Genoma	<i>Enterobacter aerogenes</i>	KCTC 2190	83	Query_123475	0	541
aldA	1440	Aldehído deshidrogenasa	Genoma	Parcial cds para <i>K. oxytoca</i>	ME-UD-3	98	Query_123476	1e-138	268
aldA	1437	Aldehído deshidrogenasa	Genoma	Completo para <i>K. pneumoniae</i>	AB106869	83	Query_123477	3e-76	228
Promotores araFGH y araJ	530	Transporte de arabinosa	Genoma	<i>Escherichia coli</i>	X58969.1	76	Query_123478	1e-17	103

(Elaboración propia en BLAST NCBI)

Cuadro 2. Alineamiento de genes involucrados en simbiosis de *K. oxytoca* contra el genoma secuenciado por ILLUMINA Miniseq de la cepa M. El alineamiento fue realizado con la opción de “poca similitud”. Las filas con una coloración gris son los genes obtenidos como resultado de un criterio de alineamiento de “alta similitud”.

Gen(es)	Tamaño (pb)	Función	Localización	Fuente de la secuencia		Identidad (%)	Acceso	Valor-E	Tamaño alineado
				Organismo	Cepa				
nifA	580	Fijación de nitrógeno	Genoma	<i>Bradyrhizobium huanghualtense</i>	CCBAU 23303	68	Query_166333	2.9	78
nifB, nifH, nifD, nifK	5272	Fijación de nitrógeno	Genoma	<i>Paenibacillus sabinae</i> (secuencia parcial de nifK y completa de las otras)	T27	75	Query_166334	5e-118	471
glnA	1410 937	Glutamina sintetasa	Genoma	<i>Escherichia coli</i>	K-12 substr. MG1655	88	Query_166335	0	1245
ntrA	1935	Genes de regulación de nitrógeno	Genoma	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X03147.1	96	Query_166337	0	1000
celA-E, fixR	12433	Endoglucanasa (degradación de celulosa)	Genoma	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	I38609.1	64	Query_166339	3e-07	187
bglB	1413	Metabolizar beta-glucosidos aromáticos	Genoma	<i>Escherichia coli</i>	K-12 substr. MG1655	73	Query_166338	1e-99	455

(Elaboración propia en BLAST NCBI)

Cuadro 3. Alineamiento de genes involucrados en patogenicidad y resistencia a antibióticos de *K. oxytoca* contra el genoma secuenciado por ILLUMINA Miniseq de la cepa M.

El alineamiento fue realizado con la opción de “poca similitud”. Las filas con una coloración gris son los genes obtenidos como resultado de un criterio de alineamiento de “alta similitud”.

Gen(es)	Tamaño (pb)	Función	Localización	Fuente de la secuencia		Identidad (%)	Acceso	Valor-E	Tamaño alineado
				Organismo	Cepa				
mrkA-E	6836	Biosíntesis de proteínas de fimbrias (pilius)	Genoma	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	M55912.1	99	Query_52823	0	1028
iutA	2202	Receptor de aerobactina para el hierro	Plásmido	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (secuencia plásmido)	NC_005249.1 :61276-63477	71	Query_52824	2e-106	613
iroB-D, iroN	9403	Transporte de hierro	Genoma	<i>Shigella dysenteriae</i>	AV365116.1	65	Query_52825	4e-28	386
fimh-1	1008	Formación de adhesina	Genoma	<i>Salmonella entérica</i> subsp. entérica	H0329919.1	NA	NA	NA	NA
entA-H, entS, cstA	23700	Enterobactina y sistema de transporte del hierro	Genoma	<i>Escherichia coli</i>	GU361605.1 Serotipo: O78::K80:H9	83	Query_52827	1e-166	479
kfu	590	Sistema de obtención de hierro	Genoma	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KY630496.1	84	Query_52828	0.14	31
uge	527	Uridina difosfato galacturonato 4-epimerasa	Genoma	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (secuencia parcial)	I-6208	80	Query_52829	1e-77	257
fha	1740	Flagelar	Genoma	Control negativo <i>Shigella flexneri</i>	NC_004337.2 :c297502-295763	80	Query_52830	1.7	32
htra	2077	Proteínas de membrana	Genoma	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AJ430233.1	84	Query_52831	0	1156
rmpA	518	Regulador de síntesis de polisacárido capsular	Genoma	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (secuencia parcial)	KPI-1627	NA	NA	NA	NA
shv	861	B-lactamasa sulfhidril	Plásmido	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kp734 SHV	76	Query_52833	0.001	50

(Elaboración propia en BLAST NCBI)

Según los resultados del análisis del genoma con el alineamiento de genes metabólicos (Cuadro 34), muestra que el genoma posee genes involucrados en la fermentación del citrato, regulación del fosfato cuando hay escasez como método de sobrevivencia, presencia de aldehído deshidrogenasa, codifica para lactasa, catalasa y ureasa. También metaboliza la maltosa y la pululínica que son compuestos que utiliza como fuente de energía para reproducirse y sobrevivir. Esto coincide con algunos resultados bioquímicos aplicados a la cepa (fermentación de lactosa, citrato positivo, ureasa positivo, entre otros). Debido a que no se encuentran registrados algunos genes para *Klebsiella oxytoca*, se tuvieron que utilizar de otras especies que se encuentren relacionada con esta cepa. Por ello es porcentaje de similitud no es tan alto, pero es mayor al 70% por lo que indica la presencia de estos genes. En cuanto al valor E, este resulta en 0 o un valor muy pequeño que indica una alta similitud y homología entre la secuencia investigada y el genoma.

En relación a los resultados de presencia de genes involucrados en simbiosis (Cuadro 35) con *C. capitata*, en la mayoría no se encontraron estos genes descritos para el género *Klebsiella* u otro organismo cercano filogenéticamente a esta especie. Debido a ello, se encontró una alta similitud en genes relacionados a fijación de nitrógeno y síntesis de glutamina. La glutamina es un aminoácido que le aportaría la bacteria a *C. capitata* como una fuente de nitrógeno que puede utilizar en su metabolismo y en especial para la síntesis de ácidos nucleicos. En relación a la degradación de celulosa se encontró una leve similitud entre el gen *celA-E* y *fixR* de *Agrobacterium tunefaciens*, dado por la distancia filogenética que existe entre estas bacterias. Por lo que de esta sección se concluye que la cepa M aislada de *C. capitata* es una bacteria simbiótica que le aporta nutrientes a esta mosca que le permiten desarrollarse y nutrirse en el trascurso de su ciclo de vida.

Finalmente, se desea determinar si la cepa M contenía genes patogénicos (Cuadro 36) que codificaban para factores de virulencia que pueden simbolizar un riesgo para la salud de los seres humanos. Según los resultados del alineamiento de criterio alto para estos genes, sólo se encontró la presencia de enterobactina, biosíntesis de proteínas de fimbria y proteínas de membrana que se clasifican como factores de virulencia, sin embargo sólo otorgan una ventaja a la cepa frente a otras y no necesariamente que sea patogénica. No posee genes que codifiquen a beta-lactamasas por lo que no se consideraría una bacteria resistente ni patogénica. Se concluye con estos alineamientos que la bacteria aporta beneficios significativos a *C. capitata* y no simboliza un peligro biológico para el ser humano.

Cuadro 34. Alineamiento de genoma de *K. oxytoca* cepa C con genes simbióticos con el programa BLAST de NCBI.

Gen	Función	Localización	Tamaño	ID	Organismo	E	Identidad	Tamaño fragmento
<i>nifA</i> , <i>nifQ</i> – <i>nifJ</i>	Fijación de nitrógeno	genoma	1773 bp	GenBank: JN600446 .1	<i>Pseudomonasputida</i>	0.00	88%	1018 bp
<i>ntrAB</i> C	Genes de regulación de nitrógeno	genoma	561 bp	GenBank: KT008922 .1	<i>Bacillusmegaterium</i> cepa Mes11	0.23	87%	561 bp
<i>celD</i>	Endoglucanasa	genoma	12433 bp	GenBank: L38609.1	<i>Agrobacteriumtumefaciens</i> línea C58.	--	--	--
<i>bglG</i> , <i>bglB</i>	Metabolismo de beta-glucosidos aromáticos	genoma	1395 bp 1118 bp	GenBank: AY12480 0.1 AY12479 9.1	<i>Klebsiella aerogenes</i>	0.00	85%	446 bp 800 bp
<i>feoB</i>	transporte de hierro	genoma	2208 bp	EBI Coding: ACI08855 .1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa 342	0.00	86%	869 bp

(Elaboración propia en BLAST NCBI)

Cuadro 35. Alineamiento de genoma de *K. oxytoca* cepa C con genes metabólicos con el programa BLAST de NCBI.

Gen	Función	Localización	Tamaño	ID	Organismo	E	Identidad	Tamaño fragmento
<i>ureaABC</i> <i>DEFG</i>	Ureasa	genoma	1,305 bp	GenBank: L07039.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa IA551	0.01	83%	1050 bp
<i>lacZ, lacY, lacI</i>	Genes de fermentación de lactosa	genoma	4812 bp	GenBank: M11441.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.00	80%	3082 bp
<i>katA, katG, katE</i>	Catalasa	genoma	2259 bp	TaxonomicID: 507522 (BioCyc)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa 342	0.00	79%	1108 bp
<i>pulA</i>	Pululanosa: degradación de almidón	genoma	2142 bp	GenBank: JX218991.1	<i>Bacillus cereus</i> cepa GXBC-3	0.08	85%	1338 bp
<i>pho box: phoRBAEM</i>	Regulación de fosfato	genoma	1650 bp	GenBank: AB044338.1	<i>Enterobacter aerogenes</i> cepa IFO12010	0.00	84%	908 bp
<i>rmpA</i>	regulación síntesis de capsula	plásmido	585 bp	EBI Coding: AAR07739.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>CG43</i>	0.00	85%	269 bp

(Elaboración propia en BLAST NCBI)

Luego del alineamiento en BLAST se puede observar que la muestra C sí contiene la mayoría genes de simbiosis listados en el Cuadro 37. Esto sugiere una posible simbiosis con *C. capitata*. El gen para celulasa no se encuentra en el genoma. Esto puede ser porque esta enzima no es necesaria para la sobrevivencia de la bacteria en su ambiente. En cuanto a los genes metabólicos (Cuadro 38), la muestra C presenta genes que confirman las reacciones obtenidas en la batería bioquímica: ureasa, operón lac, degradación de azúcares, etc.

C. Producción de quitosano a partir del pupario de mosca de la fruta *Ceratitis capitata*

Rendimiento en peso porcentual

Cuadro 36. Rendimientos de extracción de quitina para pupario de hembra y macho.

Muestra	masa inicial (± 0.001 g)	masa quitina (± 0.001 g)	Porcentaje de Rendimiento
Hembra	9.251	1.576	17.04 %
Macho	14.739	3.177	21.56%

Los resultados del Cuadro 39 muestran que el rendimiento en masa de la extracción de quitina es mayor para el pupario de macho que de hembra. Debido a que se usó el mismo método y las mismas condiciones para la extracción de ambas muestras, se puede atribuir el mayor porcentaje en machos a que el pupario de macho tenga un mayor contenido de fibra que el de la hembra. Durante el proceso de extracción se facilitó la filtración luego de la fase de desproteinización con las muestras de macho, el producto de la extracción tenía dos fases, una más oscura, viscosa y con olor fuerte y la otra transparente y cuyo olor no se pudo percibir. Esto podría implicar que en esta fase no sólo se eliminó proteína, sino también grasa, de manera que la facilidad de la filtración en machos puede deberse a que las hembras tienen mayor porcentaje de grasa que las de macho (10.26 y 6.41% respectivamente).

Cuadro 37. Rendimiento de conversión de quitina a quitosano con diferentes condiciones de reacción.

Muestra	Condiciones de tratamiento de muestra	masa muestra quitina (± 0.001 g)	masa quitosano (± 0.001 g)	Porcentaje de rendimiento
Hembra	40% NaOH, 90° C	0.106	0.062	58.49%
	40% NaOH, 100° C	0.349	0.225	64.47%
	45% NaOH, 90° C	0.345	0.194	56.23%
	45% NaOH, 100° C	0.350	0.185	52.86%
Macho	40% NaOH, 90° C	0.501	0.348	69.46%
	40% NaOH, 100° C	0.500	0.400	80%
	45% NaOH, 90° C	0.500	0.285	57%
	45% NaOH, 100° C	0.502	0.327	65.14%

El porcentaje de rendimiento de la conversión de quitina a quitosano es similar en todas las muestras, manteniéndose entre 50 y 70%, salvo en la muestra de macho a 40% NaOH y 100°C en donde este fue de 80%. Al analizar el difractograma de esta muestra (Figura 83) no se observan bandas de impureza, lo que

sugiere que no es exceso de masa por contaminación o que el contaminante no es cristalino. Esto se podrá evaluar más adelante con un análisis morfológico con microscopía electrónica.

Espectroscopía FTIR: Tres bandas se identificaron para concluir la presencia de aminas del quitosano, estos son en 1622, 1154 y 692 cm^{-1} y son característicos de la torsión N-H, el estiramiento C-N y la torsión en el plano H-N-H respectivamente. De la misma manera, tres bandas se identificaron para concluir la presencia de amidas de la quitina: 3097, 1659 y 1552 cm^{-1} , que son característicos del estiramiento N-H, estiramiento C=O y la torsión N-H respectivamente. Debido a que la quitina y el quitosano son copolímeros, los espectros de ambos deberían tener bandas en la misma posición, pero con distintos tamaños en relación con los demás. Esto puede verse claramente en las figuras 75 y 76. Se identificaron 15 bandas presentes en todos los espectros que permiten identificarlos como quitina y quitosano. Se logró identificar alcoholes primarios por la vibración del estiramiento O-H en 3434 cm^{-1} y el estiramiento C-OH en 1064 cm^{-1} , también alcoholes secundarios por la vibración de estiramiento O-H en 3054 cm^{-1} y el del C-OH en 1109 cm^{-1} . Se identificó una banda en 551 cm^{-1} que es característico de la + vibración de torsión del C-OH. Los carbonos sp_3 se identificaron según 3 bandas en 2019, 2883 y 2849 cm^{-1} que corresponden a los estiramientos simétricos de los grupos CH_3 y CH_2 y 3 bandas torsión en 1372, 1309 y 896 cm^{-1} para vibraciones de torsión asimétrica y simétrica de CH_3 y de balanceo del CH_2 . Se identificó una banda en 1421 cm^{-1} que corresponde al tijereteo H-C-H del grupo CH_2 . Los monómeros de quitina y quitosano también tienen un éter, que se logró identificar por la vibración característica por la torsión C-O-C en 1014 cm^{-1} . Finalmente se logró identificar la presencia de tanto aminas primarias como amidas secundarias en todos los espectros. Al comparar los espectros del quitosano sintetizado con el de quitosano comercial (Figura 77) se puede observar que se muestran las mismas bandas con excepción a la vibración de la amina secundaria cerca de 3097 cm^{-1} . Esta banda no puede observarse en la de quitosano comercial debido a que se traslapa con las bandas de vibración de los alcoholes primarios y secundarios que para esta muestra son más anchas.

El análisis de estos espectros indica que se cumplió con el objetivo de la extracción de quitina y su conversión a quitosano.

Cuadro 38. Grado de desacetilación para las muestras de quitosano obtenidas mediante distintas condiciones de desacetilación.

Quitosano de pupario de hembra	A1655	A345	Porcentaje de desacetilación	Quitosano de pupario de macho	A1655	A345	Porcentaje de desacetilación
40% NaOH + 100°C	95	96.65	98.29%	40% NaOH + 90°C	90.47	93.45	96.81%
40% NaOH + 90°C	91.01	93.98	96.84%	40% NaOH + 100°C	95.25	97.09	98.10%
45% NaOH + 90°C	96.14	97.46	98.65%	45% NaOH + 90°C	89.93	93.4	96.28%
45% NaOH + 100°C	96.57	97.58	98.96%	45% NaOH + 100°C	93.03	95.69	97.22%

Figura 74. Espectros FTIR de quitosano de pupario de hembra .

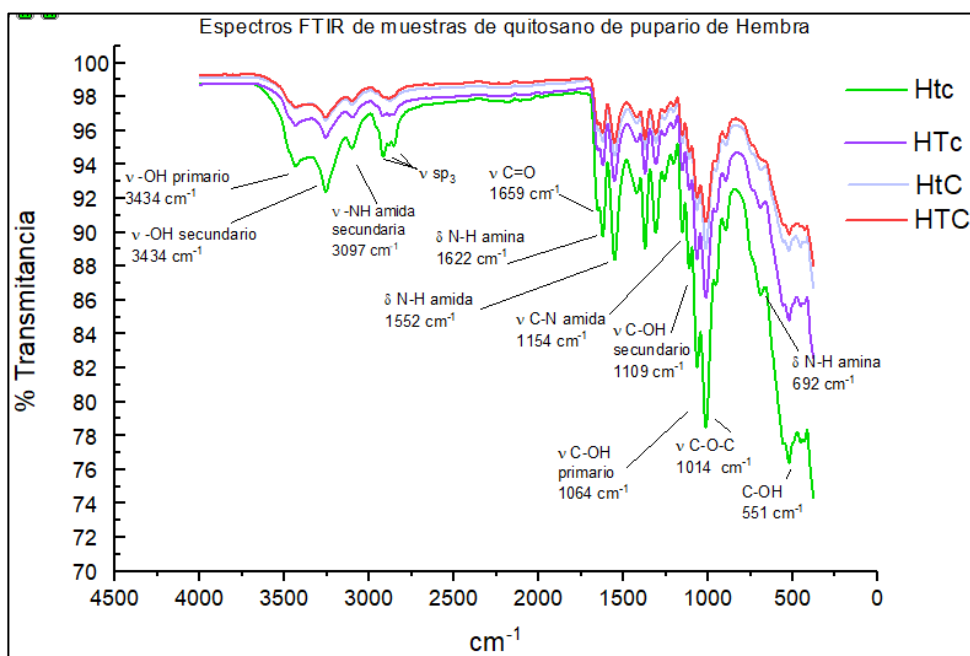


Figura 75A. Espectros FTIR de quitosano de pupario de hembra desacetilado a 90 °C con NaOH 40% (p/v).

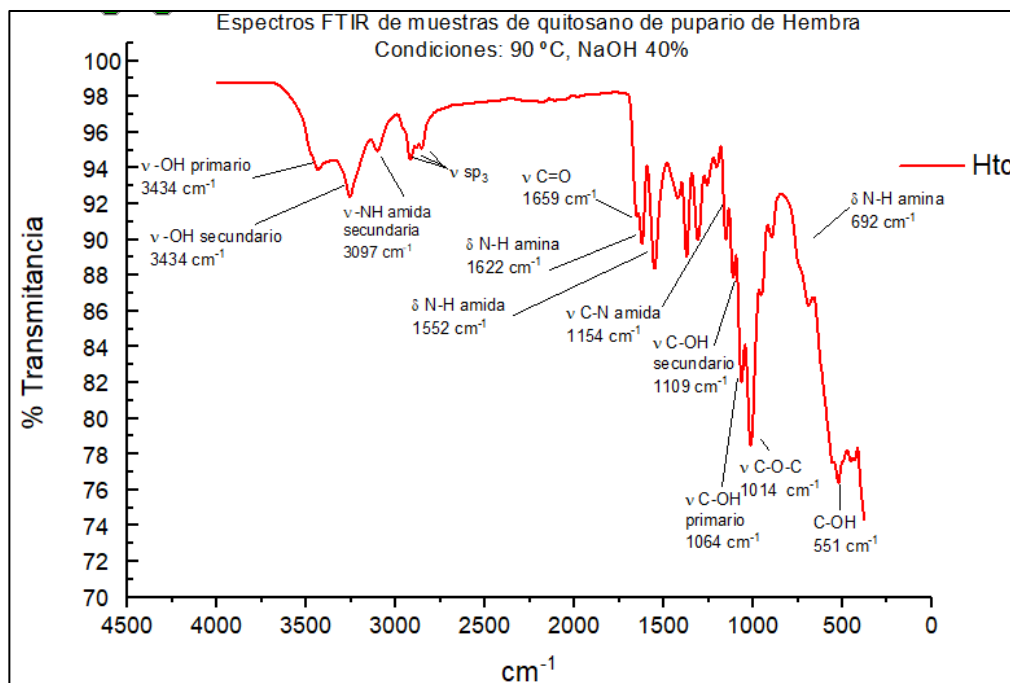


Figura 75B. Espectros FTIR de quitosano de pupario de hembra desacetilado a 100 °C con NaOH 40% (p/v).

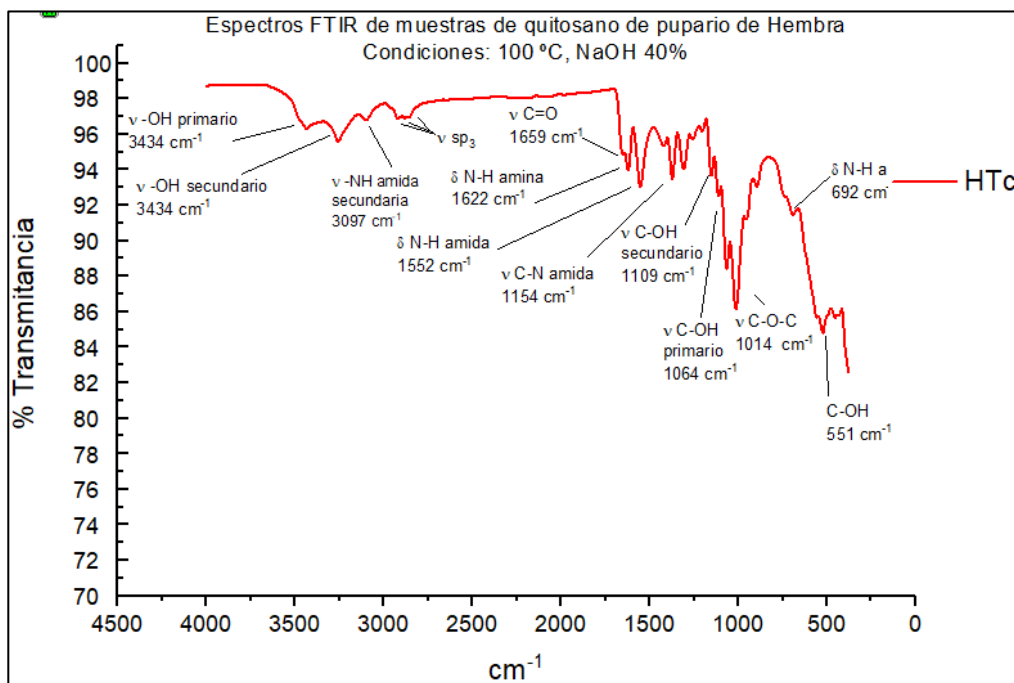


Figura 75C: Espectros FTIR de quitosano de pupario de hembra desacetilado a 90°C con NaOH 45% (p/v)

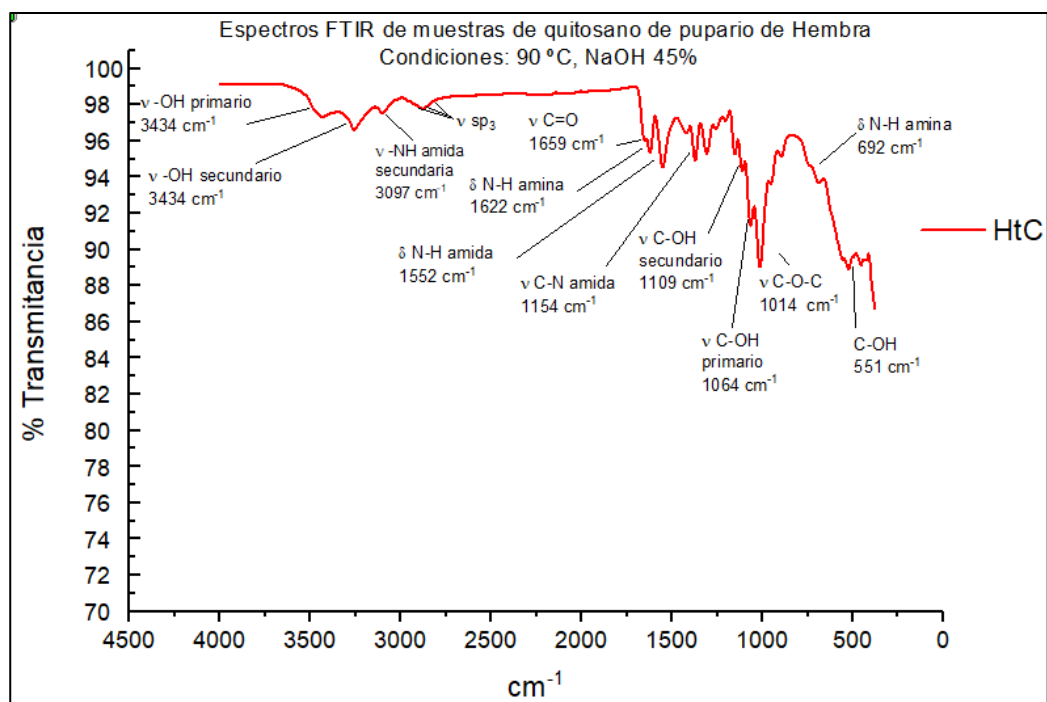


Figura 75D. Espectros FTIR de quitosano de pupario de hembra desacetilado a 100°C con NaOH 45% (p/v).

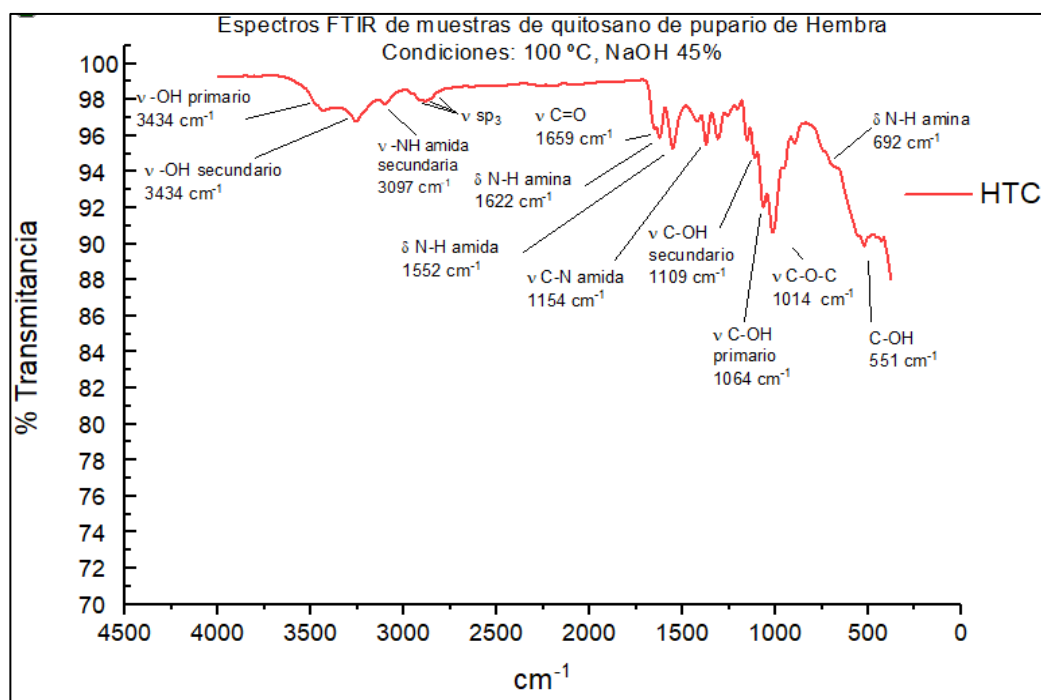


Figura 76. Espectros FTIR de quitosano de pupario de macho .

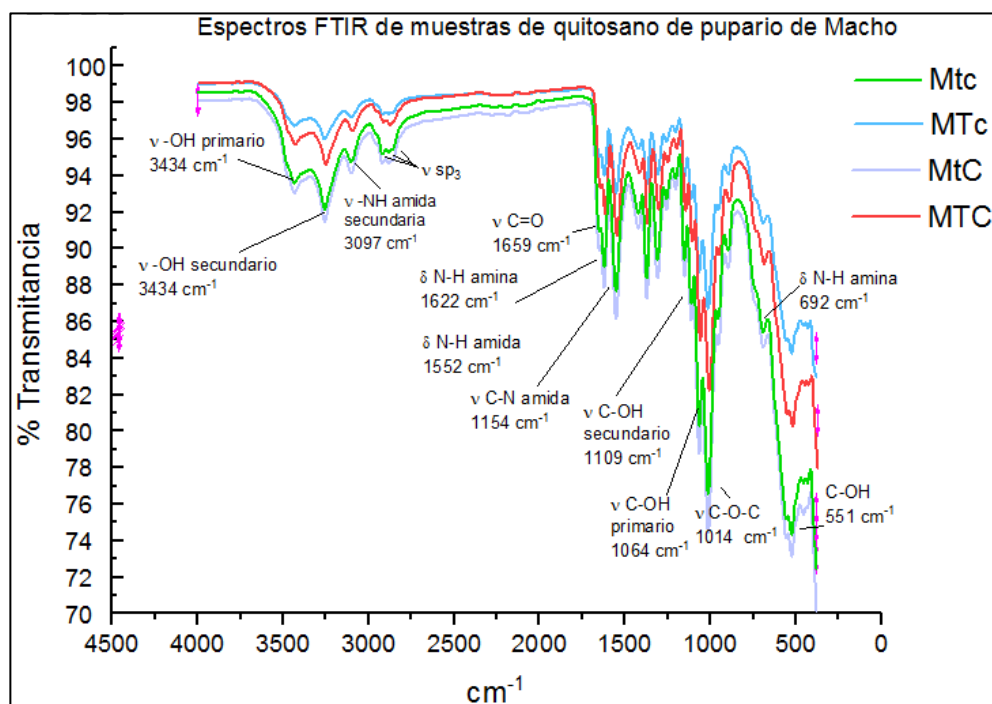


Figura 76A. Espectros FTIR de quitosano de pupario macho desacetilado a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ con NaOH 40% (p/v).

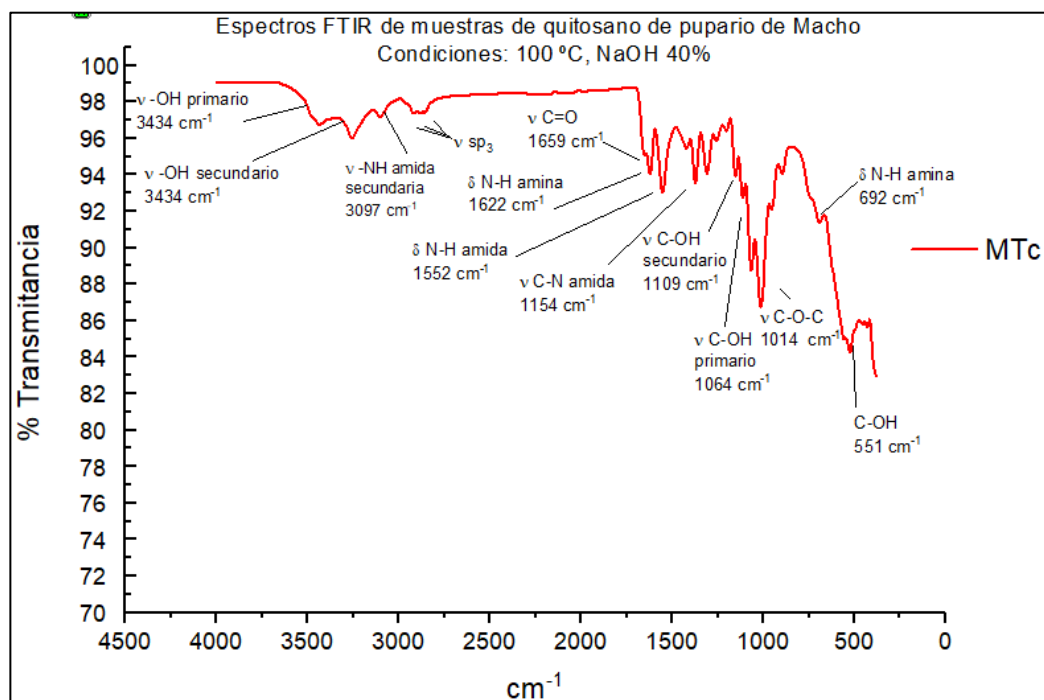


Figura 76B. Espectros FTIR de quitosano de pupario demacho desacetilado a 90 °C con NaOH 40% (p/v).

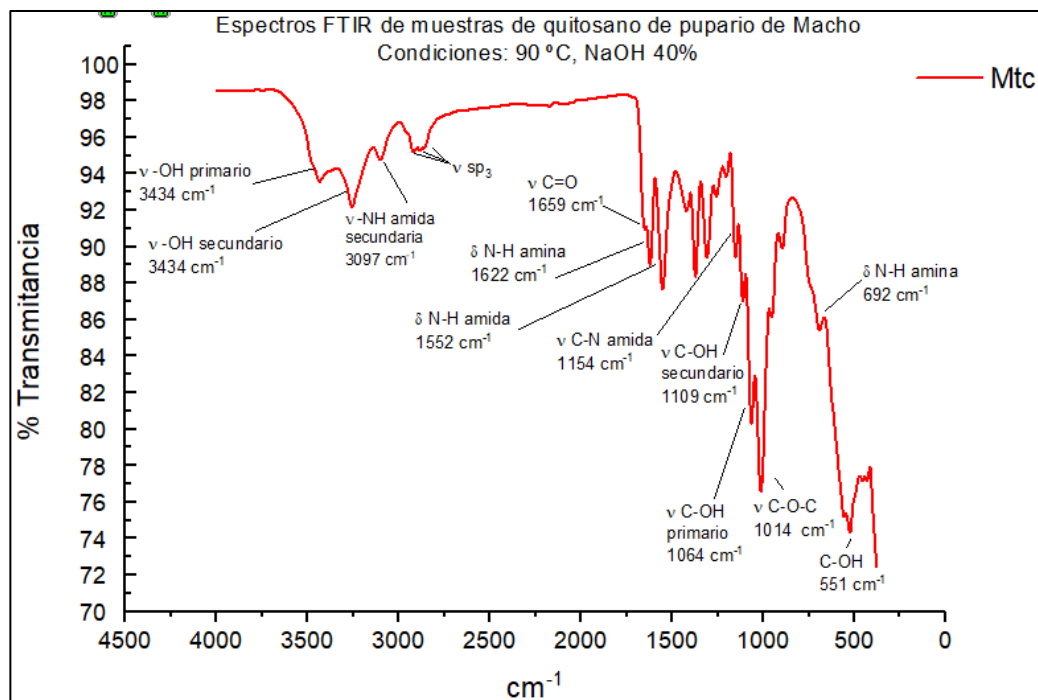


Figura 76C. Espectros FTIR de quitosano de pupario de macho desacetilado a 90 °C con NaOH 45% (p/v).

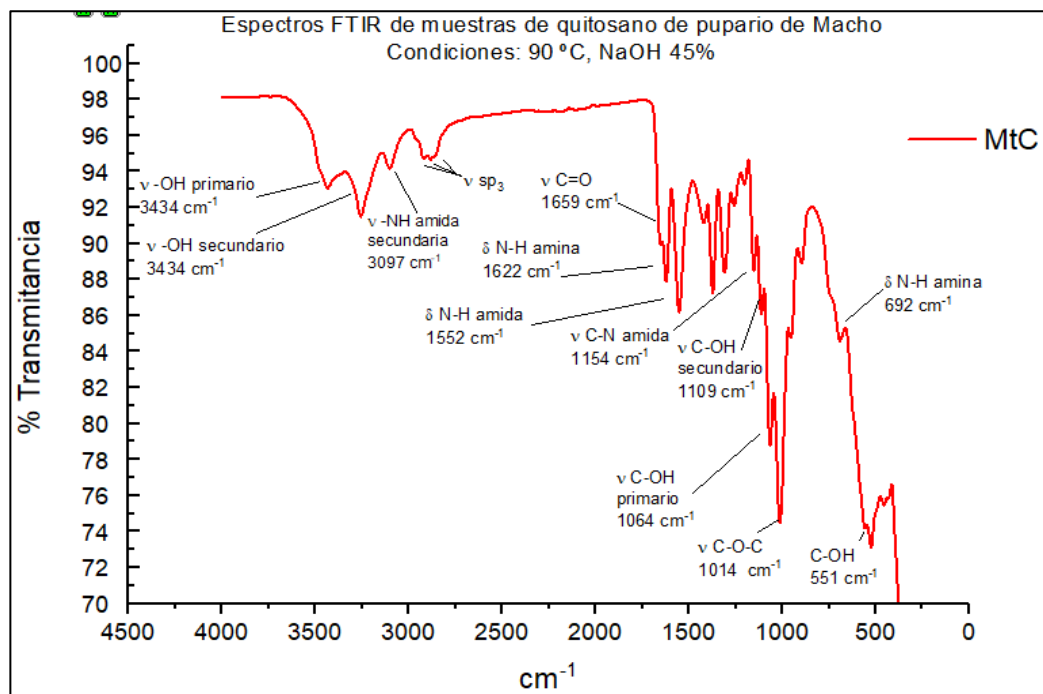


Figura 76D. Espectros FTIR de quitosano de pupario de macho desacetilado a 100 °C con NaOH 45% (p/v).

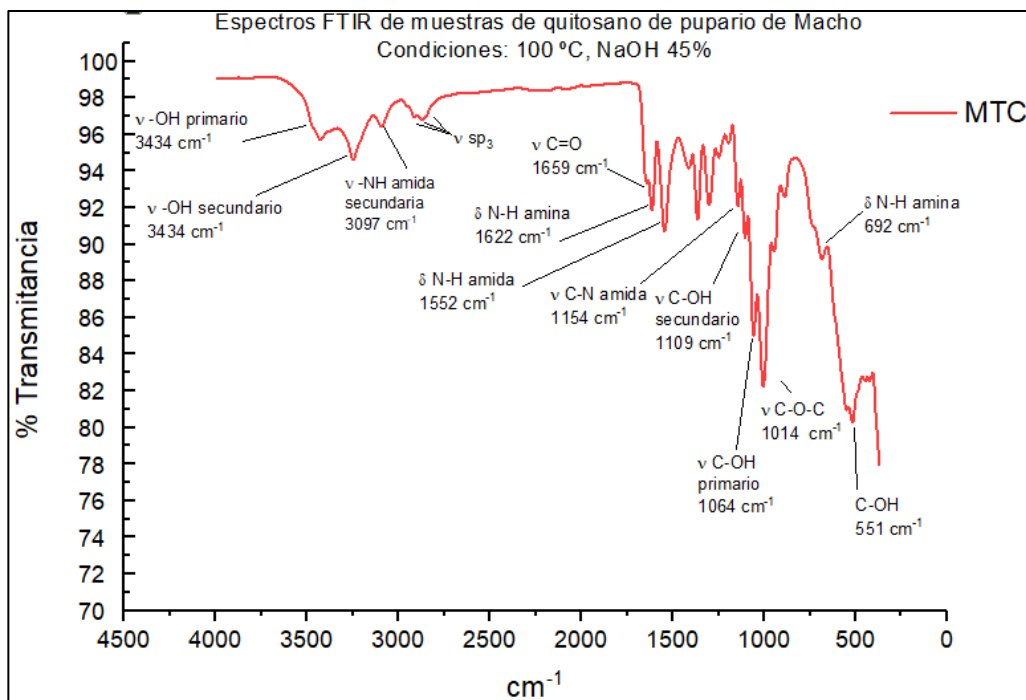
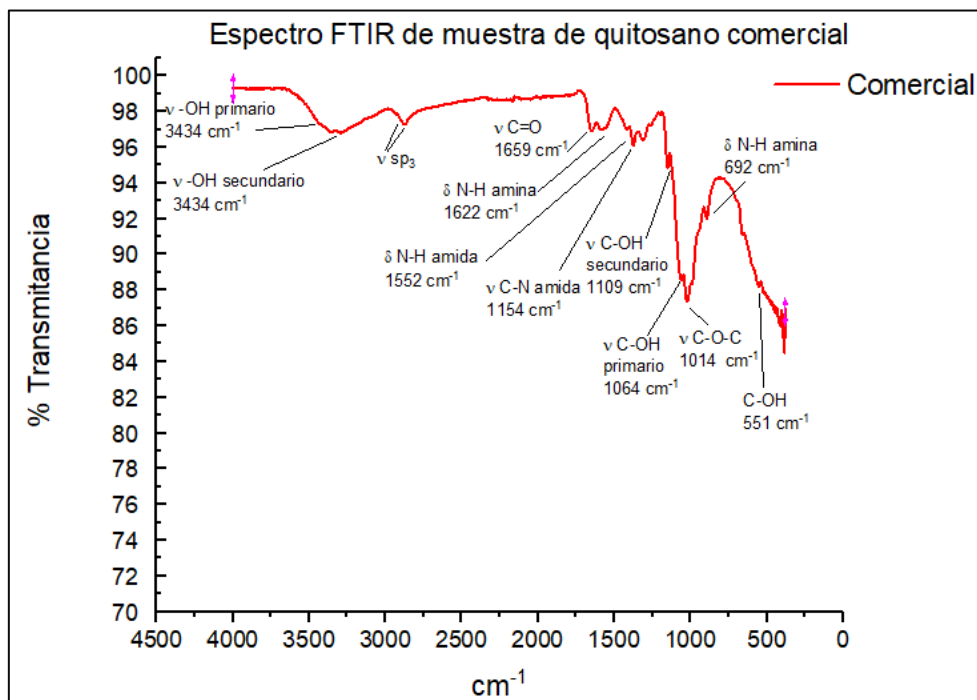


Figura 77. Espectros FTIR de quitosano comercial .



Para determinar el grado de desacetilación se usó la relación de transmitancia entre las bandas en 1655 y 3450 cm^{-1} y se logró determinar que el grado de desacetilación del quitosano producido con cada una de las 4 condiciones de reacción para la desacetilación es mayor a 96%. Este porcentaje se mantuvo respecto al obtenido para quitosano comercial con grado de desacetilación $>75\%$, de manera que podría venderse a un precio similar al de este (39.20 USD/ 10g de quitosano). Los mejores resultados fueron mayores a 98% de desacetilación. Para las muestras de quitina de hembra el mejor resultado se obtuvo con las condiciones de 45% NaOH y 100°C, y para las de macho con 40% NaOH y 100°C. Las condiciones para las muestras de hembra de 40% NaOH y 100°C también produjeron un grado de desacetilación mayor a 98%, por lo que se recomienda usar estas condiciones para obtener una mejor calidad de quitosano a partir de quitina extraída de hembra o de macho.

XRD: Al comparar los difractogramas de quitina de macho y hembra con los de quitosano (figuras 79 y 80), se ve claramente una diferencia, esto comprueba que se cumplió con el objetivo de sintetizar quitosano a partir de la quitina extraída de pupario de *Ceratitis capitata*. Las diferencias más evidentes son que la quitina presenta una banda en 6°, que desaparece en el quitosano y que el quitosano presenta una banda en 13° que no mostraba la quitina. Otra diferencia es que las bandas en la quitina tanto de macho como de hembra son menos intensas y con menor resolución que los de sus respectivos derivados a quitosano. Esto indica que tanto para las muestras de macho como para las de hembra, el quitosano es más cristalino que la quitina. Una diferencia notable es entre las muestras de macho y de hembra, tanto para quitina como para quitosano, las muestras de macho presentan bandas más definidos que los de hembra, lo que muestra que son más cristalinos los productos obtenidos a partir de macho. Esto puede deberse a que se molió la quitina para obtener polvo, ya que al secarse se compactó en una masa dura y sino la reacción no se iba a dar homogéneamente en toda la quitina sino solo en la superficie. Esto disminuyó tamaño de partícula, disminuyendo así, el grado de cristalinidad (Nakagawa, *et al* 2013). Al observar la muestra de quitosano de hembra con condiciones a 90 °C y con NaOH 45%, puede verse una banda en 30°, que no está presente en ninguna otra muestra y también podemos ver que tiene menor resolución que las demás. Esto podría deberse a una impureza, probablemente inorgánica ya que no absorbe en el rango IR.

TGA: Al observar los termogramas de la figura 80 puede verse que tanto para la quitina como para el quitosano de hembra y macho hay dos etapas de descomposición. La primera etapa se da cerca los 100°C y se atribuye a la pérdida de agua. La segunda etapa se produce debido al rompimiento de los enlaces glucosídicos que unen los monómeros y la descomposición de los grupos acetilados y desacetilados. Esta se da entre 360 y 375°C para todas las muestras. Esto indica que la termoestabilidad es muy similar en todas las muestras y que las condiciones de reacción no la afectaron.

Figura 78. Difractogramas de quitina y quitosano de pupario de macho.

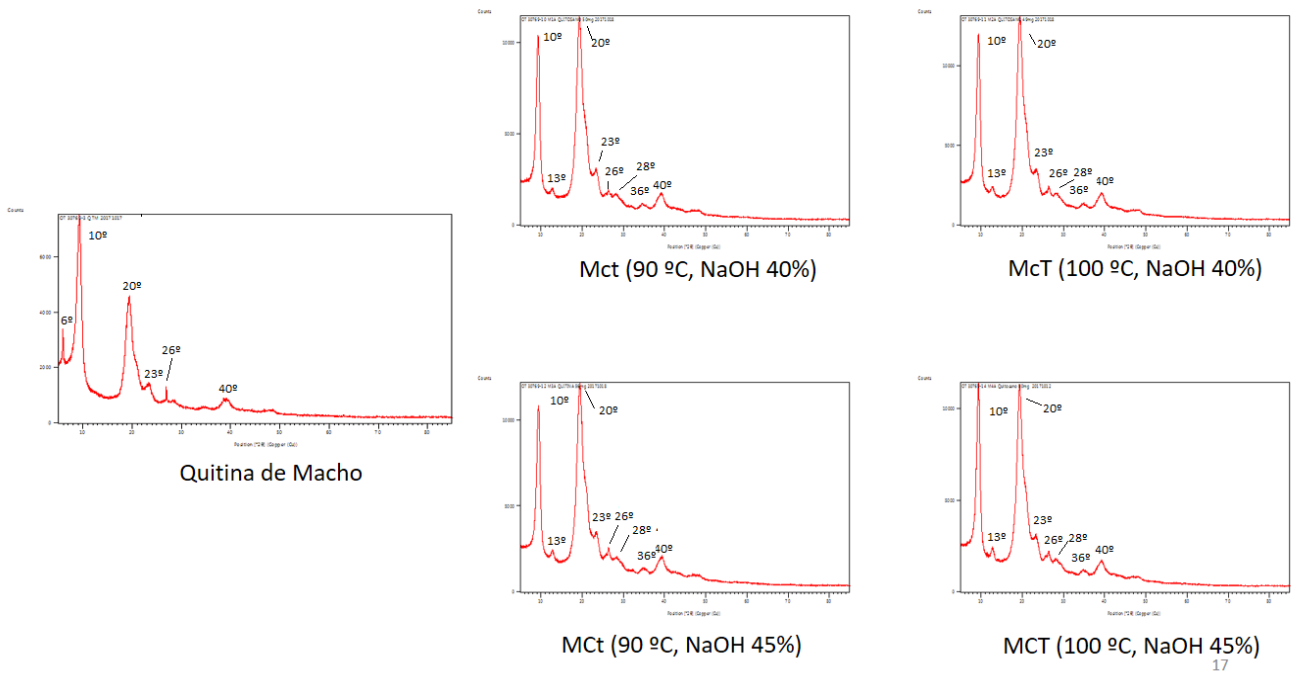


Figura 79. Difractogramas de quitina y quitosano de pupario de hembra.

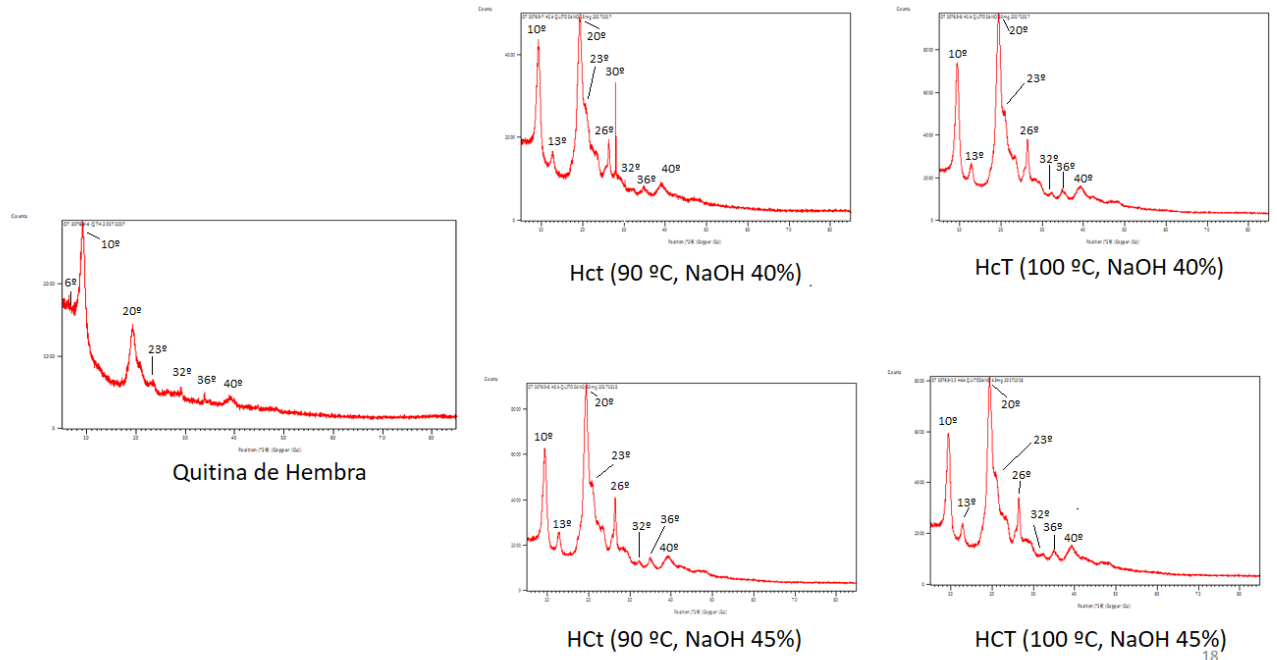
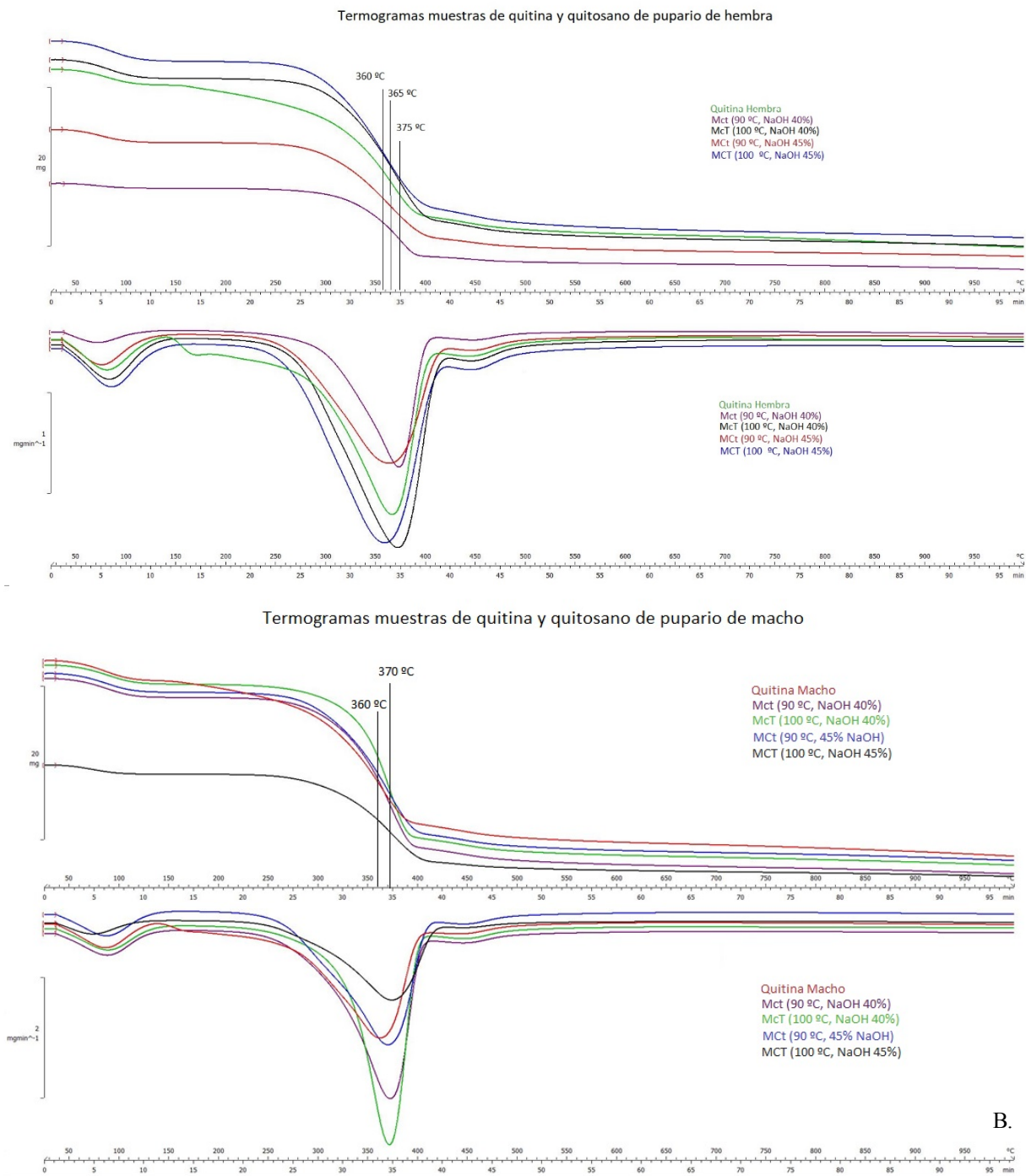


Figura 80. Termogramas de quitina y quitosano de pupario de hembra (A) y macho (B).



6. CONCLUSIONES

BIOTECNOLOGÍA

1. Se optimizó la metodología de extracción de ARN de los estadios de *Ceratitis capitata* larva, pupa y adulto para obtener la mayor proporción y calidad de ADNc
2. Se diseñaron con éxito los juegos de oligos Cctra (A), Cctra (B), Cctra (C), Cctra-2 (B), Altra (A) y Altra (B) para PCR convencional.
3. Los clones de *E. coli* XL1-BLUE y *E. coli* HT-115 (DE3) que poseían el inserto en la orientación deseada fueron: Cctra (A) col. 10BC, Cctra (A) col. 10C, Cctra (B) col. 11BC, Cctra (A) col.11B, Cctra (B) col. 25BC, Cctra (B) col. 25B, Cctra (B) col. 26B, Cctra (B) col. 26C y Cctra-2 (B) 12.
4. Los clones de *E. coli* HT-115 (DE3) Cctra (A) col. 10BC, col. 10C y Cctra (B) col. 25B, col. 25BC se proponen como candidatos para la producción de ARNdh.
5. Se diseñó con éxito un par de oligos, Q_Cctra (2), Q_Cctra-2 (2), Q_Cctra-2 (3), Q_Cctra-2 (4), Q_Altra (1), Q_Altra (2) y Q_Altra (3) para PCR tiempo real.

BIOINFORMÁTICA

1. Se optimizó el proceso de extracción de ADN genómico de *Klebsiella oxytoca* adicionando tratamientos con lisozima, proteínasa K, ARNasa y tratamiento térmico para desactivación de nucleasas. El ADN obtenido con este método cumple con los requerimientos de concentración y pureza para ser secuenciado y caracterizado genéticamente.
2. Se observó una diferencia de patrón de bandas entre las muestras C, M y NM de *Klebsiella oxytoca* y *K. pneumoniae*.
3. De las tres cepas de *Klebsiella* estudiadas, en una se detectó la presencia de tres plásmidos, en las otras dos hubo ausencia de estos.
4. Se optimizó el protocolo de BOX-PCR para *Klebsiella* con el fin de comparar patrones de bandas entre diferentes cepas.
5. La cepa M es una bacteria simbiótica que no presenta genes que codifican a factores de virulencia, ni resistencia a antibióticos de usos clínico, por lo que es importante para el desarrollo de *C. capitata* y no es un patógeno que pueda causar una infección en seres humanos.
6. La cepa C no presenta genes que codifican a factores de virulencia, ni resistencia a antibióticos, por lo que no se considera de riesgo biológico.

NANOTECNOLOGÍA

1. Se logró extraer quitina a partir de muestras de harina de pupario de *Ceratitis capitata* macho y hembra.
2. Se determinó que la harina de pupario macho tiene un mejor rendimiento (21%) para la extracción de quitina que la de hembra (17%).
3. De las cuatro condiciones de reacción evaluadas para la desacetilación de la quitina, se recomienda utilizar 40% NaOH y 100°C debido a que se obtiene un 98% de desacetilación sin afectar la estabilidad térmica del producto. La cristalinidad del producto final no se vio influenciada por las condiciones de reacción.

7. RECOMENDACIONES

BIOTECNOLOGÍA

1. Al extraer ARN, seguir el flujo de trabajo diseñado.
2. Al extraer ARN con TRIzol LS no tocar la fase orgánica para obtener una medida de pureza secundaria de ácidos nucleicos adecuada. Es posible agregar un paso a la extracción al repetir la separación de la fase acuosa y orgánica.
3. Volver a realizar la extracción de ARNdh producido por los clones y esperar a que el etanol se evapore por completo.
4. Realizar la extracción de ARNdh con clones recién transformados con el plásmido de inertes y limitar las oportunidades en las que pueda ocurrir mutaciones tanto en el inserto como en el promotor *lacUV5*.
5. Identificar por medio de PCR tiempo real utilizando los juegos de oligos de PCR tiempo real que estadio de *C. capitata* y *A. ludens* es el indicado para realizar pruebas de silenciamiento con la cepa productora de ARNdh diseñada.
6. Realizar una cuantificación relativa y utilizar el gen de actina como el gen control o normalizador y los juegos de oligos de q-PCR seleccionados.
7. Evaluar el fenotipo de *C. capitata* y *A. ludens* hembra luego de haber sido alimentada con el ARNdh producido.
8. Establecer un sistema para la producción de ARNdh, utilizado para las pruebas de silenciamiento, a gran escala para la aplicación de este método en la industria de producción de *C. capitata* y *A. ludens* estéril.

BIOINFORMÁTICA

1. Enviar ADN para secuenciación de novo por SMRT.
2. Utilizar el programa Megalignn PRO para determinar identidad con cepas de *K. oxytoca* anotadas y realizar un árbol filogenético en Megalign Pro para comparar la relación que existe entre M, C y *K. pneumoniae* hospitalaria.
3. Utilizar ADN y no PCR directo de colonias para el BOX-PCR.
4. Correr un BOX-PCR con cepas ATCC de *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* y *K. variicola* para comparar el patrón de bandas con el de las muestras con el fin de definir a que bacteria pertenecen.
5. Realizar una extracción de plásmidos con un método casero y alinear los plásmidos secuenciados con el fin de definir qué características diferentes que le confieren estos a la cepa C que no los requiere la M.
6. Analizar la presencia de otros genes simbióticos en el genoma especialmente los que estén involucrados en el éxito de la copulación entre el macho y la hembra silvestre de *C. capitata*.

NANOTECNOLOGÍA

1. Comparar los resultados utilizando otros tipos de fuentes energéticas, como radiación microondas o gamma ya que es un método más actualizado y controlado.
2. Evaluar la posibilidad de innovar con una conversión a nivel industrial utilizando radiación gamma

8. BIBLIOGRAFÍA

- 3402 Bioinformatics. 2017. <<Service – 3402 Bioinformatics>>.
- 3402 Bioinformatics Group. 2015. <<Next Generation Sequencing>>.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., & Mukherjee, S. K. 2003. <<RNA interference: biology, mechanism, and applications>>. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR*,67(4):657–85. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.657>
- Aharon, Y., Pasternak, Z., Yosef, M. Ben, Behar, A., Lauzon, C., Yuval, B., & Jurkevitch, E. 2013. <<Phylogenetic, metabolic, and taxonomic diversities shape mediterranean fruit fly microbiotas during ontogeny>>. *Applied and Environmental Microbiology*,79(1):303–313. <https://doi.org/10.1128/AEM.02761-12>
- Alphey, L., Baker, P., Burton, R. S., Condon, G. C., Condon, K. C., Dafaalla, T. H., ... Woods, A. 2006a. <<Genetic technologies to enhance the sterile insect technique (SIT)>>. *Fruit Flies of Economic Importance: From Basic to Applied Knowledge*,:319–326.
- Alphey, L., Baker, P., Burton, R. S., Condon, G. C., Condon, K. C., Dafaalla, T. H., ... Woods, A. 2006b. <<Genetic technologies to enhance the sterile insect technique (SIT)>>.
- Alphey, L., Leftwich, P. T., Koukidou, M., Rempoulakis, P., Gong, H.-F., Zacharopoulou, A., ... Vontas, J. 2014. <<Genetic elimination of field-cage populations of Mediterranean fruit flies>>. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1372>
- Aluja, M., Celedonio-Hurtado, H., Castillo, F., Guillen, J., & Rios, E. 1996. <<Seasonal Population Fluctuations and Ecological Implications for Management of Anastrepha Fruit Flies (Diptera : Tephritidae) in Commercial Mango Orchards in Southern Mexico>>. *J. Econ. Entomol.*,:654–667. <https://doi.org/10.1093/jee/89.3.654>
- Alvarez, M., Ruiz, M. F., & Sánchez, L. 2009. <<Effect of the gene *doublesex* of *Anastrepha* on the somatic sexual development of *Drosophila*>>. *PLoS ONE*,4(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005141>
- Alves, M. S., da Silva Dias, C. R., Dias De Castro, A. C., Riley, L. W., & Meurer Moreira, B. 2006. <<Identification of Clinical Isolates of Indole-Positive and Indole-Negative *Klebsiella* spp>>. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*,44(10):3640–3646. <https://doi.org/10.1128/JCM.00940-06>
- Ami, E. Ben, Yuval, B., & Jurkevitch, E. 2009. <<Manipulation of the microbiota of mass-reared Mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) improves sterile male sexual performance>>. *The ISME Journal*,4:28–37. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.82>
- Amosova, M. A. L. O. A., & Lyubchenko, Y. L. 1990. <<Flexibility Difference Between Double-Stranded RNA and DNA as Revealed by Gel Electrophoresis Institute of Molecular Genetics>>, 7(6):1237–1249.

- Angel, M., Rodriguez, A., Gozzi, A., Alves, B., Filho, D. A., Zanin, G. M., & Moraes, F. F. De. 2012. <<Potential of *Klebsiella oxytoca* for 1,3-propanediol production from glycerol under excess substrate conditions>>. *African Journal of Biotechnology*, 11(63):12675–12681. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1321>
- Arocho, A., Chen, B., Ladanyi, M., & Pan, Q. 2006. <<Validation of the 2- $\Delta\Delta$ Ct Calculation as an Alternate Method of Data Analysis for Quantitative PCR of BCR-ABL P210 Transcripts>>. *Diagnostic Molecular Pathology*, 15(1):56. <https://doi.org/10.1097/00019606-200603000-00009>
- Asensio, A., Oliver, A., Gonzalez-Diego, P., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C., Ros, P., ... Canton, R. 2000. <<Outbreak of a Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* Strain in an Intensive Care Unit: Antibiotic Use as Risk Factor for Colonization and Infection>>. *Clinical Infectious Diseases*, 30(1):55–60. <https://doi.org/10.1086/313590>
- Ahlafi, Hammou, Hamou Moussout, Fatima Boukhli, Mostafa Echetna, Mohamed Naciri Bennani, and Slimani My Slimane. "Kinetics of N-Deacetylation of Chitin Extracted from Shrimp Shells Collected from Coastal Area of Morocco." *Mediterranean Journal of Chemistry* 2.3 (2013): 503-13. Web.
- Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, A. Heras, Functional Characterization of Chitin and Chitosan, *Current Chemical Biology* 3 (2) (2009) 203-230.
- Ayin, C., M., ., Schlub, R. L., Yasuhara-Bell, J., & Alvarez, A. M. 2015. <<Identification and characterization of bacteria associated with decline of ironwood (*Casuarina equisetifolia*) in Guam>>. *Australasian Plant Pathology*, 44(2):225–234. <https://doi.org/10.1007/s13313-014-0341-4>
- BEHAR, A., YUVAL, B., & JURKEVITCH, E. 2005. <<Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*>>. *Molecular Ecology*, 14(9):2637–2643. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02615.x>
- Bioinformatics at COMAV. 2016. <<Alineamiento de secuencias — Bioinformatics at COMAV 0.1 documentation>>.
- BioLabs. 2017a. <<Heat Inactivation | NEB>>.
- BioLabs. 2017b. <<Proteinase K, Molecular Biology Grade | NEB>>.
- Biomatrix. 2013. <<DNAstable ® Plus Handbook Protocols for Sample Protection, Sample Recovery and Downstream Applications>>. *Biomatrix The Biostability Company*,(3001):21.
- BioScience, S. (s/f). <<*C. elegans* RNAi Collection (Ahringer)>>. Recuperado el 5 de marzo de 2017, a partir de <http://www.sourcebioscience.com/products/life-science-research/clones/rnai-resources/c-elegans-rnai-collection-ahringier/>
- Bopp, D., Saccone, G., & Beye, M. 2014. <<Sex determination in insects: Variations on a common theme>>. *Sexual Development*, 8(1–3):20–28. <https://doi.org/10.1159/000356458>
- Bott, M., Meyer, M., & Dimroth, P. 1995. <<Regulation of anaerobic citrate metabolism in *Klebsiella pneumoniae*>>. *Molecular microbiology*, 18(3):533–46.
- Boulier, E. L., & Jenna, S. 2009. <<Genetic Dissection of *Caenorhabditis elegans* Embryogenesis Using RNA Interference and Flow Cytometry>> (pp. 181–194). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-009-0_11

- Bridges, C. 1939. <<The Bar “gene”: A duplication>>. *Science*,83:210–211. <https://doi.org/10.1126>
- Broughton, S., & Perth, S. 2012. *Managing Mediterranean fruit fly in backyards*.
- Brown, T. A. 2010. *Gene cloning and DNA Analysis* (Sixth Edti). Manchester Manchester.
- Bruijn, F. J. de (Frans J. de), Lupski, J. R., & Weinstock, G. M. 1998. *Bacterial genomes : physical structure and analysis*. Chapman & Hall.
- CABI. 2016a. <<*Anastrepha ludens* (Mexican fruit fly)>>. Recuperado el 27 de octubre de 2016, a partir de <http://www.cabi.org/isc/datasheet/5654>
- CABI. 2016b. <<*Ceratitis capitata* (Mediterranean fruit fly)>>. Recuperado el 3 de septiembre de 2016, a partir de <http://www.cabi.org/isc/datasheet/12367>
- Chang Bioscience. 2004. <<BOX-PCR>>.
- CHEN, A. C ; MAYER, R. T., 1985: Insecticides: effects on the cuticle. En: Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology, 12. Insect control. 57-77. Ed. Pergamon Press
- Chin, C.-S., Alexander, D., Marks, P., Klammer, A., Drake, J., Heiner, C., ... Korlach, J. 2013. <<Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data>>. *Nature America*,10:563–569. <https://doi.org/10.1038/NMETH.2474>
- Cladera, J. L., Vilardi, J. C., Juri, M., Paulin, L. E., Giardini, M., Gómez Cendra, P. V, ... Lanzavecchia, S. B. 2014. <<Genetics and biology of *Anastrepha fraterculus*: research supporting the use of the sterile insect technique (SIT) to control this pest in Argentina>>. *BMC Genetics*,15(Suppl 2):S12. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-S2-S12>
- Cortes, G., de Astorza, B., Benedi, V. J., & Alberti, S. 2002. <<Role of the htrA Gene in *Klebsiella pneumoniae* Virulence>>. *Infection and Immunity*,70(9):4772–4776. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.4772-4776.2002>
- Coscrato, V. E., Braz, A. S. K., P Perondini, A. L., Selivon, D., & Marino, C. L. 2009. <<*Wolbachia* in *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae)>>. *Current microbiology*,59(3):295–301. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9433-8>
- Cross, A. S. 2008. <<What is a virulence factor?>>. *Critical care (London, England)*,12(6):196. <https://doi.org/10.1186/cc7127>
- Da Silva, G. P., De Araújo, E. F., Silva, D. O., & Guimarães, W. V. 2005. <<ETHANOLIC FERMENTATION OF SUCROSE, SUGARCANE JUICE AND MOLASSES BY *ESCHERICHIA COLI* STRAIN KO11 AND *KLEBSIELLA OXYTOCA* STRAIN P2>>. *Brazilian Journal of Microbiology*,36:395–404.
- Dantur, K. I., Enriquer, R., Welin, B., & Castagnaro, A. P. 2015. <<Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass.>>. *AMB Express*,5:15. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0101-z>
- Devia, N. (1980). *Fundamentos de Materiales Poliméricos*. Universidad de Antioquia CESET, Medellín Colombia.

- Dragicevic, N., & Maibach, H. I. 2016. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement Modification of the Stratum Corneum*. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47862-2>
- Dotto, G., Campana-Filho, S., & De Almeida Pinto, L. (2017). *Chitosan Based Materials and its Applications* (Vol. 3, *Frontiers in Biomaterials*). Sao Paulo: Bentham Science .
- Dyck, V. A., Hendrichs, J., & Robinson, A. S. 2005. *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.43-5894>
- Einbu, A. (2007). Characterization of chitin and a study of its Acid-Catalysed Hydrolysis. Thesis for the degree of philosophiae doctor, Trondheim Norwegian.
- Enkerlin, W. R. 2005a. <<Impact of Fruit Fly Control Programmes Using the Sterile Insect Technique>>. En *Sterile Insect Technique* (pp. 651–676). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2_25
- Enkerlin, W. R. 2005b. *Impact of fruit fly control programmes using the sterile insect technique*. *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2_25
- Eskafi, F. M. 1988. <<Infestation of Citrus by *Anastrepha* spp. and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in High Coastal Plains of Guatemala>>. *Environmental Entomology*, 17(1):52–58. <https://doi.org/10.1093/ee/17.1.52>
- Eskafi, F. M. 1988. <<Infestation of Citrus by *Anastrepha* spp. and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in High Coastal Plains of Guatemala>>. *Environmental Entomology*, 17(1).
- FAO/IAEA. 2016a. <<Insect Pest Control Laboratory, Insect Pest Control - NAFA>>. Recuperado el 3 de septiembre de 2016, a partir de <http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/ipc-laboratory.html>
- FAO/IAEA. 2016b. <<Sterile Insect Technique, Insect Pest Control - NAFA>>. Recuperado el 3 de septiembre de 2016, a partir de <http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/sterile-insect-technique.html>
- Farnham, P. J., & Platt, T. 1981. <<Rho-independent termination: Dyad symmetry in DNA causes RNA polymerase to pause during transcription in vitro>>. *Nucleic Acids Research*, 9(3):563–577. <https://doi.org/10.1093/nar/9.3.563>
- Farrel, R. 2005. *RNA Methologies: A laboratory guide for isolation and characterization* (3rd ed.). San Diego, California: Elsevier Inc.
- Fillon, M. 2012. *Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology*. Reino Unido: Caister Academic Press.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. 1998. <<Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*>>. *Nature*, 391(6669):806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fishbain, J. T., Sinyavskiy, O., Riederer, K., Hujer, A. M., & Bonomo, R. A. 2012. <<Detection of Extended-Spectrum β -Lactamase and *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Genes Directly from Blood Cultures by Use of a Nucleic Acid Microarray>>. *Journal of Clinical*

- Microbiology*, 50(9):2901–2904. <https://doi.org/10.1128/JCM.01023-12>
- Fisher, T. 2013. *Real-time PCR. Thermo Fisher* (Vol. 8).
- Fleige, S., Walf, V., Huch, S., Prgomet, C., Sehm, J., & Pfaffl, M. W. 2006. <<Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR>>. *Biotechnology Letters*, 28(19):1601–1613. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9127-2>
- Fouts, D. E., Tyler, H. L., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Ren, Q., Badger, J. H., ... Methé, B. A. 2008. <<Complete genome sequence of the N2-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice.>>. *PLoS genetics*, 4(7):e1000141. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000141>
- Franz, G. 2005. *Genetic sexing strains in mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique. Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2_16
- Gabrieli, P., Falaguerra, A., Siciliano, P., Gomulski, M. L., & Scolari, F. 2010. <<Sex and the single embryo: early development in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*>>. *BMC Development Biology*, 10:12. <https://doi.org/10.1186/1471-213x-10-12>
- García, K., Ramírez-Araya, S., Díaz, Á., Reyes-Cerpa, S., Espejo, R., Higuera, G., & Romero, J. 2015. <<Inactivated *E. coli* transformed with plasmids that produce dsRNA against infectious salmon anemia virus hemagglutinin show antiviral activity when added to infected ASK cells>>. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR):1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00300>
- Gasperi, G., Bonizzoni, M., Gomulski, L. M., Murelli, V., Torti, C., Malacrida, A. R., & Guglielmino, C. R. 2002a. <<Genetic differentiation, gene flow and the origin of infestations of the medfly, *Ceratitis capitata*>>. *Genetica*, 116(1):125–135. <https://doi.org/10.1023/A:1020971911612>
- Gasperi, G., Bonizzoni, M., Gomulski, L. M., Murelli, V., Torti, C., Malacrida, A. R., & Guglielmino, C. R. 2002b. <<Genetic Differentiation, Gene Flow and the Origin of Infestations of the Medfly, *Ceratitis Capitata*>>. *Genetica*, 116(1):125–135. <https://doi.org/10.1023/A:1020971911612>
- Geneaid. 2017. <<Genomic DNA | Geneaid>>.
- Ghosh, M., Verma, S. C., Mengoni, A., & Tripathi, A. K. 2004. <<Enrichment and identification of bacteria capable of reducing chemical oxygen demand of anaerobically treated molasses spent wash>>. *Journal of Applied Microbiology*, 96(6):1278–1286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02289.x>
- Gosiewski, T., Szała, L., Pietrzyk, A., Brzychczy-Włoch, M., Heczko, P. B., & Bulanda, M. 2014. <<Comparison of methods for isolation of bacterial and fungal DNA from human blood.>>. *Current microbiology*, 68(2):149–55. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0451-1>
- Grand View Research. (2016). *Chitosan Market Analysis By Application (Water Treatment, Pharmaceutical & Biomedical, Cosmetics, Food & Beverage) And Segment Forecasts To 2022. Market Research and Consulting*.
- Griffiths, A. J., Gelbart, W. M., Miller, J. H., & Lewontin, R. C. 1999. *Modern Genetic Analysis*. (A. Griffiths, Ed.) (2nd Editio). New York: W. H. Freeman. Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21402/>

- Griffiths, A., Miller, J., & Suzuki, D. 2000. *Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. Transcription: an overview of gene regulation in eukaryotes* (Vol. 2021).
- Guo, X., Lehner, K., O'Connell, K., Zhang, J., Dave, S. S., & Jinks-Robertson, S. 2015. <<SMRT Sequencing for Parallel Analysis of Multiple Targets and Accurate SNP Phasing>>. *G3 (Bethesda, Md.)*,5(12):2801–2808. <https://doi.org/10.1534/g3.115.023317>
- Hadfield, J., & Eldridge, M. D. 2014. <<Multi-genome alignment for quality control and contamination screening of next-generation sequencing data>>. *Frontiers in Genetics*,5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00031>
- Hajji S., Younes I., Ghorbel-Bellaaj O., Hajji R., Rinaudo M., Nasri M., Jellouli K. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *Int. J. Biol. Macromol.*2014;65:298–306. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.045.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. 2000. <<An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells>>. *Nature*,404(6775):293–296. <https://doi.org/10.1038/35005107>
- Hazen, T. H., Zhao, L., Sahl, J. W., Robinson, G., Harris, A. D., Rasko, D. A., & Johnson, J. K. 2014. <<Characterization of Klebsiella sp. Strain 10982, a Colonizer of Humans That Contains Novel Antibiotic Resistance Alleles and Exhibits Genetic Similarities to Plant and Clinical Klebsiella Isolates>>. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,58(4):1879–1888. <https://doi.org/10.1128/AAC.01605-13>
- Hazen, T. H., Zhao, L., Sahl, J. W., Robinson, G., Harris, A. D., Rasko, D. A., & Johnson, J. K. 2014. <<Characterization of Klebsiella sp. Strain 10982, a Colonizer of Humans That Contains Novel Antibiotic Resistance Alleles and Exhibits Genetic Similarities to Plant and Clinical Klebsiella Isolates>>. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*,58(4):1879–1888. <https://doi.org/10.1128/AAC.01605-13>
- Headrick, D. H., & Goeden, R. D. 1996a. <<Issues Concerning the Eradication or Establishment and Biological Control of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), in California>>. *Biological Control*,6(3):412–421. <https://doi.org/10.1006/bcon.1996.0054>
- Headrick, D. H., & Goeden, R. D. 1996b. <<Issues Concerning the Eradication or Establishment and Biological Control of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), in California>>. *Biological Control*,6(3):412–421. <https://doi.org/10.1006/bcon.1996.0054>
- Healy, M., Huong, J., Bittner, T., Lising, M., Frye, S., Raza, S., ... Lupski, J. R. 2005. <<Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR>>. *Journal of Clinical Microbiology*,43(1):199–207. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.199-207.2005>
- Hendrichs, J., Franz, G., & Rendon, P. 1995. <<Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting seasons>>. *Journal of Applied Entomology*,119(1–5):371–377. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1995.tb01303.x>
- Hillerton, J.E, 1984: Cuticle: mechanical properties. En: *Biology of the tegument*, 626-637. BereiterHahn, J.: Matolsty, A. G., Richards, K. S. Springer-Verlag. Berlin.

- Hisham Radwan Ibrahim, Akio Kato, & Kunihiro Kobayash. 1991. <<Antimicrobial Effects of Lysozyme against Gram-Negative Bacteria Due to Covalent Binding of Palmitic Acid>>. *J. Agric. Food Chem.*,39:2077–2082.
- Hull, D., & Timmons, L. 2004. <<Methods for Delivery of Double-Stranded RNA into *Caenorhabditis elegans*>>. En J. Gott (Ed.), *RNA Interference, Editing, and Modification: Methods and Protocols Edited* (Vol. 265, pp. 23–59). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1592597750>
- Hurteau, G. J., & Spivack, S. D. 2002. <<mRNA-specific reverse transcription-polymerase chain reaction from human tissue extracts>>. *Analytical Biochemistry*,307(2):304–315. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00058-1)
- iLLumina. 2016. <<MiniSeq System Guide>>. *ILLUMINA*,20002370(1000000002695 v00).
- Illumina. 2010. <<Illumina Sequencing Technology>>,:5.
- Illumina. 2015. <<Guía breve de flujo de trabajo de principio a fin con Custom Protocol Selector>>,:100.
- In, C., Acidity, S., Accuracy, W., The, O. F., Mix, N., & Your, I. N. 2009. <<260/280 and 260/230 Ratios>>. *ThermoFisher Scientific*,:2–3. <https://doi.org/10.1002/jobm.19770170116>
- INLAC. "Planta MOSCAMED "El Pino"" *Instituto Latinoamericano De Calidad*. N.p., 2015. Web. 5 Oct. 2016.
- Irwin, M., & Kampmeier, G. (2002). Commercial Products, from Insects. *Encyclopedia of Insects*.
- Jacek Switala, Barbara L. Triggs-Raine, & Peter C. Loewen. 1990. <<Homology among bacterial catalase genes>>. *CAN. J. MICROBIOL.*,36:728–731.
- Jamnongluk, W., Kittayapong, P., Baimai, V., & O'Neill, S. L. 2002. <<Wolbachia infections of tephritid fruit flies: molecular evidence for five distinct strains in a single host species.>>. *Current microbiology*,45(4):255–60. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3746-1>
- Jenkins, D. A., & Goenaga, R. 2008. <<Host Breadth and Parasitoids of Fruit Flies (*Anastrepha* spp.) (Diptera: Tephritidae) in Puerto Rico>>. *Environmental Entomology*,37(1).
- Jiang, J., Tun, H., Mauroo, N., Ma, A. P., Chan, S., Leung, F. C., ... Gulati, A. 2014. <<Complete genome sequence and comparative genome analysis of *Klebsiella oxytoca* HKOPL1 isolated from giant panda feces>>. *BMC Research Notes*,7(1):827. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-827>
- Joainig, M. M., Gorkiewicz, G., Leitner, E., Weberhofer, P., Zollner-Schwetz, I., Lippe, I., ... Högenauer, C. 2010. <<Cytotoxic effects of *Klebsiella oxytoca* strains isolated from patients with antibiotic-associated hemorrhagic colitis or other diseases caused by infections and from healthy subjects.>>. *Journal of clinical microbiology*,48(3):817–24. <https://doi.org/10.1128/JCM.01741-09>
- Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G., & Ahringer, J. 2001. <<Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*>>. *Genome biology*,2(1):RESEARCH0002. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-2-1-research0002>
- Kashyap, P. L., Xiang, X., & Heiden, P. 2015. <<Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture>>. *International Journal of Biological Macromolecules*,77:36–51.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039>

- Khan, T., Peh, K., & Ch'ng, H. (2002). Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3).
- Khlebnikov, A., Risa, Ø., Skaug, T., Trent, a, Keasling, J. D., & Carrier, T. a. 2000. <<Regulatable Arabinose-Inducible Gene Expression System with Consistent Control in All Cells of a Culture Regulatable Arabinose-Inducible Gene Expression System with Consistent Control in All Cells of a Culture>>. *Journal of bacteriology*, 182(24):7029–7034. <https://doi.org/10.1128/JB.182.24.7029-7034.2000>. Updated
- Khanafari A., Marandi R., Sanatei S. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iran. J. Environ. Health Sci. Eng.* 2008
- Kim, S. (2011). *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: Biological activities and applications*. Boca Raton: Taylor & Francis.
- Kim, E., Park, Y., Kim, Y., & Ling, E. 2015. <<A transformed bacterium expressing double-stranded RNA specific to integrin $\beta 1$ enhances Bt Toxin efficacy against a polyphagous insect pest, *Spodoptera exigua*>>. *PLoS ONE*, 10(7):1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132631>
- Kumar, S., & Filipski, A. 2007. <<Multiple sequence alignment: in pursuit of homologous DNA positions.>>. *Genome research*, 17(2):127–35. <https://doi.org/10.1101/gr.5232407>
- Kumar, V., Sun, P., Vamathevan, J., Li, Y., Ingraham, K., Palmer, L., ... Brown, J. R. 2011. <<Comparative genomics of *Klebsiella pneumoniae* strains with different antibiotic resistance profiles.>>. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(9):4267–76. <https://doi.org/10.1128/AAC.00052-11>
- Kumar, P. T. Sudheesh, G. Praveen, Mincy Raj, K. P. Chennazhi, and R. Jayakumar. "Flexible, Micro-porous Chitosan–gelatin Hydrogel/nanofibrin Composite Bandages for Treating Burn Wounds." *RSC Adv.* 4.110 (2014): 65081-5087. Web.
- Lee, M. H., Pankratz, H. S., Wang, S., Scott, R. A., Finnegan, M. G., Johnson, M. K., ... Hausinger, R. P. 1993. <<Purification and characterization of *Klebsiella aerogenes* UreE protein: A nickel-binding protein that functions in urease metallocenter assembly>>. *Protein Science*, 2(6):1042–1052. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020617>
- Lee, T.-Y., Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., & Nakata, A. 1989. <<Phosphate Regulon in Members of the Family Enterobacteriaceae: Comparison of the phoB-phoR Operons of *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, and *Klebsiella pneumoniae*>>. *Journal of Bacteriology*, 171(12):6593–6599.
- Li, X., Zhang, M., & Zhang, H. 2011. <<RNA Interference of Four Genes in Adult *Bactrocera dorsalis* by Feeding Their dsRNAs>>, 6(3):1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017788>
- Liao, Y.-C., Huang, T.-W., Chen, F.-C., Charusanti, P., Hong, J. S. J., Chang, H.-Y., ... Hsiung, C. A. 2011. <<An experimentally validated genome-scale metabolic reconstruction of *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578, iYL1228.>>. *Journal of bacteriology*, 193(7):1710–7. <https://doi.org/10.1128/JB.01218-10>
- Life Technologies. 2010. <<TRIzol ® Reagent>>, (15596026):18–21. <https://doi.org/10.1101/pdb.caut2701>

- Ligozzi, M., & Fontana, R. 2003. <<Isolation of total DNA from bacteria and yeast>>. *African Journal of Biotechnology*, 2(8):251–253.
- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., ... Yang, Q. (2012). Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela motschulsky*. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules17044604>
- Lim, L., Khor, E., & Koo, O. (1998). Gamma Irradiation of chitosan. *Journal of Biomedical Materials Research*, 43(3), 282-290. doi:10.1002/(sici)1097-4636(199823)43:33.0.co;2-j
- Linden, James C.; Stoner, Richard J.; Knutson, Kenneth W.; Gardner-Hughes, Cecilie A. "Organic disease control elicitors" *Agro Food Industry Hi-Tech*. (2000). 11 (5): 32–4.
- López-Arriaga, F., Montoya, P., Cancino, J., Toledo, J., & Liedo, P. 2014. <<Female pupae of the genetic sexing strain “Tap-7” of *Anastrepha ludens* as hosts of *Coptera haywardi*>>. *BioControl*, 59(2):149–157. <https://doi.org/10.1007/s10526-013-9552-9>
- Louws, F. J., Bell, J., Medina-Mora, C. M., Smart, C. D., Opgenorth, D., Ishimaru, C. A., ... Fulbright, D. W. 1998. <<rep-PCR-Mediated Genomic Fingerprinting: A Rapid and Effective Method to Identify *Clavibacter michiganensis*>>. *Phytopathology*, 88(8):862–868. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.8.862>
- Lundin, S., Jemt, A., Terje-Hegge, F., Foam, N., Pettersson, E., Käller, M., ... Lundeberg, J. 2015. <<Endonuclease Specificity and Sequence Dependence of Type IIS Restriction Enzymes>>. *PLOS ONE*, 10(1):e0117059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117059>
- Macrogen. 2017. <<Macrogen>>.
- Magaña, C., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., & Castañera, P. 2007. <<Resistance to malathion in field populations of *Ceratitis capitata*>>. *Journal of economic entomology*, 100(6):1836–1843. [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2007\)100\[1836:RTMIFP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2007)100[1836:RTMIFP]2.0.CO;2)
- Malacrida, A. R., Gomulski, L. M., Bonizzoni, M., Bertin, S., Gasperi, G., & Guglielmino, C. R. 2007. <<Globalization and fruitfly invasion and expansion: The medfly paradigm>>. *Genetica*, 131(1):1–9. <https://doi.org/10.1007/s10709-006-9117-2>
- Malakar, P., & Venkatesh, K. V. 2012. <<Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins>>. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6):2543–2549. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3642-3>
- Marchini, D., Rosetto, M., Dallai, R., & Marri, L. 2002. <<Bacteria associated with the oesophageal bulb of the medfly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)>>. *Current Microbiology*, 44:120–124.
- Marques, A. S. A., Marchaisson, A., Gardan, L., & Samson, R. 2008. <<BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae*: P. viridiflava group>>. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1):106–115. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000100019>
- Marquis-Duval F.O. Ph.D. Dissertation. Laval University; Quebec, Canada: 2008. Isolation et valorisation des constituants de la carapace de la crevette nordique
- Metzker, M. L., Caskey, C. T., Metzker, M. L., & Caskey, C. T. 2009. <<Polymerase Chain Reaction (PCR)>>. En *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000998.pub2>

- Michaelis, S., Chapon, C., D'enfert, C., Pugsley, A. P., & Schwartz, A. M. 1985. <<Characterization and Expression of the Structural Gene for Pullulanase, a Maltose-Inducible Secreted Protein of *Klebsiella pneumoniae*>>. *Journal of Bacteriology*, 164(2):633–638.
- Mirón, J. Vázquez, J., Ramos, P., Valcarcel, J., Sotelo, C., & Pérez-Martín, R. (2017). Production of Chitin from *Penaeus vannamei* By-Products to Pilot Plant Scale Using a Combination of Enzymatic and Chemical Processes and Subsequent Optimization of the Chemical Production of Chitosan by Response Surface Methodology. *Marine Drugs*, 15(6), 180. doi:10.3390/md15060180
- Montoya, P., Liedo, P., Benrey, B., Cancino, J., Barrera, J. F., Sivinski, J., & Aluja, M. 2000. <<Biological Control of *Anastrepha spp.* (Diptera: Tephritidae) in Mango Orchards through Augmentative Releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae)>>. *Biological Control*, 18(3):216–224. <https://doi.org/10.1006/bcon.2000.0819>
- Moscamed. 2010. <<Programa Moscamed Guatemala>>.
- MOSCAMED. 2016. <<Programa Moscamed Guatemala>>. Recuperado el 3 de septiembre de 2016, a partir de <http://moscamed-guatemala.org.gt/?secc=Inicio>
- N. Acosta, C. Jiménez, V. Borau, A. Heras, Extraction and characterization of chitin from crustaceans, *Biomass and Bioenergy* 5 (2) (1993) 145-153.
- NCBI. 2014. <<RNA Interference (RNAi)>>. Recuperado el 27 de octubre de 2016, a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techmai/>
- Novagen. 2004. <<Novagen Transformation Protocol for Competent Cells>>.:1–23.
- OAE. 2014. <<OEC - Guatemala (GTM) Exportaciones, Importaciones, y Socios comerciales>>. Recuperado el 27 de octubre de 2016, a partir de <http://atlas.media.mit.edu/es/profile/country/gtm/>
- Olive, D. M., & Bean, P. 1999. <<MINIREVIEW Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms>>. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 37(6):1661–1669.
- Oroño, L., Albornoz, P., Núñez, S., Van Nieuwenhove, G., & Bezdjian, L. 2006. <<Update of host plant list of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* in Argentina>>. *Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*.,:207–225.
- Ovruski, S., Aluja, M., Sivinski, J., & Wharton, R. 2000. <<Hymenopteran Parasitoids on Fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the Southern United States: Diversity, Distribution, Taxonomic Status and their use in Fruit Fly Biological Control>>. *Integrated Pest Management Reviews*, 5(2):81–107. <https://doi.org/10.1023/A:1009652431251>
- Pacheco, N.A., Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosano : caracterización y aplicación. Universit'e Claude Bernard - Lyon I, 2010. Español.
- Pane, A., Salvemini, M., Delli Bovi, P., Polito, C., & Saccone, G. 2002. <<The transformer gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate.>>. *Development (Cambridge, England)*, 129:3715–3725.
- Park, S., Marsh, K., & Rhim, J. (2002). Characteristics of Different Molecular Weight Chitosan Films

- Affected by the Type of Organic Solvents. *Journal of Food Science*, 67(1), 194-197. Peterson, J. W. 1996. *Bacterial Pathogenesis. Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Percot, A., Viton, C., & Domard, A. (2003). Characterization of Shrimp Shell Deproteinization. *Biomacromolecules*, 4(5), 1380-1385. doi:10.1021/bm034115h
- Pfaffl, M. 2000. <<Relative quantification>>. En *Real time PCR* (pp. 63–82). International University Line. Recuperado a partir de <http://gene-quantification.com/pfaffl-rel-quan-book-ch3.pdf>
- Pillai, W., Chandra P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34 (2009) 641–678
- Podschun, R., & Ullmann, U. 1998. <<Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors>>. *Clinical Microbiology Revi*, 11(4):589–603.
- Pöhlmann-Dietze, P., Ulrich, M., Kiser, K. B., Döring, G., Lee, J. C., Fournier, J. M., ... Wolz, C. 2000. <<Adherence of Staphylococcus aureus to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase.>>. *Infection and immunity*, 68(9):4865–71. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.4865-4871.2000>
- Pomerantz, A. F., & Hoy, M. A. 2014. <<RNAi-mediated knockdown of transformer-2 in the predatory mite Metaseiulus occidentalis via oral delivery of double-stranded RNA>>. *Experimental and Applied Acarology*, 65(1):17–27. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9852-5>
- Promega. 2009a. <<pGEM(R)-T and pGEM(R)-T Easy Vector Systems Quick Protocol, FB033>>.:1–2. Recuperado a partir de [papers2://publication/uuid/E1997377-D3F6-4B77-A955-EA5466C7B1AF](https://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/pureyield-plasmid-miniprep-system-protocol/)
- Promega. 2009b. <<PureYield™ Plasmid Miniprep System>>, 374:12. Recuperado a partir de <https://www.promega.co.uk/resources/protocols/technical-bulletins/101/pureyield-plasmid-miniprep-system-protocol/>
- Promega. 2010a. <<GoScript(TM) Reverse Transcription System Quick Protocol, 9FB114>>.:5000–5001.
- Promega. 2010b. <<pGEM(R)-T and pGEM(R)-T Easy Vector Systems Technical Manual>>. Recuperado a partir de <https://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>
- Promega. 2013. <<GoTaq® Colorless Master Mix>>, (6):8–9.
- Promega. 2016. <<GoScript™ Reverse Transcription System GoScript™ Reverse Transcription System>>.
- Promega. 2017. <<Promega BioMath Calculators>>.
- Pro-Agro. (n.d.). Retrieved October 18, 2016, from <http://www.pro-agro.com.mx/prods/dow/dow20.htm>
- Poole-Warren, L., Martens, P., & Green, R. (2016). *Biosynthetic polymers for medical applications*. Amsterdam: Elsevier/Woodhead Publishing.
- Qureshi, S. 2016. <<Klebsiella Infections: Background, Pathophysiology, Epidemiology of Klebsiellae>>.

- Qureshi, S., & Bronze, M. S. 2017. <<Klebsiella Infections: Background, Pathophysiology, Epidemiology of Klebsiellae>>.
- Ramírez M. Á, Rodríguez A, Peniche C. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Biotecnología Aplicada* v.27 n. 4; (2010) 270- 276.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. 2013. <<An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis.>>. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*,3(3):71–85. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25558171>
- Rashid, Taslim, Mohammed Rahman, Sayed Shamsuddin, and Mubarak Khan. "A New Approach for the Preparation of Chitosan from γ -irradiation of Prawn Shell: Effects of Radiation on the Characteristics of Chitosan." *ResearchGate*. (2011). Web. 5 Oct. 2016.
- Rauf, A. (2017). Chitosan Based Nanoparticles towards Biomedical Applications. *Journal of Nanomedicine Research*,5(2). doi:10.15406/jnmr.2017.05.00112
- Regue, M., Hita, B., Pique, N., Izquierdo, L., Merino, S., Fresno, S., ... Tomas, J. M. 2004. <<A Gene, uge, Is Essential for Klebsiella pneumoniae Virulence>>. *Infection and Immunity*,72(1):54–61. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.54-61.2004>
- Rempoulakis, P., Taret, G., Ul Haq, I., Wornayporn, V., Ahmad, S., Tomas, U. S., ... Vreysen, M. J. B. 2016a. <<Evaluation of quality production parameters and mating behavior of novel genetic sexing strains of the mediterranean fruit fly ceratitis capitata (wiedemann) (diptera: Tephritidae)>>. *PLoS ONE*,11(6):1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157679>
- Rempoulakis, P., Taret, G., Ul Haq, I., Wornayporn, V., Ahmad, S., Tomas, U. S., ... Vreysen, M. J. B. 2016b. <<Evaluation of quality production parameters and mating behavior of novel genetic sexing strains of the mediterranean fruit fly ceratitis capitata (wiedemann) (diptera: Tephritidae)>>. *PLoS ONE*,11(6):1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157679>
- Rendon, P., & Montoya, P. 2008. <<Final Report. United States, Mexico, and Guatemala Fruit Fly Emergence and Release Facilities Review>>. *USDA*.
- Reynolds, S. E., 1987: The cuticle, growth and moulting in insects: the essential background to the action of acylurea insecticides. *Pestic. Sci*, 20:131-146.
- Rhoads, A., & Au, K. F. 2015. <<PacBio Sequencing and Its Applications>>. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>
- Rideout, E. J., Billeter, J. C., & Goodwin, S. F. 2007. <<The Sex-Determination Genes fruitless and doublesex Specify a Neural Substrate Required for Courtship Song>>. *Current Biology*,17(17):1473–1478. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.047>
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and Chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*, 31:603-632.
- Rodrigues, D. F., Sakata, S. K., Comasseto, J. V., Bicego, M. C., & Pellizari, V. H. 2009. <<Diversity of hydrocarbon-degrading *Klebsiella* strains isolated from hydrocarbon-contaminated estuaries>>. *Journal of Applied Microbiology*,106(4):1304–1314. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04097.x>

- Rosenberg, M. S. 2009. *Sequence Alignment: Methods, Models, Concepts, and Strategies - Michael S. Rosenberg - Google Books*. (Michael S. Rosenberg, Ed.) (1ra ed.). University of California Press.
- Ruiz, M. F., Milano, A., Salvemini, M., Eirín-López, J. M., Perondini, A. L. P., Selivon, D., ... Sánchez, L. 2007. <<The gene *transformer* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects>>. *PLoS ONE*,2(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001239>
- Ruiz-Herrera J., Sing V.O., van der Woude W.J., Bartnicki-Garcia S. Microfibril assembly by granules of chitin synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1975;72:2706–2710.
- Sage Science. 2017. <<BluePippin Size Selection | Genomics & Bioinformatics Core Facility>>.
- Salvemini, M., Robertson, M., Aronson, B., Atkinson, P., Polito, L. C., & Saccone, G. 2009. <<*Ceratitidis capitata* transformer-2 gene is required to establish and maintain the autoregulation of Cctra, the master gene for female sex determination>>. *International Journal of Developmental Biology*,53(1):109–120. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082681ms>
- Sambrook, J; Russell, D. 2011. *Molecular Cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarno, F., Ruiz, M. F., Eirín-López, J. M., Perondini, A. L. P., Selivon, D., & Sánchez, L. 2010. <<The gene *transformer-2* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects.>>. *BMC evolutionary biology*,10(1):140. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-140>
- Sastoque Cala L., Mercado Reyes M., Martínez Salgado, M., Quevedo Hidalgo, B., Pedroza Rodríguez, A. Producción de quitinasas extracelulares con una cepa alcalófila halotolerante de *Streptomyces* sp. aislada de residuos de camarón. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol. 6 N° 2 (2007) 137-146
- Schetelig, M. F., Milano, A., Saccone, G., & Handler, A. M. 2012. <<Male only progeny in *Anastrepha suspensa* by RNAi-induced sex reversion of chromosomal females>>. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*,42(1):51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.10.007>
- Schmidt, G., Stiverson, J., Angen, Ø., Yu, Z., & Schmidt, G. 2014. <<Number of PCR Cycles and Magnesium Chloride Concentration Affect Detection of tet Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins in Swine Manure>>. *Advances in Microbiology*,4(4):780–787. <https://doi.org/10.4236/aim.2014.412086>
- Schwarz, E., & Oesterhelt, D. 1985. <<Cloning and expression of *Klebsiella pneumoniae* genes coding for citrate transport and fermentation.>>. *The EMBO Journal*,4(6):1599–1603. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1985.TB03823.X>
- Scientific, T. (s/f). <<Thermo Scientific Replicator RNAi Kit #F-610 Lot _ Expiry Date>>. Recuperado a partir de https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012405_Replicator_RNAi_UG.pdf
- Scolari, F., Gomulski, L. M., Gabrieli, P., Manni, M., Savini, G., Gasperi, G., & Malacrida, A. R. 2014. <<How functional genomics will impact fruit fly pest control: the example of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*>>. *BMC Genetics*,15(Suppl 2):S11. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-S2-S11>
- SIGMA-ALDRICH. 2017a. <<88902 Mac Conkey-Sorbitol Agar (Sorbitol Mac Conkey Agar, SMAC

Agar)>>. *Product Information*.

SIGMA-ALDRICH. 2017b. <<Proteinase K from *Engyodontium album*>>. *Product Information*,:1–2.

Soler Bistué, A. J. C., Birshan, D., Tomaras, A. P., Dandekar, M., Tran, T., Newmark, J., ... Tolmasky, M. E. 2008. <<*Klebsiella pneumoniae* Multiresistance Plasmid pMET1: Similarity with the *Yersinia pestis* Plasmid pCRY and Integrative Conjugative Elements>>. *PLoS ONE*,3(3):e1800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001800>

Soutter, W. (2017, July 31). Chitosan Nanoparticles - Properties and Applications. Retrieved December 05, 2017, from <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3232>

Stuart M. Brown. 2017. <<Sequencing-by-Synthesis: Explaining the Illumina Sequencing Technology - Bitesize Bio>>.

Stamford, Thayza Christina Montenegro, Thatiana Montenegro, Horacina Maria De Medeiros Cavalcante, Rui Oliveira, and Galba Maria De Campos-Takaki. "Microbiological Chitosan: Potential Application as Anticariogenic Agent." *Practical Applications in Biomedical Engineering* (2013): n. pag. Web.

Sun, S., Huang, H., Qi, Y. B., Qiu, M., & Dai, Z.-M. 2015. <<Complementary annealing mediated by exonuclease: a method for seamless cloning and conditioning site-directed mutagenesis>>. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*,29(1):105–110. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.988094>

Takara. 2017. <<Proteinase K | Protein Digestion>>.

Taracena, M. L., Oliveira, P. L., Almendares, O., Umaña, C., Lowenberger, C., Dotson, E. M., ... Pennington, P. M. 2015. <<Genetically Modifying the Insect Gut Microbiota to Control Chagas Disease Vectors through Systemic RNAi>>. *PLoS Neglected Tropical Diseases*,9(2):e0003358. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003358>

Teal, P. E. A., Gomez-Simuta, Y., Dueben, B. D., Holler, T. C., & Olson, S. 2006. <<Improving the Efficacy of the Sterile Insect Technique for Fruit Flies by Incorporation of Hormone and Dietary Supplements into Adult Holding Protocols>>. En *Area-Wide Control of Insect Pests* (pp. 163–173). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5_14

Tevfik, M. 2006. *Real-time PCR*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.4016/17251.01>

Thermo Scientific. 1975. *260/280 and 260/230 Ratios*. New York. Recuperado a partir de www.nanodrop.com

ThermoFisher. 2016. <<Extraction of DNA using DNAzol® Reagent>>.

ThermoFisher Scientific. 2017. <<Your DNA may be degraded>>.

Timmons, L., Court, D. L., & Fire, A. 2001. <<Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*>>. *Gene*,263(1–2):103–112. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00579-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00579-5)

Timmons, L., & Fire, a. 1998. <<Specific interference by ingested dsRNA.>>. *Nature*,395(6705):854. <https://doi.org/10.1038/27579>

- Tsaih M.L., Chen R.H. The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.*2003;88:2917–2923. doi: 10.1002/app.11986
- Tsigos I., Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V. Chitin deacetylases: New, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2000;18:305–312. doi: 10.1016/S0167-7799(00)01462-1.
- Tkachuk, a. P., Kim, M. V., Savitskiy, V. Y., & Savitskiy, M. Y. 2011. <<The prospects of using transgenic insects in biological programs>>. *Biology Bulletin Reviews*,1(3):265–278. <https://doi.org/10.1134/S2079086411030091>
- University of Florida, U. 2014. <<Diachasmimorpha longicaudata>>. Recuperado el 5 de octubre de 2016, a partir de http://entnemdept.ufl.edu/creatures/beneficial/d_longicaudata.htm
- University of Washington. 2004. <<MgCl2>>.
- Verhulst, E. C., van de Zande, L., & Beukeboom, L. W. 2010. <<Insect sex determination: It all evolves around transformer>>. *Current Opinion in Genetics and Development*,20(4):376–383. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.05.001>
- Vethanayagam, J. G., & Flower, A. M. 2005. <<Decreased gene expression from T7 promoters may be due to impaired production of active T7 RNA polymerase>>. *Microbial cell factories*,4:3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-3>
- Wang, W., Shuqin Bo, Shuqing y Wen Qin (1991). Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *Int. J. Biol. Macromol.* 13:281-285.
- Wang, W., Shuqin Bo, Shuqing y Wen Qin (1991). Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *Int. J. Biol. Macromol.* 13:281-285.
- Wanule, D., Nagare, K. H., Moulvi, S., & Koche, N. P. (n.d.). Extraction and Physico-Chemical Analysis of Chitosan from Shell of Marine Crab Scylla Serrata. *INDIAN JOURNAL OF APPLIED RESEARCH X*.
- Wasikiewicz, J. M., Yoshii, F., Nagasawa, N., Wach, R. A., & Mitomo, H. (2005). Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods. *Radiation Physics and Chemistry*,73(5), 287-295.
- Weill Cornell, M. C. 2016. <<SMRT Sequencing Service>>.
- Wen, Z., Liu, Y., Qu, F., & Zhang, J.-R. 2016. <<Allelic Variation of the Capsule Promoter Diversifies Encapsulation and Virulence In Streptococcus pneumoniae>>. *Scientific Reports*,6(1):30176. <https://doi.org/10.1038/srep30176>
- Whyard, S., Singh, A. D., & Wong, S. 2009. <<Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides>>. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*,39(11):824–832. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.09.007>
- Wilson E. Buvinger, & Monica Riley. 1985. <<Nucleotide Sequence of Klebsiella pneumoniae lac Genes>>. *Journal of Bacteriology*,163:850–857.
- Wolska, K., & Szweda, P. 2012. <<Genotyping Techniques for Determining the Diversity of

- Microorganisms>>. En M. Caliskan (Ed.), *Genetic Diversity in Microorganisms* (p. 43).
- Wu, M.-C., Lin, T.-L., Hsieh, P.-F., Yang, H.-C., & Wang, J.-T. 2011. <<Isolation of Genes Involved in Biofilm Formation of a *Klebsiella pneumoniae* Strain Causing Pyogenic Liver Abscess>>. *PLoS ONE*,6(8):e23500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023500>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. 2012. <<Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction>>. *BMC Bioinformatics*,13(1):134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*.
- Yu, N., Christiaens, O., Liu, J., Niu, J., Cappelle, K., Caccia, S., ... Smagghe, G. 2013. <<Delivery of dsRNA for RNAi in insects: An overview and future directions>>. *Insect Science*,20(1):4–14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01534.x>
- Yuval, B., Ben-Ami, E., Behar, A., Ben-Yosef, M., & Jurkevitch, E. 2013. <<The Mediterranean fruit fly and its bacteria - potential for improving sterile insect technique operations>>. *Journal of Applied Entomology*,137(SUPPL.1):39–42. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01555.x>
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. a, & Bartel, D. P. 2000. <<RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals.>>. *Cell*,101(1):25–33. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80620-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80620-0)
- Zhang, X., Zhang, J., & Zhu, K. Y. 2010. <<Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*)>>. *Insect Molecular Biology*,19(5):683–693. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01029.x>
- Zhang, Y. (s/f). *Molecular genetic approaches to the study of early sex determination in the Mediterranean fruit fly Ceratitis capitata*. Universidad de Napoles Federico II.
- Zhang, Y.-. 2013. *Encyclopedia of Systems Biology*. (W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K.-H. Cho, & H. Yokota, Eds.). Netherlands: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7>
- Zheng, B., Li, A., Jiang, X., Hu, X., Yao, J., Zhao, L., ... Li, L. 2014. <<Genome sequencing and genomic characterization of a tigecycline-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from the bile samples of a cholangiocarcinoma patient>>. *Gut Pathogens*,6(1):40. <https://doi.org/10.1186/s13099-014-0040-2>
- Zhou, J., Lemos, B., Dopman, E. B., & Hartl, D. L. 2011. <<Copy-number variation: The balance between gene dosage and expression in *Drosophila melanogaster*>>. *Genome Biology and Evolution*,3(1):1014–1024. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr023>

9. ANEXOS

Figura 81. Flujo de trabajo para extracción de ARN

Esta figura muestra la localización del equipo utilizado para cada una de las siguientes actividades 1) Extracción de ARN, 2) Preparación de Master Mix de tratamiento de ADNasa y 3) Tratamiento de ANasa

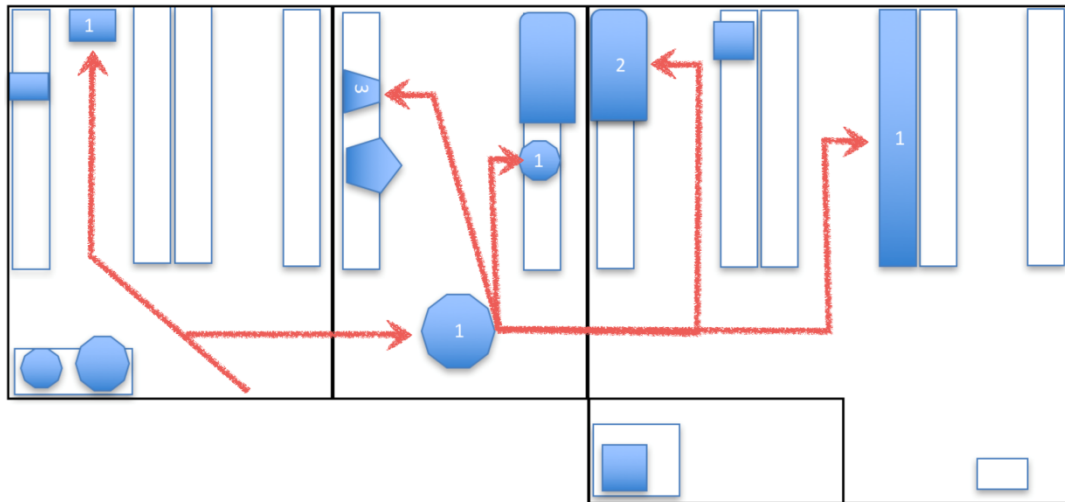


Figura 82. Flujo de trabajo para síntesis de ADNc

Esta figura muestra la localización del equipo utilizado para cada una de las siguientes actividades 1) Preparación de Master Mix para síntesis de ADNc o PCR, 2) Adición de ARN a Master Mix, 3) Síntesis de ADNc y 4) Adición de plantilla de ADNc

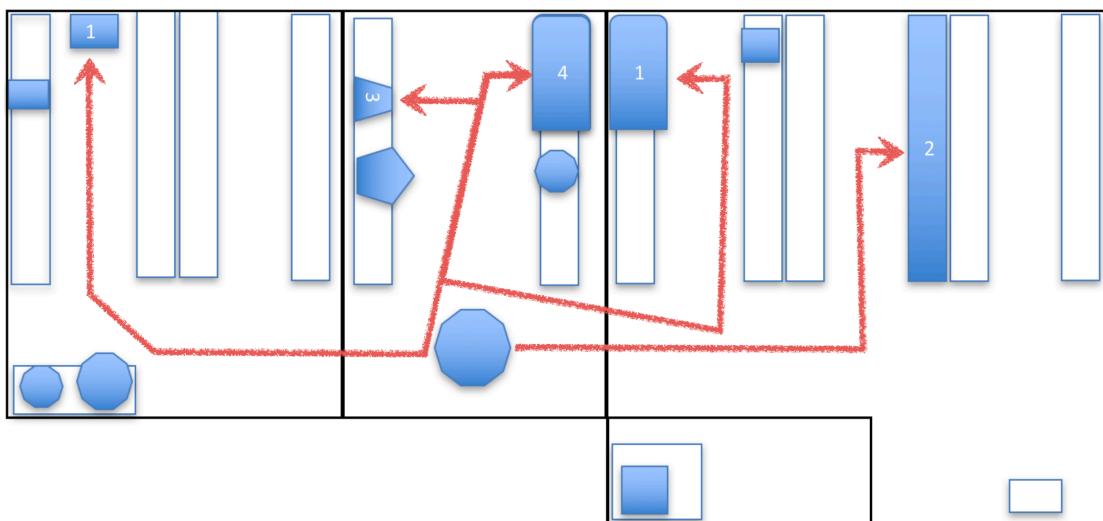


Figura 83. Flujo de trabajo para PCR de genes específicos y geles de agarosa

Esta figura muestra la localización del equipo utilizado para cada una de las siguientes actividades
1) PCR de actina o genes específicos, 2) Electroforesis de geles de agarosa, 3) Observación de gel en transiluminador y 4) Preservación de productos PCR (4°C)

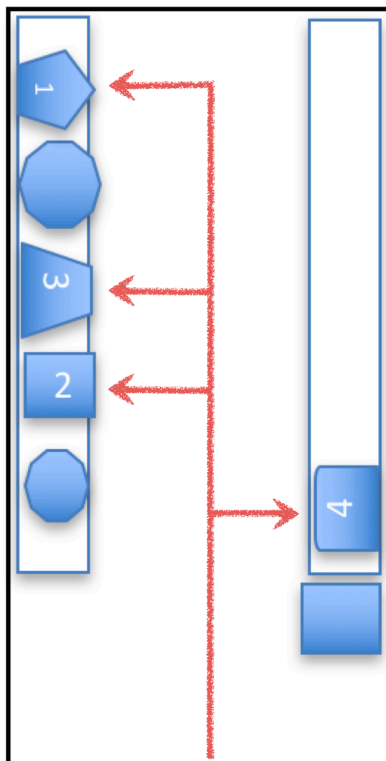


Figura 84. Alineamiento de secuencia de gen *transformer* en *C. capitata* y *A. suspensa*

Secuencia del gen *transformer* variante femenina de *C. capitata* (GenBank: AF434936.1), variante masculina 1 de *C. capitata* CcTraM1 (GenBank: AF434937.1), variante masculina 2 de *C. capitata* CcTraM2 (GenBank: AF434938.1) y variante femenina de *A. suspensa* AstraF (GenBank: JN597286.1). Los oligos para q-PCR se encuentran subrayados de distintos colores.

```

AsTraF      -----ATCCCAT-----CAGAAAAATATCTTATA
CcTraM2    GTTGTA AACCCCTGATAATGTTGTAAGTAATGTGGGTGCTCATT TTTGAAACACAGCCTAAA
CcTraF     GTTGTA AACCCCTGATAATGTTGTAAGTAATGTGGGTGCTCATT TTTGAAACACAGCCTAAA
CcTraM1    GTTGTA AACCCCTGATAATGTTGTAAGTAATGTGGGTGCTCATT TTTGAAACACAGCCTAAA
           *:***: *                               :****.* * * **:*

AsTraF     AGTGAAGTAAAAACAGGGCTAAGGACGTTTCAAATCAATATCTAAAAAGAAGTCGCAGT
CcTraM2    GATCGGAGTAACAACAGTAAAGAGGAGGTTGAAAATCAATGGCGCAAAGAGCGTCAAAA
CcTraF     GATCGGAGTAACAACAGTAAAGAGGAGGTTGAAAATCAATGGCGCAAAGAGCGTCAAAA
CcTraM1    GATCGGAGTAACAACAGTAAAGAGGAGGTTGAAAATCAATGGCGCAAAGAGCGTCAAAA
           ..* ..*****.***** ..:.* ** .*****. * .***....**.*.:

AsTraF     TCGACAGATTCTAGCAGCCAGAAGGATATCGGAAGTACCATACCGGTCCCTATAATGAC
CcTraM2    TCGACAGATTCCAGCAGCCAGAACGATTTCGTAAGCATCATTCTAGTAACAAAAGTGAA
CcTraF     TCGACAGATTCCAGCAGCCAGAACGATTTCGTAAGCATCATTCTAGTAACAAAAGTGAA
CcTraM1    TCGACAGATTCCAGCAGCCAGAACGATTTCGTAAGCATCATTCTAGTAACAAAAGTGAA
           ***** ***** **:* ** * **:* * .*. .*:*.***.

AsTraF     TGCACAATA---GTACCAATAATAGAT--CGCCTC-----CACGAACCAAGCCCTTAAA
CcTraM2    CATTCAAACAGCGGTAACAATATTACAACACGACACACAAAAACGCACCA--CCC-----
CcTraF     CATTCAAACAGCGGTAACAATATTACAACACGACACACAAAAACGCACCA--CCC-----
CcTraM1    CATTCAAACAGCGGTAACAATATTACAACACGACACACAAAAACGCACCA--CCC-----
           . :***. *   **.******:** * : * .*: *   .***.*** **

AsTraF     ATCTACTAATGAGGGA-----AACATACAACCTCGCTGCGACTCGTCACCACCATTAA
CcTraM2    ---TTCACAAGAGAATCTTAACACAGCTTCAAACGCGGTGACTCTTACCACCAACTAA
CcTraF     ---TTCACAAGAGAATCTTAACACAGCTTCAAACGCGGTGACTCTTACCACCAACTAA
CcTraM1    ---TTCACAAGAGAATCTTAACACAGCTTCAAACGCGGTGACTCTTACCACCAACTAA
           *.*:.*:***.:.:   *. * .*:.*:*** * ***** *****: **

AsTraF     CCATCGTCGAAGAACACCTGAAAACTGCCATATTTTATAGACGAGACAAGAGAACGTGA
CcTraM2    CCGACGGCACAGAACGCCAGAGAAAGTCCCTACTTCATAGACGAGATTAGAGAACGCGA
CcTraF     CCGACGGCACAGAACGCCAGAGAAAGTCCCTACTTCATAGACGAGATTAGAGAACGCGA
CcTraM1    CCGACGGCACAGAACGCCAGAGAAAGTCCCTACTTCATAGACGAGATTAGAGAACGCGA
           **.:** * ..*****.**:*.*** * *.** ** ***** :***** **

AsTraF     TAGACTTCGGCGCAAATATGAACTAGATCCAAAATACCATCATCTTCGCTCCCTTGTC
CcTraM2    CCGCATTCGACGT-----
CcTraF     CCGCATTCGACGTAAATATGGAAAGAGATCTACAAAATCACCGTCACCCCA GTTATGTC
CcTraM1    CCGCATTCGACGT-----
           .*. .*****.

AsTraF     ATCAAGGTCACGTCATAGGCGCAGTCTACGAAATC-----ACGGTCTCGCTCCCAATC
CcTraM2    -----
CcTraF     ATCAAGGTTTCGTCGAGGCGGAGTTACTCAAGATCAATCTCTCGTCAAGGTCATTC
CcTraM1    -----

```

**Figura 85. Alineamiento de secuencia de gen *transformer-2* en *C. capitata* y *A. suspensa*
 Secuencia del gen *transformer-2* variante femenina de *C. capitata*. Oligos de tiempo real coloreados de color azul.**

NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	----- TCAACATTCAATAACTGGGTAATTGGAATTAAATTCCTGGACACCTGGATTAC	14 1260
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	----- AACAACTCAACTCGAACTTATATACAATGTAAATAAAAATTGATATGCATACATGAAGA	14 1320
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	-----GGCAITTTTATT TCACATCAGCGTAG ----- TCAAGTGAATTCATTAAATCAATTTTATTCGAATAAAGTTTTTTCCTTTAATTT * * * * * * * * * * * * *	40 1380
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	----- GTCTGAAAGTAAATAGACATTCCAAATTTAAGTTAATAAATTAATGAATGACTAGT	40 1440
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	----- TTCTGTGA AAATFGA GATTTTAAGAGAAAAGATAAGATTTAAAAAGAAAGCCTTCTGTGATAAATTTTGA * * * * *	56 1500
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	GAAAAATTATTGCTGTAGT----- ACCACTTATGCGCTTCAATCAATAAAACATTTAAGAACACATGACTGTAAAAATAAT * * * * *	76 1560
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	-----TTACAACGT----- TTAAACAATTTAAATTTCAACGTAACATTCACAAAATGGTAAAAATCACGGA * * * * *	85 1620
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	-----TTAATAAGTAGAAAAATAATATAAATAACATA----- AATTGTTAATAATTTTAAACAATAATATGTCACAAAATAACCTTTGTATGATATGATAC * * * * * * * * * * * * *	121 1680
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	-----AAAGCTGGATATAATAACATATAAAAGCTGGAATGAGTCCAAGTTC TAATCCATACATCTATGTAATCTATAGGTGAAGCTCAAAGCTCTGTTTCAACGCGACG * * * * * * * * * * * * *	168 1740
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	A----- ACATCGTTGTAACCTGATATGTTGTAAGTAATGTTGGTCTCATTTGAAACGACG *	169 1800
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	----- CTAAAGATCGAAGTAAACAGTAAAGAGGAGTTGAAATCAATGGCCGAAAAGCGTC	169 1860
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	-----CGTAGCCGAAGCATTTCCGCAGTCGAGTTATACAA--GTCGCC-----T ACAAATCGACATAGTGAATCTATAGCTTATAGCAAAAAAATCATTTTTTT * * * * * * * * * * * * *	214 1920
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	GCTCGAC-----GCAGCAAT--G--GACGCCCGGCATTCAGAGAAAGGTTA TTTTAAGGATTCAGCAGCCAGAACGATTCGTAAGCATATCTAGTACAAAAGTGA * * * * * * * * * * * * *	261 1980
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	TAAATCTGAAGCCGTTCAATTTCAAGACACCCGCTTACCACCGCCACCCCTACAGG ACATTCAAACAGCGTAACAATAATACACAGCACAAAACGCACCCCTTACACA * * * * * * * * * * * * *	321 2040
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	ACGTGGTGTT TCGCTT CAGATGCCAGCCAAG TTCTTC AACGTCACTATCACACG AGAGAATCTTAAACAAGCTTCAAAGC---CCGTGACTTACCACCAACTAACCGAG * * * * * * * * * * * * *	381 2097
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	GCAAGCCGTCGGATGTACGTTCCCGTTCGCGAGTCCATACG-----ATA GCACAGAACGCA--GAGAAATCCCTACTTCA TAGACGAGATTAGAGAACGCGCA * * * * * * * * * * * * *	428 2156
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	AGCGACGCGCAATAGAGAAAACAGTACAAAACCGTTGTA--TAGGAGTTTGGTTT TTCGACGTAAA--TATGAAAGAGATCTACAAAATCCGTCACCCCAATGTTGTCATC * * * * * * * * * * * * *	486 2214
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	GAGTGTATATACAAACGCA-----CAAAAA-----TACGTGATATATCTCTAGATTGG CAAGTTTCGTCGACGGGAGTACTAAGATCAATCTCTCGTTCAAGGTCTCATCTCTCC * * * * * * * * * * * * *	537 2274
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	ACCA----ATCGAGAGGATACAAATGATCTATGATGACAGACTGGCCGATCTCGTGGCT CGCAAGAGTAAATCGTACATGT---TTATGGCTACTTTCACGACCGCTCTCTTC * * * * * * * * * * * * *	593 2331
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	TTTGTATTATATGATGATATAGCTGATGCTAAGGCAAGGACGATGTTCCG AGTG-----G---ATCGTACATAGCGGTGTAAGGAGCGGCTGCGAGAAAATTTAC * * * * * * * * * * * * *	653 2381
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	GCATGAAATCGATGATCGACGATACCGTAGATTACTCAACTACAGACGACACACA GCACCAGAGAGACCGGATGGAATATCGACATCTGACACAGATCGGAGAACAGG * * * * * * * * * * * * *	713 2441
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	CTCCACACCTGGCCTTATATGGGAC -----GACACAGAGCGGTG AACGTCACGTCGTGTCAGCAGCCACGAGCACGTACCAAGTCTGAAACAGTTCAGAG * * * * * * * * * * * * *	755 2501
NM_001279408.1 NW_004523847.1:c3847943-3844689	AACGTGAATATAATGATCGTTATCGGATGACTACCGTCCCCTGCTGTT-----C AACGTCAAAGCATGTTCTGTCAGAAATGACGAGGTAATAAATCTCCACGCGCAATC	807 2561

**Figura 86. Alineamiento de secuencia de gen *transformer* en *A. suspensa*
 Secuencia del gen *transformer* variante femenina de *A. ludens***



Procedimiento Normado de Operación	SOP 1:1
	Páginas Totales: 3
Recolección y disección de muestra. Implementación de RNAlater para preservar muestra	Autores: Isabella Garcia Caffaro, Mariana Lopez, Luisa Fernanda Mejia

1. Propósito

La recolección de muestras biológicas de manera adecuada es de mucha importancia para el mantenimiento del tejido. La implementación de RNAlater juega un papel importante en el mantenimiento de las mismas, puesto que este estabiliza y protege el ARN por las RNAsas que posee. Siendo la función principal el mantenimiento del tejido para implementaciones posteriores del mismo, en este caso particular para la generación de ARNd_h a partir de esa secuencia de ARN extraída de las moscas de fruta.

2. Aplicación

RNAlater es una solución que estabiliza y protege el ARN ya que esta posee RNAsas que se inactivan de forma inmediata, elimina la necesidad de inmediatamente procesar las muestras o congelar las muestras. Esta solución se utiliza para guardar tejidos frescos, bacterias, células cultivadas, levaduras o tejidos vegetales.

3. Referencias

- 3.1. Agilent Technologies. (s/f). *AffinityScript QPCR ADNc Synthesis Kit*.
- 3.2. CABI. 2016. *Ceratitis capitata (Mediterranean fruit fly)*. [Recuperado el 3 de septiembre de 2016]a partir de <http://www.cabi.org/isc/datasheet/12367>
- 3.3. Promega. 2009. *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System Protocol*. Promega, 1–2. Recuperado a partir de <https://au.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/wizard-plus-sv-minipreps-dna-purification-system-protocol/>
- 3.4. Timmons, L. 2000. *Bacteria mediated RNAi*. *Carnegie Institution of Washington*. Recuperado a partir de https://www.addgene.org/static/cms/filer_public/72/83/7283e73a-de34-41c6-b5e4-6f3c5458855a/fire-lab-bacteria-mediated-rnai-documentation.pdf

4. Terminología

- 4.1. ARN: Ácido ribonucleico
- 4.2. RNAsa: Enzima que degrada ARN resistente al autoclave ya que su estructura con varios residuos de cisteína y puentes disulfuro permiten que la enzima recupera parcialmente su función luego de regresar a temperatura ambiente. Por lo anterior se utilizan inhibidores de la enzima para eliminar esta proteína de las superficies y soluciones.

5. Documentos asociados

- 5.1. Agilent Technologies. (s/f). *AffinityScript QPCR ADNc Synthesis Kit*.
- 5.2. Promega. 2009. *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System Protocol*. Promega, 1–2. Recuperado a partir de <https://au.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/wizard-plus-sv-minipreps-dna-purification-system-protocol/>

- 5.3. Timmons, L. 2000. *Bacteria mediated RNAi*. *Carnegie Institution of Washington*. Recuperado a partir de https://www.addgene.org/static/cms/filer_public/72/83/7283e73a-de34-41c6-b5e4-6f3c5458855a/fire-lab-bacteria-mediated-rnai-documentation.pdf

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles.
- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
- 6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Esterioscopio

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Tubos cónicos (0.6ml)
- 7.2.2. Pinzas, tijeras
- 7.2.3. Hielo
- 7.2.4. Hielera

7.3. Reactivos

- 7.3.1. RNAlater

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. No aplica

7.5. Material biológico

- 7.5.1. Moscas, larvas, pupas

8. Procedimiento

- 8.1. Preparar las siguientes soluciones con agua libre de nucelinas (en campana)
- 8.2. Preparación de material:
 - 8.2.1. Adicionar a 27 tubos eppendorf (0.6ml) 500ul de solución RNAlater
 - 8.2.2. Colocar los tubos dentro de una caja y fueron transportados en una hielera
- 8.3. Muestreo:

8.3.1. *Anasttepha ludens*

- 8.3.1.1. Colectar 3 larvas (hasta volumen 0.6ml) del estadio L3 dentro de 5 tubos eppendorf (cortadas a la mitad).
- 8.3.1.2. Colectar 15 adultos hembras (3 en cada tubo), quitar la cabeza y alas con tijera y posteriormente se cortaron en pedazos (total de tubos 5).
- 8.3.1.3. Colectar 15 adultos hembras (3 en cada tubo), quitar la cabeza y alas con tijera y posteriormente se cortaron en pedazos (total de tubos 5).
- 8.3.1.4. Colectar 6 pupas machos de 24 horas (3 en cada tubo), hacer una incisión (tota de tubos 2).

- 8.3.1.5. coleccionar 6 pupas hembras de 24 horas colocando 3 en cada tubo (hacer una incisión) (total de tubos 2).
- 8.3.1.6. Colectar 6 pupas machos de 48 horas colocando 3 en cada tubo (hacer una incisión) (total de tubos 2).
- 8.3.1.7. Colectar 6 pupas Hembras de 48 horas colocando 3 en cada tubo, (hacer una incisión) (total de tubos 2).
- 8.3.1.8. Colectar 6 pupas machos de dos días para eclosión colocando 3 en cada tubo (hacer una incisión) (total de tubos 2).
- 8.3.1.9. Colectar 6 pupas hembras de dos días para eclosión colocando 3 en cada tubo (hacer una incisión) (total de tubos 2).

8.3.2. *Ceratitis capitata* (Muestras de filtrado genético)

- 8.3.2.1. Colocar larvas (hasta volumen 0.6ml) del estadio L1 (total de tubos 4).
- 8.3.2.2. Colocar larvas (hasta volumen 0.6ml) del estadio L2 (total de tubos 4).
- 8.3.2.3. Colocar larvas (hasta volumen 0.6ml) del estadio L3 en suspensión de agua (total de tubos 4).
- 8.3.2.4. Colocar larvas (hasta volumen 0.6ml) del estadio L3 antes de saltar (total de tubos 4).
- 8.3.2.5. Colocar pupas (hasta volumen 0.6ml) de 6 días (total de tubos 4).
- 8.3.2.6. Colocar pupas (hasta volumen 0.6ml) de 9 días (total de tubos 4).
- 8.3.2.7. Colocar pupas (hasta volumen 0.6ml) que les falta 5 días para emerger (total de tubos 4).
- 8.3.2.8. Colectar 8 adultos hembras que estaban en jaulas junto con machos durante 3 días (hasta volumen 0.6ml), a los cuales se les quitó la cabeza y alas con tijera (total de tubos 5).
- 8.3.2.9. Colectar 8 adultos machos que estaban en jaulas junto con machos durante 3 días (hasta volumen 0.6ml), a los cuales se les quitó la cabeza y alas con tijera (total de tubos 5).

Nota: Almacenar las muestras overnight a -4°C, Luego de Overnight remover el sobrenadante y Guardar a -20°C o -80°C. Es posible almacenar a temperatura ambiente por 1 semana sin comprometer calidad de ARN o a -20-80°C para tiempo indefinido.

9. Esterilización de material

No aplica

10. Cálculos

No aplica

11. Control de calidad

- 11.1. Verificar con un check list que se llevó al lugar los implementos necesarios
- 11.2. Verificar que el almacenamiento sea a -4°C y a -20°C en los tiempos correspondientes

11.3. Conflict solution policy

- 11.3.1. Si luego de realizar algún proceso con ARN se observa degradación y se sospecha que es por actividad e ARNasa se recomienda volver a realizar el procedimiento con la otra solución detallada en el procedimiento.

Procedimiento Normado de Operación	SOP 1:1:1
	Páginas Totales: 3
Recolección y disección de muestra por personal de la planta Moscamed.	Autores: Isabella Garcia Caffaro, Mariana Lopez, Luisa Fernanda Mejia

1.1. Muestreo:

1.1.1. A. ludens

- 1.1.1.1. Colectar las siguientes muestras del área de filtrado genético (hembras y machos sin copular)
- 1.1.1.2. Colectar 30 adultos hembras (3 en cada tubo), a los cuales se les quita la cabeza y alas con tijera y posteriormente se cortaron en pedazos (total de tubos 10).
- 1.1.1.3. Colectar 30 adultos machos (3 en cada tubo), a los cuales se les quita la cabeza y alas con tijera y posteriormente se cortaron en pedazos (total de tubos 10).

1.1.2. C. capitata

- 1.1.1.1. Colectar las siguientes muestras del área de filtrado genético (hembras y machos sin copular)
- 1.1.1.2. Colectar 100 adultos hembras (5 en cada tubo), quitar alas y cabeza con tijera (total de tubos 20).
- 1.1.1.3. Colectar 100 adultos machos (5 en cada tubo), quitar alas y cabeza con tijera (total de tubos 20).

Nota: Repetir para ambas moscar el mismo procedimiento (tres días distintos; documentarlos). Almacenar las muestras a -80

Procedimiento Normado de Operación	SOP 1:2
	Páginas Totales: 5
Tratamiento de material plástico para eliminar ARNasa	Autores: Isabella Garcia Caffaro, Mariana Lopez, Luisa Fernanda Mejia

1. Propósito

1.1. Preparar el material plástico, libre de ARNasa, a utilizar para la extracción de ARN.

2. Aplicación

Cuando se trabaja con ARN es necesario preparar el material con el que se trabajará ya que el ARN es una molécula inestable y de fácil degradación comparada con ADN. La enzima más importante que causa la degradación del ARN es la ribonucleasa también llamada ARNasa, esta cataliza la hidrólisis del ARN por su actividad de endonucleasa y exonucleasa. La contaminación por ARNasas es causada por buffers contaminados o del uso de pipetas automáticas contaminadas.

En muchos laboratorios se utilizan guantes para evitar la contaminación con ARNasa, pero se ha demostrado que esto no ayuda a disminuir la contaminación ya que solamente protegen si los guantes no han tocado la piel y para que sean eficientes es necesario cambiarlos cada vez que se toca un aparato no libre de ARNasa. Esto no significa que no se deben utilizar guantes, solamente que no se debe creer que estos son suficientes para disminuir la contaminación de ARNasa. Algunas consideraciones especiales que se deben tener en cuenta son:

- Mantener un juego de pipetas automáticas específicas para el manejo de ARN
- Separar cristalería, buffers y materiales utilizados para actividades que involucren ARN
- Guardar los buffers y soluciones en pequeñas alicotas y descartar cada alicota luego de cada uso
- Tenga una cámara de electroforesis libre de ARNasa
- Prepare todas las soluciones en cristalería libre de ARNasa
- Utilice puntas y tubos centrifuga de un solo uso
- Use inhibidores para suprimir ARNasas durante la extracción de ARN

Dado que las ARNasas son extremadamente comunes, estables y difíciles de desactivar es necesario utilizar inhibidores específicos que se pueden dividir en tres tipos: DEPC (dimetilpirocarbonato)

- Complejos vanadil ribonucleosidos
- Inhibidores proteicos de ARNasas

3. Referencias

- 3.1. Ausubel, F.M. et al. (1991) In: Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, New York
- 3.2. Brown, T.A. (1991) In: Molecular Biology Lab Fax. Bios Scientific Publishers, Academic Press.
- 3.3. Sambrook, J. y Russell, D. (2011) Molecular Cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. 3rd edición. Pp 2,231

4. Terminología

- 4.1. ARNasa: Enzima que degrada ARN resistente al autoclave ya que su estructura con varios residuos de cisteína y puentes disulfuro permiten que la enzima recupere parcialmente su función luego de

regresar a temperatura ambiente. Por lo anterior se utilizan inhibidores de la enzima para eliminar esta proteína de las superficies y soluciones.

- 4.2. Agente quelante: También conocido como un agente antagonista de metales pesados, es una sustancia que forma complejos con iones de metales, inhibiendo su actividad.

5. Principio

El peróxido de hidrógeno inhibe la actividad de la ARNasa al desnaturalizar las proteínas rompiendo los enlaces covalentes causando la pérdida de la estructura nativa de las proteínas. También reduce la actividad proteolítica de la enzima ya que es un agente quelante de los cofactores enzimáticos.

6. Documentos asociados

- 6.1. Chávez, N. 2006. *Glosario de Biotecnología*. UAA. Aguascalientes, México.
- 6.2. Mulhardt, C. 2010. *Molecular biology and genomics*. Academic Press. San Francisco, EUA.
- 6.3. OMS (2005) Manual de Bioseguridad de Laboratorio. Ginebra. 3ra edición. Pp.210. http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguirad_laboratorio.pdf
- 6.4. Torres, L. 2001. *Tratado de cuidados críticos y emergencias*. Arán Ediciones. Mexico D.F.

7. Seguridad

- 7.1. Peróxido de hidrogeno: líquido oxidante corrosivo. En contacto con otro material puede causar fuego. Causante de daños al ser ingerido y puede presentar efectos en el sistema nervioso central.
- 7.2. **Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:**
 - 7.2.1. Formación de aerosoles.
 - 7.2.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
 - 7.2.3. Exceso de material o personal.
- 7.3. **Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio**
 - 7.3.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
 - 7.3.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
 - 7.3.3. Limitar el acceso al laboratorio.
 - 7.3.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
 - 7.3.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles
 - 7.3.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
 - 7.3.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
 - 7.3.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
 - 7.3.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
 - 7.3.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
 - 7.3.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

8. Equipo, materiales y reactivos

- 8.1. **Equipo**
 - 8.1.1. Campana de flujo laminar
 - 8.1.2. Purificador de agua
- 8.2. **Materiales/ Cristalería**
 - 8.2.1. Tubos cónicos (1.5ml)
 - 8.2.2. Beakers
 - 8.2.3. Puntas de micropipeta
 - 8.2.4. Tubos ependorff de distinto tamaño
 - 8.2.5. Recipiente para realizar la solución

8.3. Reactivos

- 8.3.1. NaOH 0.1M
- 8.3.2. EDTA 1mM
- 8.3.3. SDS 1%
- 8.3.4. Peróxido de hidrogeno 5% comercial
- 8.3.5. Agua ultrapura
- 8.3.6. Etanol
- 8.3.7. Agua libre de nucleasas

8.4. Medicamentos

- 8.4.1. No aplica

8.5. Material biológico

- 8.5.1. No aplica

9. Procedimiento

- 9.1. Preparar las siguientes soluciones con agua libre de nucleasas (en campana)
 - 9.1.1. 1L NaOH 0.1M/ EDTA 1mM
 - 9.1.1.1. Disolver en agua libre de nucleasas
 - 9.1.2. ó 1L NaOH 0.1M /SDS 1% en etanol
- 9.2. Colocar el material en la solución e incubar 2 horas a 37°C u overnight
- 9.3. Lavar con agua libre de nucleasas
 - 9.3.1. Para hacer el agua libre de nucleasas se debe tratar con DPEC
- 9.4. Autoclavear con papel aluminio
 - Peroxido de hidrogeno*
- 9.5. Llenar los recipientes con peróxido de hidrogeno comercial e incube a oscuridad por 1 hora.
- 9.6. Descartar el peróxido en el lavadero con bastante agua estéril
- 9.7. Lavar 3 veces con agua ultrapura
- 9.8. Llenar con agua ultrapura y autoclaveelo
- 9.9. Pistilos
 - 9.9.1. Coloque los pistilos en un beker
 - 9.9.2. Llenelo con peróxido e incube 1 hora
 - 9.9.3. Lavelos con agua ultrapura esterilizado en los pasos anteriores (con guantes)
 - 9.9.4. Esterilícelos y séquelos a 55°C

10. Esterilización de material

No aplica

11. Cálculos:

No aplica

12. Control de calidad

- 12.1. Verificar que el agua libre de nucleasas se encontrara en buen estado y guardada adecuadamente.
- 12.2. **Conflict solution policy**
 - 12.2.1. Si luego de realizar algún proceso con ARN se observa degradación y se sospecha que es por actividad e ARNasa se recomienda volver a realizar el procedimiento con la otra solución detallada en el procedimiento.

Procedimiento Normado de Operación	SOP 1:3
	Páginas Totales: 4
Extracción ARN	Autores: Isabella Garcia Caffaro, Mariana Lopez, Luisa Fernanda Mejia

1. Propósito

- 1.2. Extraer ARN de distintos estadios (adultos, larvas y pupas) de la mosca de la fruta *A. ludens* y *C. capitata* utilizando TRIzol
- 1.3. Poner en práctica la manipulación de ARN tomando en cuenta la eliminación de ARNasas

2. Aplicación

El ARN se utiliza para realizar diferentes análisis y técnicas como RT-PCR y Northern Blot para la determinación de expresión de un gen. Otras aplicaciones del ARN son la selección con poly(A)+, traducción *in vitro*, clonación, entre otras. Existen distintos métodos de extracción de ADN entre los cuales se encuentra: método de extracción orgánico, filter-based spin basket, métodos con partículas metálicas, métodos de lisis directa. El método orgánico es el más utilizado para la extracción de ARN, esta utiliza compuestos orgánicos para separar las proteínas y ADN del ARN. Algunos beneficios de utilizar esta técnica es la desnaturalización de nucleasas y la estabilización del ARN. Las desventajas de este método son que posee pasos laboriosos, su dificultad en automatizar y el manejo de desechos.

El método Filter-based spin basket utiliza membranas de sílica o de intercambio iónico que se encuentran dentro de canastas. Para realizar la extracción de ARN con este método la muestra se lisa con un buffer que contiene un inhibidor de ARNasas, el lisado se pasa por la membrana que atrapa los ácidos nucleicos, estos se separan de la membrana realizando lavados. Algunas ventajas de este método son: la simple utilización, la posibilidad de automatizar y su conveniencia. Algunas desventajas son: la retención de ácidos nucleicos grandes como gADN y la propensión de la membrana a taparse.

Los métodos con partículas metálicas utilizan partículas de 0.5-1µm que se unen a las moléculas de interés al aplicar un campo magnético, luego las partículas son recogidas y luego de una serie de lavados se obtiene la molécula de interés. Las ventajas de este método son: su alta eficiencia, la rápida recolección de moléculas de interés, su habilidad de automatizar. Las desventajas son: la baja migración de las partículas en soluciones viscosas y la laboriosidad del método si se realiza a mano.

El método directo de lisis utiliza un buffer de lisis que realiza lisis y estabiliza los ácidos nucleicos, este método solo prepara la muestra, pero no purifica el producto. Algunas ventajas de este método son: su fácil aplicación en muestras pequeñas y su fácil automatización. Algunas desventajas son: el producto no se puede utilizar para realizar métodos analíticos y puede existir actividad residual de ARNasas si la solución de lisis no se maneja de forma apropiada.

3. Referencias

- 3.1. Life Technologies. (2010). TRIzol ® Reagent, (15596026), 18–21. <http://doi.org/10.1101/pdb.caut2701>
- 3.2. Applied Biosystems. (2010). TRI Reagent, 1–12

4. Terminología

- 4.1. ARNasa: Enzima que degrada ARN resistente al autoclave ya que su estructura con varios residuos de cisteína y puentes disulfuro permiten que la enzima recupera parcialmente su función luego de regresar a temperatura ambiente. Por lo anterior se utilizan inhibidores de la enzima para eliminar esta proteína de las superficies y soluciones.

5. Principio

El TRIzol es un reactivo diseñado para la extracción de proteínas, ARN y ADN. Este reactivo contiene compuestos utilizados en otros protocolos de extracción como el cloroformo, isocianato de guanidina (inhibidor de ARNasas) e isopropanol. El TRIzol también mantiene la integridad del ARN ya que es un inhibidor de la ARNasa cuando se realizan los pasos de homogenización. El cloroformo se utiliza para separar las fases y poder dejar en la fase acuosa solamente el ARN mientras que en la fase orgánica se encuentran proteínas y ADN. El isopropanol precipita el ARN de la solución acuosa para luego poder realizar lavados que eliminan las impurezas.

SDS inhibe la actividad de la ARNasa al desnaturalizar las proteínas rompiendo los enlaces covalentes causando la pérdida de la estructura nativa de las proteínas. El EDTA reduce la actividad proteolítica de la enzima ya que es un agente quelante de los cofactores enzimáticos. El NaOH ser una base fuerte causa una pérdida de conformación de la enzima al causar la reacción de hidrólisis. Estos agentes permiten eliminar o disminuir la actividad de la ARNasa presente en plásticos no desechables.

6. Documentos asociados

- 6.1. Chávez, N. 2006. *Glosario de Biotecnología*. UAA. Aguascalientes, México.
- 6.2. Mulhardt, C. 2010. *Molecular biology and genomics*. Academic Press. San Francisco, EUA.
- 6.3. OMS (2005) Manual de Bioseguridad de Laboratorio. Ginebra. 3ra edición. Pp.210. http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguirad_laboratorio.pdf
- 6.4. Sambrook, J. y Russell, D (2011) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. 3rd edición. Pp 2,231
- 6.5. ThermoFisher. (n.d.). The Basics: RNA Isolation. Retrieved September 11, 2016, from <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/the-basics-rna-isolation.html>
- 6.6. Torres, L. 2001. *Tratado de cuidados críticos y emergencias*. Arán Ediciones. Mexico D.F.

7. Seguridad

- 7.1. TRIzol: Contiene fenol que es tóxico y corrosivo e isotiocianato de guanidina que es irritante. Trabaje siempre en una campana de extracción y utilice guantes ya que el reactivo puede causar quemaduras químicas. Si ocurre algún contacto con el reactivo se recomienda lavar el área inmediatamente con agua por 15min.
- 7.2. Cloroformo: Líquido orgánico volátil, al oxidarse produce productos altamente peligrosos como el fosgeno por lo cual se debe manejar en campana de extracción.
- 7.3. Alcohol isopropílico: fácilmente inflamable y causa irritación en ojos, vías respiratorias. Puede provocar náuseas, dolor de cabeza, vértigo y pérdida de conocimiento.
- 7.4. Etanol: alcohol volátil, se deben utilizar bata y guantes cuando se manipula este producto.
- 7.5. SDS: líquido inflamable que puede causar irritación en la piel y en vías respiratorias. Manténgase lejos del calor y evite liberarlo en el ambiente, utilice en todo momento protección.

8. Equipo, materiales y reactivos

8.1. Equipo

- 8.1.1. Campana de flujo laminar

- 8.1.2. Campana de extracción de químicos
- 8.1.3. Centrifuga refrigerada
- 8.1.4. Baño maría
- 8.1.5. Balanza analítica
- 8.1.6. Vortex
- 8.1.7. Portaobjetos
- 8.1.8. Cajas Petri
- 8.1.9. Aluminio
- 8.1.10. Pinzas
- 8.1.11. Estiletes
- 8.1.12. Celdas de plástico
- 8.1.13. Microcelda de cuarzo
- 8.1.14. Micropipetas (1000ul, 100ul y 10ul)

8.2. **Materiales/ Cristalería**

- 8.2.1. Tubos cónicos (15ml)
- 8.2.2. Tubos ependorff
- 8.2.3. Puntas de micropipeta
- 8.2.4. Micropipetas

8.3. **Reactivos**

- 8.3.1. Cloroformo grado molecular
- 8.3.2. Alcohol isopropilico
- 8.3.3. Etanol 75%
- 8.3.4. SDS 0.5%
- 8.3.5. Agua libre de nucelasas
- 8.3.6. TRIzol

8.4. **Medicamentos**

- 8.4.1. No aplica

8.5. **Material biológico**

- 8.5.1. Mosca adulto
- 8.5.2. Pupas
- 8.5.3. Larvas

9. **Procedimiento**

9.1. **Extracción de ARN adultos**

9.1.1. *Homogenización*

- 9.1.1.1. Agregar en un tubo 50-100mg de tejido (70-100mg), adicionar 125ul de H₂O y 125ul de TRIzol LS
- 9.1.1.2. Macerar con macerado automático
- 9.1.1.3. Agregar 625ul de TRIzol LS
- 9.1.1.4. Agregar 125 ul H₂O DECP
- 9.1.1.5. Mezclar

NOTA: Total de trizol implementado 750ul y de agua DECP 250ul (1ml de líquido)

9.1.2. *Separación de fases*

- 9.1.2.1. Incubar la muestra homogeneizada a temperatura ambiente por 5min para para permitir la completa disociación del complejo nucleoproteico
- 9.1.2.2. Agregar 200µl de cloroformo por 0.75ml de TRIzol y cierre el tubo
- 9.1.2.3. Mover el tubo vigorosamente por 15segundos
- 9.1.2.4. Incubar a temperatura ambiente 15 minutos (5-10 min)
- 9.1.2.5. Centrifugar la muestra a 12,000g por 15min a 4°C, es importante que la centrifuga este a esta temperatura ya que si se centrifuga a una temperatura mayor a 8°C causa que el ADN se quede en la fase acuosa. ARN se encuentra únicamente en la fase acuosa

- 9.1.2.6. Remover la fase acuosa pipetiando la solución (contiene ARN) y evite tomar la fase orgánica
- 9.1.2.7. Colocar la fase acuosa en un nuevo tubo
- 9.1.3. *Aislamiento de ARN*
 - 9.1.3.1. *Tomar en cuenta todas las precauciones para trabajar con ARN*
 - 9.1.3.2. Agregar en la fase acuosa 500µl de isopropanol al 100% por 0.75ml de TRIzol usado para la homogenización
 - 9.1.3.3. Incubar 10min a temperatura ambiente (5-10min)
 - 9.1.3.4. Centrifugar a 12,000g por 10 min a 25-4°C (pellet no se ve, pero ya esta presente).
- 9.1.4. *Lavado de ARN*
 - 9.1.4.1. Remover el sobrenadante dejando únicamente el pellet
 - 9.1.4.2. Lavar el pellet con 1000ul de etanol al 75% por 0.75ml de TRIzol usado para la homogenización
 - 9.1.4.2.1. El ARN se puede guardar en etanol por un año a -20°C
 - 9.1.4.3. Vortexear la muestra brevemente
 - 9.1.4.4. Centifugar a 7,500g por 5min a 4°C, si el precipitado de ARN flota repita el a 12,000xg por 5 min
 - 9.1.4.5. Descartar el sobrenadante con micropipeta
 - 9.1.4.6. Secar el pellet de 3-5min, no deje que se seque completamente porque pierde su solubilidad
- 9.1.5. *Resuspensión de ARN*
 - 9.1.5.1. Resuspender con micropipeta el pellet de ARN en 50µl de agua DECP
 - 9.1.5.2. Incubar en baño maria a 55-60°C 10 minutos (10-15min). Nota: Sumergir los tubos en un beaker con agua estéril, para avitar el contacto directo de los mismos con el agua del baño maría.
 - 9.1.5.3. Preparar alícuota de 5ul para cuantificación en nanodrop (1ul por medición en duplicado) o 7ul para cuantificación en Espectrofotómetro con microcelda (longitudes de onda; 260, 280 y 230nm).
 - 9.1.5.4. Guardar idealmente a -70°C (1 mes de vida), pero se guarda a -20°C (1 semana de vida)
- 9.2. **Extracción de ARN larvas**
 - 9.2.1. *Homogenización*
 - 9.2.1.1. Agregar en un tubo 50-100mg de tejido (70-100mg), adicionar 125ul de H2O y 125ul de TRIzol LS
 - 9.2.1.2. Macerar con macerado automático
 - 9.2.1.3. Agregar 625ul de TRIzol LS
 - 9.2.1.4. Agregar 125 ul H2O DECP
 - 9.2.1.5. Mezclar
 - NOTA:** Total de trizol implementado 750ul y de agua DECP 250ul (1ml de líquido)
 - 9.2.2. *Separación de fases*
 - 9.2.2.1. Incubar la muestra homogeneizada a temperatura ambiente por 5min para para permitir la completa disociación del complejo nucleoproteico
 - 9.2.2.2. Agregar 200µl de cloroformo por 0.75ml de TRIzol y cierre el tubo
 - 9.2.2.3. Mover el tubo vigorosamente por 15segundos
 - 9.2.2.4. Incubar a temperatura ambiente 15 minutos (5-10 min)
 - 9.2.2.5. Centrifugar la muestra a 12,000g por 15min a 4°C, es importante que la centrifuga este a esta temperatura ya que si se centrifuga a una temperatura mayor a 8°C causa que el ADN se quede en la fase acuosa. ARN se encuentra únicamente en la fase acuosa
 - 9.2.2.6. Remover la fase acuosa pipetiando la solución (contiene ARN) y evite tomar la fase orgánica
 - 9.2.2.7. Colocar la fase acuosa en un nuevo tubo
 - 9.2.3. *Aislamiento de ARN*
 - 9.2.3.1. *Tomar en cuenta todas las precauciones para trabajar con ARN*
 - 9.2.3.2. Agregar en la fase acuosa 500µl de isopropanol al 100% por 0.75ml de TRIzol usado para la homogenización

- 9.2.3.3. Incubar 10min a temperatura ambiente (5-10min)
- 9.2.3.4. Centrifugar a 12,000g por 10 min a 25-4°C (pellet no se ve, pero ya esta presente).
- 9.2.4. *Lavado de ARN*
 - 9.2.4.1. Remover el sobrenadante dejando únicamente el pellet
 - 9.2.4.2. Lavar el pellet con 1000ul de etanol al 75% por 0.75ml de TRIzol usado para la homogenización
 - 9.2.4.2.1. El ARN se puede guardar en etanol por un año a -20°C
 - 9.2.4.3. Vortexear la muestra brevemente
 - 9.2.4.4. Centifugar a 7,500g por 5min a 4°C, si el precipitado de ARN flota repita el a 12,000xg por 5 min
 - 9.2.4.5. Descartar el sobrenadante con micropipeta
 - 9.2.4.6. Secar el pellet de 3-5min , no deje que se seque completamente porque pierde su solubilidad
- 9.2.5. *Resuspensión de ARN*
 - 9.2.5.1. Resuspender con micropipeta el pellet de ARN en 50µl de agua DECP
 - 9.2.5.2. Incubar en baño maria a 55-60°C 10 minutos (10-15min). Nota: Sumergir los tubos en un beaker con agua estéril, para evitar el contacto directo de los mismos con el agua del baño maría.
 - 9.2.5.3. Preparar alicuota de 5ul para cuantificación en nanodrop (1ul por medición en duplicado) (longitudes de onda; 260, 280 y 230nm).
 - 9.2.5.4. Guardar idealmente a -70°C (1 mes de vida), pero se guarda a -20°C (1 semana de vida)
- 9.3. **Extracción de ARN pupas**
 - 9.3.1. *Disección de pupa*
 - 9.3.1.1. Colocar las pupas previamente colectadas en ARNlater sobre una caja Petri (utilizar pinzas)
 - 9.3.1.2. Pasar pupas de manera individual sobre un portaobjetos
 - 9.3.1.3. Cortar la quitina con estilete en forma en gancho (colocarlo en el extremo de la pupa)
 - 9.3.1.4. Sacar el tejido con mucho cuidado y trasvasarlo en un tubo previamente pesado para determinar el peso exacto del mismo.
 - 9.3.2. *Homogenización*
 - 9.3.2.1. Agregar en un tubo 50-100mg de tejido (70-100mg), adicionar 125ul de H2O y 125ul de TRIzol LS
 - 9.3.2.2. Macerar con macerado automático
 - 9.3.2.3. Agregar 625ul de TRIzol LS
 - 9.3.2.4. Agregar 125 ul H2O DECP
 - 9.3.2.5. Mezclar
 - NOTA:** Total de TRIzol implementado 750ul y de agua DECP 250ul (1ml de líquido)
 - 9.3.3. *Separación de fases*
 - 9.3.3.1. Incubar la muestra homogeneizada a temperatura ambiente por 5min para para permitir la completa disociación del complejo nucleoproteico
 - 9.3.3.2. Agregar 200µl de cloroformo por 0.75ml de TRIzol y cierre el tubo
 - 9.3.3.3. Mover el tubo vigorosamente por 15segundos
 - 9.3.3.4. Incubar a temperatura ambiente 15 minutos (5-10 min)
 - 9.3.3.5. Centrifugar la muestra a 12,000g por 15min a 4°C, es importante que la centrifuga este a esta temperatura ya que si se centrifuga a una temperatura mayor a 8°C causa que el ADN se quede en la fase acuosa. ARN se encuentra únicamente en la fase acuosa
 - 9.3.3.6. Remover la fase acuosa pipetiando la solución (contiene ARN) y evite tomar la fase orgánica
 - 9.3.3.7. Colocar la fase acuosa en un nuevo tubo
 - 9.3.4. *Aislamiento de ARN*
 - 9.3.4.1. *Tomar en cuenta todas las precauciones para trabajar con ARN*
 - 9.3.4.2. Agregar en la fase acuosa 500µl de isoporpanol al 100% por 0.75ml de TRIzol usado para la homogenización
 - 9.3.4.3. Incubar 10min a temperatura ambiente (5-10min)

- 9.3.4.4. Centrifugar a 12,000g por 10 min a 25-4°C (pellet no se ve, pero ya esta presente).
- 9.3.5. *Lavado de ARN*
 - 9.3.5.1. Remover el sobrenadante dejando únicamente el pellet
 - 9.3.5.2. Lavar el pellet con 1000ul de etanol al 75% por 0.75ml de TRIzol usado para la homogenización
 - 9.3.5.2.1. El ARN se puede guardar en etanol por un año a -20°C
 - 9.3.5.3. Vortexear la muestra brevemente
 - 9.3.5.4. Centifugar a 7,500g por 5min a 4°C, si el precipitado de ARN flota repita el a 12,000xg por 5 min
 - 9.3.5.5. Descartar el sobrenadante con micropipeta
 - 9.3.5.6. Secar el pellet de 3-5min , no deje que se seque completamente porque pierde su solubilidad
- 9.3.6. *Resuspensión de ARN*
 - 9.3.6.1. Resuspender con micropipeta el pellet de ARN en 50μl de agua DECP
 - 9.3.6.2. Incubar en baño maria a 55-60°C 10 minutos (10-15min). Nota: Sumergir los tubos en un beaker con agua estéril, para avitar el contacto directo de los mismos con el agua del baño maría.
 - 9.3.6.3. Preparar alícuota de 5ul para cuantificación en nanodrop (1ul por medición en duplicado) o 7ul para cuantificación en Espectrofotómetro con microcelda (longitudes de onda; 260, 280 y 230nm).
 - 9.3.6.4. Guardar idealmente a -70°C (1 mes de vida), pero se guarda a -20°C (1 semana de vida)

10. Esterilización de material

- 10.1. Esterilize los tubos centrifuga y ependorff a utilizar
- 10.2. Portaobjetos

11. Cálculos:

No aplica

12. Control de calidad

- 12.1. Verificar que el agua libre de nucleasas se encontrara en buen estado y guardada adecuadamente.
- 12.2. Eliminar la cabeza de los adultos para que los pigmentos de los ojos no afecten en la extracción
- 12.3. Verificar que el material plástico sea libre de ARNasas
- 12.4. Verificar el funcionamiento adecuado del equipo
- 12.5. Trabajar en campana o áreas limpias con ARNsin para evitar contaminación
- 12.6. **Conflict solution policy**
 - 12.6.1. Si la extracción dio un bajo porcentaje de extracción
 - 12.6.1.1. No se realizó por completo la homogenización o la lisis de la muestra
 - 12.6.1.1.1. Disminuya la cantidad de muestra y asegurarse que esta este completamente inmersa en TRIzol
 - 12.6.1.2. El pellet de ARN no se resuspendió completamente
 - 12.6.1.2.1. Aumente la solubilidad del pellet pipeteando repetidamente y calentando la muestra a 50-60°C
 - 12.6.1.3. El ARN se degrado
 - 12.6.1.3.1. La muestra no se utilizó inmediatamente o no se congelo la muestra cuando se recolectó
 - 12.6.1.3.2. El ARN no se guardó a la temperatura adecuada (-60 o -70°C)
 - 12.6.1.4. El ARN se contaminó
 - 12.6.1.4.1. Se pipetió interfase orgánica en el paso del aislamiento de ARN
 - 12.6.1.4.1.1. No trate de tomar toda la fase acuosa en el oligo intento
 - 12.6.1.5. Se obtuvo un $A_{260/280}$ bajo de ARN
 - 12.6.1.5.1. La muestra no se homogenizó suficientemente
 - 12.6.1.5.1.1. Agregue el volumen apropiado de TRIzol
 - 12.6.1.5.2. Se pipetió interfase orgánica en el paso del aislamiento de ARN
 - 12.6.1.5.2.1. No trate de tomar toda la fase acuosa en el primer intron

Procedimiento Normado de Operación	SOP 1:4
	Páginas Totales: 6
PCR y gel de electroforesis	Autores: Isabella Garcia Caffaro, Mariana Lopez, Luisa Fernanda Mejia

1. Propósito

- 1.1. Cuantificación de ARN extraído utilizando nanodrop o espectrofotómetro
- 1.2. Tratamiento de ARN con ADNasa RQI
- 1.3. Realizar la conversión de ADNc por transcriptasa inversa a partir de ARN de larva de *Anastrepha ludens* y *Ceratitis capitata*.
- 1.4. Poner en practica la manipulación de ARN tomando en cuenta la eliminación de ARNasas

2. Aplicación

Es necesario cuantificar la concentración de ARN adquirido con la extracción para mejorar los métodos y para tomar decisiones basado en la calidad del ARN de que procedimiento seguir. El ADNc se utiliza para clonar generar eucariotas en procariotas, para expresar una proteína específica en una célula que normalmente no se expresa. También se usa para crear bibliotecas de ADNc o como sondas. Para determinar la calidad y cantidad del ADNc sintetizado por medio de esta reacción se realiza un PCR en tiempo real en el que se obtiene las cantidades de ARN transformados a ADNc por la reacción. Antes de realizar el ADNc es necesario purificar el ADN la enzima Esta enzima en especial se utiliza para producción de fragmentos al azar, corte de footprinting del ADN, remover la plantilla de ADN *in vitro* y remover ADN de ARN antes de realizar RT-PCR.

3. Referencias

- 3.1. Aglient Thechnologies. (n.d.). AffinityScript QPCR ADNc Synthesis Kit.
- 3.2. Healthcare, G. E., & Sciences, L. (n.d.). Spectrophotometry.
- 3.3. <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2007/11/pdb.ip47.full>
- 3.4. Promega. (2016). GoScript TM Reverse Transcription System GoScript TM Reverse Transcription System.

4. Terminología

- 4.1. ADNc: o ADN complementario es una cadena de ADN de doble hebra sintetizada de una hebra de ARN. Esta reacción es catalizada por la enzima transcriptasa reversa
- 4.2. Transcriptasa reversa: es una enzima de tipo ADN- polimerasa que tiene como función la síntesis de ADN de doble hebra a partir de ARN.

5. Principio

Se realiza la cuantificación de ADN y ARN si la muestra es pura, se cuantifica 260nm y 280nm, otras longitudes de onda que dan más información son 230 y 320nm. Esto es posible ya que los acidos nucelicos absorben luz naturalmente a 260nm. En muestras puras se ha documentado que un pathlength de 10mm y

una absorción de 1A es igual a 40µg/ml RNA. La razón A_{260}/A_{280} indica la pureza del ARN la lectura debería de ser de 2.0 o mayor. La razón A_{260}/A_{230} debe de ser de 2 o mayor para indicar una muestra pura. Un aumento de A_{230} puede indicar contaminación (aromáticos, fenol, proteínas, urea) y puede afectar la lectura de A_{260} . A_{230} se toma como una corrección del entorno.

Existen muchos procedimientos para la purificación de ARN entre los cuales se encuentra el uso de ADNasas. La ADNasa RQI (RNA-Qualified) es una ADNasa tipo I que degrada ADN de doble y simple hebra produciendo oligonucleótidos 3'-OH. El ARN se convierte en ADN complementario por la acción de la transcriptasa reversa.

6. Documentos asociados

- 6.1. Agilent Technologies. (n.d.). AffinityScript QPCR ADNc Synthesis Kit. Corporation, P. (2011). M-MLV Reverse Transcriptase Product Information, 2. Retrieved from <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/m-mlv-reverse-transcriptase-protocol.pdf>
- 6.2. Chávez, N. 2006. *Glosario de Biotecnología*. UAA. Aguascalientes, México.
- 6.3. Mulhardt, C. 2010. *Molecular biology and genomics*. Academic Press. San Francisco, EUA.
- 6.4. OMS (2005) Manual de Bioseguridad de Laboratorio. Ginebra. 3ra edición. Pp.210. http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguiridad_laboratorio.pdf
- 6.5. Sambrook, J. y Russell, D (2011) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. 3rd edición.
- 6.6. ThermoFisher. (n.d.). The Basics: RNA Isolation. Retrieved September 11, 2016, from <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/the-basics-rna-isolation.html>
- 6.7. Torres, L. 2001. *Tratado de cuidados críticos y emergencias*. Arán Ediciones. Mexico D.F.

7. Seguridad

7.1. Manipule con guantes, bajo campana y en recipientes libres de ARNasas el ARN

7.2. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

7.2.1. Formación de aerosoles.

7.2.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.

7.2.3. Exceso de material o personal.

7.3. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

7.3.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.

7.3.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.

7.3.3. Limitar el acceso al laboratorio.

7.3.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.

7.3.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.

7.3.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.

7.3.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.

7.3.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).

7.3.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.

7.3.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.

7.3.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

8. Equipo, materiales y reactivos

8.1. Equipo

8.1.1. Baño maría

8.1.2. Campana de flujo laminar

8.1.3. Centrifuga

8.1.4. Bloque caliente

8.2. Materiales/ Cristalería

8.2.1. Tubos ependorff

8.2.2. Puntas de micropipeta

8.2.3. Micropipetas

8.3. Reactivos

8.3.1. ARN

8.3.2. buffer RQ1 ADNasa

8.3.3. RQ1 ADNasa

8.3.4. RQ1 ADNasa stop solution

8.3.5. oligos

8.3.6. dNTP's 0.5mM

8.3.7. Inhibidor de ribonucleasas, ARNsin recombinante

8.3.8. Agua libre de nucleasas

8.3.9. oligos

8.3.10. Buffer 5X GoScript

8.3.11. MgCl₂

8.3.12. ARNsin recombinante

8.3.13. GoScript Reverse Transcriptase

8.4. Medicamentos

8.4.1. No aplica

8.5. Material biológico

8.5.1. ARN

9. Procedimiento

9.1. Cuantificación de ARN por nanodrop

9.1.1. Utilizar agua DECP en la que resuspendió el pellet como blanco

9.1.2. Encender el equipo

9.1.3. Colocar 1ul sobre el lente

9.1.4. Cerrar

9.1.5. Medir

9.2. Cuantificación de ARN por Espectrofotómetro

9.2.1. Microcelda

9.2.1.1. Encender el equipo

9.2.1.2. Colocar longitudes de onda en 230, 260 y 280nm

9.2.1.3. Utilizar agua DECP como blanco

9.2.1.4. Agregar 7ul de muestra en la micro celda

9.2.1.5. Sacar la muestra y limpiar la celda 3 veces con agua DECP (volver a medir para asegurar limpieza adecuada de la celda)

9.2.1.6. Repetir el paso anterior para todas las muestras.

9.2.2. Celda de plástico

9.2.2.1. Encender el equipo y esperar a que se caliente

9.2.2.2. Realizar dilución de las muestras 1:10 (5ul de ARN en 45 de agua DECP)

9.2.2.3. Colocar longitudes de onda en 230, 260 y 280nm

9.2.2.4. Utilizar agua DECP como blanco

9.2.2.5. Medir las muestras en distintas celdas

9.3. Tratamiento de RQ1 ADNasas

9.3.1. Colocar en un tubo ependorff esteril libre de ARNasas

9.3.1.1. Volumen variado en μ l de ARN previamente resuspendido en agua (depende de la concentración a la que se encuentre el ARN)

9.3.1.2. Adicionar 1 μ l de buffer RQ1 ADNasa

9.3.1.3. Adicionar 1 μ /μgARN RQ1 ADNasa (1 unidad de RQ1 por μg ARN)

9.3.1.4. Agua libre de nucleasas para llegar a un volumen final de 10 μ l

- 9.3.2. Incubar a 37°C por 1 hora en termociclador.
 9.3.3. Agregar 1µl de RQ1 ADNasa stop solution para terminar la reacción
 9.3.4. Incubar a 65°C por 10 min para inactivar la ADNasa
 9.3.5. Tomar una alícuota de ARN para PCR de actina (1ul)

Reactivo	Cantidad adicionada por adultos (µl)	Cantidad adicionada por larva
ARN	4.26	3.74
H2O DECP	3.74	4.53
RQ1 Dnasa	1	1
Buffer RQ1 Dnasa	1	1
Volumen final	10	10

9.4. Correr gel según SOP: 1.5

9.5. **Transcripción reversa de ARNa ADNc**

9.5.1. Convertir 5µg de ARN total

9.5.1.1. Agregar en un tubo ependorff estéril y libre de ARNasas

9.5.1.1.1. ARN (hasta 5µg/reacción) (adicionar 10ul del ARN tratado)

9.5.1.1.2. oligo (0.5µg/reacción)→ “random primer” (0.5µg/reacción) o gene specific (10-20pmol/reacción)

9.5.1.1.3. Para un volumen final de 11µl

Reactivos	Cantidad (1 rxn)
ARN tratado con DNAsa	10ul
Random primers	1ul

9.5.2. Colocar en baño maría a 70°C por 5 min (para derretir la estructura secundaria del ARN)

9.5.3. Enfriar inmediatamente en hielo por lo menos 5min

9.5.4. Guardar en hielo hasta agregar transcriptasa reversa

9.5.5. Preparar la reacción de transcriptasa reversa en hielo (volumen final de la reacción 20ul)

Reactivo	Cantidad (1 rxn) (ul)
GoScript buffer (5x)	4
DNTP'S	1
MgCl2	2
ARNsin	1
GoScript RT	1
H2O DECP	0
ARN anterior	11
Volumen final	20

9.6. Anillamiento

9.6.1. Colocar en baño maría a 25°C por 5 min

9.7. Extención

9.7.1. Colocar en baño maría a 42°C por 1:30 hora

9.7.2. Se puede guardar de 0-5°C

9.7.3. Sacar alícuota 1ul para PCR actina

9.8. Inactive la transcriptasa reversa

- 9.8.1. Colocar en baño maria a 70°C por 15 min
- 9.9. Realizar la síntesis de la segunda hebra utilizando el protocolo de su preferencia para QPCR

10. Esterilización de material

No aplica

11. Cálculos

No aplica

12. Control de calidad

- 12.1. Verificar que el agua libre de nucleasas se encontrara en buen estado y guardada adecuadamente.
- 12.2. Verificar se le diera el tratado con NaOH a los tubos utilizados
- 12.3. Verificar que el equipo utilizara funcionara correctamente.
- 12.4. Trabajar campana para evitar contaminación

12.5. Conflict solution policy

- 12.5.1. No se obtiene producto o se obtiene poco producto ADNc de una hebra
 - 12.5.1.1. Verifique la integridad el ARN
 - 12.5.1.1.1. Prepare otra muestra de ARN teniendo cuidado con la ARNasas
 - 12.5.1.2. Asegúrese que no existan inhibidores de la transcriptasa inversa: SDS, EDTA, entre otros.
 - 12.5.1.3. La temperatura de anillamiento es muy alta
 - 12.5.1.4. La secuencia target de ARN contiene pausas transcripciones fuertes
 - 12.5.1.5. Verificar la especificidad del oligo
 - 12.5.1.6. Concentración de dNTP's muy alta
 - 12.5.1.7. No se utilizó la concentración de magnesio optima
 - 12.5.1.8. Se inactivo la transcriptasa reversa antes que se sintetizara ADNc
- 12.5.2. No se obtiene producto o se obtiene poco producto ADNc doble hebra por PCR
 - 12.5.2.1. Coloque mayor cantidad de ADNc de una hebra
 - 12.5.2.2. Optimice las condiciones del QPCR
 - 12.5.2.3. Re examine el diseño de los oligos
 - 12.5.2.4. Aumente el número de ciclos
- 12.5.3. El tamaño del producto es mayor del esperado
 - 12.5.3.1. El ARN se encuentra contaminado de ADN
 - 12.5.3.2. Diseñe de oligos con span de intrones convirtiendo en unión de exon-exon

Procedimiento Normado de Operación	SOP 1:5
	Páginas Totales: 7
Ligación y transformación	Autores: Isabella Garcia Caffaro, Mariana Lopez, Luisa Fernanda Mejia

1. Propósito

1.1. Realizar la ligación del gen de interés a un vector de interés

2. Aplicación

La ligación es realizada por una ADN ligasa, este proceso se utiliza como una herramienta en investigación de biología molecular ya que se utiliza para generar secuencias de ADN recombinante. Esta enzima se utiliza como enzima de restricción para insertar fragmentos de ADN en un plásmido de ADN y clonación.

La importancia de esto se refleja en transformación bacteriana. Es decir, si una bacteria posee una mutación en alguna sección del operón lac, esta mutación puede ser complementada totalmente o parcialmente. Lo cual puede ser comprobado mediante la implementación de indicadores cromogénicos y análogos del sustrato del operón, que hagan que el indicador funcione cortando en dicho caso el x-gal.

3. Terminología

- 3.1. Ligasa de ADN es una enzima que cataliza la unión de dos extremos 5'-fosfato y 3'-OH de ADN que se encuentran en nucleótidos adyacentes
- 3.2. Endonucleasa: enzimas de restricción provenientes de eubacterias y arqueas que reconocen una secuencia específica de ADN.

4. Principio

Las endonucleasas son enzimas de restricción que reconocen una secuencia específica y realizan un corte tipo sticky y blunt. Este corte se realiza en una sección denominada MCS (multiple cloning sites) que posee distintos, aproximadamente 20, sitios de restricción específicos. La ligasa de ADN es una enzima que cataliza la unión de dos extremos 5'-fosfato y 3'-OH de ADN que se encuentran en nucleótidos adyacentes que sean sticky o blunt ends. La enzima también cataliza la unión de ARN a ADN u ARN de doble hebra. Para realizar esta reacción es necesario mantener la temperatura de acción de la enzima y cofactores. El IPTG es un compuesto análogo a la lactosa no metabolizable que activa la transcripción del operón lac. Es importante mencionar que debido a que no es metabolizable la concentración del IPTG siempre se mantiene constante a lo largo de las investigaciones. El IPTG actúa al unirse al represor lac inhibiéndolo y por ende causando la transcripción del operón lac. La concentración de IPTG utilizado puede variar según la investigación a realizar, pero normalmente se usa en un rango de 100uM a 1mM. La concentración utilizada depende del nivel de inducción que se quiere obtener en las bacterias utilizadas.

Con respecto al X-gal, este es un análogo a la lactosa y es un cromogénico el cual al ser metabolizado produce una coloración azul. El x-Gal ayuda a indicar la presencia de la transcripción del operón lac. X-gal en combinación con IPTG puede ser utilizado en la técnica blue-white screening para verificar que bacterias transformadas con plásmidos recombinantes. Los plásmidos recombinantes además de presentar el gen de interés contienen el operon lac por lo que bacterias que logran metabolizar el x-gal, tomando azul, evidencian que ha habido una incorporación del plásmido recombinante efectivo. El x-gal puede ser agregado al agar líquido antes de este ser vertido a cajas petri o puede ser esparcido en la superficie del agar previamente solidificado.

5. Documentos asociados

- 5.1. Chávez, N. 2006. *Glosario de Biotecnología*. UAA. Aguascalientes, México.
- 5.2. Mulhardt, C. 2010. *Molecular biology and genomics*. Academic Press. San Francisco, EUA.
- 5.3. OMS (2005) Manual de Bioseguridad de Laboratorio. Ginebra. 3ra edición. Pp.210. http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
- 5.4. ThermoFisher. (n.d.). The Basics: RNA Isolation. Retrieved September 11, 2016, from <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/the-basics-rna-isolation.html>
- 5.5. Torres, L. 2001. *Tratado de cuidados críticos y emergencias*. Arán Ediciones. Mexico D.F.
- 5.6. Promega. (2010). pGEM(R)-T and pGEM(R)-T Easy Vector Systems Technical Manual TM042 - pgem-t and pgem-t easy vector systems protocol.pdf. Retrieved from https://www.promega.co.uk/~media/files/resources/protocols/technical_manuals/0/pgem-t_and_pgem-t_easy_vector_systems_protocol.pdf
- 5.7. Promega. (2009). pGEM(R)-T and pGEM(R)-T Easy Vector Systems Quick Protocol, FB033, 1–2. Retrieved from papers2://publication/uuid/E1997377-D3F6-4B77-A955-EA5466C7B1AF
- 5.8. Timmons, L. 2000. *Bacteria mediated RNAi*. Carnegie Institution of Washington. Recuperado a partir de https://www.addgene.org/static/cms/filer_public/72/83/7283e73a-de34-41c6-b5e4-6f3c5458855a/fire-lab-bacteria-mediated-rnai-documentation.pdf
- 5.9. Sambrook, J. y Russell, D (2011) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. 3rd edición.

6. Seguridad

- 6.1. Realice el master mix de preferencia en campana de extracción
- 6.2. Triptona. Si se ingiere puede causar diarrea, náusea y vomito. Si se inhala puede causar irritación en las vías respiratorias. Si se absorbe causa irritación. Si algo de esto ocurre se debe lavar el área afectada, tomar aire fresco y buscar atención
- 6.3. Cloruro de sodio: Si se ingiere causa vómitos, deshidratación y diarrea. Si se absorbe causa irritación leve. Si algo de esto ocurre se debe lavar el área afectada, tomar aire fresco y buscar atención médica
- 6.4. Cloro: Si se ingiere causa dolor de cabeza, náusea, tos y espasmos musculares. Si se inhala causa dolor en el tracto respiratorio y dolor de cabeza. Si se absorbe causa quemadura. Si algo de esto ocurre se debe lavar el área afectada, tomar aire fresco y buscar atención médica
- 6.5. Antibióticos: Si se ingiere causa irritación. Si se inhala causa irritación en el tracto respiratorio. Si se absorbe causa irritación. Si algo de esto ocurre se debe lavar el área afectada, tomar aire fresco y buscar atención médica. Si la persona que está manipulando el antibiótico es alérgica se recomienda el uso de guantes y mascarilla.
- 6.6. X-Gal: Puede ser tóxico para los ojos y la piel, es sensible a la luz. Tenga cuidado especial al manejar en polvo
- 6.7. IPTG: Puede ser dañino para los pulmones, piel y si se ingiere. Use guantes y lentes de seguridad para el manejo.
- 6.8. **Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:**
 - 6.8.1. Formación de aerosoles.
 - 6.8.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
 - 6.8.3. Exceso de material o personal.
- 6.9. **Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio**
 - 6.9.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
 - 6.9.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
 - 6.9.3. Limitar el acceso al laboratorio.
 - 6.9.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.

- 6.9.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles
- 6.9.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.9.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.9.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.9.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.9.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.9.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Campana de flujo laminar
- 7.1.2. Centrifuga
- 7.1.3. Baño hielo
- 7.1.4. incubadora

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Tubos ependorff 1.5ml
- 7.2.2. Puntas de micropipeta
- 7.2.3. Micropipetas
- 7.2.4. Palillos estériles

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Células competentes de alta eficiencia
- 7.3.2. 2X rapid Ligation Buffer
- 7.3.3. pGEM-T
- 7.3.4. Producto de PCR
- 7.3.5. Control de ADN
- 7.3.6. Ligasa ADN T4
- 7.3.7. Agua desionizada
- 7.3.8. NaOH (0.2N)
- 7.3.9. ARNa

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. No aplica

7.5. Material biológico

- 7.5.1. Producto de PCR del gen de interés

8. Procedimiento

8.1. Ligación

- 8.1.1. Centrifugar previamente el vector pGEM-T
- 8.1.2. Colocar en un tubo ependorff libre de nucleasas (antes de usar el buffer vortexear):

Reactivo	Volumen final	Control positivo	Background Control
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA ligase	5µl	5µl	5µl
pGEM-T (50ng)	1µl	1µl	1µl
Producto de PCR	Xµl		
Control Inserto de ADN		2µl	
T4 DNA ligase (3 Weiss units/µl)	1µl	1µl	1µl
Agua desionizada	10µl	10µl	10µl

- 8.1.3. Mezcle la reacción pipeteando
- 8.1.4. Incube overnight a 4°C y guardar a -20°C

8.2. Transformación por heat shock

- 8.2.1. Preparar una placa con LB + Carbenicilina (100ug/ml) + IPTG (0.8M) + X-Gal (2%)
- 8.2.2. Adicionar el plásmido ya ligado (25ng por cada 50ul de células competentes: 3ul de plásmido) (volumen de plásmido no exceda el 5% de la cantidad de células competentes).
- 8.2.3. Mover los tubos gentilmente muchas veces para mezclar todo el contenido
- 8.2.4. Implementar dos tubos control para el proceso de transformación, que incluya un tubo con células competentes y plásmido sin cortar.
- 8.2.5. Colocar todos los tubos en hielo durante 30 min.
- 8.2.6. Transferir los tubos a bloque de calor que se encuentre a 42°C por 90 segundos (no agite los tubos).
- 8.2.7. Sacar los tubos rápidamente y transfíralos a un baño de hielo. (1-2 min.).
- 8.2.8. Adicionar 800ul medio SOC a cada tubo, caliente el medio a 37°C en un baño de agua y transfiera los tubos a la incubadora con shaker a 37°C.
- 8.2.9. Incubar el medio por 45 min.
- 8.2.10. Sembrar 500ul por cada placa realizada anteriormente.

8.3. Réplicas

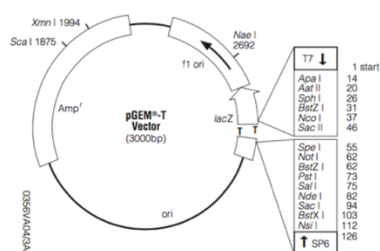
- 8.3.1. Preparar una placa con LB + Carbenicilina (60ug/ml) + IPTG (0.8M) + X-Gal (2%)
- 8.3.2. Cuadrillar las placas
- 8.3.3. Utilizar mecheros para esterilizar el área de trabajo
- 8.3.4. Numerar las colonias de la placa original
- 8.3.5. Tomar la colonia no. 1 con un palillo estéril de la placa original
- 8.3.6. Colocar en la primera placa de réplica, la colonia no. 1 en el cuadro no. 1
- 8.3.7. Frotar el mismo palillo en la placa no. 2 en la misma posición.
- 8.3.8. Realizar el mismo procedimiento con todas las colonias.
- 8.3.9. Sellar las placas con parafilm
- 8.3.10. Incubar 12 horas a 37°C
- 8.3.11. Guardar a 4°C.

8.4. Tamizaje de colonias

- 8.4.1. Preparar solución de NaOH 0.2N
- 8.4.2. Adicionar a la cantidad de tubos necesarios para todas las colonias
 - 8.4.2.1. 20ul de NaOH 0.2N
 - 8.4.2.2. 1ul de ARNa
 - 8.4.2.3. Frotar un palillo estéril sobre cada colonia e introducirlo en los tubos previos
 - 8.4.2.4. Incubar durante 7 min. a 37°C
 - 8.4.2.5. Centrifugar 13,000rpm durante 3 min. a 37°C
 - 8.4.2.6. Agregar 4ul de loading dye
 - 8.4.2.7. Correr un gel de electroforesis según SOP 1.5 inciso 8.4

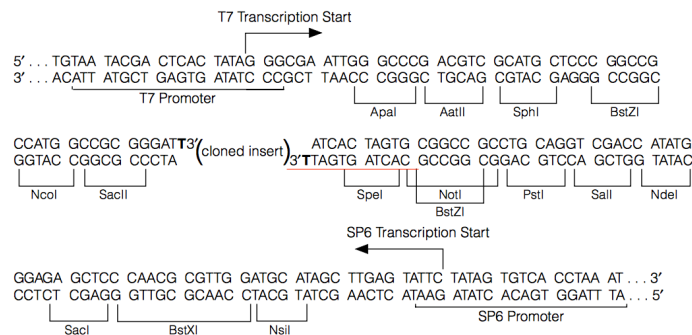
8.5. PCR de colonias (Según SOP 1:5)

pGEM[®]-T Vector Circle Map and Sequence Reference Points



pGEM[®]-T Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–113
SP6 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	124–143
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161–177
<i>lacZ</i> start codon	165
<i>lac</i> operator	185–201
β -lactamase coding region	1322–2182
phage f1 region	2365–2820
<i>lac</i> operon sequences	2821–2981, 151–380
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941–2957
T7 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	2984–3



9. Esterilización de material

Esterilizar medio LB

10. Cálculos

10.1. Medio LB sólido 1000ml

- 10.1.1. 37g de agar LB
- 10.1.2. 1000ml de agua
- 10.1.3. Esterilizar el medio en autoclave

10.2. Medio LB líquido 500ml

- 10.2.1. 5g peptona
- 10.2.2. 2.5g extracto de levadura
- 10.2.3. 5g NaCl
- 10.2.4. Aforar a 500ml
- 10.2.5. Esterilizar el medio en autoclave

10.3. Medio SOC líquido 50ml

- 10.3.1. 1g triptona
- 10.3.2. 0.25g de extracto de levadura
- 10.3.3. 0.25g de NaCl
- 10.3.4. 0.5ml de KCl (250mM)
- 10.3.5. Autoclavear
- 10.3.6. Adicionar:
 - 10.3.6.1. 0.25ml de MgCl₂ (2M)
 - 10.3.6.2. 1ml de glucosa (1M)

10.4. Stock de carbenicilina (50mg/ml)

- 10.4.1. 0.05g carbenicilina
- 10.4.2. Aforar a 5ml de agua destilada
- 10.4.3. Filtrar la solución con 0.02μm

10.5. Stock IPTG (20% w/v)

- 10.5.1. 1g de IPTG
- 10.5.2. Afore a 5ml de agua destilada
- 10.5.3. Filtrar la solución con 0.02μm
- 10.5.4. Cubrir el tubo con aluminio

10.6. Stock X-Gal (4%w/v)

- 10.6.1. Tubo original

10.6.2. Agregar 20ul por placa para que se encuentre a concentración de 2%.

11. Control de calidad

11.1. Asegurar que la temperatura ambiente fuera la adecuada para la actividad de la ligasa de ADN T4

11.2. Verificar que los reactivos estuvieran guardados correctamente.

11.3. Conflict solution policy

11.3.1. No se observan colonias

11.3.1.1. Ocurrió un problema con la transformación

11.3.1.2. Las células perdieron su competencia

11.3.1.3. No se incubó suficiente tiempo para la ligación

11.3.1.4. Presencia de inhibidor de reacción en producto de PCR

11.3.2. Se obtuvo menos de 10 colonias blancas en placa con el inserto control

11.3.2.1. No se realizó correctamente la dilución de la solución de dilución

11.3.2.2. La temperatura de ligación es muy alta

11.3.2.3. Si se obtienen más células

11.3.2.3.1. Competencia de las células es alta pero hubo un problema en la ligación

11.3.2.3.1.1. El buffer puede tener baja eficiencia (se degrada en fluctuaciones de temperatura)

11.3.3. Solo se observan células blancas no azules

11.3.3.1. La ampicilina no está activa

11.3.3.2. La sepa bacteriana perdió su episoma F⁺ que permite hacer el blue/White screening

11.3.3.3. Revise que el X-Gal e IPTG sean frescos

Procedimiento Normado de Operación	SOP 1:6
	Páginas Totales: 6
Células competentes	Autores: Isabella Garcia Caffaro, Mariana Lopez, Luisa Fernanda Mejia

1. Propósito

- 1.1. Generar células con características de competencia que permitan internalizar el plásmido PgEmT con los insertos de interés.

2. Aplicación

La importancia principal de la ligación y por ende transformación bacteriana radica en el hecho de poder introducir ADN externo de un organismo dentro de otro. Para lo cual es necesario introducir ese ADN en un vector, es decir, la elaboración de ADN recombinante. Siendo este ADN recombinante el que se introduce en la bacteria, el cual tiene la capacidad de integrarse al genoma de la misma y expresarse con algún cambio fenotípico. Esto es importante por ejemplo si se requiere determinar la función específica de un gen determinado mediante el silenciamiento del mismo. Del mismo modo puede ser importante si se requiere determinar los efectos de la sobre expresión de un gen en determinado organismo. También se menciona la elaboración de medicamentos o de proteínas de fusión mediante la implementación de estas técnicas mediante la sobre expresión de dos genes que las producen. Se mencionan algunas de las proteínas que podrían ser expresadas mediante ligación y transformación: Insulina, Proteasas, Anticuerpos monoclonales e interleucinas.

3. Terminología

- 3.1. Ligasa de ADN es una enzima que cataliza la unión de dos extremos 5'-fosfato y 3'-OH de ADN que se encuentran en nucleótidos adyacentes
- 3.2. Endonucleasa: enzimas de restricción provenientes de eubacterias y arqueas que reconocen una secuencia específica de ADN
- 3.3. ADN recombinante: Molécula de ADN generada in vitro mediante la unión de dos secuencias de ADN que pertenecen a distintos organismos, generalmente uno es artificial (perteneciente al vector) siendo este el que posee los sitios de replicación que permitirán que la secuencia de ADN puede multiplicarse.
- 3.4. Vector: Secuencias de ADN que son capaces de replicarse de manera autónoma, en estos se introduce otra secuencia de nucleótidos.
- 3.5. ARNasa: Enzimas degradadoras de ARN que resisten a la autoclave por lo cual al autoclavar cualquier material estas se encuentran presentes. Esto se debe a que poseen puentes disulfuro, los cuales evitan que la enzima se degrade por completo. Se recomienda en extracciones de ARN inhibir la actividad de estas con el fin de que el mismo se mantenga intacto.

4. Principio

En el proceso de transformación en las células bacterianas se introduce ADN libre del medio, este puede ocurrir de manera natural o artificial. La eficiencia con la que cada bacteria puede transformarse de manera natural depende de la especie de la misma. Para que las células bacterianas tengan un nivel de transformación elevado se necesita que se encuentren en un estado de competencia, en el cual estas deben de cumplir con ciertas condiciones fisiológicas como: alteración en la pared celular y membrana celular, lo cual permite la

entrada de ácidos nucleicos en la misma. De manera artificial actualmente las células pueden prepararse de manera que estas se encuentren competentes para la transformación (Una bacteria muy utilizada para esto es *Escherichia coli*), esto permite la introducción de ADN exógeno con mayor eficiencia. Para la preparación de células competentes se utiliza cloruro de calcio y cloruro de magnesio, siendo el calcio y el magnesio iones esenciales debido a que cagan la membrana de la bacteria positivamente lo cual provoca que los fosfatos del ambiente sientan una atracción por la misma lo cual genera a su vez que se activen las proteínas “Heat shock protein”, siendo estas las que hacen los poros de la membrana más grandes. El tamaño de los poros aumenta más debido a la aplicación de otros métodos entre los que se mencionan el choque térmico que maximiza los orificios de la pared celular de la bacteria y facilita la entrada del ADN exógeno a la misma. También existen métodos de mayor eficiencia como lo es electroporación en el cual se aplica choque eléctrico a la bacteria y esto habré más los poros, haciendo esto más eficiente la transformación.

5. Documentos asociados

- 5.1. Chávez, N. 2006. *Glosario de Biotecnología*. UAA. Aguascalientes, México.
- 5.2. Mulhardt, C. 2010. *Molecular biology and genomics*. Academic Press. San Francisco, EUA.
- 5.3. OMS (2005) Manual de Bioseguridad de Laboratorio. Ginebra. 3ra edición. Pp.210. http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
- 5.4. Galván, A; Tejada, M; Camargo, A; Higuera, J; & Fernández, E. 2010. Transformación de *Escherichia coli* con un plásmido recombinante. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba. 1-5Pp.
- 5.5. Quick protocol. Cloning PCR Products with pGEM®-T and pGEM®-T Easy VectorsPromega. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems.
- 5.6. Sambrook, J. & Russell, D. *Molecular cloning a laboratory manual*. 3er. Edition. Volumen 1. Cold Spring New York.
- 5.7. Sambrook, J. y Russell, D (2011) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. 3rd edición.
- 5.8. ArgenBio; consejo Argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología. Revisado el 20-08-16, en: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=248>
- 5.9. Calum, J; Martin, B; Fichant, G; Polard, P; & Claverys, P. 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology*: 12: 181:196. www.nature.com/reviews/micro.
- 5.10. ThermoFisher. (n.d.). The Basics: RNA Isolation. Retrieved September 11, 2016, from <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/the-basics-rna-isolation.html>
- 5.11. Torres, L. 2001. *Tratado de cuidados críticos y emergencias*. Arán Ediciones. Mexico D.F.

6. Seguridad

- 6.1. Realice el master mix de preferencia en campana de extracción
- 6.2. Triptona. Si se ingiere puede causar diarrea, nausea y vomito. Si se inhala puede causar irritación en las vías respiratorias. Si se absorbe causa irritación. Si algo de esto ocurre se debe lavar el área afectada, tomar aire fresco y buscar atención
- 6.3. Cloruro de sodio: Si se ingiere causa vómitos, deshidratación y diarrea. Si se absorbe causa irritación leve. Si algo de esto ocurre se debe lavar el área afectada, tomar aire fresco y buscar atención médica
- 6.4. Cloro: Si se ingiere causa dolor de cabeza, náusea, tos y espasmos musculares. Si se inhala causa dolor en el tracto respiratorio y dolor de cabeza. Si se absorbe causa quemadura. Si algo de esto ocurre se debe lavar el área afectada, tomar aire fresco y buscar atención médica
- 6.5. Antibióticos: Si se ingiere causa irritación. Si se inhala causa irritación en el tracto respiratorio. Si se absorbe causa irritación. Si algo de esto ocurre se debe lavar el área afectada, tomar aire fresco y buscar atención médica. Si la persona que está manipulando el antibiótico es alérgica se recomienda el uso de guantes y mascarilla.

- 6.6. X-Gal: Puede ser tóxico para los ojos y la piel, es sensible a la luz. Tenga cuidado especial al manejar en polvo
- 6.7. IPTG: Puede ser dañino para los pulmones, piel y si se ingiere. Use guantes y lentes de seguridad para el manejo.
- 6.8. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:**
 - 6.8.1. Formación de aerosoles.
 - 6.8.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
 - 6.8.3. Exceso de material o personal.
- 6.9. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio**
 - 6.9.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
 - 6.9.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
 - 6.9.3. Limitar el acceso al laboratorio.
 - 6.9.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
 - 6.9.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.
 - 6.9.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
 - 6.9.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
 - 6.9.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
 - 6.9.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
 - 6.9.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
 - 6.9.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Campana de flujo laminar
- 7.1.2. Centrifuga
- 7.1.3. Baño hielo

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Tubos ependorff 1.5ml
- 7.2.2. Puntas de micropipeta
- 7.2.3. Micropipetas
- 7.2.4. Cajas Petri

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Agua desionizada
- 7.3.2. Medio LB
- 7.3.3. Medio SOC
- 7.3.4. Cloruro de magnesio
- 7.3.5. Cloruro de calcio

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. No aplica

7.5. Material biológico

- 7.5.1. Producto de PCR del gen de interés

8. Procedimiento

8.1. Células competentes *Protocolo 26 Sambrook*

- 8.1.1.** Tome una colonia bacteria y transfíeralo a 100ml de medio LB (suplementado con abx) en un Erlenmeyer de 1L. Incube por 3 horas a 37°C con agitación vigorosa (200rpm), hasta que llegue a OD₆₀₀ 0.4
- 8.1.2.** Transfiera el cultivo a tubos ependorff fríos de 50ml y enfríe el cultivo a 0°C por 10min
- 8.1.3.** Centrifugar a 2,700 gravedades por 10 min a 4°C. descarte el sobrenadante.
- 8.1.4.** Coloque el tubo invertido sobre una toalla de papel por 1 min

- 8.1.5. Re suspenda cada pellet en 30ml de solución fría de MgCl₂-CaCl (80mM, 20Mm), suavemente y Centrifugue a 2,700 gravedades por 10 min a 4°C. Descartar el sobrenadante.
- 8.1.6. Coloque el tubo invertido sobre una toalla de papel por 1 min
- 8.1.7. Re suspenda cada pellet en 2ml de solución 0.1M CaCl₂ fría, gentilmente
- 8.1.8. En este punto se pueden utilizar las células competentes inmediatamente (24-48 horas a 4°C), si no se van a utilizar inmediatamente se deben seguir los siguientes pasos.
- 8.1.9. Agregue 70µl de DMSO! y mezcle gentilmente
- 8.1.10. Coloque la re suspensión en hielo por 15min
- 8.1.11. Luego agregue 70µl de DMSO! y mezcle gentilmente
- 8.1.12. Coloque la re suspensión en hielo
- 8.1.13. Separe la solución en alícuotas de 50ml en tubos ependorff previamente congelados
- 8.1.14. Luego de alícuota sumerja inmediatamente en nitrógeno líquido y guarde los tubos a -70°C.

NOTA: Cuando se deseen utilizar las células competentes seguir los siguientes pasos

- Saque las células de -70°C
- Tome la alícuota a utilizar con las manos hasta que se derritan
- Colóquelas en baño de hielo y déjelas allí por 10min
- Utiliza puntas de pipetas frías y esteriles para transferir las células competentes

8.2. Células ultra competentes *Protocolo 24 Sambrook*

- 8.2.1. Realizar placas suplementadas con antibióticos específicos para el plásmido (Carbenicilina 100mg/µl y Tetraciclina 12.5 mg/µl).
- 8.2.2. Preparar PIPES 0.5M (piperazine 1,2-bis 2-ethanesulfonic acid) al disolver 1.51g de PIPES en 10ml de agua pura. Ajustar PH de la solución a 6.7 con KOH 5M. Esterilizar al filtrar por 0.45µm. Almacenar en alícuotas y almacenar a -20° C.
- 8.2.3. Preparar buffer de transformación Inove al disolver los solutos en 100ml de agua y luego agregar 2.5ml de solución PIPES.

Reactivo	Peso para 100ml	Concentración final
MnCl 4H ₂ O	1.088g	55mM
CaCl ₂ 2H ₂ O	220mg	15Mm
KCl	1.865g	250mM
PIPES (0.5M, pH 6.7)	2ml	10Mm
H ₂ O	A los 100ml	

- 8.2.4. Esterilizar el buffer INOVE al filtrar por un poro de 0.45µm y dividir en alícuotas para almacenar a -20° C.
- 8.2.5. Tome una colonia de bacteria que fue incubada por 16-20 horas a 37° C y transfíralo a 25ml de medio LB o SOB en un Erlenmeyer. Incube de 6-8 horas a 37°C con agitación vigorosa (250-300rpm).
- 8.2.6. Inocule 250ml de medio LB con 2.5ul de cultivo.
- 8.2.7. Inocule 250ml de medio LB con 500ul de cultivo
- 8.2.8. Los dos cultivos anteriores incúbelos overnight con agitación moderada. Lea el OD600 hasta que alcance 0.55.
- 8.2.9. Transfiera el cultivo a tubos ependorff fríos de 50ml y enfríe el cultivo a 0°C por 10min
- 8.2.10. Centrifugar a 2,500 gravedades por 10 min a 4°C. descarte el sobrenadante.
- 8.2.11. Coloque el tubo invertido sobre una toalla de papel por 2 min.

- 8.2.12. Re suspenda cada pellet gentilmente en 20ml de solución fría de buffer INOVE, suavemente y Centrifugue a 2,500 gravedades por 10 min a 4°C. Descartar el sobrenadante.
- 8.2.13. Coloque el tubo invertido sobre una toalla de papel por 2 min.
- 8.2.14. Re suspenda cada pellet en 5ml de INOVE frío, gentilmente (Si lo quiere usar inmediatamente). Si lo va almacenar, siga el siguiente paso:
- 8.2.15. Agregar 3.75ul de DMSO. Colocar en hielo por 10 min.
- 8.2.16. Rápidamente dispense la solución en alícuotas de tubos eppendorf fríos estériles.
- 8.2.17. Congelar los tubos con nitrógeno líquido y guardar las células competentes a -80°C hasta que se necesiten.
- 8.2.18. Para usar las células congeladas: Tome el tubo y descongelo con la mano e inmediatamente colóquelo en hielo por 10 min.

9. Esterilización de material

- 9.1. Esterilizar medio LB
- 9.2. Soluciones PIPES e INOVE

10. Cálculos

10.1. Medio LB sólido 500ml

- 10.1.1. 5g triptona
- 10.1.2. 2.5g extracto de levadura
- 10.1.3. 5g NaCl
- 10.1.4. Afore a 500ml
- 10.1.5. Esterilice el medio en autoclave

11. Control de calidad

- 11.1. Mantener las temperaturas adecuadas debido a que estas son críticas
- 11.2. Verificar OD600
- 11.3. Asegurar autoclavar todo el material a implementar
- 11.4. Se aseguró guardar las células competentes a temperaturas no más calientes de -70°C para que no perdieran su competencia
- 11.5. Conflict solution policy
 - 11.5.1. No se observan colonias
 - 11.5.1.1. Ocurrió un problema con la transformación
 - 11.5.1.2. Las células perdieron su competencia
 - 11.5.1.3. No se incubó suficiente tiempo para la ligación
 - 11.5.1.4. Presencia de inhibidor de reacción en producto de PCR
 - 11.5.2. Se obtuvo menos de 10 colonias blancas en placa con el inserto control
 - 11.5.2.1. No se realizó correctamente la dilución de la solución de dilución
 - 11.5.2.2. La temperatura de ligación es muy alta
 - 11.5.2.3. Si se obtienen más células
 - 11.5.2.3.1. Competencia de las células es alta pero hubo un problema en la ligación
 - 11.5.2.3.1.1. El buffer puede tener baja eficiencia (se degrada en fluctuaciones de temperatura)
 - 11.5.3. Solo se observan células blancas no azules
 - 11.5.3.1. La ampicilina no está activa
 - 11.5.3.2. La sepa bacteriana perdió su episoma F' que permite hacer el blue/White screening
 - 11.5.3.3. Revise que el X-Gal e IPTG sean frescos

Procedimiento Normado de Operación	SOP 1:7
	Páginas Totales: 6
Extracción y purificación de plásmido	Autores: Isabella Garcia Caffaro, Mariana Lopez, Luisa Fernanda Mejia

1. Propósito

- 1.1. Realizar la purificación de plásmido p-GEMT con el inserto correspondiente a los genes (*CcTra*, *CcTra2* y *AlTra*).

2. Aplicación

La purificación de plásmido se utiliza en bacterias previamente transformadas con el plásmido de interés. Este plásmido se purifica ya que se puede utilizar para secuenciar (conocer la secuencia del gen insertado), producir plásmido en grandes cantidades para luego insertar y expresar el plásmido purificado en otra bacteria (Agilent Technologies, n.d.) en donde se llevará a cabo una función establecida para este, siendo en este proyecto el plásmido a partir del cual se generará ARNdh.

3. Terminología

- 3.1. ARNdh: ARN de doble hebra

4. Principio

Existen distintos procedimientos de purificación de ADN plasmidial, todos incluyen tres pasos básicos: Crecimiento de bacterias en medio selectivo, lisis bacteriana para la liberación del plásmido, purificación del ADN plasmidial. El método más utilizado es la lisis alcalina que explota las diferencias de las propiedades de desnaturalización y renaturalización entre el ADN plasmidial y el ADN cromosómico. La alcalinización con NaOH en presencia de un detergente fuertemente anionico (SDS) causa la ruptura de la pared celular, desnaturalización de ADN cromosómico, proteínas y liberación de proteínas. La neutralización del medio se da en presencia de una alta concentración de sal (acetato potásico) que provoca la precipitación de proteínas y ADN cromosomal. Los agregados insolubles de proteínas y ADN cromosomal se separan por centrifugación quedando el ADN plasmidial en el sobrenadante.

5. Documentos asociados

- 5.1. Chávez, N. 2006. *Glosario de Biotecnología*. UAA. Aguascalientes, México.
- 5.2. Mulhardt, C. 2010. *Molecular biology and genomics*. Academic Press. San Francisco, EUA.
- 5.3. OMS (2005) Manual de Bioseguridad de Laboratorio. Ginebra. 3ra edición. Pp.210. http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
- 5.4. ThermoFisher. (n.d.). The Basics: RNA Isolation. Retrieved September 11, 2016, from <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/the-basics-rna-isolation.html>
- 5.5. Torres, L. 2001. *Tratado de cuidados críticos y emergencias*. Arán Ediciones. Mexico D.F.
- 5.6. Promega. (2009). Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System Protocol. *Promega*, 1–2. Retrieved from <https://au.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/wizard-plus-sv-minipreps-dna-purification-system-protocol>
- 5.7. Sambrook, J. y Russell, D (2011) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. 3rd edición.

6. Seguridad

- 6.1. NaOH: Base fuerte que es irritante y corrosivo al contacto con la piel y los ojos
- 6.2. Etanol: alcohol volátil, se deben utilizar bata y guantes cuando se manipula este producto.
- 6.3. SDS: líquido inflamable que puede causar irritación en la piel y en vías respiratorias. Manténgase lejos del calor y evite liberarlo en el ambiente, utilice en todo momento protección.
- 6.4. **Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:**
 - 6.4.1. Formación de aerosoles.
 - 6.4.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
 - 6.4.3. Exceso de material o personal.
- 6.5. **Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio**
 - 6.5.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
 - 6.5.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
 - 6.5.3. Limitar el acceso al laboratorio.
 - 6.5.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
 - 6.5.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.
 - 6.5.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
 - 6.5.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
 - 6.5.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
 - 6.5.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
 - 6.5.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
 - 6.5.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Campana de flujo laminar
- 7.1.2. Centrifuga

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Tubos ependorff 1.5ml
- 7.2.2. Puntas de micropipeta
- 7.2.3. Micropipetas
- 7.2.4. Spin column
- 7.2.5. Collection tube

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Cell resuspension solution
- 7.3.2. Cell lysis solution
- 7.3.3. Alkaline protease solution
- 7.3.4. Neutralization solution
- 7.3.5. Wash solution
- 7.3.6. Agua libre de nucelastas

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. No aplica

7.5. Material biológico

- 7.5.1. Bacterias transformadas

8. Procedimiento

8.1. Lisado

- 8.1.1. Realizar un 6ml de cultivo overnight
- 8.1.2. Formar un pellet del cultivo usando la centrifuga pro 5 min.
- 8.1.3. Resuspender el pellet en 250µl de Cell resuspension solution
- 8.1.4. Agregar 250µl de Cell lysis Solution para cada muestra

- 8.1.5. Invertir 4 veces para mezclar
- 8.1.6. Agregar 10 μ l de Alkaline Protease Solution
- 8.1.7. Invertir 4 veces para mezclar
- 8.1.8. Incubar 5 min a temperatura ambiente
- 8.1.9. Agregar 300 μ l de Neutralization Solution
- 8.1.10. Invertir 4 veces para mezclar
- 8.1.11. Centrifugar a velocidad máxima por 10 min a temperatura ambiente

8.2. Unión de plásmido

- 8.2.1. Insertar "Spin Colum" en "Collection tube"
- 8.2.2. Decantar el lisado claro en la Spin Colum
- 8.2.3. Centrifugar a velocidad máxima por 1min a temperatura ambiente
- 8.2.4. Descartear el sobrenadante
- 8.2.5. Reinsertar la columna en el "Colletion tube"

8.3. Lavado

- 8.3.1. Agregar 750 μ l de "Wash Solution" con etanol
- 8.3.2. Centrifugar a velocidad máxima por 1min a temperatura ambiente
- 8.3.3. Descartar el sobrenadante
- 8.3.4. Reinsertar la columna en el "Colletion tube"
- 8.3.5. Centrifugar a velocidad máxima por 2 min a temperatura ambiente

3.4 Elución

- 3.4.1. Transfiere el "Spin Column" a un tubo centrifuga de 1.5ml estéril, tenga cuidado de no transferir ninguna de las soluciones.
- 3.4.2. Si la columna tiene solución vuelva a centrifugar
- 3.4.3. Agregar 100 μ l de Agua libre de nucleasas a la "Spin Column"
- 3.4.4. Centrifugar a velocidad máxima por 1min a temperatura ambiente
- 3.4.5. Descarte la columna
- 3.4.6. Guarde el ADN a -20°C o a menor temperatura.

9. Control de calidad

- 9.1. Se aseguró que el kit estuviera en buen estado
- 9.2. Se verificó que los reactivos estuvieran guardados correctamente.

9.3. Conflict solution policy

- 9.3.1. Pobre lisis celular
 - 9.3.1.1. Muchas bacterias, el cultivo debería de estar en un OD₆₀₀ entre 2 y 4. El medio no debe contener antibiótico
 - 9.3.1.2. Se resuspendio mal
- 9.3.2. No se purifico ADN
 - 9.3.2.1. No se agregó etanol a la columna con Wash solution
 - 9.3.2.2. No hubo suficiente yield del plasmido
- 9.3.3. Bajo yields de plasmido
 - 9.3.3.1. Crecieron más las bacterias no transformadas que las transformadas.
 - 9.3.3.2. El cultivo es viejo
 - 9.3.3.3. El plásmido es de bajo número de copias

Procedimiento Normado de Operación	Páginas Totales: 6
Cuantificación de ARNdh	Autores: Isabella Garcia Caffaro, Mariana Lopez, Luisa Fernanada Mejia

1. Propósito

- 1.1. Realizar la cuantificación de ARNdh producido por *E. coli* HT115 (DE3) transformada con el inserto correspondiente a los genes (*CcTra*, *CcTra2* y *AlTra*).

2. Aplicación

El ARNdh producido de un fragmento de gen específico permite silenciar evitar la expresión de este. El silenciamiento de genes es ampliamente utilizado para el control de plagas y el estudio de la función de genes.

3. Terminología

- 3.1. ARNdh: ARN de doble hebra

4. Principio

Existen distintas técnicas de causar el silenciamiento el factor común es que todas estas utilizan una plantilla de ARN. Algunas de estas técnicas son: ARN de horquilla pequeño, ARN pequeño de interferencia y ARN interferencia dirigido al ADN. El mecanismo básico de interferencia posee dos pasos: el ARN de doble hebra es cortado por la enzima Dicer que transforma el ARNdh en ARNip, este se une al complejo enzimático RISC que degrada el ARNm con la secuencia complementaria a los ARNip. LA degradación de ARNm en esta secuencia específica causa que el gen ya no se exprese en el organismo de interés.

5. Documentos asociados

- 5.1. Chávez, N. 2006. *Glosario de Biotecnología*. UAA. Aguascalientes, México.
- 5.2. Mulhardt, C. 2010. *Molecular biology and genomics*. Academic Press. San Francisco, EUA.
- 5.3. OMS (2005) Manual de Bioseguridad de Laboratorio. Ginebra. 3ra edición. Pp.210. http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
- 5.4. Torres, L. 2001. *Tratado de cuidados críticos y emergencias*. Arán Ediciones. Mexico D.F.
- 5.5. Sambrook, J. y Russell, D (2011) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. 3rd edición.

6. Seguridad

- 6.1. SDS: líquido inflamable que puede causar irritación en la piel y en vías respiratorias. Manténgase lejos del calor y evite liberarlo en el ambiente, utilice en todo momento protección.
- 6.2. Triptona. Si se ingiere puede causar diarrea, náusea y vomito. Si se inhala puede causar irritación en las vías respiratorias. Si se absorbe causa irritación. Si algo de esto ocurre se debe lavar el área afectada, tomar aire fresco y buscar atención
- 6.3. Cloruro de sodio: Si se ingiere causa vómitos, deshidratación y diarrea. Si se absorbe causa irritación leve. Si algo de esto ocurre se debe lavar el área afectada, tomar aire fresco y buscar atención médica
- 6.4. Cloro: Si se ingiere causa dolor de cabeza, náusea, tos y espasmos musculares. Si se inhala causa dolor en el tracto respiratorio y dolor de cabeza. Si se absorbe causa quemadura. Si algo de esto ocurre se debe lavar el área afectada, tomar aire fresco y buscar atención médica
- 6.5. Antibióticos: Si se ingiere causa irritación. Si se inhala causa irritación en el tracto respiratorio. Si se absorbe causa irritación. Si algo de esto ocurre se debe lavar el área afectada, tomar aire fresco

y buscar atención médica. Si la persona que está manipulando el antibiótico es alérgica se recomienda el uso de guantes y mascarilla.

- 6.6. X-Gal: Puede ser tóxico para los ojos y la piel, es sensible a la luz. Tenga cuidado especial al manejar en polvo
- 6.7. IPTG: Puede ser dañino para los pulmones, piel y si se ingiere. Use guantes y lentes de seguridad para el manejo.
- 6.8. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:**
 - 6.8.1. Formación de aerosoles.
 - 6.8.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
 - 6.8.3. Exceso de material o personal.
- 6.9. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio**
 - 6.9.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
 - 6.9.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
 - 6.9.3. Limitar el acceso al laboratorio.
 - 6.9.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
 - 6.9.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.
 - 6.9.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
 - 6.9.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
 - 6.9.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
 - 6.9.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
 - 6.9.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
 - 6.9.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Campana de flujo laminar

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Tubos centrifuga 50ml
- 7.2.2. Puntas de micropipeta
- 7.2.3. Micropipetas
- 7.2.4. Shaker
- 7.2.5. Nanodrop

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Medio YT
- 7.3.2. Medio LB
- 7.3.3. IPTG
- 7.3.4. X-Gal
- 7.3.5. SDS
- 7.3.6. Acetato de sodio
- 7.3.7. Tris-Cl
- 7.3.8. EDTA
- 7.3.9. ARNasa
- 7.3.10. TRIzol

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. Carbenicilina
- 7.4.2. Tetraciclina

7.5. Material biológico

- 7.5.1. Bacterias transformadas

8. Procedimiento

8.1. Inducción de células *E. coli* HT115 (DE3) y cuantificación de ARNdH

- 11.3.4. Realizar overnight (37°C) de 5ml de bacterias LB + Carb (100ug/ml) + Tet (12.5ug/ml)

- 8.1.1. Diluir 4.5ml en 30 ml de 2xYT; medio contiene LB + Carb (100ug/ml) + Tet (12.5ug/ml)
- 8.1.2. Del cultivo anterior inocule 50ml de medio 2xYT LB + Carb (100ug/ml) + Tet (12.5ug/ml); incubar a 37°C hasta OD₆₀₀ 0.4
- 8.1.3. Agregar 0.4mM IPTG e incubar por 2 horas a 37°C (OD₆₀₀ 0.6-0.7)
- 8.1.4. Centrifugar 6000rpm por aproximadamente 10 min. a 4 °C
- 8.1.5. Resuspender pellet en 50ul de SDS (0.1%) y hervir por 2 minutos para lisar las células.
- 8.1.6. Agregar 1ug de ARNasa en 65ul de buffer (300 mM acetato de sodio, 10 mM Tris-Cl pH 7.5u 5 mM EDTA).
- 8.1.7. Agregar la solución de buffer a los 50ul de SDS con el pellet e incubar 37°C por 5 min.
- 8.1.8. Purificar con 500ul de Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA según el protocolo del reactivo.
- 8.1.9. Cuantificar con Nanodrop
(Ongvarrasopone, Roshorm, & Panyim, 2007)

8.2. Medición de toxicidad de inserto en *E. coli* HT115 (DE3)

- 11.3.5. Hacer placas LB con ++ IPTG (0.8M) + X-Gal (2%) + Carb (100ug/ml) + Tet (12.5ug/ml)
- 11.3.6. Haber placar LB + Carb (100ug/ml) + Tet (12.5ug/ml)
- 11.3.7. Hacer un overnight en LB + Carb (100ug/ml) + Tet (12.5ug/ml)
- 8.2.1. y sembrar 100 ul de overnigth en cada placa. Incubar 37°C 1 día
- 8.2.2. Contar colonias en cada placa y comparar el número de colonias → indicación de no toxicidad del inserto placas con IPTG y sin IPTG tienen que tener el mismo número de colonias (IPTG induce producción de ARNdh; si hay menos colonias en las placas con IPTG indicador que ARNdh es tóxico para la bacteria).
Nota: Todo el procedimiento anterior se realiza en duplicado.

9. Control de calidad

- 9.1. Se aseguró que los reactivos estuvieran en buen estado
- 9.2. Se verificó que los reactivos estuvieran guardados correctamente.
- 9.3. **Conflict solution policy**
 - 9.3.1. Pobre lisis celular
 - 9.3.1.1. Muchas bacterias, el cultivo debería de estar en un OD₆₀₀ entre 2 y 4. El medio no debe contener antibiótico
 - 9.3.1.2. Se resuspendio mal
 - 9.3.2. No se purifico ADN
 - 9.3.2.1. No se agregó etanol a la columna con Wash solution
 - 9.3.2.2. No hubo suficiente yield del plasmido
 - 9.3.3. Bajo yields de plasmido
 - 9.3.3.1. Crecieron más las bacterias no transformadas que las transformadas.
 - 9.3.3.2. El cultivo es viejo
 - 9.3.3.3. El plásmido es de bajo número de copias

Procedimiento Operacional Estándar	SOP 2:1 Fecha 17/11/16
	Páginas Totales: 6

Identificación de Enterobacterias <i>(Klebsiella oxytoca)</i>	Autores: Crista Gavarrete y Nina Figueroa
---	--

1. Propósito:

1.1 Identificar *Klebsiella oxytoca* en las muestras de agua de los huevos y del campo, de Ceratitis capitata, utilizando medios selectivos y Microgen por pruebas bioquímicas.

2. Aplicación:

Identificación de diversas bacterias en una muestra según el tipo de metabolismo que estas tengan, por lo que se utilizan pruebas bioquímicas y medios selectivos. También son utilizados para inhibir el crecimiento de bacterias o microorganismos no deseados según el tipo de sustratos utilizados.

3. Referencias:

- 3.1 addgene. 2016. Inoculating a Liquid Bacterial Culture. addgene. En: <https://www.addgene.org/plasmid-protocols/inoculate-bacterial-culture/>. [visto 19/11/16].
- 3.2 Zhou, K.; et. al. 2011. Lag Phase of Salmonella enterica under Osmotic Stress Conditions. Appl Environ Microbiol. Vol. 7(5). pp. 1758-1762.
- 3.3 Prats, G. 2005. Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana. 400p.
- 3.4 Microgen, The. “GN-ID A & GN-ID B An Identification System for Commonly GN-ID A & GN-ID B.”

4. Terminología y abreviaciones:

- 4.1 LB: medio Luria-Bertani: este medio está compuesto por cloruro de sodio (NaCl), extracto de levadura, agua destilada y bacto-triptona. Lo anterior es para un medio líquido, mientras que para realizar un medio sólido se requiere añadir agar. Permite el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos.
- 4.2 ON: over night: esto se refiere en este trabajo a que los cultivos o medios se dejan en reposo por la noche.
- 4.3 UFC: unidades formadoras de colonias: se utiliza esta unidad para indicar el número de colonias independientes.

5. Principio:

Los medios selectivos son los que permiten el crecimiento de ciertas bacterias e inhibe el crecimiento de otras. Depende de la sustancia requerida o que posee el medio tales como: cloruro de sodio, citrato, sales biliares, antibióticos, etc. La función de este es identificar y aislar bacterias (Prats 2005).

En agar sangre, *Klebsiella sp.* se observan colonias brillantes, sin hemólisis. En agar MacConkey, crecen como colonias circulares, rosadas. Se diferencia de otras bacterias gram negativo, como *Escherichia coli*. Esta presenta bacterias circulares, pero con el centro más oscuro que en *Klebsiella sp.* (Romero Cabello, 2007).

6. Documentos asociados:

- 6.1 Bailón, L.; Cruz, R.; Cervantes, A. 2003. Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias. Universidad Nacional Autónoma de México. 175p.
- 6.2 Prats, G. 2005. Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana. 400p.
- 6.3 Ferrer, I. 2012. Identificación Bioquímica de los bacilos Gram-negativo. Bayamon. En: <http://facultad.bayamon.inter.edu/iferer/Clase%205%202012.pdf>. [visto 12/10/16]. 34p.

7. Seguridad:

- 7.1 Uso de centrífuga
 - La centrifugadora deberá utilizarse en base a las instrucciones del fabricante.
 - Los tubos para la centrifugadora deben estar fabricados de plástico, estar en buen estado y completamente cerrados para la centrifugación.
 - Asegurarse de equilibrar el peso de los soportes, colocando correctamente los tubos en su sitio.

- Para equilibrar se debe utilizar tubos con agua destilada o alcohol.
 - Asegurar la velocidad y tiempo de rotación. Cerrar correctamente la tapadera antes de iniciar.
 - Si se realizó la centrifugación en frío, mantener la tapa abierta durante un tiempo (1 hora aprox.) para que se evapore el agua o hielo formado.
- 7.2 Manejo de bacterias concentradas
- Resuspender bacterias, utilizar la campana de flujo laminar.
- 7.3 Derrame de medios de cultivos
- Agregar una solución de cloro al 10% sobre el medio de cultivo derramado, absorber con papel toalla y desechar en bote Ecotermo®.
- 7.4 Uso de bata y guantes
- Utilizar los guantes cuando se maneja bacterias concentradas.
- 8. Equipos, materiales y reactivos:**
- 8.1 Reactivos**
- 8.1.1 LB para 2l de medio líquido:
- Extracto de levadura 10g
 - Agua destilada 2000ml (aforado)
 - NaCl 20g
 - bacto-triptona 20g
- 8.1.2 Cloro 10% en piseta
- 8.1.3 Alcohol en piseta
- 8.1.4 Agua destilada en piseta y tambo
- 8.1.5 Aceite mineral
- 8.1.6 Microgen GN ID
- 8.1.7 Solución salina
- 8.2 Material**
- 8.2.2 5 Erlenmeyer de 1000ml
- 8.2.3 Espátulas
- 8.2.4 30 Cajas Petri
- 8.2.5 Pipetas Pasteur desechables
- 8.3 Equipo**
- 8.3.1 Papel pH
- 8.3.2 Potenciómetro Thermo Electro Corporation (ORION 2 STAR)
- 8.3.3 Balanza OHAUS Scout Pro
- 8.3.4 Balanza analítica Precisa XB220A
- 8.3.5 Estufa con agitador Corning Stirrer Hot Plate
- 8.3.7 Campana F L: LAB con Co.
- 8.3.8 Campana de flujo laminar
- 8.3.11 Autoclave
- 8.3.12 Incubadora
- 8.3.13 Incubadora con agitador
- 9. Prueba estándar:**
- 10. Procedimiento:**
- Día 1: Preparación de medio líquido**
- 10.1** Lavar cristalería
- 10.2** Preparar 2 litros de medio LB:
- Extracto de levadura 10g
 - Agua destilada 2000ml (aforado)
 - NaCl 20g
 - bacto-triptona 20g
- 10.3** Ajustar el pH del medio líquido con pHímetro. Si es necesario, agregar gotas de NaOH 0.1N.
- 10.4** Autoclavear a 121°C por 15 minutos.
- 10.5** Preparar 500 ml de agar sangre
- Pesar el agar sangre para 500ml de medio

- Agregar los 500ml de agua destilada
- 10.6** Preparar 500 ml de agar MacConkey
 - Pesar el agar sangre para 500ml de medio
 - Agregar los 500ml de agua destilada
- 10.7** Autoclavear a 121°C por 15 minutos.
 - Día 1: Preparación de placas con medio sólido**
- 10.8** Esperar a que enfíe el medio autoclaveado
- 10.9** Repartir los medio en cajas Petri debidamente rotuladas (15 de cada medio)
- 10.10** Guardar e incubar a 37°C para control de calidad (revisar que no crezca bacteria alguna)
- 10.11** Guardar boca arriba (la tapa de la caja queda abajo) en el refrigerador.
 - Día 2: Cultivo inicial**
- 10.12** Preparar tubos con 20ml del medio LB y 2ml de las muestras entregadas
- 10.13** Incubar a 37°C con agitación ON
 - Día 3: Cultivo en los diferentes medios sólidos**
- 10.14** Tomar una asada del cultivo inicial y sembrarlo en las cajas Petri por técnica de estriado.
- 10.15** Incubar a 37°C ON
 - Día 3: Pruebas bioquímicas**
- 10.16** Realizar la prueba de oxidasa para el cultivo aislado.
- 10.17** Preparar una suspensión con una colonia en 3 – 5 ml de solución salina 0.85%.
- 10.18** Microgen
 - Abrir la tira de reacciones. No descartar la tapa adhesiva.
 - Con una pipeta Pasteur, agregar 3 gotas de la suspensión a cada pozo de la tira de reacciones.
 - Cubrir los pozos 1, 2, 3 y 9 de GN A ID con 3 gotas de aceite mineral.
 - Cubrir los pozos 20 y 24 de GN B ID con 3 gotas de aceite mineral.
 - Sellar la tira de reacciones con la tapa adhesiva.
 - Incubar a 37°C ON
 - Día 4: Lectura de resultados**
- 10.19** Quitar la tapa adhesiva.
- 10.20** Agregar los siguientes reactivos
 - 2 gotas de los reactivos de Kovac al pozo 2 y leer luego de transcurrir 1 minuto.
 - 1 gota de reactivo VP I y VP II al pozo 10 y leer luego de 15 – 30 minutos.
 - 1 gota de reactivo TDA al pozo 12 y leer luego de 1 minuto.
- 10.21** IMÁGENES
- 11. Control de calidad:**
 - 11.1** Incubar placas con medio sólido para verificar que no tengan bacterias.
 - 11.2** Trabajar bajo la campana de flujo laminar
 - 11.3** Verificar el funcionamiento del equipo a utilizar
 - 11.4** **Conflict solution policy:**

Procedimiento Operacional Estándar	SOP 2:2 Fecha 17/11/16
	Páginas Totales: 5
Extracción del genoma de <i>Klebsiella oxytoca</i>	Autores: Crista Gavarrete y Nina Figueroa

1. Propósito:

1.1 Extraer el ADN genómico (cromosoma 1) de *Klebsiella oxytoca* del agua de los huevos y del campo de *Ceratitis capitata*.

2. Aplicación:

Extracción de ADN tanto genómico como no genómico de diversas fuentes tanto de muestras vegetales, tejidos y bacterias. Dicho ADN puede ser utilizado para clonación y transformación de un organismo utilizándolo como inserto. También puede ser utilizado para determinar la cantidad, concentración, integridad y pureza del ADN de una muestra. El ADN extraído puede ser usado como un medio para la obtención de primers diseñados y específicos para futuros experimentos. También como un marcador molecular de presencia de cierto gen específico. Finalmente, puede ser utilizado para ser secuenciado y determinar el orden de sus nucleótidos.

3. Referencias:

- 3.1 White, Peter. 2004. Evaluating Concentration and Purity of RNA. UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA. FUNCTIONAL GENOMICS CORE. 2p. En: http://www.cbil.upenn.edu/downloads_orig/EPConDB/download/Protocols/RNA%20-%20Evaluating%20Concentration%20and%20Purity.pdf. [21/09/16].
- 3.2 Macrogen. 2016. "Macrogen." <http://www.macrogen.com/eng/>.
- 3.3 ThermoFisher. 2016. "Extraction of DNA Using DNazol® Reagent." ThermoFisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/dna-extraction-protocols/extraction-of-dna-using-reagent.html> (August 28, 2016).
- 3.4 Ligozzi, Marco, and Roberta Fontana. 2003. "Isolation of Total DNA from Bacteria and Yeast." African Journal of Biotechnology 2(8): 251–53. <http://www.academicjournals.org/AJB> (August 28, 2016).
- 3.5 Zavala Castro, Jorge. 2005. Electroforesis. Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular. Volumen 7. Ediciones de la Universidad.
- 3.6 Somma, M. 2001. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestra de Alimentos. Extracción y Purificación de ADN. JRC. CHCP. PP. 1-18.

4. Terminología y abreviaciones:

- 4.1 LB: medio Luria-Bertani (Lisogenia): este medio está compuesto por cloruro de sodio (NaCl), extracto de levadura, agua destilada y bacto-triptona. Lo anterior es para un medio líquido, mientras que para realizar un medio sólido se requiere añadir agar. Permite el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos.
- 4.2 ON: over night: esto se refiere en este trabajo a que los cultivos o medios se dejan en reposo por la noche.
- 4.3 UFC: unidades formadoras de colonias: se utiliza esta unidad para indicar el número de colonias independientes.

5. Principio:

Muchos procedimientos, en biología molecular, incluyen la extracción de ADN o ARN de alta calidad. La extracción y purificación del ADN es un paso clave en la mayoría de protocolos. Existen muchos métodos para extraer ADN de bacterias y levaduras, incluyendo la extracción con fenol (Alejos, Aragón, & Romero, 2000). Sin embargo, el concepto básico de extracción de ADN se divide en 5 pasos.

- 1) Ruptura de las células. El método de lisis celular depende de las características de la célula. Es diferente si se quiere obtener ADN de una célula bacteriana, vegetal o de una animal. Se puede utilizar
- 2) Eliminación de proteínas. Para ellos se utilizan enzimas para degradar las proteínas.
- 3) Eliminación de ARN. Se utiliza una RNasa.
- 4) Extracción de proteínas. Se utilizan solventes orgánicos como el fenol o cloroformo.
- 5) Precipitación de ADN. Se utilizan sales como el acetato de potasio o de amonio. Una vez el ADN entra en contacto con los cationes se precipita en etanol (Zavala Castro, 2005).

La mayoría de métodos para extraer ADN de bacterias tienen múltiples y *time consuming* pasos o requieren el uso de químicos tóxicos. Ligozzi y Fontana investigaron un nuevo método para la extracción de ADN de bacterias gram positivas, gram negativas y micobacterias. Ellos utilizaron DNAzol, un reactivo para extraer ADN genómico de muestras líquidas o sólidas. Se basa en la adhesión del ADN a una columna de sílica para poder lavar ARN y proteínas. Ellos concluyeron que el método con DNAzol es simple, reproducible y más rápido que otras técnicas. También observaron que el ADN extraído es de buena calidad y se obtiene una cantidad similar a otros métodos de extracción (Ligozzi & Roberta, 2003)

Existen ciertos métodos para determinar la integridad y concentración del ADN de una solución. Uno de los más utilizados es el espectrofotómetro UV ya que el ADN absorbe luz UV lo que permite que su cuantificación sea sencilla (Zavala Castro 2005). Otro método de cuantificación es la citometría de flujo que es utilizada para tratar tumores que son sólidos y aneuploidías del ADN (Zavala Castro 2005). La fluorometría al igual que la espectrofotometría UV se basa en absorbancia de ADN con ayuda de una lámpara UV y bromuro de etidio (Zavala Castro 2005). La electroforesis en gel de agarosa es utilizado como un marcador de la integridad del ADN a cierta concentración conocida (Zavala Castro 2005). También se encuentra el PCR y PCR en tiempo real que permiten cuantificar el ADN, sin embargo existen ciertos contaminantes que inhiben su función y afectan los resultados. La mayoría de dichos contaminantes provienen de reactivos utilizados en la extracción y purificación del ADN (Somma 2001).

6. Documentos asociados:

- 6.1 White, Peter. 2004. Evaluating Concentration and Purity of RNA. UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA. FUNCTIONAL GENOMICS CORE. 2p. En: http://www.cbil.upenn.edu/downloads_orig/EPConDB/download/Protocols/RNA%20-%20Evaluating%20Concentration%20and%20Purity.pdf. [21/09/16].
- 6.2 Microbial. 2009. La extracción y purificación del ADN para análisis de PCR. Mitos y realidades. Newsletter. Núm. 3. Pp. 1-2.
- 6.3 Peña; Arroyo; Gómez; Tapia; Gómez. 1988. Bioquímica. 2da edición. LIMUSA Noriega Editores. 427p.

7. Seguridad:

- 7.1 Uso de centrífuga
 - La centrifugadora deberá utilizarse en base a las instrucciones del fabricante.
 - Los tubos para la centrifugadora deben estar fabricados de plástico, estar en buen estado y completamente cerrados para la centrifugación.
 - Asegurarse de equilibrar el peso de los soportes, colocando correctamente los tubos en su sitio.
 - Para equilibrar se debe utilizar tubos con agua destilada o alcohol.
 - Asegurar la velocidad y tiempo de rotación. Cerrar correctamente la tapadera antes de iniciar.
 - Si se realizó la centrifugación en frío, mantener la tapa abierta durante un tiempo (1 hora aprox.) para que se evapore el agua o hielo formado.
- 7.2 Manejo de bacterias concentradas
 - Resuspender bacterias, utilizar la campana de flujo laminar.
- 7.3 Derrame de medios de cultivos
 - Agregar una solución de cloro al 10% sobre el medio de cultivo derramado, absorber con papel toalla y desechar en bote Ecotermo®.
- 7.4 Uso de bata y guantes

- Utilizar los guantes cuando se maneja bacterias concentradas.

8. Equipos, materiales y reactivos:

8.1 Reactivos

- 8.1.1 Etanol absoluto
- 8.1.2 Etanol 75%
- 8.1.3 Cloro 10% en piseta
- 8.1.4 Alcohol en piseta
- 8.1.5 Agua destilada en piseta y tambo
- 8.1.6 NaOH 8 mM

8.2 Material

- 8.2.1 Tubos Eppendorff
- 8.2.2 Micropipetas p100, p1000, p200
- 8.2.3 Puntas para micropipetas
- 8.2.4 Pipetas serológicas con tapón de algodón esterilizadas de 1.0 ml
- 8.2.5 Pipetas serológicas con tapón de algodón esterilizadas de 10 ml

8.3 Equipo

- 8.3.1 Estufa con agitador Corning Stirrer Hot Plate
- 8.3.2 Campana F L: LAB con Co.
- 8.3.3 Campana de flujo laminar
- 8.3.4 Incubadora
- 8.3.5 Incubadora con agitador

10. Procedimiento:

Lisis celular y nuclear

10.1 Para células que crecen en una monolayer:

- Añadir 0.75-1.0ml de DNAzol por cada 10cm² del cultivo utilizado.
- Lisar las células agitando el cultivo con el reactivo.
- Pipetear con gentileza la solución en el tubo.

10.2 Células en pellet o resuspensión:

- A un pellet o suspensión de células se debe añadir 1ml de DNAzol por cada 1-3x10⁷ células.

10.3 Núcleo de células:

- Añadir 1ml de DNAzol por cada 1-3x10⁷ células ya sea en pellet o resuspensión.
- Lisar el núcleo invirtiendo el tubo varias veces y mezclar con pipeteo.

Nota: Para evitar que el ADN sea dañado mientras se mezcla por pipeteo, se recomienda cortar las puntas de pipetas de 2-3mm o mezclar por inversión. Nunca mezclar vigorosamente o usando un vortex.

Centrifugación (opcional)

10.4 Para eliminar los fragmentos por lisis de células se recomienda centrifugar a 10,000xg por 4°C por 10 minutos

10.5 Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo estéril

Precipitación de ADN

10.6 Agregar 0.5 ml de etanol 100% por cada mililitro de DNAzol utilizado

10.7 Mezclar por inversión.

10.8 Dejar a temperatura ambiente por 1 – 3 minutos. El ADN debe observarse como un precipitado.

10.9 Quitar el ADN con una punta de pipeta. Esto se realiza enrollando el ADN a la punta y pegarlo a la pared del tubo.

10.10 Decantar el sobrenadante con cuidado.

10.11 Colocar el tubo verticalmente por 1 minutos y aspirar el sobrenadante restante.

10.12 Para pequeñas cantidades de ADN (< 15 µg) puede ser necesario centrifugación a 4000 por 1 – 2 minutos.

Lavado de ADN

10.13 Lavar el ADN precipitado dos veces con 0.8 – 1.0 ml de etanol 75%.

10.14 En cada lavado se debe suspender el ADN invirtiendo los tubos de 3 – 6 veces.

- 10.15** Dejar reposar los tubos 1 min para permitir que el ADN llegue al fondo de los tubos.
10.16 Remover el etanol con pipeta o por decantado.

Solubilización del ADN

- 10.17** Secar el ADN dejando el tubo abierto por 15 segundos.
10.18 Disolver el ADN en NaOH 8 mM para llegar a una concentración aproximada de 0.2 – 0.3 µg/µl.
 - 2.1. Se utiliza 0.3 ml para ADN de 107 células o 10 – 20 mg de tejido animal.

Cuantificación de ADN

- 10.19** Mezclar una alícuota de ADN solubilizado con 1 ml de NaOH 8 mM.
10.20 Medir absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro UV-VIS.
10.21 Calcular la pureza del ADN con A260/A280. La razón debe encontrarse entre 1.7-2.0
10.22 Calcular cantidad de ADN suponiendo que una unidad de A260 equivale a 50 µg de ADN doble hebra por mililitro. También puede calcularse según la siguiente imagen:

Volume of RNA sample = 1.6 ml

Dilution = 10 µl of RNA sample + 490 µl distilled water (1/50 dilution).

Measured absorbance of diluted sample in a 1 ml cuvette (RNase-free): A260 = 0.75

Concentration of RNA sample = 40 x A260 x dilution factor
 = 40 x 0.75 x 50
 = 1500 µg ml⁻¹

Total yield = concentration x volume of sample in milliliters
 = 1500 µg ml⁻¹ x 1.6 ml
 = 2400 µg = 2.4 mg RNA

11. Control de calidad:

- 11.1** Incubar placas con medio sólido para verificar que no tengan bacterias.
11.2 Trabajar bajo la campana de flujo laminar
11.3 Verificar el funcionamiento del equipo a utilizar

Procedimiento Operacional Estándar	SOP 2:3 Fecha 17/11/16
	Páginas Totales: 5
Extracción de plásmidos de <i>Klebsiella oxytoca</i>	Autores: Crista Gavarrete y Nina Figueroa

1. Propósito:

1.1 Extraer los plásmidos de *Klebsiella oxytoca* no degradado por endonucleasas de la misma bacteria.

2. Aplicación:

Extracción de plásmidos de diversas bacterias. Cuantificación de los plásmidos extraídos, determinación del tamaño y número de plásmidos. Puede ser utilizado para obtener un plásmido con un inserto o clon utilizado para transformar las bacterias. Esto como confirmación de que las bacterias poseen el plásmidos insertado y en especial el inserto deseado. A continuación se listan las aplicaciones que se le puede dar al plásmido:

- Determinación de la ligación y transformación de las células.
- El producto extraído es utilizado para PCR de transcripción reversa (RT-PCR), PCR tiempo real (qPCR).
- Librería de Construcción de cDNA.
- Clonación -> Transformación.
- Northern Blotting.

3. Referencias:

- 3.1 https://worldwide.promega.com/products/biochemicals-and-labware/biochemical-buffers-and-reagents/te-buffer_-1x_-molecular-biology-grade/
- 3.2 <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/qiagen-plasmid-kits/#orderinginformation>
- 3.3 Mini, Qiagen Plasmid, and Maxi Kits. 2011. "20160304_QIAGEN-Plasmid-Mini-Midi-and-Maxi-Kits-EN." (January): 4–5.
- 3.4 McGrawHill. 2016. Restriction Endonucleases. Biology (Mader), 10th Edition. Chapter 14: Biotechnology and Genomics. http://highereducation.com/sites/0035456775/student_view0/chapter14/restriction_endonucleases.html.

3.5

4. Terminología y abreviaciones:

- 4.1 LB: medio Luria-Bertani (Lisogenia): este medio está compuesto por cloruro de sodio (NaCl), extracto de levadura, agua destilada y bacto-triptona. Lo anterior es para un medio líquido, mientras que para realizar un medio sólido se requiere añadir agar. Permite el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos.
- 4.2 g: gravedades en la centrifuga

5. Principio:

Las endonucleasas son muy utilizadas para cortar una molécula de ADN en un sitio específico. En la naturaleza las células utilizan este mecanismos para cortar el ADN de virus evitando de esta forma que dicho ADN extraño se una al genómica para la replicación y continuación de infección (McGrawHill 2016). Por lo que si se extrae ADN de una muestra se debe de tener cuidado con dichas endonucleasas ya que pueden degradar el ADN deseado. Por ello, primero las endonucleasas deben ser desnaturalizadas para que pierdan su actividad enzimática y con ello obtener un fragmento completo de ADN deseado.

El kit QIAGEN maxi plasmid es utilizado como un método fácil para la extracción, aislamiento y purificación de plásmidos. Es muy utilizado ya que es bastante rápidos se lleva como máximo 30

minutos en todo el proceso y es muy eficiente al extraer plásmidos de 20,000 pares de bases o menos.

6. Documentos asociados:

- 6.1 Yábar Varas, Carlos. 2003. Manual de Procedimientos de Electroforesis para Proteínas y ADN. Serie de Normas Técnicas N° 38. INS (Instituto Nacional de Salud). Lima. 69p.
- 6.2 Cultek. 2015. Marcadores de Peso Molecular para ADN. Novedades. Cultek. http://www.cultek.com/index.asp?p=novedad&id_nov=175. [visto 15/10/16].

7. Seguridad:

- 7.1 Uso de centrífuga
- La centrifugadora deberá utilizarse en base a las instrucciones del fabricante.
 - Los tubos para la centrifugadora deben estar fabricados de plástico, estar en buen estado y completamente cerrados para la centrifugación.
 - Asegurarse de equilibrar el peso de los soportes, colocando correctamente los tubos en su sitio.
 - Para equilibrar se debe utilizar tubos con agua destilada o alcohol.
 - Asegurar la velocidad y tiempo de rotación. Cerrar correctamente la tapadera antes de iniciar.
 - Si se realizó la centrifugación en frío, mantener la tapa abierta durante un tiempo (1 hora aprox.) para que se evapore el agua o hielo formado.
- 7.2 Manejo de bacterias concentradas
- Resuspender bacterias, utilizar la campana de flujo laminar.
- 7.3 Derrame de medios de cultivos
- Agregar una solución de cloro al 10% sobre el medio de cultivo derramado, absorber con papel toalla y desechar en bote Ecotermo®.
- 7.4 Uso de bata y guantes
- Utilizar los guantes cuando se maneja bacterias concentradas.

8. Equipos, materiales y reactivos:

8.1 Reactivos

- 8.1.1 Isopropanol
- 8.1.2 Etanol 75%
- 8.1.3 Cloro 10% en piseta
- 8.1.4 Alcohol en piseta
- 8.1.5 Agua destilada en piseta y tambo
- 8.1.6 QIAGEN maxi plasmid kit
- 8.1.7 Buffer TE: 10mM Tris-HCl containing 1mM EDTA•Na2

8.2 Material

- 8.2.1 Tubos Eppendorff
- 8.2.2 Micropipetas p100, p1000, p200
- 8.2.3 Puntas para micropipetas
- 8.2.4 Pipetas serológicas con tapón de algodón esterilizadas de 1.0 ml
- 8.2.5 Pipetas serológicas con tapón de algodón esterilizadas de 10 ml

8.3 Equipo

- 8.3.1 Estufa con agitador Corning Stirrer Hot Plate
- 8.3.2 Campana F L: LAB con Co.
- 8.3.3 Campana de flujo laminar
- 8.3.4 Incubadora
- 8.3.5 Incubadora con agitador

10. Procedimiento:

Antes de empezar

- 10.1 Centrifugar el vial de RNAse antes de usar
- 10.2 Agregar la solución de RNAase A al buffer P1.
Nota: usar un vial de RNAase A para cada botella de buffer.
- 10.3 Revisar si el buffer P2 tiene precipitado de SDS. Si lo tiene, calentarlo a 37°C.

- 10.4 Pre-chill buffer P3 a 4°C.
- Inóculo inicial**
- 10.5 Tomar una colonia de un medio selectivo.
- 10.6 Hacer un inóculo inicial en 2 – 5 ml de medio LB.
- 10.7 Incubar por 8 horas a 37°C con agitación (aproximadamente 300 rpm).
- 10.8 Diluir el inóculo inicial en medio LB. Para high-copy plasmids inocular 100 ml de medio con 100 – 200µl de incóculo inicial.
- 10.9 Incubar por 12 horas a 37°C con agitación (aproximadamente 300 rpm). El cultivo debe llegar a 4×10^9 células por mililitro.
- Tratamiento contra enzimas**
- 10.10 Para 1ml de cultivo ON: agregar EDTA para una concentración fina de 5mM
- 10.11 Mezclar con vortex
- 10.12 Dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente
- 10.13 Centrifugar a 8000 rpm por 2 minutos
- 10.14 Descartar sobrenadante y resuspender bacterias en 975µl de solución salina
- Extracción de ADN**
- 10.15 Recolectar las células por centrifugación a 6000g por 15 minutos a 4°C.
- 10.16 Resuspender las bacterias en 10 ml de buffer P1
- 10.17 Añadir 10ml del buffer P2 y mezclar vigorosamente invirtiendo el tubo 4 - 6 veces. No usar vortex
- 10.18 Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 5 minutos. Si se utiliza el reactivo LyseBlue la solución se tornará azul.
- 10.19 Añadir 10ml de Buffer P3 previamente enfriado. Mezclar vigorosamente de 4 - 6 veces. Si se utiliza el reactivo LyseBlue, se debe de mezclar la solución hasta que se encuentre incolora
- 10.20 Incubar en hielo por 20 minutos. Se puede observar el ADN precipitado.
- 10.21 Centrifugar a 20000g por 30 minutos a 4°C.
- 10.22 Retirar el sobrenadante (ADN de plásmidos).
- 10.23 Volver a centrifugar y retirar el sobrenadante (ADN de plásmidos).
- Lavado de ADN**
- 10.24 Equilibrar un QIAGEN-tip 500 aplicando 10ml de Buffer QBT y permitir que la columna se vacíe por gravedad.
- 10.25 Aplicar el sobrenadante a QIAGEN-tip y dejar que entre a la resina por gravedad.
- 10.26 Lavar QIAGEN-tip dos veces con 30 ml de buffer QC. Dejar que el buffer corra por gravedad.
- Nota: Si se desea eluir ADN mayor de 45 kilo bases se debe de precalentar el buffer QF a 65°C para ayudar a incrementar el el rendimiento.**
- 10.27 Eluir el ADN con 15 ml de buffer QF. Recolectarlo en tubo de 15 o 50 ml. No usar tubos de policarbonato.
- Precipitación del ADN**
- 10.28 Precipitar el ADN al adicionar 10.5ml (0.7 volúmenes) de isopropanol a temperatura ambiente.
- 10.29 Centrifugar a 15,000g por 30 minutos a 4°C.
- 10.30 Con mucho cuidado, decantar el sobrenadante.
- 10.31 Lavar el pellet de ADN con 5 ml de etanol 70% a temperatura ambiente.
- 10.32 Centrifugar a 15,000g por 10 minutos a 4°C
- 10.33 Decantar el sobrenadante con mucho cuidado.
- 10.34 Airear pellet por 5-10 minutos.
- 10.35 Solubilizar ADN en un volumen apropiado de buffer (en TE buffer pH8.0 o 10mM Tris-Cl pH 8.5).

11. Control de calidad:

- 11.1 Incubar placas con medio sólido para verificar que no tengan bacterias.
- 11.2 Trabajar bajo la campana de flujo laminar
- 11.3 Verificar el funcionamiento del equipo a utilizar
- 11.4 **Conflict solution policy:**

Procedimiento Operacional Estándar	SOP 2:4 Fecha 18/11/16
	Páginas Totales: 4
Patrón de digestión de plásmidos de <i>Klebsiella oxytoca</i>	Autores: Crista Gavarrete y Nina Figueroa

1. Propósito:

- 1.1 Determinar el tamaño y número de plásmidos por medio de electroforesis en agarosa realizando previamente la digestión de plásmidos circulares a plásmidos lineales por medio de endonucleasas (EcoRI y HindIII).

2. Aplicación:

Las enzimas de restricción utilizadas en la digestión son muy utilizadas para la clonación en el momento de insertar una secuencia específica en un vector ya sea un plásmido o un bacteriófago. Por lo que estas enzimas cortan el inserto para poseer extremos con *sticky ends* o *blunt ends* que se puedan ligar con el plásmido elegido también cortado de la misma forma. Con dicho clon se pueden transformar células competentes como bacterias y otro tipo de organismos.

La digestión también permite cortar al plásmido en un sitio para abrir la secuencia circular y volverla lineal de tal forma que se pueda determinar su integridad y tamaño por medio de electroforesis. Un plásmido circular al migrar va a tener mayor dificultad en comparación con uno lineal que proporciona mayor información sobre su tamaño.

3. Referencias:

- 3.1 Neb. 2012. Optimizing Restriction Endonuclease Reactions. En: <https://www.neb.com/protocols/2012/12/07/optimizing-restriction-endonuclease-reactions>
- 3.2 Lee, P.; et. al. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. University of California, Los Angeles. J. Vis. Exp. 62.
- 3.3 Zavala Castro, Jorge. 2005. Electroforesis. Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular. Volumen 7. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. Pp. 43-51.
- 3.4 BioLabs. 2016. Types of Restriction Endonucleases. New England BioLabs Inc. En: <https://www.neb.com/products/restriction-endonucleases/restriction-endonucleases/types-of-restriction-endonucleases>.
- 3.5 McGrawHill. 2016. Restriction Endonucleases. Biology (Mader), 10th Edition. Chapter 14: Biotechnology and Genomics. http://highered.mheducation.com/sites/0035456775/student_view0/chapter14/restriction_endonucleases.html.

4. Terminología y abreviaciones:

- 4.1 Buffer TBE: buffer Tris base con ácido bórico y EDTA

5. Principio:

Las enzimas de restricción son muy utilizadas para cortar una molécula de ADN en un sitio específico. En la naturaleza las células utilizan este mecanismo para cortar el ADN de virus evitando de esta forma que dicho ADN extraño se una al genómica para la replicación y continuación de infección (McGrawHill 2016). Las enzimas de restricción son clasificadas en cuatro tipos dependiendo del tipo de corte, su composición, cofactores específicos y las secuencias específicas que reconocen. El tipo I es el complejo con múltiples sub-unidades y estos tienen a cortar de forma aleatoria en las secuencias por lo que no son muy específicas (BioLabs 2016). El tipo II corta en una posición definida, producen fragmentos que pueden ser observados como bandas en el gel. La diferencia entre los tipos de enzimas en este grupo se debe a la variación de aminoácidos y la posición de estos. Como ejemplo de este grupo se encuentra EcoRI y HindIII. El tipo III se caracteriza por cortar a fuera del sitio de reconocimiento por lo que para una secuencia de ADN requiere de reconocimiento en ambas direcciones. Finalmente, se encuentran las tipo IV que tienen un sitio de reconocimiento modificable, estas son muy comunes en la bacteria *Escherichia coli* (BioLabs 2016).

La electroforesis horizontal en gel de agarosa utiliza un buffer y dos electrodos que dan corriente eléctrica para la corrida de las muestras. La corrida de los ácidos nucleicos se lleva a cabo en un gel de agarosa en pozos realizados por peines de diversos grosores dependiendo de la muestra (Zavala 2005). En algunos casos se utiliza una enzima para fragmentar el ADN analizando diversas bandas

producidas por los diversos fragmentos de ADN (Zavala 2005). Debido a que el ADN es una molécula negativa, va a migrar hacia el electrodo positivo o polo positivo (Zavala 2005). El tinte de carga que se utiliza en electroforesis posee tres funciones: la primera es para agregarle densidad a la muestra de ADN permitiendo y desplazamiento eficiente entre el gel y evitando que la muestra se salga del pozo. La segunda es para darle coloración al ADN y con ello poder ser visualizado en el transiluminador UV. La tercera función está dada por la velocidad estándar a la que viaja el tinte por lo que se puede estimar la distancia a la que migró el ADN de la muestra (Lee 2012). La velocidad a la que migra el ADN está dada por el tamaño de fragmentos de ADN y su compactación. Entre más pequeños son los fragmentos de ADN más rápido van a migrar en comparación con fragmentos grandes de ADN (Lee 2012).

6. Documentos asociados:

- 6.1 Cultek. 2015. Marcadores de Peso Molecular para ADN. Novedades. Cultek. http://www.cultek.com/index.asp?p=novedad&id_nov=175. [visto 29/09/16].
- 6.2 Lee, P.; et. al. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. University of California, Los Angeles. J. Vis. Exp. 62.
- 6.3 Zavala Castro, Jorge. 2005. Electroforesis. Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular. Volumen 7. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. Pp. 43-51.

7. Seguridad:

- 7.1 Uso de centrífuga
 - La centrifugadora deberá utilizarse en base a las instrucciones del fabricante.
 - Los tubos para la centrifugadora deben estar fabricados de plástico, estar en buen estado y completamente cerrados para la centrifugación.
 - Asegurarse de equilibrar el peso de los soportes, colocando correctamente los tubos en su sitio.
 - Para equilibrar se debe utilizar tubos con agua destilada o alcohol.
 - Asegurar la velocidad y tiempo de rotación. Cerrar correctamente la tapadera antes de iniciar.
 - Si se realizó la centrifugación en frío, mantener la tapa abierta durante un tiempo (1 hora aprox.) para que se evapore el agua o hielo formado.
- 7.2 Manejo de bacterias concentradas
 - Resuspender bacterias, utilizar la campana de flujo laminar.
- 7.3 Derrame de medios de cultivos
 - Agregar una solución de cloro al 10% sobre el medio de cultivo derramado, absorber con papel toalla y desechar en bote Ecotermo®.
- 7.4 Uso de bata y guantes
 - Utilizar los guantes cuando se maneja bacterias concentradas.

8. Equipos, materiales y reactivos:

8.1 Reactivos

- 8.1.1 Agarosa
- 8.1.2 Cloro 10% en piseta
- 8.1.3 Alcohol en piseta
- 8.1.4 Agua destilada en piseta y tambo
- 8.1.5 Buffer TBE
- 8.1.6 Loading Dye
- 8.1.7 50bp DNA Step Ladder
- 8.1.8 Enzimas de restricción EcoRI y HindIII
- 8.1.9 Buffer de enzimas de restricción
- 8.1.10 BSA

8.2 Material

- 8.2.1 Micropipetas p100, p1000, p200
- 8.2.2 Puntas para micropipetas
- 8.2.3 Tubos Eppendorf
- 8.2.4 Erlenmeyer
- 8.2.5 Espátula

8.3 Equipo

- 8.3.7 Campana F L: LAB con Co.
- 8.3.8 Campana de flujo laminar
- 8.3.11 Cámara de electroforesis
- 8.3.12 Microondas

9. Prueba estándar:

10. Procedimiento:**Día 1: Preparación de buffer TBE**

10.1 Preparar solución stock 5X de buffer TBE

10.2 Receta para 1 litro en agua:

- 54 g de Tris base

- 27.5 g de boric acid

- 20 mL de 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Día 2: Digestión de plásmidos con enzimas de restricción

10.3 Sacar reactivos para que se descongelen

10.4 Preparar mezclas de reacción para plásmidos extraídos

10.5 Receta para digestión rápida:

- 15.8ul agua

- 2ul buffer enzima 1X

- 0.2ul BSA

- 1ul plásmido

- 1ul enzima

Volumen final 20ul

10.6 Mezclar en tubos de 0.5ml e incubar a 37°C por 1 - 2 horas.

Día 2: Electroforesis

10.7 Pesar 0.24g de agarosa y colocarlo en un Erlenmeyer.

10.8 Medir 30ml de buffer TBE 0.5X para diluir la agarosa. La agarosa va a estar al 0.8%.

Diluir 3ml de solución stock 5X en 27ml de agua destilada.

10.9 Mezclar y calentar en microondas por aproximadamente 1 minuto. Realizarlo en intervalos de 20 y 10 segundos hasta que la mezcla sea transparente.

10.10 Agregar 5ul de Gel Red

10.11 Dejar enfriar el agar a temperatura ambiente y colocarlo en la cámara de electroforesis.

10.12 Cuando haya polimerizado el agar, quitar el peine.

10.13 Agregar buffer TBE de corrida hasta cubrir el agar.

10.14 Cargar

- 5ul de escalera

- 5ul de muestra con 1.5ul de loading dye

10.15 Correr electroforesis

10.16 Observar el gel en el transiluminador para registrar resultados

11. Control de calidad:

11.1 Incubar placas con medio sólido para verificar que no tengan bacterias.

11.2 Trabajar bajo la campana de flujo laminar

11.3 Verificar el funcionamiento del equipo a utilizar