

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Excelencia que trasciende

DELVALLE
GRUPO EDUCATIVO

Validación *in vivo* de iniciadores para amplificar genes de las familias de citocromo P450 CYP6 y CYP9 en *Anopheles albimanus* (Wiedemann, 1820)

Juan Carlos Lol Chigüil

Guatemala
2011

Validación *in vivo* de iniciadores para amplificar genes de las familias de citocromo P450 CYP6 y CYP9 en *Anopheles albimanus* (Wiedemann, 1820)

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Excelencia que trasciende


DELVALLE
GRUPO EDUCATIVO

Validación *in vivo* de iniciadores para amplificar genes de las familias de citocromo P450 CYP6 y CYP9 en *Anopheles albimanus* (Wiedemann, 1820)

Trabajo de investigación presentado
por Juan Carlos Lol Chigüil
para optar el grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología


Guatemala
2011

Vo. Bo. Asesor Principal

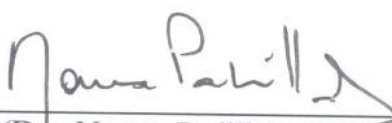
(f) 

(Licda. Elena Dardón)

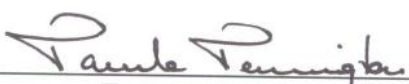
Tribunal Examinador:

(f) 

(Licda. Elena Dardón)

(f) 

(Dra. Norma Padilla)

(f) 

(Dra. Pamela Pennington)

Fecha de aprobación: 3 de Junio de 2011

PREFACIO

La resistencia a insecticidas en insectos vectores de enfermedades se ha reportado en diferentes partes del mundo. En Guatemala, el mosquito hembra *An. albimanus* (principal vector de la malaria) ha desarrollado resistencia a insecticidas, tales como la deltametrina. En ensayos realizados para determinar el mecanismo de resistencia, se encontró un aumento en la actividad de las enzimas de la familia citocromo P450 y mutaciones en el sitio blanco. Por lo tanto, es necesario implementar un sistema de vigilancia de resistencia a insecticidas rápido y eficiente a nivel molecular. Sin embargo, el principal problema para alcanzar esta implementación es que no se cuenta con las secuencias de los genes de las familias de citocromo P450 CYP6 y CYP9 (principales familias involucradas en la resistencia). Ameyna *et al.* (2005) publicó iniciadores degenerados para amplificar genes de las familias de citocromo P450 CYP4, CYP6 y CYP9 de *An. funestus* diseñados con base a las secuencias de *An. gambiae*. Ramírez (2009), realizó la validación *in silico* de los iniciadores para utilizarlos con *An. albimanus*. Con base a los resultados obtenidos de dicha validación, el presente estudio pretende validar los iniciadores degenerados *in vivo* y así obtener secuencias parciales de los genes de las familias de citocromo P450 CYP6 y CYP9.

Este estudio fue financiado por la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID), como parte Iniciativa Amazónica contra la Malaria (AMI) y el Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala. Agradezco principalmente a la Dra. Norma Padilla por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar mi tesis, a la Dra. Mónica Stein, Dra. Pennington por su asistencia, guía en el alcance del estudio y análisis de resultados, y en especial a la Licda. Elena Dardón por su apoyo, paciencia y haberme guiado en mi primera investigación. Agradezco a mis amigos y amigas por brindarme su amistad y apoyarme en todo momento. Por último, agradezco a mi familia por apoyarme en este largo camino y en especial a mis padres por darme la oportunidad de estudiar lo que quería.

ÍNDICE

PREFACIO.....	VI
LISTA DE CUADROS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT.....	XVI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Antecedentes.....	1
1. Malaria.....	1
2. Control de la malaria.....	7
3. Insecticidas.....	9
4. Resistencia a insecticidas.....	11
5. Citocromo P450.....	18
B. Justificación.....	35
C. Objetivos.....	36
1. Objetivo general.....	36
2. Objetivos específicos.....	36
II. MARCO METODOLÓGICO.....	37
A. Metodología.....	37
1. Muestra.....	37
2. Extracción de ADN genómico.....	37
3. PCR genómico de la familia CYP6 y CYP9.....	37
4. Clonación de los productos del PCR genómico de la familia CYP6 y CYP9.....	38

5. Extracción de plásmido y verificación del inserto de los clones CYP6 y CYP9	38
6. Generación de una biblioteca genómica de la familia CYP6 y CYP9	39
7. Secuenciación de los clones de la familia CYP6 y CYP9	39
8. Análisis de resultados	39
III. RESULTADOS	43
IV. DISCUSIÓN	49
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
VI. BIBLIOGRAFÍA	55
VII. ANEXOS	63
A. Optimización de las condiciones de amplificación del pcr genómico de la familia CYP6 y CYP9.....	63
B. Clones de la familia CYP6 y CYP9.....	65
C. Verificación de inserto en el plásmido de los clones CYP6 y CYP9	65
D. Secuenciación de los clones CYP6 y CYP9	67
E. Análisis de los clones CYP6 y CYP9 de <i>An. albimanus</i> y <i>D. melanogaster</i> a nivel de ADN	75
F. Análisis filogenético de los clones CYP6 y CYP9 de <i>An. albimanus</i> a nivel de aminoácido.....	81

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores degenerados publicados por Amenity <i>et al.</i> (2005) para amplificar genes de las familias CYP6 y CYP9 de citocromo P450.....	38
Cuadro 2. Mezcla de reacción para el PCR genómico de la familia CYP6 y CYP9	38
Cuadro 3. Programa de amplificación del PCR genómico de la familia CYP6 y CYP9...	38
Cuadro 4. Análisis “BLASTX” de las secuencias de ADN genómico de los clones CYP6 y CYP9 de <i>An. albimanus</i> contra la base de datos de <i>Anopheles</i>	44
Cuadro 5. Iniciadores “Forward” degenerados para amplificar genes de las familias CYP6 y CYP9 citocromo P450 en <i>An. albimanus</i> por RT-PCR	48
Cuadro 6. Clones de <i>An. albimanus</i>	65
Cuadro 7. Clones de <i>D. melanogaster</i>	65
Cuadro 8. Análisis “BLAST” de las secuencias de ADN genómico de los clones CYP6 y CYP9 de <i>An. albimanus</i>	79
Cuadro 9. Análisis de los iniciadores degenerados para la familia CYP6 contra los citocromos de <i>D. melanogaster</i>	80
Cuadro 10. Análisis de los iniciadores degenerados para la familia CYP9 contra los citocromos de <i>D. melanogaster</i>	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del <i>Plasmodium</i>	1
Figura 2. Distribución de mosquitos del género <i>Anopheles</i> en América	3
Figura 3. Filogenia de Anofelinos por análisis de parsimonia utilizando aproximaciones por peso sucesivas de secuencias de ADNr y ADNmt	4
Figura 4. Mapa de países donde ocurre transmisión de malaria	5
Figura 5. Población que vive en lugares de alto riesgo de transmisión de malaria en diferentes países de América al año 2009	7
Figura 6. Mapa de los países que utilizan redes de cama impregnadas (I) y rociados intradomiciliarios (II) con insecticidas en el periodo del 2003-2005	9
Figura 7. Proceso de selección de individuos resistentes a insecticidas en una población	12
Figura 8. Mecanismos de resistencia metabólica cruzada de los insecticidas utilizados para el control de vectores	13
Figura 9. Estructura primaria de proteínas P450	19
Figura 10. Estructura secundaria de proteínas P450	20
Figura 11. Estructura terciaria del citocromo P450 CYP2C5	21
Figura 12. Mecanismo de reacción de los citocromos P450	22
Figura 13. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP6 del orden Díptera	27
Figura 14. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP6 de la familia Culicidae	28

Figura 15. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP9 del superorden Endopterygota	29
Figura 16. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP9 de la familia Culicidae	30
Figura 17. Alineamiento de secuencias de ARNm de la familia CYP6 del orden Díptera	31
Figura 18. Alineamiento de secuencias de ARNm de la familia CYP6 de la familia Culicidae	32
Figura 19. Alineamiento de secuencias de ARNm de la familia CYP9 del superorden Endopterygota	33
Figura 20. Alineamiento de secuencias de ARNm de la familia CYP9 de la familia Culicidae	34
Figura 21. Metodología del estudio	41
Figura 22. Productos de amplificación de los genes de la familia CYP6 y CYP9 de <i>An. albimanus</i> y <i>D. melanogaster</i> por PCR genómico.....	43
Figura 23. Dominio putativo conservado de la superfamilia P450 de las secuencias de aminoácidos de los clones CYP6 y CYP9 de <i>An. albimanus</i>	45
Figura 24. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de los clones CYP6 de <i>An. albimanus</i>	45
Figura 25. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de los clones CYP9 de <i>An. albimanus</i>	46
Figura 26. Árbol filogenético tipo UPGMA de la relación entre <i>An. albimanus</i> y <i>An. gambiae</i> de la familia CYP6 de citocromo P450.....	47

Figura 27. Árbol filogenético tipo UPGMA de la relación entre <i>An. albimanus</i> y <i>An. gambiae</i> de la familia CYP9 de citocromo P450.....	47
Figura 28. Optimización de la amplificación de la familia CYP6 de <i>An. albimanus</i> y <i>D. melanogaster</i> a diferentes temperaturas.....	64
Figura 29. Optimización de la amplificación de la familia CYP9 de <i>An. albimanus</i> y <i>D. melanogaster</i> a diferentes temperaturas.....	64
Figura 30. Insertos de los plásmidos de los clones CYP6 de <i>An. albimanus</i>	66
Figura 31. Insertos de los plásmidos de los clones CYP6 de <i>An. albimanus</i> y <i>D. melanogaster</i>	66
Figura 32. Insertos de los plásmidos de los clones CYP9 de <i>An. albimanus</i> y <i>D. melanogaster</i>	67
Figura 33. Electroferograma del clon CA601 de <i>An. albimanus</i>	67
Figura 34. Electroferograma del clon CA602 de <i>An. albimanus</i>	68
Figura 35. Electroferograma del clon CA603 de <i>An. albimanus</i>	69
Figura 36. Electroferograma del clon CA610 de <i>An. albimanus</i>	69
Figura 37. Electroferograma del clon CA611 de <i>An. albimanus</i>	70
Figura 38. Electroferograma del clon CA612 de <i>An. albimanus</i>	70
Figura 39. Electroferograma del clon CA613 de <i>An. albimanus</i>	71
Figura 40. Electroferograma del clon CA615 de <i>An. albimanus</i>	71
Figura 41. Electroferograma del clon CA904 de <i>An. albimanus</i>	72
Figura 42. Electroferograma del clon CA906 de <i>An. albimanus</i>	73

Figura 43. Electroferograma del clon CA909 de <i>An. albimanus</i>	73
Figura 44. Electroferograma del clon CD601 de <i>D. melanogaster</i>	74
Figura 45. Electroferograma del clon CD602 de <i>D. melanogaster</i>	75
Figura 46. Secuencia de ADN genómico del clon CA601 sin vector pUC19.	75
Figura 47. Secuencia de ADN genómico del clon CA603 sin vector pUC19.	76
Figura 48. Secuencia de ADN genómico del clon CA610 sin vector pUC19.	76
Figura 49. Secuencia de ADN genómico del clon CA612 sin vector pUC19.	76
Figura 50. Secuencia de ADN genómico del clon CA613 sin vector pUC19.	76
Figura 51. Secuencia de ADN genómico del clon CA615 sin vector pUC19.	77
Figura 52. Secuencia de ADN genómico del clon CA904 sin vector pUC19.	77
Figura 53. Secuencia de ADN genómico del clon CA906 sin vector pUC19.	77
Figura 54. Secuencia de ADN genómico del clon CA909 sin vector pUC19.	78
Figura 55. Secuencia de ADN genómico del clon CD601 sin vector pUC19.	78
Figura 56. Secuencia de ADN genómico del clon CD602 sin vector pUC19.	78
Figura 57. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los clones CYP6 de <i>An. albimanus</i> y sus citocromos homólogos de <i>An. gambiae</i>	81
Figura 58. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los clones CYP9 de <i>An. albimanus</i> con sus citocromos homólogos de <i>An. gambiae</i>	82

RESUMEN

En los últimos años, el control del vector de la malaria ha vuelto a ser importante como resultado de la resistencia a los antimaláricos. Los programas para el control de vectores se basan en la utilización de insecticidas, ya sea rociando casas o utilizando mosquiteros impregnados. Estudios realizados en insectos, indicaron que mutaciones en el sitio blanco y aumento en la actividad de enzimas detoxificantes son algunos de los mecanismos responsables de la resistencia a insecticidas: esterasas, citocromos P450, carboxilesterasas y glutatión s-transferasas. Se ha encontrado que enzimas de las familias de citocromo P450 CYP4, CYP6 y CYP9 se encuentran sobre-expresadas en cepas de mosquitos de *An. gambiae*, *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti* resistentes a piretroides.

En Guatemala, *An. albimanus* es el principal vector de la malaria. Debido a que no se ha secuenciado el genoma de éste, no se han podido establecer los genes involucrados en la resistencia a insecticidas. Estudios bioquímicos revelaron que la resistencia en este vector puede ser mediada por citocromos P450. Por lo tanto, es importante obtener sus secuencias e identificarlos para poder establecer su papel en la resistencia a insecticidas.

El objetivo principal de este estudio, fue la validación *in vivo* de iniciadores degenerados para amplificar genes de las familias de citocromos P450 CYP6 y CYP9 en *An. albimanus* a partir de ADN genómico. Esto se realizó por amplificación por PCR genómico, clonación de los productos de PCR, secuenciación de los clones, análisis de secuencias y filogenia.

Los resultados obtenidos, indican que los iniciadores degenerados publicados por Amenya *et al.* (2005) permitieron amplificar genes de la subfamilia P y M para la familia CYP6 y subfamilia M y J para la familia CYP9 de citocromo P450 en *An. albimanus*.

También, se estableció que los genes de las familias CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* son ortólogos a los genes de *An. gambiae*. Por último, se comprobó que los iniciadores degenerados se pueden utilizar para amplificar genes de las familias de citocromo P450 CYP6 y CYP9 en otros vectores de la malaria, como *An. albimanus* a partir de ADN genómico.

ABSTRACT

In recent years, vector control of malaria has again become important as a result of resistance to antimalarial drugs. Programs for vector control are based on the use of insecticides, spraying either home or impregnated bednets. Studies on insects showed that mutations in the target site and increased activity of detoxifying enzymes are some of the mechanisms responsible for resistance to insecticides: esterase, cytochrome P450s, carboxylesterase and glutathione S-transferase. It has been found that enzymes of CYP4, CYP6 and CYP9 families of cytochrome P450 families are over-expressed in mosquito strains of *An. gambiae*, *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti* resistant to pyrethroids.

In Guatemala, *An. albimanus* is the principal malaria vector. Because it has not been sequenced the genome of this, have not been able to establish the genes involved in resistance to insecticides. Biochemical studies revealed that resistance in this vector can be mediated by cytochrome P450. Therefore, it is important get the sequences and identified cytochrome P450 genes to establish its role in resistance to insecticides.

The main objective of this study was the validation in vivo of degenerate primers to amplify genes of the CYP6 and CYP9 families of cytochromes P450 in *An. albimanus* from genomic DNA. This was done by genomic PCR amplification, cloning of PCR products, sequencing of the clones, sequence analysis and phylogeny.

The results obtained show that the degenerate primers published by Amenyá et al. (2005) allowed to amplify genes of the subfamily P and M from CYP6 family and subfamily M and J from CYP9 family of cytochrome P450 of *An. albimanus*. Also, it was established that the genes of CYP6 and CYP9 families of *An. albimanus* are orthologous genes of the *An. gambiae*. Finally, it was found that the degenerate primers

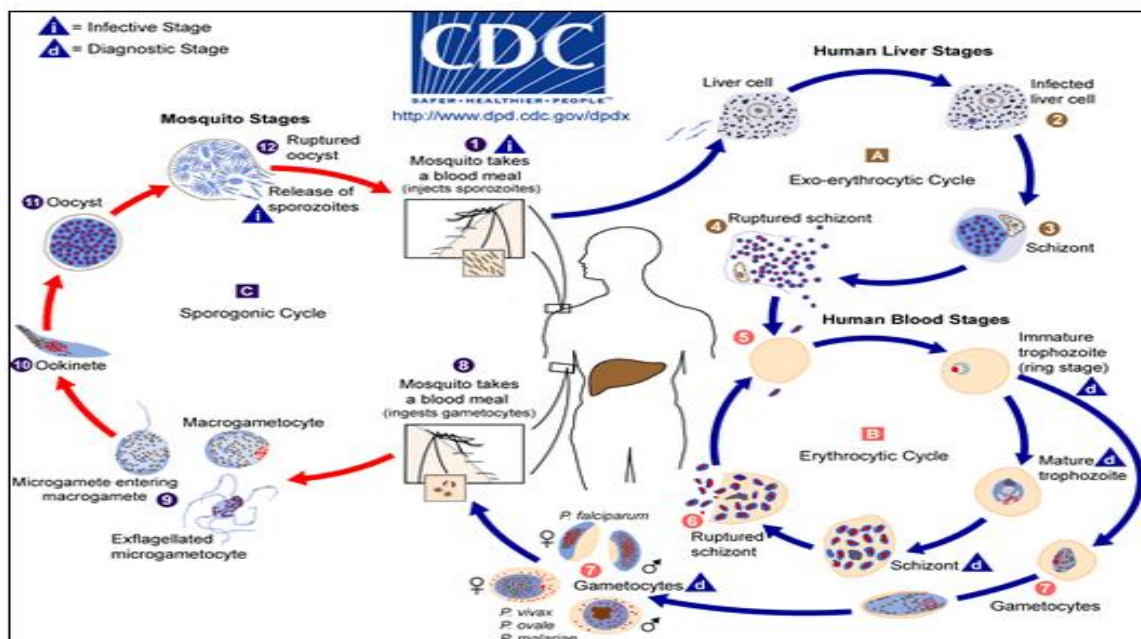
can be used to amplify CYP6 and CYP9 families of cytochrome P450 in other malaria vectors, as *An. albimanus* from genomic DNA.

I. INTRODUCCIÓN

A. Antecedentes

1. Malaria. Esta enfermedad es causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium* (*P.*), las especies importantes son: *P. falciparum* (siendo esta la más infecciosa y letal), *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*. Las especies difieren en distribución geográfica, apariencia microscópica, características clínicas, y potencial para desarrollar resistencia a los antimaláricos. En América, los casos de malaria corresponden principalmente a *P. vivax*, y el resto corresponde a *P. falciparum*, y *P. malariae*. En Guatemala se han registrado casos de malaria únicamente para *P. vivax* y *P. falciparum*, donde predomina totalmente *P. vivax* según registros hasta el 2008 (Bloland, 2001; Córdón-Rosales, 2000; CDC(1), 2010; Orozco, 2008; OPS, 2001; UN, 2002). El ciclo de vida del *Plasmodium* consta de 2 etapas, una en el hospedero humano y la otra en el mosquito (Figura 1) (CDC (1), 2010).

Figura 1. Ciclo de vida del *Plasmodium*.



(CDC (1), 2010)

La malaria es de interés en el sector de salud pública de las regiones tropicales, debido a la elevada mortalidad y morbilidad. El tratamiento y programas de erradicación de la malaria varían de región en región, debido a la variabilidad en sus manifestaciones clínicas y epidemiológicas. Estas variaciones dependen de los siguientes factores, tales como: especie del parásito de la región, susceptibilidad a los antimaláricos, distribución y capacidad vectorial, resistencia del vector a los insecticidas, clima y la inmunidad adquirida de la población de esa región (Bloland, 2001; Greenwood, 2002).

a. Principales vectores de la malaria. Los vectores de la malaria humana son los mosquitos adultos hembras del género *Anopheles* (*An.*), debido a sus requerimientos proteicos de la sangre para la producción de sus huevos. El mosquito adulto se reconoce por su postura de cola en el aire, alas empedradas y un par palpos largos al lado de la proboscis en la hembra. La infección ocurre cuando el mosquito pica, ya que inocula los parásitos que se encuentran en las glándulas salivares en el torrente sanguíneo del hospedero humano (CINU, 2008; CDC (1), 2010; Curtis, 1996).

En América se han encontrado cuatro principales vectores de la malaria: *An. pseudopunctipennis*, *An. albimanus*, *An. vestitipennis* y *An. darlingi* (Figura 2). En Guatemala el principal vector es *An. albimanus*, el cual se distribuye ampliamente a baja altitud en los trópicos y las regiones subtropicales de América donde las condiciones son húmedas y cálidas. Sus larvas prefieren las áreas expuestas al sol, tales como: orillas de lagos y lagunas, pozas creadas por la lluvia. Los niveles de parásitos encontrados en *An. albimanus* son generalmente bajos, por lo que solo el 2% de los mosquitos pueden transmitir malaria. Sin embargo, durante la temporada de lluvia se favorece una alta densidad de mosquitos y eso aumenta la probabilidad de transmisión de la malaria (CDC (1), 2010; Chaverri, 2004; CINU, 2008; Rodríguez, 2004; Zimmerman, 1992). Se han realizado estudios filogenéticos para establecer la relación entre las diferentes especies de *Anopheles*, en la Figura 3 se pudo observar la relación filogenética de los diferentes anofelinos con base a secuencias de ADNr y ADNmt.

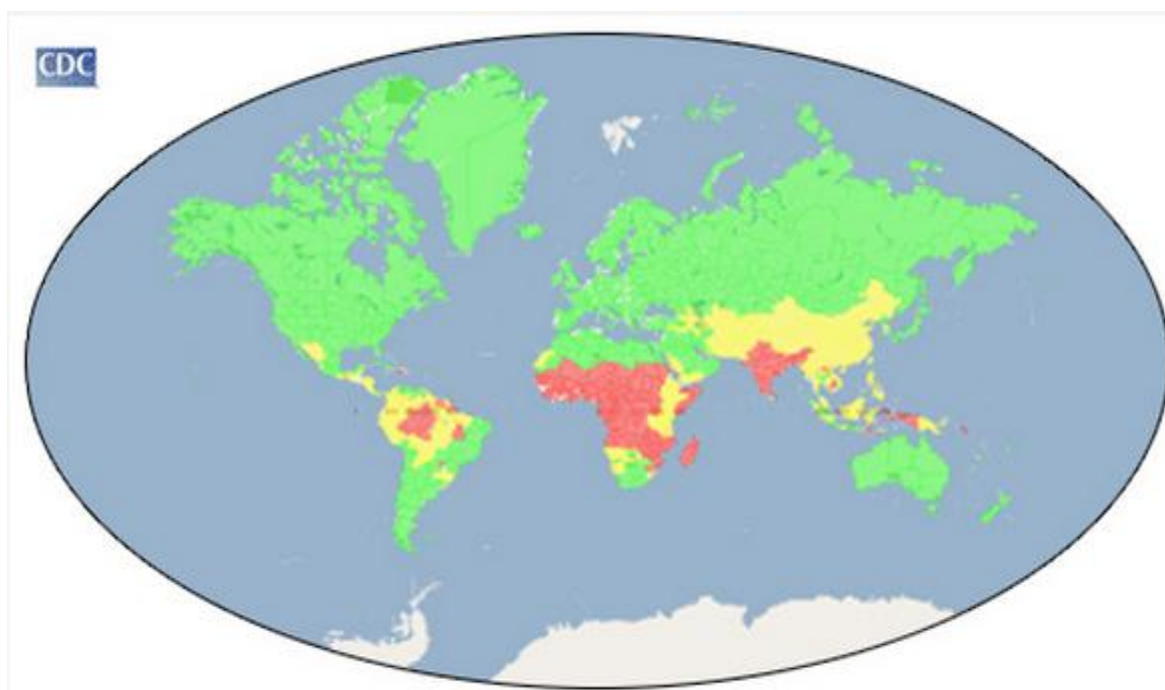
Figura 2. Distribución de mosquitos del género *Anopheles* en América.



(Kiszewski, 2004)

b. Distribución geográfica e incidencia. La malaria se encuentra distribuida en áreas tropicales y subtropicales (Figura 4). Esta distribución depende de la temperatura, precipitación y humedad, tales factores son importantes para la sobrevivencia del vector y así el parásito pueda completar su ciclo de vida. De acuerdo al reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2009 de la situación de la malaria: 3.3 billones de personas viven en áreas de alta transmisión, 190 a 311 millones de casos y 708,000 a 1,003,000 muertes fueron reportadas en el 2008. El 89% de las muertes por malaria en el mundo ocurrieron en África, y los más afectados son niños, adolescente y mujeres embarazadas (Bloland, 2001; CDC(2), 2010; Greenwood, 2002; OMS(1), 2006).

Figura 4. Mapa de países donde ocurre transmisión de malaria. Los países de color rojo corresponden a países con alta transmisión, de amarillo a países de poca transmisión, y los verdes a países donde no ocurre transmisión.

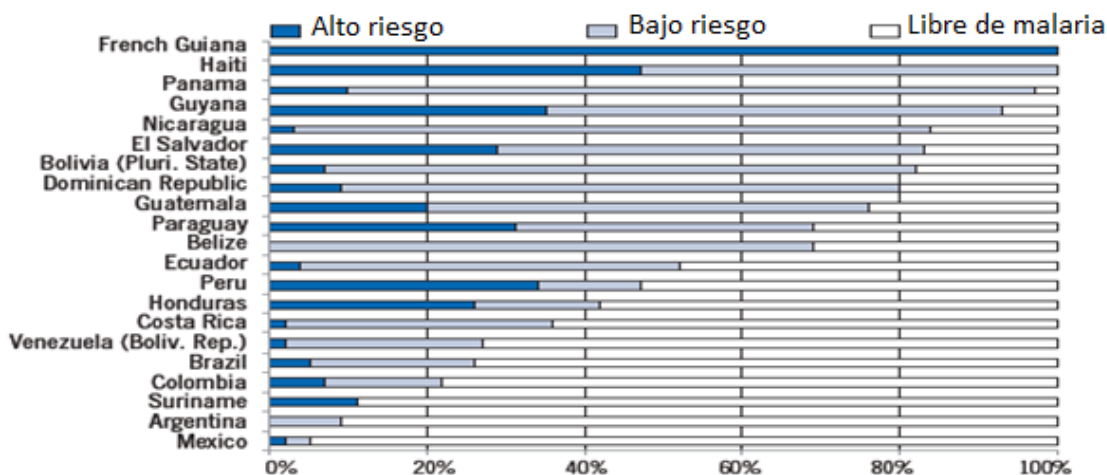


(CDC (2), 2010)

c. Situación actual en América y Guatemala. Con base al informe final que presentó la Organización Panamericana de la Salud (OPS) de los casos de malaria en América en el 2007, el número de casos reportados fue de 797,911. Este dato indica una reducción del 30.5% de la morbilidad por malaria comparado con los datos del 2000. Los países de América notificaron 219 muertes por malaria, lo que representa una reducción de la mortalidad por malaria comparado con los datos del 2000 (OPS, 2008).

En Guatemala, la malaria se encuentra distribuida en 20 departamentos, principalmente en la región Norte, Sur y Occidente. La incidencia durante el periodo de 1998-2000 fue la misma, a pesar de las estrategias de control y uso continuo de insecticidas. El Ministerio de Salud reportó 47,689 casos para 1998, 45,723 casos para 1999 y 48,098 casos en el 2000 (OPS, 2001). La situación de la malaria en Guatemala para el 2008 registró una disminución de 38.5% respecto al 2007 en general (OPS, 2008). Las áreas de salud registraron 27,083 casos de malaria en el 2007 y 16,664 casos de malaria en el 2008. A pesar de la disminución de casos para el 2008, hay departamentos que presentaron un aumento, tales como: Chimaltenango, Zacapa, Quetzaltenango, Izabal y Guatemala central. En la semana epidemiológica 39 de 2009 hubo un incremento en casos de malaria acumulados de 22.7% respecto al 2008 (Orozco, 2008; Orozco, 2009). El porcentaje de la población que vive en áreas de alta transmisión de la malaria en los diferentes países de América, se muestran en la Figura 5.

Figura 5. Población que vive en lugares de alto riesgo de transmisión de malaria en diferentes países de América al año 2009. Alto riesgo equivale a más de 1 caso de malaria por 1000 personas en un año y bajo riesgo equivale a menos de 1 caso de malaria por 1000 personas por año.



(OMS, 2010)

2. Control de la malaria

a. Antimaláricos. La malaria debe ser tratada dentro las 24 horas con antimaláricos al momento de ser diagnosticada. El tratamiento se realiza con el fin de evitar el progreso de la enfermedad y prevenir la propagación del parásito (CDC (3)). Según la OMS, el tratamiento depende de los siguientes factores: especie del parásito infectante, estado clínico del paciente, embarazo, alergias y otras drogas que toma el paciente. Entre los medicamentos que la OMS sugiera para el tratamiento de casos de malaria no complicados son: artemisina, atovacuona-proguanil, cloroquina, doxiciclina, mefloquina, quinina y sulfadoxina-pirimetamina. En Guatemala la primera línea es cloroquina-primaquina, ya que no se ha reportado resistencia a cloroquina como en países de América del Sur. Aunque, se han implementado medidas regulatorias para disminuir el uso inadecuado de los antimaláricos como resultado del surgimiento de resistencia (OMS (2), 2006).

b. Control del vector. La OMS propuso el programa de erradicación global de la malaria por medio de rociados intradomiciliarios utilizando el insecticida DDT y dieldrin para eliminar el vector en los años de 1950. El programa se abandonó en África en 1965 por el surgimiento de resistencia a DDT por *An. gambiae*, y lo mismo pasó en los demás países. En los últimos años, como resultado de la resistencia a los antimaláricos, el control del vector ha vuelto a ser una alternativa para el control de la malaria (Brogdon y McAllister, 1998; Hemingway y Ranson, 2000). Entre las medidas sugeridas por el CDC para el control del vector de la malaria están:

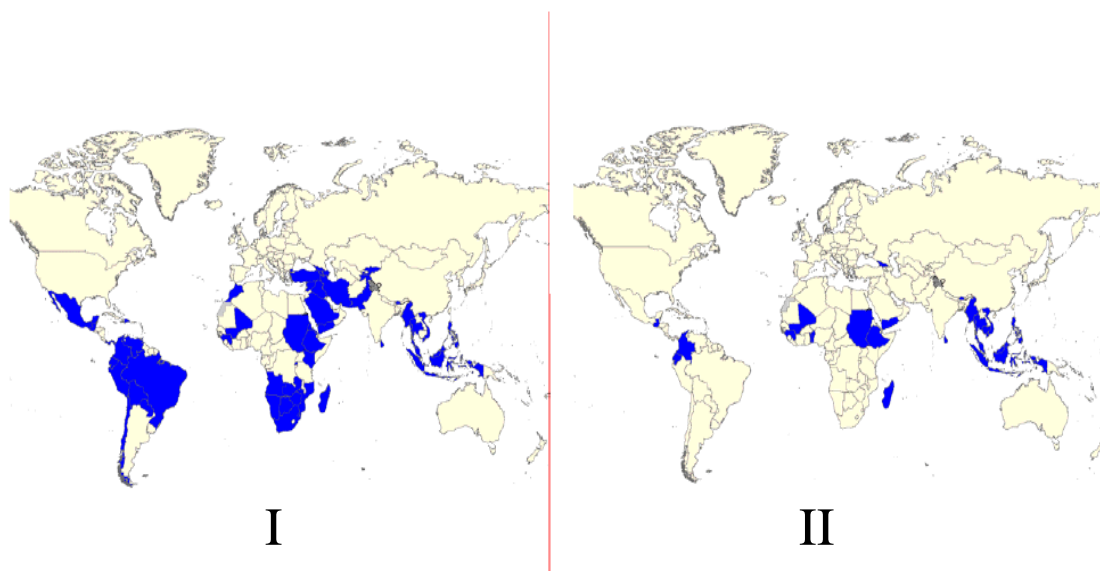
1) Mosquiteros impregnados con insecticida de larga duración. Esta medida es una forma de protección personal contra el vector de la malaria. Estas son impregnadas con insecticidas piretroides, con el objetivo de matar a los mosquitos y disminuir la frecuencia de picaduras (acción repelente). Actualmente, existen mosquiteros con tres años de duración las cuales son ampliamente utilizadas en todo el mundo (Figura 6) (CDC (4), 2008; Ranson *et al.*, 2000; Zaim *et al.*, 2007).

2) Rociado intradomiciliario. El rociado de paredes de viviendas con insecticidas, es otra de las medidas utilizadas para el control de vectores. En este caso, el insecticida queda impregnado en la pared y cuando el mosquito entra en contacto con la pared muere. Esta medida se basa en que los mosquitos después de picar, se reposan en las paredes y entran en contacto con el insecticida. Entre los más utilizados está el DDT y los piretroides (CDC (4), 2008; Hougard *et al.*, 2002; Zaim *et al.*, 2007).

3) Reducción de criaderos de larvas. Esta medida tiene como objetivo, la destrucción permanente de los criaderos de larvas y así evitar que lleguen al estado adulto. La medida se logra al eliminar agua estancada, contenedores con agua de lluvia y manejo cuidadoso del agua de riego. En algunas ocasiones, las acciones mencionadas no son posibles por lo que la aplicación de insecticidas directamente a los criaderos es una alternativa eficaz (CDC (4), 2008; Zaim *et al.*, 2007).

4) Rociado de áreas extensas. La nebulización de insecticidas es la base de esta medida, y es utilizada únicamente bajo situaciones de emergencia para disminuir la densidad poblacional de mosquitos. La programación correcta de la nebulización es importante, ya que tiene que coincidir con el tiempo de mayor actividad de los mosquitos adultos (CDC (4), 2008; Zaim *et al.*, 2007).

Figura 6. Mapa de los países que utilizan redes de cama impregnadas (I) y rociados intradomiciliarios (II) con insecticidas en el periodo del 2003-2005



(Zaim *et al.*, 2007)

3. Insecticidas. Los insecticidas son compuestos tanto químicos y biológicos, con la función de controlar las poblaciones de insectos. Este control puede ser ya por la muerte de insectos o impedir un comportamiento destructivo. La aspersion, cebos, difusión de liberación lenta entre otros, son los sistemas de aplicación de los insecticidas. Estos juegan un papel importante en el control de vectores de enfermedades emergentes, tales como: malaria, dengue, fiebre amarilla, encefalitis equina, filariasis, etc (Brogdon y McAllister, 1998; Ware y Whitacre, 2004; Zaim *et al.*, 2007).

En el programa de control de vectores, los insecticidas utilizados actualmente son: organoclorados (OCs), organofosforados (OFs), carbamatos y piretroides. Estos

insecticidas difieren en sus propiedades fisicoquímicas, toxicidad, especificidad, dosis letal y costo. El efecto del insecticida depende si este logra penetrar el cuerpo del insecto. La primera vía es el envenenamiento por contacto (insecticida atraviesa la cutícula del insecto hasta llegar al sitio activo), envenenamiento oral (ocurre ingestión del insecticida seguida por absorción en el intestino del insecto) y fumigaciones (penetración del insecticida a través de los espiráculos del sistema respiratorio del insecto) (Bisset, 2002; Ware y Whitacre, 2004; Zaim *et al.*, 2007).

a. Organoclorados. Los insecticidas OCs también llamados hidrocarburos clorados, están compuestos por átomos de carbono, hidrógeno y cloro. Estos insecticidas se dividen en 3 grupos: DDT y análogos, hexaclorociclohexano y ciclodienos. El DDT y dieldrin, fueron los insecticidas más utilizados en el programa global de erradicación de la malaria basada en el control del vector. El mecanismo de acción del DDT se basa en un desequilibrio de iones sodio y potasio en los axones de las neuronas del sistema nervioso lo cual impide la transmisión de impulsos nerviosos. El insecticida DDT se ha prohibido por sus efectos dañinos al ambiente en los países como Estados Unidos, mientras que en países en vías de desarrollo aún se utiliza para el control del vector de la malaria (Ware y Whitacre, 2004; OMS, 2008; Zaim *et al.*, 2007).

b. Organofosforados. Son insecticidas compuestos de fósforo unidos a ésteres o amidas. Se caracterizan por ser poco persistentes en el ambiente y tener un nivel toxicidad mayor para los vertebrados comparada con los OCs. El mecanismo de los OFs se basa en la inhibición de enzimas del sistema nervioso como la acetilcolinesterasa (ChE), y se da una acumulación de la acetilcolina que resulta finalmente en una parálisis del insecto. El malatión es un insecticida OF de amplio espectro y baja toxicidad en los mamíferos. Es uno de los insecticidas más utilizados en los programas de control de vector de la malaria (Bisset, 2002; Ware y Whitacre, 2004; OMS, 2008; Zaim *et al.*, 2007).

c. Carbamatos. Los carbamatos son compuesto derivados del ácido carbámico y su mecanismo de acción se basa también en la inhibición de la ChE. Se

caracteriza por su toxicidad oral y amplio espectro para los insectos. El propoxur es un carbamato que generalmente se utiliza para el control de la malaria en lugares donde ha surgido resistencia a DDT e insecticidas OFs (Bisset, 2002; OMS, 2008; Ware y Whitacre, 2004; Zaim *et al.*, 2007).

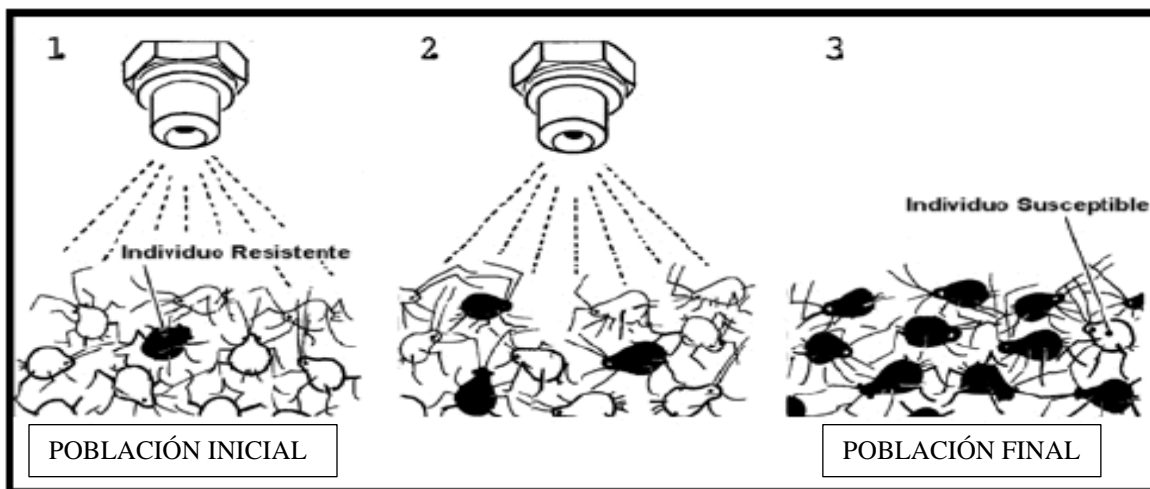
d. Piretroides. Son insecticidas que se derivan de las piretrinas, compuestos extraídos de las flores de plantas del género *Chrysanthemum*. Los piretroides surgieron como resultado de la baja fotoestabilidad, ya que eran degradados rápidamente y no persistían en el ambiente. Los piretroides se caracterizan por tener una alta fotoestabilidad y toxicidad en los insectos (Bisset, 2002; OMS, 2009; Ware y Whitacre, 2004).

Estos insecticidas se pueden dividir en 4 generaciones: primera (aletrina), segunda (tetrametrina), tercera (permetrina) y cuarta (deltametrina). La estructura general consiste en una parte alcohólica y una ácida. Se pueden clasificar con base a la presencia o ausencia del grupo ciano en la parte alcohólica como piretroides tipo 1 y tipo 2. Los piretroides del tipo 1 actúan sobre los nervios periféricos, mientras que los del tipo 2 actúan sobre nervios centrales. El mecanismo de acción de los piretroides se basa en un aumento en el tiempo de apertura de los canales de sodio en las membranas de las neuronas de los insectos. Actualmente, la deltametrina y permetrina son los piretroides utilizados para el control del vector de la malaria tanto en el rociado del intradomiciliar y redes de camas impregnadas con insecticidas (Bisset, 2002; Hougard *et al.*, 2002; Nájera y Zaim, 2002; Ware y Whitacre, 2004; OMS, 2008; Zaim *et al.*, 2007).

4. Resistencia a insecticidas. Los insecticidas juegan un papel importante en los programas de control de vectores de enfermedades. Aunque, con el pasar del tiempo los insectos desarrollaron resistencia a los insecticidas. El primer caso de resistencia a insecticidas para el control de la malaria fue para el DDT, y así fue para los posteriores insecticidas desarrollados (Brogdon y McAllister, 1998; Hemingway y Ranson, 2000).

La resistencia es definida como el desarrollo de la tolerancia a dosis altas de compuestos tóxicos, las cuales resultarían letales para la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie. El surgimiento de resistencia se puede considerar inevitable, ya que la aplicación de insecticidas ejerce una fuerza de selección continua (Figura 7) (Brattsten, 1990; OMS, 1957).

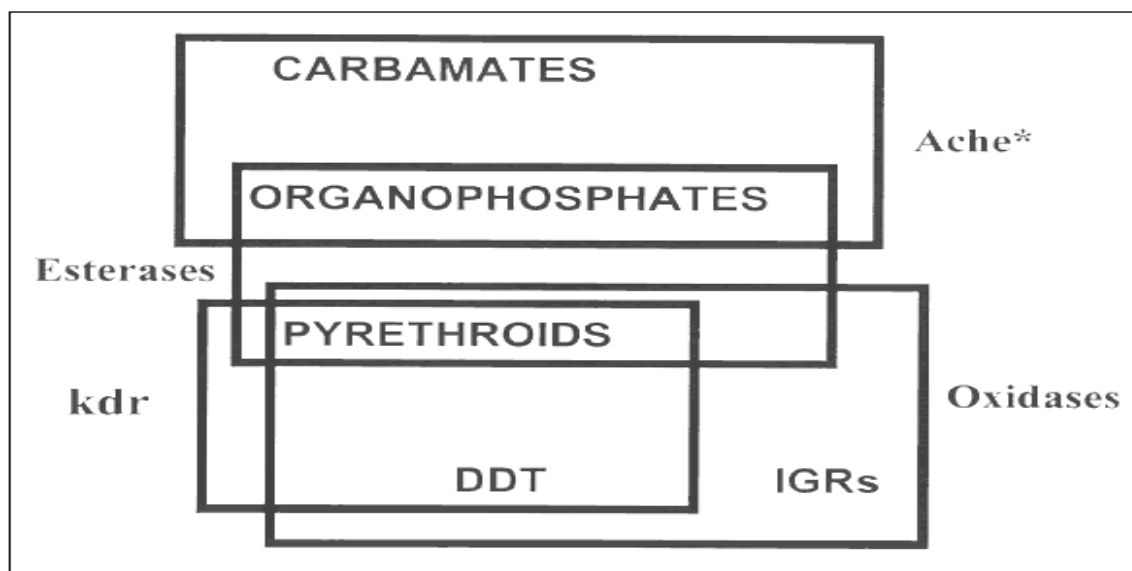
Figura 7. Proceso de selección de individuos resistentes a insecticidas en una población.



(University of California, 2001)

La resistencia puede ser de dos tipos, cruzada o múltiple. La resistencia cruzada es cuando un mecanismo confiere resistencia a compuestos químicos del mismo grupo, por ejemplo el gen *kdr* que confiere resistencia tanto a piretroides y DDT (Figura 8). En el caso de la resistencia múltiple, se debe a la acción de dos mecanismos que confieren resistencia al insecticida en el insecto y el nivel de resistencia puede ser mucho mayor (Bisset, 2002).

Figura 8. Mecanismos de resistencia metabólica cruzada de los insecticidas utilizados para el control de vectores.



(Brogdon y McAllister, 1998)

a. Factores influyentes de la resistencia. Los factores que influyen en la evolución de la resistencia se pueden categorizar en tres grupos principales, según Georghiou y Taylor (1986), OMS (1980) y Wood y Bishop (1981):

1) Factores genéticos

- Tasa de mutación
- Frecuencia de alelos de resistencia
- Dominancia de alelos de resistencia
- Penetración, expresividad e interacción entre alelos de resistencia
- Selección pasada por otros insecticidas

2) Factores biológicos

- Generaciones por año
- Progenie por generación
- Monogamia, poligamia y partenogénesis
- Tasa de incremento y fluctuación en el tamaño de la población

- Aislamiento y migración
- Evitar insecticidas
- Variación de condiciones ecológicas

3) Factores operacionales

- Naturaleza química del insecticida
- Frecuencia de aplicación
- Relación con insecticidas anteriormente utilizados
- Persistencia del insecticida
- Proporción de población expuesta al insecticida
- Ruta de exposición
- Umbral de aplicación
- Etapas de vida seleccionada
- Uso de mezclas de insecticidas

b. Control de resistencia a insecticidas. El control tiene como objetivo, mantener bajos los niveles de resistencia de las poblaciones silvestres de insectos (Rodríguez y Silva, 2003; OMS, 2008). Los enfoques para el control de resistencia son: por moderación, saturación y ataque múltiple (Bisset, 2002; Georghiou, 1994).

1) Control por moderación. El objetivo es mantener las poblaciones de insectos susceptibles a insecticidas al disminuir la presión de selección. Las medidas implementadas son: dosis bajas de insecticida, aplicaciones poco frecuentes e insecticidas no persistentes (Bisset, 2002; Georghiou, 1994).

2) Control por saturación. Este se basa en la anulación de los mecanismos de resistencia por aplicaciones de dosis altas de insecticida. También, se pueden anular estos mecanismos de resistencia por medio de compuestos sinergistas. Los sinergistas, son compuestos que inhiben mecanismos de resistencia en los insectos, por ejemplo: el butóxido de piperonilo se utiliza como sinergista de los piretroides, ya que suprime el

sistema de los citocromos P450 (enzimas asociadas al metabolismo de piretroides) (Bisset, 2002; Georghiou, 1994).

3) Control por ataque múltiple. Este tipo de control se basa en la utilización de mezclas o rotación de insecticidas, ya que no permite el desarrollo de resistencia a insecticidas. La teoría de este tipo de control asume que los mecanismos de resistencia a cada insecticida son diferentes y que existen a bajas frecuencias. Por lo tanto, si un insecto sobrevive a un insecticida específico de la mezcla, se espera que el otro insecticida sea efectivo (Bisset, 2002; Curtis *et al.*, 1998; Georghiou, 1994).

c. Resistencia en insectos. La resistencia a insecticidas se ha desarrollado ampliamente en diferentes insectos del orden díptero. Hasta el año 1992, la lista de insectos vectores de enfermedades resistentes indicaba que había 56 mosquitos del género *Anopheles* y 39 del género *Culex* (Brogdon y McAllister, 1998; Hemingway y Ranson, 2000).

El primer caso de resistencia al DDT ocurrió en *Aedes (Ae.) tritaeniorhynchus* y *Ae. sollicitans*, también se registró resistencia al DDT en el vector de leishmania, *Plebotomus papatasi*. Posteriormente, se desarrolló resistencia a los OFs en vectores importantes de la malaria, tales como: *An. culicifacies*, *An. stephensi*, *An. albimanus*, *An. arabiensis* y *An. sacharovi*. Los vectores del dengue del género *Culex (Cx.)*, como *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. pipiens*, han desarrollado resistencia a los insecticidas OFs y piretroides. La resistencia a piretroides ha tenido mucho énfasis por parte de la OMS, ya que se utilizan como el insecticida de elección para la impregnación de redes de cama. Se han registrado casos de resistencia a piretroides y DDT, en *An. albimanus*, *An. stephensi* y *An. gambiae* (Bisset, 2002; Brogdon y McAllister, 1998; Hemingway y Ranson, 2000; Penilla *et al.*, 2007; Ranson *et al.*, 2000). Otros insectos tales como, *Musca (M.) domestica*, *Blatella (B.) germanica*, *Heliothis (H.) virescens*, también han desarrollado alta resistencia cruzada de piretroides y DDT (Milani, 1954; Miyazaki *et al.*, 1996; Park y Taylor, 1997).

d. Mecanismos de resistencia. Los mecanismos de resistencia en los insectos se según Miller (1998), se clasifican en:

1) Resistencia por comportamiento. En este caso no ocurre un contacto entre el insecto y el insecticida, por lo tanto los mosquitos sobreviven (Bisset, 2002).

2) Resistencia por penetración. Cambios en la composición del exoesqueleto del insecto inhibe la penetración del insecticida. Esta inhibición resulta de la disminución de la velocidad de penetración, la cual depende de características moleculares del insecticida y propiedades del tegumento del insecto. Al ocurrir una demora en la penetración del insecticida se provee mayor tiempo para la desintoxicación de este. En el caso de *H. virescens*, la resistencia al DDT se debió a una baja penetración del insecticida. También, en la mosca doméstica se determinó que el gen responsable de resistencia a DDT influía en la penetración del insecticida ya que aumentan el contenido total de lípidos del exoesqueleto. Por lo tanto, la penetración depende de: propiedades fisicoquímicas del insecticida, formulación del insecticida, polaridad del insecticida y naturaleza del solvente (Bisset, 2002).

3) Resistencia del sitio blanco. Mutaciones en el sitio blanco de los insecticidas produce una disminución en la sensibilidad a la forma activa del insecticida. Una reducción de la sensibilidad de la acetilcolinesterasa y en el sistema nervioso, son ejemplos de este tipo de resistencia. Mutaciones en los genes de la enzima acetilcolinesterasa de insectos produce resistencia a organofosforados y carbamatos. En cambio, la resistencia a piretroides y DDT resulta de mutaciones en el gen del canal de sodio (resistencia *kdr*) del sistema nervioso del insecto (Bisset, 2002; Brogdon y McAllister, 1998; Hemingway y Ranson, 2000; Hemingway, 2004; Martínez-Torres *et al.*, 1998; Ranson *et al.*, 2000).

4) Resistencia metabólica. La disminución o aumento de la actividad enzimática de las vías metabólicas del insecto, da como resultado una desintoxicación del insecticida o no permite el metabolismo del insecticida en su forma tóxica. Las enzimas

involucradas en los mecanismos de resistencia son: esterasas, citocromos P450 (oxidasas), glutatión s-transferasas y acetilcolinesterasas (Bisset, 2002; Brogdon y McAllister, 1998; Hemingway y Ranson, 2000; Hemingway, 2004).

e. Monitoreo de la resistencia a insecticidas

1) Bioensayos. Un bioensayo se define como un experimento donde un organismo vivo es utilizado como sujeto de estudio. Actualmente, existen dos tipos de bioensayos para determinar la susceptibilidad a insecticidas de los vectores de la malaria, el de OMS y el de CDC. El bioensayo de la OMS, utiliza como matriz de exposición un cilindro con papeles impregnados con insecticida (OMS, 1998). El bioensayo del CDC, utiliza una botella de vidrio de 250mL impregnada con insecticida. La ventaja del bioensayo del CDC, es que permite elucidar el posible mecanismo de resistencia utilizando sinergistas (Brogdon y McAllister, 1998).

2) Pruebas bioquímicas. Estas pruebas permiten medir la actividad de las enzimas involucradas en los mecanismos de resistencia en poblaciones de campo. La actividad enzimática se mide para cada individuo de una población. La mayor desventaja es que los mosquitos deben ser analizados rápidamente para evitar la degradación de las enzimas o preservarse en nitrógeno líquido y hielo seco para mantener una temperatura de -70°C . Los resultados de éstas, no nos indican (Penilla *et al.*, 1998)

3) Pruebas moleculares. La resistencia a insecticidas puede ser a nivel molecular, como resultado de cambios en el ADN de los genes involucrados en los mecanismos de resistencia. El monitoreo se realiza por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para los piretroides y organoclorados se amplifica el gen *kdr* (dominio IIS-6) para detectar la presencia y ausencia de mutaciones puntuales (Martinez-Torres *et al.*, 1998).

5. Citocromo P450

a. Generalidades. Las citocromos P450 son un complejo de familias enzimáticas hidrofóbicas y con un grupo hemo. Los citocromos se encuentran en la mayoría de organismos, incluidos los insectos. En los eucariotas, los citocromos P450 se encuentran en el retículo endoplasmático y mitocondria. También, se les llama monoxigenasas u oxidasas y tienen la función de metabolizar una diversidad de compuestos endógenos y exógenos (Hemingway y Ranson, 2000; Hemingway *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 1998; Scott, 1999; Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000).

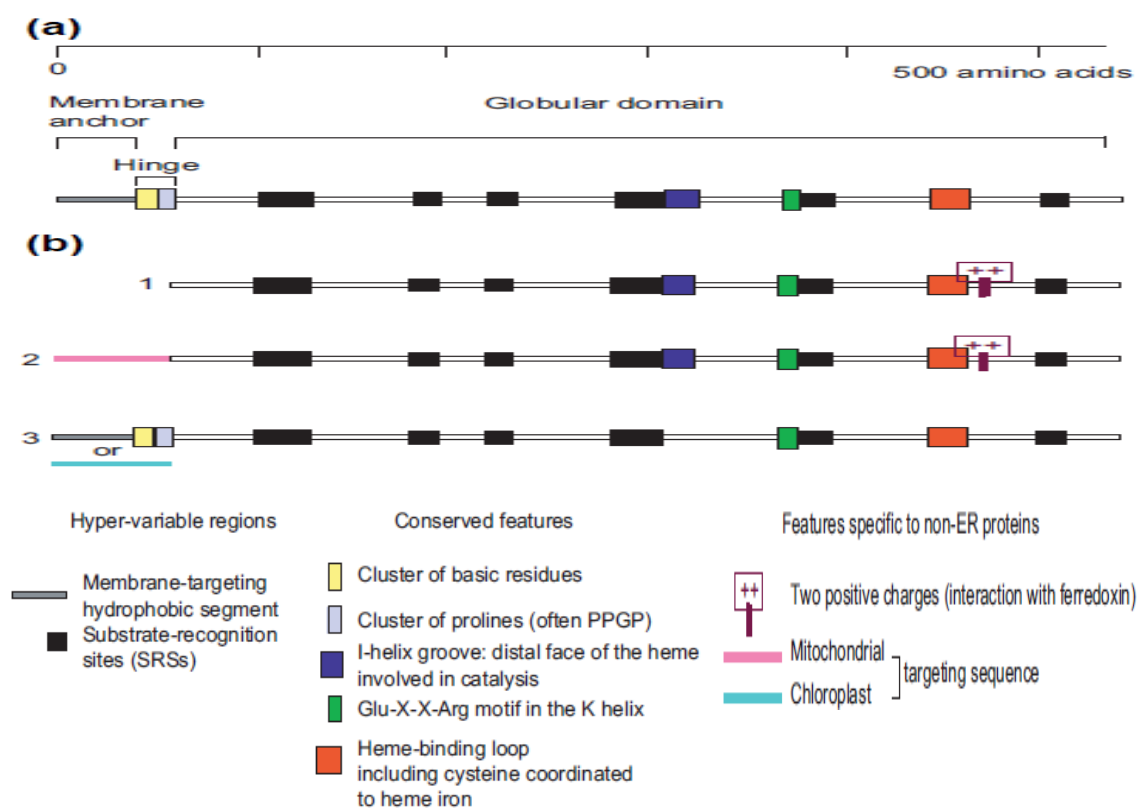
b. Nomenclatura y organización. El sistema de nomenclatura para los citocromos P450 fue establecido por Neber *et al* (1987). El nombre consiste de CYP por citocromo P450, seguido de un número que indica la familia, una letra para la subfamilia, un número para la isoforma y a veces los alelos son designados como v1, v2, etc. La nomenclatura se basa en la similitud de las secuencias de aminoácidos. Los genes de citocromos P450 están agrupados en 70 familias con 127 subfamilias tanto de plantas y animales, de las cuales las familias 4, 6, 9 y 18 han sido identificadas en insectos (Berge, 1998; Nelson *et al.*, 1996). La diversidad de los citocromos P450 se debe a las múltiples isoformas, diferentes patrones de expresión y el amplio espectro de substratos (Feyereisen, 1999; Scott y Wen, 2001).

c. Estructura. Con base a la secuencia de aminoácidos de los citocromos P450 se ha determinado que la identidad es extremadamente baja, aunque existen tres dominios altamente conservados. Se ha visto que esta alta variabilidad en la secuencia de aminoácidos de los citocromos no afecta la estructura altamente conservada del núcleo donde se encuentra el grupo hemo y reflejan un mecanismo común de transferencia de protones y electrones y activación por oxígeno (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000).

El núcleo conservado está formado por un paquete de hélices (D, E, I y L), hélices J y K, dos conjunto de hojas beta, y un conglomerado llamado “meander” (Figura 9 y 10). Las regiones comprimen: primero, al lazo de unión al grupo hemo (Phe-X-X-Gly-X-Arg-

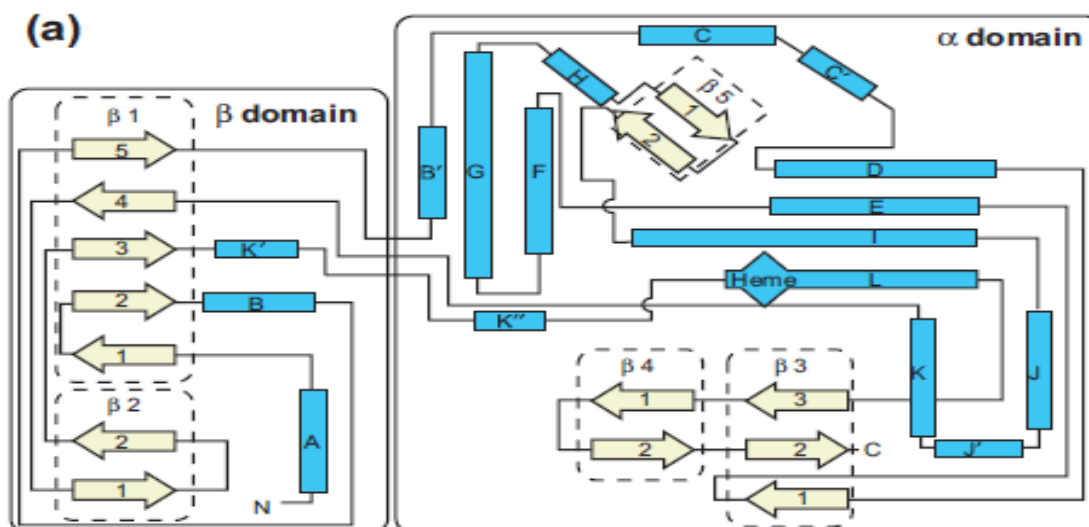
X-Cys-X-Gly) con el aminoácido cisteína altamente conservado (participa en la ligación con el hierro del grupo hemo); segundo, el motivo Glu-X-X-Arg en la hélice K el cual se ve involucrado en la estabilización del núcleo estructural de la proteína; y finalmente, la parte central de la hélice I el dominio Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser el cual corresponde a la hendidura donde ocurre la transferencia de protones (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000). La estructura de los citocromos P450 se puede dividir en dos dominios, el dominio α (predominan las hélices α) y β (predominan las hélices β) (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000). En la Figura 11, se puede observar la estructura tridimensional del citocromo P450 CYP2C5 con los dominios ya descritos el cual está asociado al retículo endoplasmático (RE).

Figura 9. Estructura primaria de proteínas P450. (a) Características típicas de proteínas P450 unida al RE. (b) Variantes de la estructura general: 1, solubles; 2, mitocondriales; 3, unidas a la membrana.



(Werck-Reichart y Feyereisen, 2000)

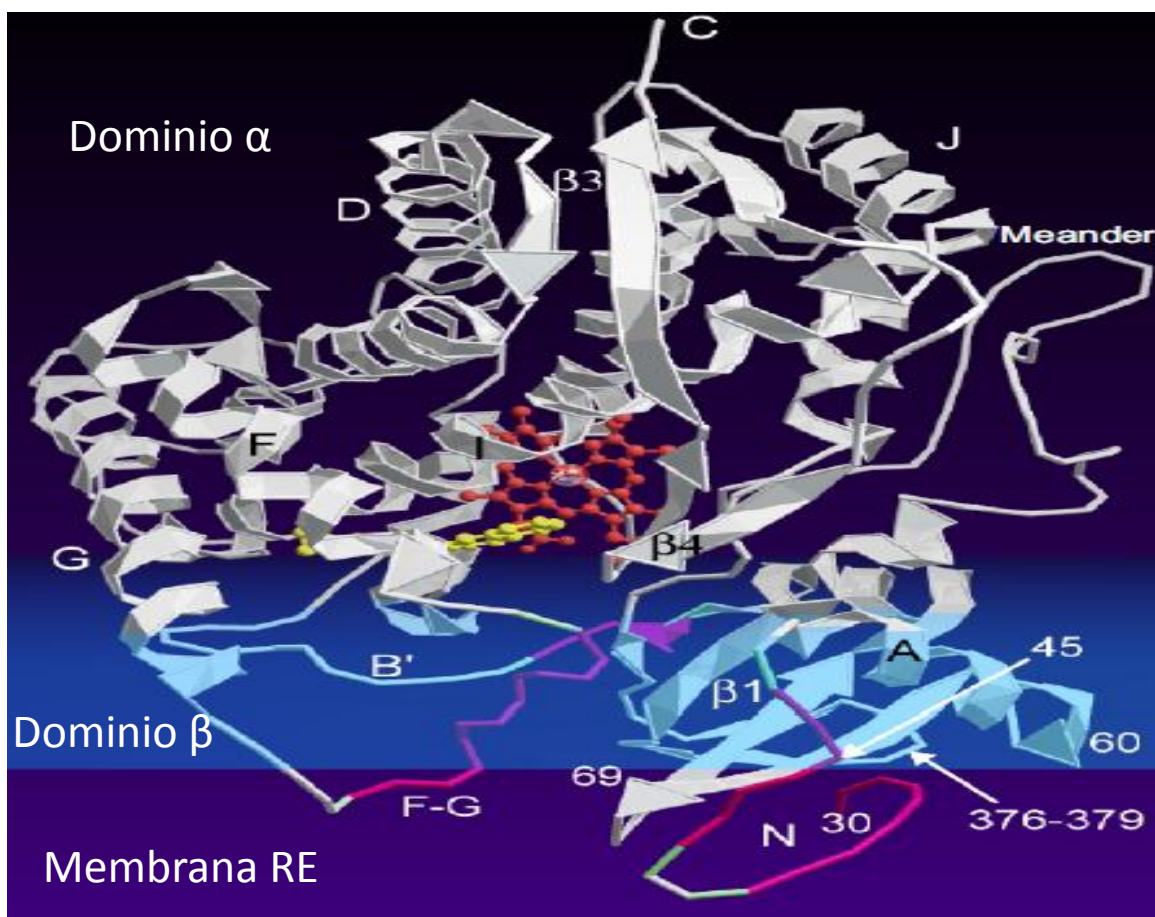
Figura 10. Estructura secundaria de proteínas P450. El diagrama muestra los arreglos de estructurales secundarias típicos de las proteínas P450. Las cajas azules son las hélices α y las flechas color crema son las hojas β . Dominio α está asociado al centro catalítico y el dominio β al reconocimiento del sustrato y acceso al canal.



(Werck-Reichart y Feyereisen, 2000)

d. Mecanismo de reacción. Los citocromos tienen la habilidad de metabolizar una variedad de compuestos, tales como: hormonas, ácidos grasos, esteroides, drogas, pesticidas y toxinas de plantas. La actividad de los citocromos P450 en los eucariotas requiere de la NADPH citocromo P450 reductasa, NADPH, fosfolípidos y algunas veces citocromo b_5 en presencia de oxígeno molecular. Los citocromos P450 se caracterizan por tener una especificidad hacia un solo sustrato o varios sustratos, por lo tanto un sustrato podría ser metabolizado por varios citocromos P450. Por ejemplo, CYP1A1 puede metabolizar más de 20 sustratos, mientras que CYP7A1 solo un sustrato (Bisset, 2002; Hemingway y Ranson, 2000; Scott, 1999). El mecanismo generalmente consiste en la inserción de uno de los átomos de oxígeno molecular al sustrato y el segundo es reducido a agua (Figura 12) (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000).

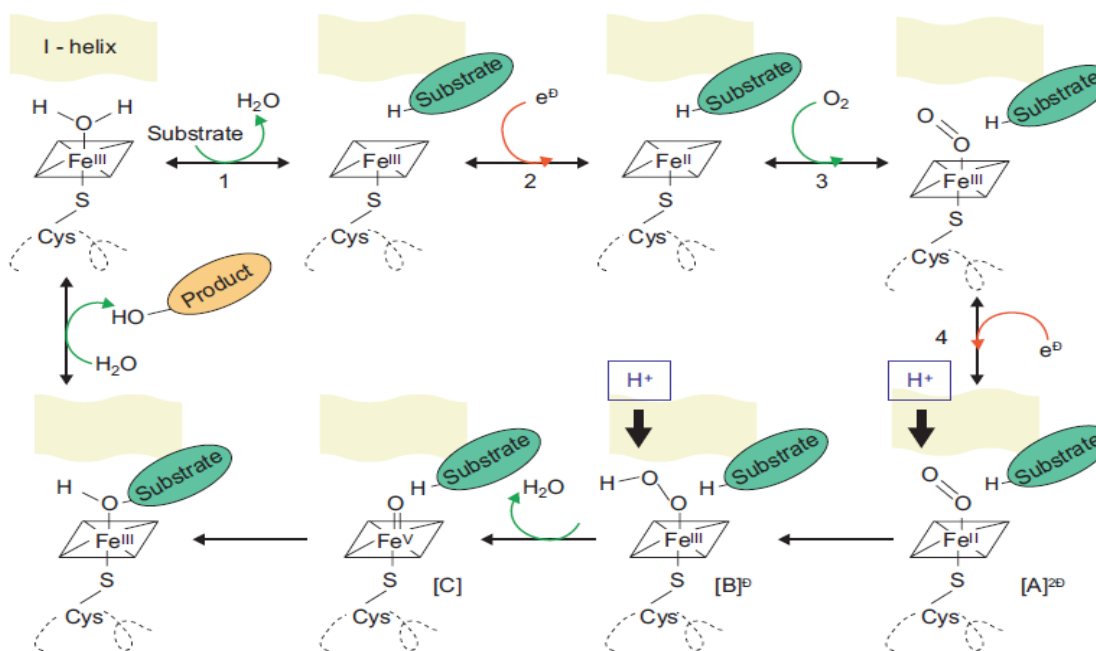
Figura 11. Estructura terciaria del citocromo P450 CYP2C5.



(Werck-Reichart y Feyereisen, 2000).

Los citocromos P450 metabolizan los insecticidas a través de hidroxilaciones de O, S, C y N; hidroxilación y epoxidación alifática; hidroxilación aromática; oxidación de esteres, nitrógeno y tioeter (Bisset, 2002; Brogdon y McAllister, 1998).

Figura 12. Mecanismo de reacción de los citocromos P450.



(Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000).

e. Citocromos P450 en insectos. Las familias 4, 6, 9, 12, 15, 18 y 28 de citocromos P450 han sido identificadas en insectos. Estas enzimas tienen diferentes funciones en los insectos, tales como: crecimiento, desarrollo, alimentación, metabolismo de insecticidas y toxinas de plantas. Los citocromos P450 se encuentran distribuidos en diferentes tejidos del insecto, pero la mayor actividad se ha detectado en el cuerpo gordo, tubos de Malpighi e intestino (Brogdon y McAllister, 1998; Hemingway y Ranson, 2000; Scott *et al.*, 1998; Scott, 1999).

Los niveles de actividad enzimática y la expresión de los citocromos P450 pueden variar en los tejidos y en la etapa de desarrollo del insecto. En los mosquitos, los niveles de citocromos P450 son indetectables en los huevos, luego aumentan y decaen en el estadio de larva, vuelven a ser indetectables en las pupas y finalmente se detectan niveles altos de expresión en los adultos (Scott *et al.*, 1998; Scott, 1999).

La secuenciación de los genomas de diferentes insectos ha ayudado a determinar los genes de las familias de citocromos P450. En el caso de *D. melanogaster*, la diversidad

encontrada de citocromos P450 fue de 90 genes diferentes (Adams *et al.*, 2000). Un análisis de los genes de desintoxicación del mayor vector del dengue, *Ae. aegypti*, identificó 44 genes de la familia CYP6 y 37 genes de la familia CYP9 (Strode *et al.*, 2008). La secuenciación del genoma de *An. gambiae*, reveló la existencia de un total de 111 citocromos P450 distribuidos en clusters de genes (Ranson *et al.*, 2002). Con base a los resultados obtenidos de *An. gambiae*, se diseñaron iniciadores degenerados con regiones conservadas (región de unión del grupo hemo, dominio ETLR y Hélice I) para amplificar genes de las familias de citocromos CYP4, CYP6 y CYP9 en *An. funestus*. Estos iniciadores degenerados permitieron identificar 12 genes de la familia CYP4, 12 genes de la familia CYP6 y 7 genes de la familia CYP9 (Amenya *et al.*, 2005).

f. Resistencia a insecticidas mediada por citocromos P450. La resistencia a insecticidas es importante, porque resulta ser un obstáculo para los programas de control de vectores de enfermedades tal como la malaria. Estudios realizados en insectos con el fin de determinar los mecanismos de resistencia, reveló que los citocromos P450 juegan un papel importante en la resistencia a insecticidas y toxinas de plantas. La resistencia mediada por citocromos P450 en los insectos se ha detectado para los insecticidas carbamatos, organofosforados, piretroides y DDT (Bisset, 2002; Scott *et al.* 1998; Scott 1999).

La resistencia mediada por citocromos P450 es el resultado de un aumento en la expresión de los genes que las codifican o cambios en el sitio catalítico (Brogdon y McAllister, 1998; Scott, 1999). Un citocromo P450 debe ser solo considerado en la resistencia, sí cumple los siguientes 2 criterios: 1) El citocromo P450 debe mostrar la capacidad de metabolizar o secuestrar el compuesto a la cual la cepa es resistente, y 2) La cepa resistente debe mostrar un incremento en la expresión del gen del citocromo P450 o de la proteína en comparación de la cepa susceptible (Scott *et al.*, 1998). El aumento en la actividad de los citocromos ha sido detectado como un mecanismo de resistencia a insecticidas en diferentes insectos:

1) *Ae. aegypti*. Estudios de caracterización de resistencia a deltametrina en poblaciones de este mosquito en diferentes localidades de Tailandia, detectaron una elevación significativa de actividad enzimática de los citocromos P450 por análisis bioquímicos (Yaicharoen, 2005).

2) *An. gambiae*. En una cepa procedente de Kenia, se demostró que un aumento en los niveles de esterasas y citocromos P450 confieren resistencia a permetrina (Vulule *et al.* 1991). La CYP6Z1 ha sido relacionada a resistencia a permetrina, ya que se ha detectado sobreexpresión de esta en cepas resistentes por PCR en tiempo real y microarreglos (David *et al.*, 2005). CYP6M2, CYP6Z2, CYP6Z3, CYP6S1 y CYP6S2 han sido asociados a resistencia a permetrina por análisis de microarreglos (Müller *et al.* 2007).

3) *An. minimus*. En un cepa resistente a deltametrina, se encontró la sobreexpresión de CYP6AA2 y que probablemente podría estar involucrado en la resistencia (Rongnoparut *et al.*, 2003).

4) *Cx. quinquefasciatus*. Se ha detectado resistencia a permetrina mediada por la sobreexpresión de CYP6F1 (Kasai *et al.*, 2000).

5) *D. melanogaster*. En cepas resistentes a DDT se ha detectado sobreexpresión de CYP6A8, por lo que hace pensar que se encuentra asociada a la resistencia (Hemingway y Ranson, 2000). Un estudio de inducción de la CYP6A2 en cepas susceptibles y resistentes a DDT, demostró que ésta podría estar involucrada en el metabolismo del insecticida (Brun *et al.* 1996).

6) *H. armígera*. Estudios en Australia han revelado que CYP6B2 es sobre expresada en cepas resistentes a piretroides (Xiao-Ping y Hobbs, 1995). La CYP6B7 ha sido detectada en cepas resistentes a piretroides según Ranasinghe y Hobbs (1998). Genes de las familia CYP9, CYP9A12 y CYP9A14, han sido relacionados con resistencia a piretroides debido a una sobreexpresión en cepas resistentes (Yang *et al.*, 2006).

7) *H. virenses*. Rose *et al.* (1997), detecto la expresión CYP9A1 en una población resistente a tiodicarb seleccionada.

8) *M. domestica*. Se ha caracterizado cepas con resistencia a piretroides mediada por citocromos P450, resultado de la sobreexpresión de CYP6D1 (Kasai y Scott, 2000; Scott *et al.*, 1998). La resistencia a organofosforados en *M. domestica* se ha relacionado a sobreexpresión de CYP6A1 (Sabourault *et al.*, 2001).

g. Resistencia a insecticidas y citocromos P450 en *An. albimanus*. En Guatemala, se han realizado estudios en el principal vector de la malaria de esa región, *An. albimanus*. Uno de los primeros estudios identificó resistencia a organofosforados y piretroides mediada por esterasas (Beach y Cerdón-Rosales, 1989). Métodos enzimáticos y el ensayo de la OMS permitieron identificar la resistencia a fenitrotion (Beach *et al.*, 1989). Posteriormente, la resistencia a carbamatos por alteración del sitio blanco fue reportada por Cerdón-Rosales *et al.* (1990). Brogdon *et al.* (1992 y 1999), reportó resistencia a organofosforados por insensibilidad de la acetilcolinesterasa y resistencia a piretroides y DDT mediada por esterasas y oxidasas. Un estudio sobre métodos para el uso de insecticidas para el control del vector de la malaria en México, *An. albimanus*, detecto una disminución de la susceptibilidad a piretroides la cual estaba mediada por una alta actividad enzimática de citocromos P450 (Penilla *et al.*, 2007).

Los genes de las familias de citocromos P450 de *An. albimanus* han sido poco estudiadas, en la literatura solo se cuenta con 17 secuencias parciales de genes de la familia CYP4 (Scott, 1994). La amplificación de estos genes se realizó con iniciadores degenerados diseñados con base a la región de unión del grupo hemo conservado.

Amenya *et al.* (2005), publicó unos iniciadores degenerados para amplificar ADNc y ADN genómico de genes de las familias de citocromos P450 CYP4, CYP6 y CYP9 en *An. funestus*. Los resultados indicaban que los iniciadores degenerados habían funcionado, debido a que obtuvieron las secuencias de los genes de las familias de

citocromos P450 CYP4, CYP6 y CYP9. Con base a información filogenética de anofelinos y otros insectos del orden díptero, existe la posibilidad de que los iniciadores degenerados puedan utilizarse para amplificar esos mismos genes en otros anofelinos, como en *An. albimanus*. Por lo tanto, Ramírez (2009) realizó una validación *in silico* de los iniciadores degenerados publicados por Amenity *et al.* (2005) y otros iniciadores específicos para la familia CYP6 y CYP9 en *An. albimanus*. Realizó alineamientos (Figura 13 a la 20) con las secuencias de aminoácidos y ARNm de insectos del orden Díptera (CYP6), superorden Endopterygota (CYP9) y familia Culicidae (CYP6 y CYP9), para determinar las regiones a partir de las cuales se diseñaron los iniciadores y determinar si están conservadas (Ramírez, 2009).

Los resultados obtenidos a partir de análisis bioinformático, indicaban que los iniciadores específicos no podían ser utilizados para amplificar citocromos específicos (Ramírez, 2009). En el caso de los iniciadores degenerados para la familia CYP6, sí se podrían utilizar. En cambio, el iniciador degenerado “Reverse” para la familia CYP9 no se podía utilizar debido a que contiene una parte que no coincide con la región conservada con la que se une el resto del iniciador (Ramírez, 2009). También, se observó que las secuencias de la región conservada donde no se une el resto del iniciador es muy variable en la familia Culicidae. Estos resultados, sugieren que el iniciador no amplificara todos los CYP9 de *An. albimanus* y por lo tanto se rediseñó el iniciador “Reverse” con base al original. El rediseño consistió en cambiar la región TCG por WSC, ya que esta puede unirse a diferentes secuencias debido a su variabilidad en la secuencia y por presentar menos estructuras de lazo, heterodímeros y homodímeros (baja estabilidad). El nuevo iniciador es 5'-AGYGYTCGSWACRACCATRTC-3' (Ramírez, 2009).

Figura 13. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP6 del orden Díptera.

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: región a partir de la cual se diseñó el iniciador “Forward”. R: región a partir de la cual se diseñó el iniciador “Reverse”. Fun.: *An. funestus*; Gamb.: *An. gambiae*; Min.: *An. minimus*; Cx.: *Cx. quinquefasciatus*; Dros.: *D. melanogaster*; Mus.: *M. domestica*.

		F	
Fun.	CYP6P1	-----WLYELAKNPD IQERLRDELNR	21
	CYP6P9	--DGSVKGGEVGMTQRELAAQAFIFFLAGFETSSTTQSFC	LYELAKNPD IQERLRQEQINQ 346
	CYP6P5	-----ELAAQVLIFFFLAGFETSSTTLSFC	LYELAKNPGIQDRLRDEITR 44
	CYP6P4	-----	LAKNPD IQERLRREEIER 17
	CYP6Y1	-----DFS	LYELALKQDVQDKARQCCKVE 23
	CYP6N2	-----	ALNEIQQRARQCVDL 16
	CYP6M1	-----	LNPEIQEKGRKCKVE 15
	CYP6M8	-----	LYELALNPEVQEQGRKCKVE 20
	CYP6M7	-----	LYELALNQDAQDKGRKCKVE 20
	CYP6AA4	-----	LYELANPD IQERVRAEVL 20
Gamb.	CYP6P3	--DGS LGKGEVGMTQNELAAQAFVFFFLAGFETSSTTQSFC	LYELAKNPD IQERLRREEINR 346
	CYP6Z1	-----ETLTDACAANVFLFYGAGADTSTGTITFT	LHELTHNAEAMAKLQREVE 331
	CYP6P2	--EDHIGKGEVGMTMNELAAQVFIFFFLAGFETSSTTMNFC	LYELAKHPD IQERLRREEIER 344
Min.	CYP6P7	--EEHVKGGEVGMTQNELAAQVFIFFFLAGFETSSTTMNFC	LYELAKNSELQERLRKEINR 346
Cx.	CYP6F1	--DIEVSTNKKKLSLEQVTAHAFVFFIAAYETSSTTISFC	L FELARNPEIQKKVQEQEIDQ 342
Dros.	CYP6G1	--PHYAK-----NQDFLVAQAGVFFTAGFETSSTMSFAL	LYEMAKHPMQKRLRDEINE 344
	CYP6A2	--GEVIEGMDI----GELAAQVFVYVAGFETSSTMSYCL	LYELAQNQDIQDRLRMEIQT 342
	CYP6A8	--GDVVRGLTM----EEVLAQAFVFFIAGFETSSTMGFAL	LYELAKNPD IQDKVRAEVEE 342
Mus.	CYP6D1	HDVESTAENLKAMSIDMIANSFLFYIAGSETTAATTSFT	LYELAMYPEILKKAQSEVDE 349
		LYELAK	: : :
			R
Fun.	CYP6P1	DHVI PRNVGVQVPVFAIHRDPEHYDPPECDFDPRFSAEECKKRLPYTFL	PFGE GP----- 126
	CYP6P9	KHVI PKRTL VQIPVHAIQHDPEHYDPERFD PDRFSP EEVKGRHPFTFL	PFGE GPRVCIG 456
	CYP6P5	KHIIPEGAI VQIPIYAIQRDPDHFPDPERFD PDRFTPEEVKGRHPVYVL	----- 143
	CYP6P4	KHVIPKDTFIQIPVYAIQRDP E FYPEPDQFN PDRFLPEGVKQRHPVYVFL	----- 117
	CYP6Y1	GLLLRRGQKIMIPYAMHHDSTHFPDPEQYRPERFSP EEVAKRDPYCYL	PFGDGPR----- 129
	CYP6N2	DVTFPKGMNVMI PVYAIHHDPEHYDPERYD PDRFAADASEARKPYSFI	PFGE GP----- 120
	CYP6M1	DSVIEAGTRVLIPIFAIQRDSDIFPEPEKFDPERFSP EEEAKRHPFAMI	----- 114
	CYP6M8	KSVLEAGTAVHVPVHAIHHDPAVFPDPERYDPERFSP EQEAKRHPYAWT	PFGE GP----- 125
	CYP6M7	KTVLEAGTSMVVPVYAIHRDPEHFPNPD LFD PDRFTPEEEAKRHPYAWT	PFGE GP----- 125
	CYP6AA4	NVTLDRDTHLMVPIYAIHHDATIYPDPKRFD PDRFATDALHSRHTHAF	PFGE GP----- 125
Gamb.	CYP6P3	KHVI PKRTL VQIPAYAIQRDPDHYPDPERFNPDRFLPEEVKGRHPFTFI	PFGE GPRICIG 456
	CYP6Z1	DTVIRKGTQMIIPLLGISMNEKYFPEPEL YSPERFDEA-TKNYDADAY	PFGAGPRNCIG 440
	CYP6P2	AHVIPKGTMIQIPIYALHHD AQYYPDPERFDPERFRPEVANARPAYVYM	PFGE GPRICIG 454
Min.	CYP6P7	KHVI PKGTMVQIPIYALHHDPEYFPERFDPERFQPEVANARPPYVYM	PFGE GPRICIG 456
Cx.	CYP6F1	DTTIEKGTSLVIPVLGLHRDPDHYPEPDRFIPERFSN--FEDISTKPYL	PFGAGPRNCIG 450
Dros.	CYP6G1	DYTLNGTVPVFIPIYALHHDPKYWTNPSQFDPERFSPANRKNIVAMAYQ	PFSGGPRNCIG 460
	CYP6A2	KLVIKGTQV IIPACAYHRDEDLYPNPETFDPERFSP EKVAAARESVEWL	PFGDGPRNCIG 453
	CYP6A8	NFVIEAGQSVIIPSSAIHHDPSIYPEPFEFRPERFSP EESAGRPSVAWL	PFGDGPRNCIG 453
Mus.	CYP6D1	KLTIPKETGIIISLLGIHRDPQYFYPQPEDYRPERFADE-SKDYDPAAYM	PFGE GPRHCIA 462
		: : : . : : : * : * : * * . : PFGE GP	

(Ramírez, 2009)

Figura 14. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP6 de la familia Culicidae. Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: región a partir de la cual se diseñó el iniciador “Forward”. R: región a partir de la cual se diseñó el iniciador “Reverse”. Fun.: *An. funestus*; Gamb.: *An. gambiae*; Min.: *An. minimus*; Cx.: *Cx. Quinquesciatus*.

		F	
Fun. CYP6P1	-----	WLYELAKNPDIQERLRDELNRAIETNDGELT	31
CYP6P9	--MTQRELAQAFFIFLAGFETSSTTQSFCL	YELAKNPDIQERLRQEIINQAIEENDGQVT	356
CYP6P5	-----ELAAQVLIFFLAGFETSSTTLSFCL	YELAKNPDIQDRLRDEITRAIDNNGGEVT	54
CYP6P4	-----	LAKNPDIQERLRREEIERGVEDHGGQVT	27
CYP6Y1	-----DFS	LYELALKQDVQDKARQCVKETLQKYGGKLS	33
CYP6N2	-----	ALNEIQQRARQCVLDAVKKHG-GLS	25
CYP6M1	-----	LNPEIQEKGRKCVKEILEKRNMENT	25
CYP6M8	-----	LYELALNPEVQEQGRKCVREVLKKNHNGEMS	30
CYP6M7	-----	LYELALNQDAQDKGRRCVKEVLERHNGELT	30
CYP6AA4	-----	LYELANNPDIQERVRAEVLEKCLKLHDNQIT	30
Gamb. CYP6P3	--MTQNELAAQAFVFFLAGFETSSTTQSFCL	YELAKNPDIQERLRREINRAIAENGGEVT	356
CYP6Z1	ETLTDQAQCAANVFLFYGAGADTSTGTITFTL	HELTHNAEAMAKLQREVDENMERHNGEIT	341
CYP6P2	--MTMNELAAQVFIFFLAGFETSSTTMNFC	LYELAKHPDIQERLRREIERAVEENGELT	354
Min. CYP6P7	--MTQNELAAQVFIFFLAGFETSSTTMNFC	LYELAKNSELQERLRKEINRALEANGELT	356
Cx. CYP6F1	KKLSLEQVTAHAFVFFIAAYETSSTTISFCL	FELARNPEIQKKVQEQEIDQVLASHNGEIT	352
		: : : : :	::
		R	
Fun. CYP6P1	PEHYDPPECFDPDRFSAEECKKRLPYTFL	PFGE GP	----- 126
CYP6P9	PEHYDPERFDPDRFSPPEVKKRHPFTFL	PFGE GPRVCIGLRFGLMOTKVGLITLLRKFR	476
CYP6P5	PDHFPDPERFDPDRFTPEEVKKRHPYVYL	-----	143
CYP6P4	PEFYPEPDQFNPDRFLPEGVKQRHPYVFLP	-----	117
CYP6Y1	STHFPDPEQYRPERFSPEEVAKRDPYCYL	PFGDGPR	----- 129
CYP6N2	PEHYDPERYDPDRFAADASEARKPYSFI	PFGE GP	----- 120
CYP6M1	SDIFPEPEKFDPERFSPEEEAKRHPFAWI	-----	114
CYP6M8	PAVFPDPERYDPERFSPEQEAKRHPYAWT	PFGE GP	----- 125
CYP6M7	PEHFPNPD LFD PDRFTPEEEAKRHPYAWT	PFGE GP	----- 125
CYP6AA4	ATIYPDPKRFDPDRFATDALHSRHTHAF	LPFGE GP	----- 125
Gamb. CYP6P3	PDHYDPERFNPDRFLPEEVKKRHPFTFI	PFGE GPRICIGLRFGLMOTKVGLITLLRKFR	476
CYP6Z1	EKYFPEPELYSPERFDEATKNYD-ADAYYP	FGAGPRNCIGLRQGLLLSKIALVMMLSRFN	460
CYP6P2	AQYYPDPERFDPERFRPEVANARPAYVYMP	PFGE GPRICIGLRFGLMOTKVGLITLLRQFR	474
Min. CYP6P7	PEYYPEPERFDPERFQPEVANARPAYVYMP	PFGE GPRICIGMRFGMMOTKVGLITLLRQFR	476
Cx. CYP6F1	PDHYPEPDRFIPERFSN--FEDISTKPYL	PFAGGPRNCIGLRLGKLTQKAGLVMMMLSKFN	470
	:*. : : *:**	. :	

(Ramírez, 2009)

Figura 15. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP9 del superorden Endopterygota. Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: región a partir de la cual se diseñó el iniciador “Forward”. R: región a partir de la cual se diseñó el iniciador “Reverse”. Fun.: *An. funestus*; Gamb.: *An. gambiae*; Min.: *An. minimus*; Cx.: *Cx. quinquefasciatus*; Aed.: *Ae. aegypti*; Dros.: *D. melanogaster*; Helio.: *H. virescens*.

		F	
Fun. CYP9L4	-----	FTGSKMRQMFSLIVECSENMIHSLAHS	27
CYP9K1fun	-----		
CYP9M3	-----	FTGSKMRSMFGLLSKSAGDAMDRLVMFSR-DKS--	32
CYP9J14	-----	--AKCVTMFQQVVECSSGMVQYKKQTDTN----	28
CYP9J13	-----	-----QMFELMSESCQGMVQHLLLEEARADE--S	26
CYP9J12	-----	FTGSKMRLMFALIAECGQTMVAHFRSEEQKAGG-T	34
CYP9J11	-----	FTGSKMRQMFELIVECSANMAKHVREEIRMMGV-S	34
Gamb. CYP9K1gam	PLFGRALFAMRDRWRNMRITLSPA	FTGIKMRLMFGLITSYCDGAVRTIRSELGADGT--	59
CYP9L1	AMFSKILFNLTGQRWRNVRTTLSPT	FTGSKMRQMFAMILECSDNMVQALAHPT-----	171
Cx. CYP9C1Cul	PFIGRSLFFSEGLRWRHGRAGLSPA	FTGSKMRMMFELLATYSEGAMQRLAQGGK-----	169
CYP9B2	PVLGRALFFTEGTRWKHGRSGLSPA	FTGSKMRMMFALLSNYTEGAMGRLVDDARRDGG--	172
CYP9B1Cul	LIATKTLFLLTGQHWKMRSTLSPA	FTGVKMRQMFELVVECSSESMIEFYRKKG-----	171
Aed. CP9J1	FFN--SLFSLRGQKWRDMRSTLSPA	FTGSRMRHMAELVVKCATSMTDFHSEAKAG---R	174
CYP9J2	FFN--SLFSLRGQKWRDMRSTLSPA	FTGSRMRMAELVVKCATSMTDFHSEAKAG---R	174
Dros. CYP9B1dro	VND--MLNVMRDQHWNRMSVLTVPV	FTSAKMRMMFTLMNESFAQCLEHLKSSQPIAAGEN	172
CYP9C1dro	ISK--SLLSLDRRWKQMRSTLPTPT	FTSLKIRQMFELIHFCNVEAVDFVQRQLDAG----	172
CYP9B2dro	FND--MLSVMRDQRWKHMRNTLTPV	FTAARK--NMFTLMNESFAECLQHLDDSSSKTLPGRK	171
Helio. CYP9A1V2	PIFGRGLLLLHGDEWKAMRSTMSPA	FTSSKMRMLMVPFMEEIALEMIRVLRGKIKD SGK-P	169
		FTGSKM	
			R
Fun. CYP9L4	LTIAPDIQRLYEIILQA-SESPG-WKSLTYDALQGMRYLDMVVSETL	-----	250
CYP9K1fun	LAVNPGAQERLRNEIDTV-RTSICGADKLSYETLQSMRYMDMVAVETLRKWTTPAPFLDRT	-----	61
CYP9M3	LSINPSIQDRLRAEIDETREELEDGK-TPTYEILQKMKYLDMMVSETL	-----	255
CYP9J14	LTLNRDIQDRLYEIIVAT-DIDLQ-QKPLTYEALQHMKYMDMMVSETL	-----	252
CYP9J13	LMLHPEVQDRLYEIIVGV-DEKLN-GKPLNYEAVQGMRYMDMMVSETL	-----	248
CYP9J12	LAVNDDIQXRLFEEVHES-EQSLEEGKSLSYEKLQSLPYLDMVVSETL	-----	261
CYP9J11	LTVMKDAQNKLYEEIRAT-SKSLG-GSSLTYPDALQNMQYMDMMVSETL	-----	258
Gamb. CYP9K1gam	-----	-----	
CYP9L1	VTLAPEIQRLYEIQQV-SETLD-GKALTYDALQGMRYLDMVVSETLRKWSPPGTD RM	-----	406
Cx. CYP9C1Cul	-----	-----	
CYP9B2	MSQNPVVKQKLQAEIDQVKEQLSTTDSKLSYEVLMQMKYLDMMVSETLRWAPLGLTN--	-----	403
CYP9B1Cul	LALNPDVQEKLRKEVEDT-MRMLN-GGSLTYDSLHKMITYLDMVLSLRLWPPASAVDRY	-----	403
Aed. CP9J1	LTVNQDIQRRLYEIIVAT-ESTLNGQP-ITYEALQKMAYLDMVVSETLRKYPTATLTD RY	-----	407
CYP9J2	LTVNQDIQRRLYEIIVAT-ESTLNGQP-ITYEALQKMAYLDMVVSEALRKYPTATLTD RY	-----	407
Dros. CYP9B1dro	LLRNLDIQRRLYEIIVAT-ESTLNGQP-ITYEALQKMAYLDMVVSEALRKYPTATLTD RY	-----	377
CYP9C1dro	LMMNPEVQEKLLAEILLAV-KEQLGKLP-LDYDTLMGMKYLNCVVSSEALRKYPTATLTD RY	-----	392
CYP9B2dro	LLYNPDVQERLYEIVET-KKALNGAP-LTYDAVQKMTYMDMVISSEALRKYPTATLTD RY	-----	375
Helio. CYP9A1V2	LAVNPDVQDRLLQEIERY-DEKNH--GKIDYVNVQSMTYLDMVVSEGLRLWPPAAVVDRV	-----	399
		ETLR	

(Ramírez, 2009)

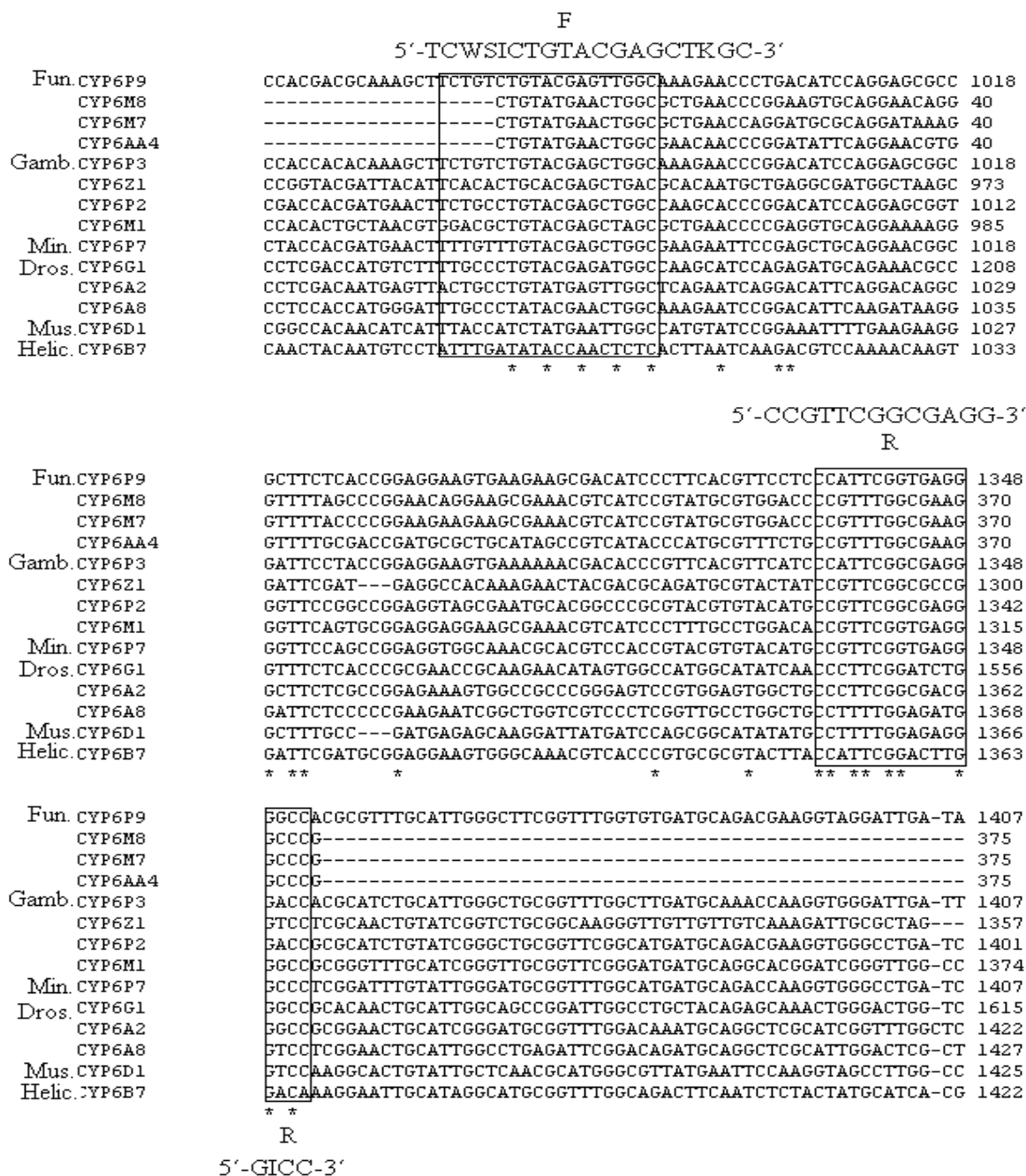
Figura 16. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP9 de la familia Culicidae. Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: región a partir de la cual se diseñó el iniciador “Forward”. R: región a partir de la cual se diseñó el iniciador “Reverse”. Fun.: *An. funestus*; Gamb.: *An. gambiae*; Cx.: *Cx. quinquefasciatus*; Aed.: *Ae. aegypti*.

		F	
Fun. CYP9L4	-----	FTGSKMRQMFSLIVECSENMIHSLAHS	-----AQ 29
CYP9M3	-----	FTGSKMRSMFGLLSKSAGDAMDRLVMFSRDKS	---F 33
CYP9J14	-----	---AKQVIMFQQVVECSGVMVQYYKKQTDN	---GQ 30
CYP9J13	-----	---QMFELMSESCQGMVQHLLEEARADE	---SKQ 28
CYP9J12	-----	FTGSKMRLMFALIAECGQTMVAHFRSEEQKAGGTGV	36
CYP9J11	-----	FTGSKMRQMFELIVECSANMAKHYREEIRMNGVSSR	36
Gamb. CYP9K1	LFGRALFAMRDTRWRNMRITLSPA	FTGIKMRMLFGLITSYCDGAVRTIRSELGADG	--TA 60
CYP9L1	MFSKILFNLTGQRWRNVRTTLSPT	FTGSKMRQMFAMILECSDNMVQALAHPT	-----GR 173
Cx. CYP9C1	FIGRSLFFSEGLRWHRHGRAGLSPA	FTGSKMRNMFELLATYSEGAMQRLAQQGK	-----V 170
CYP9B2	VLGRALFFTEGTRWKHGRSGLSPA	FTGSKMRNMFALLSNYTEGAMGRLVDDARRDG	--GL 173
CYP9B1	IATKTLFTLTGQHWKMRSTLSPA	FTGVKMKQMFELVVECESESMIEFYRKKG	-----AQ 173
Aed. CP9J1	LFFNSLFSLRGQKWRDMRSTLSPA	FTGSRMRHMAELVVKCATSMTDFHSEAKAGR	--RL 176
CYP9J2	LFFNSLFSLRGQKWRDMRSTLSPA	FTGSRMRHMAELVVKCATSMTDFHSEAKAGR	--RL 176
		FTGSKM * :	
			R
Fun. CYP9L4	TIAPDIQRLYEEILQASESPG--WKS	LYDALQGMRYLDMVVSETL	----- 250
CYP9M3	SINPSIQDRLRAEIDETREELED--GKT	PTYEILQKMKYLDMMVVSETL	----- 255
CYP9J14	TLNRDIQDRLYEEIVATDIDLQ--QKPL	TYEALQHKMYDMVVSETL	----- 252
CYP9J13	MLHPEVQDRLYEEIVGVDEKLN--GKPL	NVEAVQGMRYDMVVSETL	----- 248
CYP9J12	AVNDDIQXRLFEEVHESEQSLEE--GKS	LSYEKLQSLPYLDMVVSETL	----- 261
CYP9J11	TVNKDAQNKLYEEIRATSKSLG--GSSL	TYDALQNMQYDMVVSETL	----- 258
Gamb. CYP9K1	-----	-----	
CYP9L1	TLAPEIQRLYEEIQVSETLD--GKAL	TYDALQGMRYLDMVVSETL	RKWSPPSGTDRMC 407
Cx. CYP9C1	-----	-----	
CYP9B2	SQNPVVKQLQAEIDQVKEQLSTTD	SKLSYEVLMQMKYLDMMVVSETL	RWAPLGLTNRAC 406
CYP9B1	ALNPDVQEKLRKEVEDTNRMLN--GG	SLTYDSLHKMTYLDMMVSESL	MWPPASAVDRYC 404
Aed. CP9J1	TVNQDIQRLYEEIAVTESTLN--GQP	ITYEALQKMAYLDMVVSETL	RKYPTATLTDRYV 408
CYP9J2	TVNQDIQRLYEEIAATESTLN--GQP	ITYEALQKMAYLDMVVSEAL	RKYPTATLTDRYA 408
		ETLR	

(Ramírez, 2009)

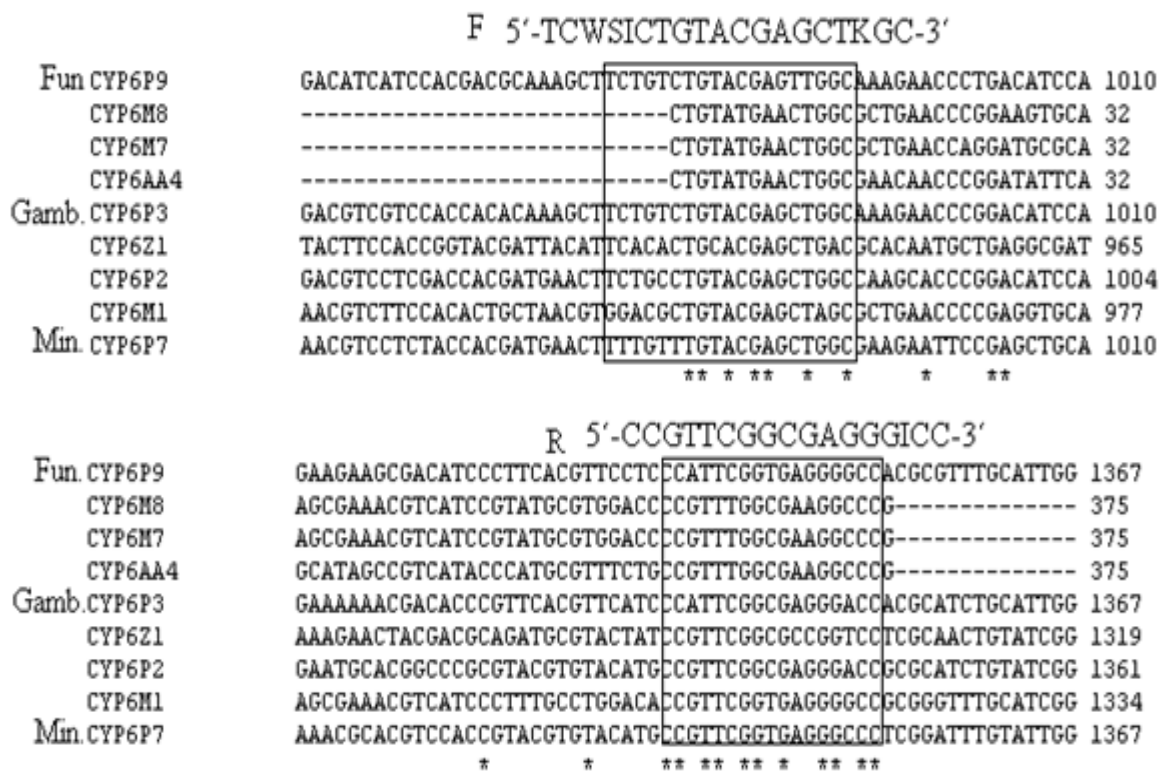
Figura 17. Alineamiento de secuencias de ARNm de la familia CYP6 del orden Díptera.

Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos.
 W:A/T, R: A/G, Y: C/T, S:C/G. F: iniciador “Forward”. R: complemento reverse del iniciador “Reverse”. Fun.: *An. funestus*; Gamb.: *An. gambiae*; Min.: *An. minimus*; Dros.: *D. melanogaster*; Mus.: *M. domestica*; Helio.: *H. virescens*.



(Ramírez, 2009)

Figura 18. Alineamiento de secuencias de ARNm de la familia CYP6 de la familia Culicidae. Los nucleótidos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los nucleótidos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: iniciador “Forward”. R: complemento reverso del iniciador “Reverse” W: A/T, R: A/G, Y: C/T, S: C/G. Fun.: *An. funestus*; Gamb.: *An. gambiae*; Min.: *An. minimus*.



(Ramírez, 2009)

Figura 19. Alineamiento de secuencias de ARNm de la familia CYP9 del superorden Endopterygota. Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. W: A/T, R: A/G, Y: C/T, S:C/G. F: iniciador “Forward”. R: complemento reverso del iniciador “Reverse”. Fun.: *An. funestus*; Gamb.: *An. gambiae*; Cx.: *Cx. quinquefasciatus*; Aed.: *Ae. aegypti*; Dros.: *D. melanogaster*; Helio.: *H. virescens*.

		F 5'-TTYACCGGCAGCAARATGCG-3'		
Fun.	CYP9M3	--TTTACCGGCAGCAAAATGCG	TAGC-ATGTTTGGCCTGCTGAG-----	CAAAGCGC 50
	CYP9J14	-----GCGAAATGCG	TGACCATGTTTCAGCAGGTGGT-----	GGAATGCAG 41
	CYP9J13	-----	CAG--ATGTTTGAAGCTGATGAG-----	CGAAAGCTG 29
	CYP9J12	--TTTACCGGCAGCAAAATGCG	TCTG-ATGTTTGGCCTGATTGC-----	GGAATGCCG 50
	CYP9J11	--TTTACCGGCAGCAAAATGCG	TCAG-ATGTTTGAAGCTGATTGT-----	GGAATGCAG 50
Gamb.	CYP9K1	CCTTTACCGGCAGCAAGATGCG	GGCTA-ATGTTCCGGCTGATCAC-----	GAGCTACTG 488
	CYP9L1	CGTTTACCGGCAGCAAGATGCG	CCAG-ATGTTCCGCATGATCTT-----	GGAGTGCAG 479
Cx.	CYP9C1Cul	CGTTCACCGGCAGCAAGATGCG	GAAAC-ATGTTCCGAGCTGTTGGC-----	GACGTACAG 470
	CYP9B2Cul	CTTTTACGGGTAGCAAAATGAG	GAGGA-ATGTTCCAGTTTATCAC-----	TGATTATTG 500
Aed.	CYP9J1	CTTTCACCGGAAGTCGTATGCG	GCAC-ATGGCCGAGTTGGTGGT-----	CAAATGTGC 557
	CYP9J2	CTTTCACCGGAAGTCGTATGCG	GTAC-ATGGCCGAGTTGGTGGT-----	CAAATGTGC 553
	CYP9H1	CATTTACGGGGAGCAAAATGCG	GATA-ATGTACGACCTGATCCA-----	ATCGTGCAG 470
Dros.	CYP9C1Dro	CTTTCACCGCCTCAAAATCCG	CACAG-ATGTTCCGAGCTCATCCA-----	TTTCTGCAA 584
	CYP9B1Dro	TCITCACGTCGGCCAAGATGCG	AAAC-ATGTTACCCTGATGAACGAGAGCTTCGCTCAA	498
Helio.	CYP9A1V2	CGTTCACCGCTCCAAGATGCG	CCTG-ATGGTGCCTTCATGGA-----	GGAGATCGC 542
			*** *	
		5'-GAYATGGTYGTRTCGGARACRCT-3'		
		R		
Fun.	CYP9M3	ATATCTGGATATGGTGGTGAGCGAAACCTG	-----	765
	CYP9J14	ATATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCTG	-----	756
	CYP9J13	TTATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCTG	-----	744
	CYP9J12	GTATCTGGATATGGTGGTGAGCGAAACCTG	-----	783
	CYP9J11	GTATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCTG	-----	774
Gamb.	CYP9K1	CTATCTGGACATGGTCGCGAACGAGACGCT	CCGCAAAGTGGACACCGGCACCGTTCCCTCGA	1202
	CYP9L1	GTATCTGGATATGGTGTATCGGAAACGCT	ACGCAAAGTGGTCACCATCACCAGGTACC	1211
Cx.	CYP9C1Cul	-----	-----	
	CYP9B2Cul	GTACTTGGACCAAGTCTTACAGAAACTCT	TCGCAAATGGCCCCAGGCGATTTCATCGA	1214
Aed.	CYP9J1	CTACTTGGATATGGTGTATCGGAGACTCT	TCGTAATATCCCACAGCGACTCTGACGGA	1295
	CYP9J2	CTACTTGGATATGGTAGTATCGGAGGCTCT	TCGTAATATCCCACAGCGACTCTGACGGA	1291
	CYP9H1	GTATCTGGACATGGTGGTACTCGAAGCACT	CGTAATGGCCACCATCGATTTCACC	1169
Dros.	CYP9C1Dro	ATATCTGAACTGCGTGGTGTCCGAGTCCGCT	GAGAAAGTGGCCACCGGCTTCATCGTGA	1280
	CYP9B1Dro	CTACATGGACATGGTTCATCTCCGAGTCCCT	TCGAAAGTGGACCCCTTCGGCAGCAGCAGA	1154
Helio.	CYP9A1V2	GTATTTGGATATGGTGGTTTCTGAGGGACT	GCGATTATGGCCCCAGCTGCAGTTGTAGA	1277

(Ramírez, 2009)

B. Justificación

La malaria es una enfermedad parasitaria causada por *Plasmodium* y es transmitida por mosquitos hembras del género *Anopheles*. En Guatemala es transmitida principalmente por *An. albimanus*. Actualmente, el control vectorial se basa en el uso de mosquiteros tratados con piretroides de larga duración y en algunas áreas el rociado intradomiciliar con deltametrina. Sin embargo, en el pasado se ha detectado resistencia a organofosforados (Brogdon, 1992), a piretroides y DDT (Brogdon, 1999) en la costa Sur de Guatemala. Según Hemingway (2000), el desarrollo de resistencia es favorecida por el uso intensivo de insecticidas agrícolas, como es el caso de la costa Sur de Guatemala.

Estudios realizados en insectos, indicaron que mutaciones en el sitio blanco y aumento en la actividad de enzimas desintoxicantes son algunos de los mecanismos responsables de la resistencia a insecticidas: esterasas, citocromos P450, carboxilesterasas y glutatión s-transferasas. Se ha encontrado que enzimas de las familias de citocromo P450 CYP4, CYP6 y CYP9 se encuentran sobre-expresadas en cepas de mosquitos de *An. gambiae*, *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti* resistentes a piretroides.

En poblaciones de *An. albimanus* resistentes a piretroides se han detectado aumentos en la actividad enzimática de los citocromos P450, lo cual hace pensar que es el principal mecanismo de resistencia.

En la literatura solo se conocen secuencias parciales de 17 genes de la familia CYP4 de *An. albimanus* (Scott, 1994) y no hay información de la familia CYP6 y CYP9. Estas otras dos familias han sido relacionadas a la resistencia a piretroides, por lo que es importante analizar la diversidad en *An. albimanus*. Ramírez (2009), realizó una validación *in silico* de iniciadores degenerados publicados por Amenyá *et al.* (2005) para utilizarlos con *An. albimanus* la cual demostró que estos iniciadores podrían ser utilizados. Este trabajo se basó en dicho análisis y permitió obtener secuencias parciales de ADN genómico de genes de estas dos familias de citocromos P450 de *An. albimanus*. También, se determinó su relación filogenética con los citocromos P450 de *An. gambiae*.

Estos resultados permitirán eventualmente poder estudiar la expresión de los genes de los citocromos P450 en cepas de *An. albimanus* resistentes y susceptibles a deltametrina para entender posible mecanismos de resistencia asociados a la expresión de estos genes.

C. Objetivos

1. Objetivo general

Validar *in vivo* iniciadores degenerados para amplificar genes de las familias de citocromos P450 CYP6 y CYP9 en *An. albimanus*.

2. Objetivos específicos

- a. Amplificar los genes de las familias de citocromos P450 CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* por PCR genómico.
- b. Generar una biblioteca de genómica de los genes de las familias de citocromos P450 CYP6 y CYP9 de *An. albimanus*.
- c. Secuenciar los insertos de clones seleccionados de la biblioteca de ADN genómico de genes de las familias de citocromos P450 CYP6 y CYP9 de *An. albimanus*.
- d. Analizar la relación filogenética entre los genes de las familias de citocromos P450 CYP6 y CYP9 amplificados en *An. albimanus* y *An. gambiae*.

II. MARCO METODOLÓGICO

A. Metodología

1. Muestra. Se trabajó con mosquitos hembras *An. albimanus* alimentadas con agua miel y 3 días de edad adulta de la colonia SANARATE mantenida en el insectario (edificio M) del Laboratorio de Entomología y Ecología, Centro de Estudios en Salud, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. Se utilizó como control positivo la mosca adulta *D. melanogaster* proporcionada por Colecciones de Referencia del Departamento de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala.

2. Extracción de ADN genómico. Se extrajo ADN genómico de 5 mosquitos hembras *An. albimanus* y 5 moscas *D. melanogaster* (sin cabeza), según el método descrito en Collins *et al.* (1987) y las muestras se almacenaron a -20°C . La concentración y pureza (A_{260}/A_{280} : 1.7 a 1.9) del ADN genómico se determinó por espectrofotometría UV-Visible midiendo absorbancia a 260nm y 280nm.

3. PCR genómico de la familia CYP6 y CYP9. Se amplificaron genes de las familias CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* y *D. melanogaster* empleando los iniciadores degenerados (Cuadro 1) publicados por Ameyna *et al.*, 2005 (iniciador “Reverse” para la familia CYP9 rediseñado por Ramírez, 2009) y el PCR Master Mix 2X M7505 (Promega), según instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción y el programa de amplificación se detallan en el Cuadro 2 y 3. Los productos del PCR genómico fueron expuestos a 100V por 30min en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron con la tinción de bromuro de etidio en el transiluminador UV Transilluminator UVP M-20. Se esperaban bandas aproximadamente entre un rango de 432 a 512pb para CYP6 y 750 a 782pb para CYP9 (Ameyna *et al.*, 2005) en el caso de *An. albimanus*; mientras que para *D. melanogaster*, se esperaban bandas aproximadamente entre un rango de 600 a 800pb para CYP6 y 800 a 1000pb para CYP9.

Cuadro 1. Iniciadores degenerados publicados por Ameyna *et al.* (2005) para amplificar genes de las familias CYP6 y CYP9 de citocromo P450.

Familia	Iniciador "Forward" (5'-3')	Iniciador "Reverse" (5'-3')
CYP6	TCWSICTGTACGAGCTKGC	GGICCCTCGCCGAACGG
CYP9	TTYACCGGCAGCAARATGCG	AGYGTYTCSWYACRACCATRTC*

Según la nomenclatura de NC-IUB(2008): W(A/T), S(C/G), K(G/T), Y(C/T) y R(G/A).

*Iniciador "Reverse" rediseñado con base al publicado por Ameyna *et al.* (2005) por Ramírez (2009).

Cuadro 2. Mezcla de reacción para el PCR genómico de la familia CYP6 y CYP9.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 1 reacción (uL)
Agua DEPC	-----	-----	5.5
Master Mix	2X	1X	7.5
CYP_F	15uM	0.5uM	0.5
CYP_R	15uM	0.5Um	0.5
ADN	-----	-----	1
Total			15

Cuadro 3. Programa de amplificación del PCR genómico de la familia CYP6 y CYP9*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	15 min	1
Desnaturalización	94	1 min	35
Hibridización	55	30 seg	
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	10 min	1

*Termociclador Eppendorf Mastercycler Personal.

4. Clonación de los productos del PCR genómico de la familia CYP6 y CYP9. Los productos del PCR genómico de la familia CYP6 y CYP9 fueron clonados utilizando el TA Cloning Kit (vector pCR2.1) con células *E. coli* competentes INVαF' (Invitrogen), según instrucciones del fabricante. Las células competentes INVαF' se recuperaron en agar LB suplementado con ampicilina 100ug/mL y X-gal 40mg/mL. Se consideraron como células transformadas las células blancas (clones CYP6 y CYP9) y las azules como células no transformadas. Los clones obtenidos se recuperaron en agar LB suplementado con ampicilina 100ug/mL y X-gal 40mg/mL por 24h a 37°C y se almacenaron a 4°C.

5. Extracción de plásmido y verificación del inserto de los clones CYP6 y CYP9. La extracción del vector pCR2.1 (plásmido pUC19) de los clones obtenidos se realizó por el

método de lisis alcalina (Ausubel *et al.*, 1999) y fueron purificados con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y resuspendidos en agua DEPC (Gene Choice). La concentración y pureza (A_{260}/A_{280} : 1.7 a 1.9) de los plásmidos fueron determinadas por espectrofotometría UV-Visible a 260nm y 280nm. Posteriormente, la presencia del inserto en el plásmido se verificó por PCR utilizando los iniciadores degenerados de la familia CYP6 y CYP9. La mezcla de reacción y el programa de amplificación se detallan en el Cuadro 2 y 3. Los productos de PCR fueron expuestos a 100V por 30min en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron con la tinción de bromuro de etidio en el transiluminador UV Transilluminator UVP M-20. Los clones que presentaron bandas del tamaño esperado para la familia CYP6 y CYP9, fueron seleccionados para generar una biblioteca genómica y secuenciación.

6. Generación de una biblioteca genómica de la familia CYP6 y CYP9. Los clones seleccionados de *An. albimanus* fueron inoculados en caldo LB suplementado con ampicilina 100ug/mL e incubados a 37°C por 24 h. Se preparó una mezcla de caldo LB (85%) de cada clon con glicerol (15%) en crioviales, los cuales fueron identificados con un código correspondiente a cada clon y almacenados a -70°C.

7. Secuenciación de los clones de las familia CYP6 y CYP9. Los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* y *D. melanogaster* con una pureza entre 1.8 y 2.0, fueron diluidos a 100ng/uL. Estos se enviaron a MACROGEN para la secuenciación de la reacción “Forward” utilizando el iniciador M13 “Forward” (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3').

8. Análisis de resultados. Las secuencias “Forward” de ADN genómico de los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* y *D. melanogaster* fueron editadas para eliminar secuencia del vector pUC19 utilizando la herramienta VecScreen del sitio NCBI (National Center for Biotechnology Information), <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Dichas secuencias fueron comparadas con la base de datos de *An. gambiae*, *An. funestus* y *An. minimus* del GenBank utilizando la herramienta “Nucleotide BLAST (Basic Local

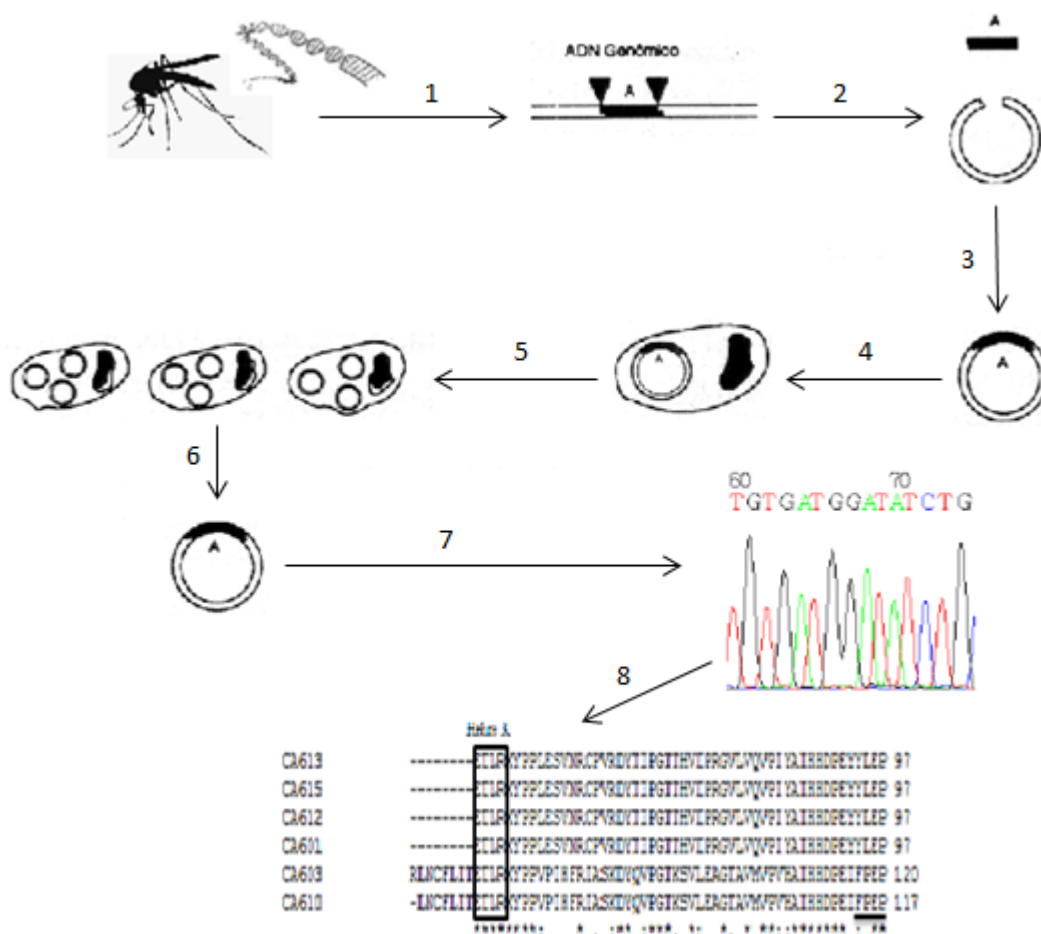
Alignment Search Tool)” del sitio NCBI. Las secuencias que no coincidían con algún citocromo CYP6 y CYP9 fueron excluidas del análisis.

Posteriormente, las secuencias fueron comparadas con la base de datos de *Anopheles* mediante la herramienta “BLASTX” del sitio web <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html> (Nelson, 2009). Se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de cada clon por el “BLASTX” y se determinó la presencia del dominio conservado de la superfamilia P450 utilizando la herramienta “Conserved Domain Search Service” del sitio NCBI. Seguidamente, se eliminó la secuencia introducida por los iniciadores y se realizaron alineamientos de estas secuencias con sus citocromos homólogos utilizando la herramienta ClustalW2 del sitio EBI (European Bioinformatics Institute), <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, optimizada con un valor de 10 para “Gap open” y 0.1 para “Gap extensión”. Con base a los alineamientos, se generaron los respectivos arboles filogenéticos tipo UPGMA por el método bootstrap con un valor de 1000 réplicas utilizando el programa MEGA 5.0 (Kumar *et. al.*, 2011).

Adicionalmente, se diseñaron iniciadores “Forward” degenerados para la familia CYP6 y CYP9 de *An. albimanus*. Para esto, se establecieron las regiones conservadas y las variaciones en la secuencias de aminoácidos para cada familia. Seguidamente, se determinó la secuencia de ADN que codificaba dichas regiones de aminoácidos. Con base a estas secuencias nucleotídicas, se propusieron los iniciadores “Forward” degenerados y los nucleótidos que variaban fueron nombrados con base a la nomenclatura de NC-IUB (2008).

9. Diagrama de metodología

Figura 21. Metodología del estudio.



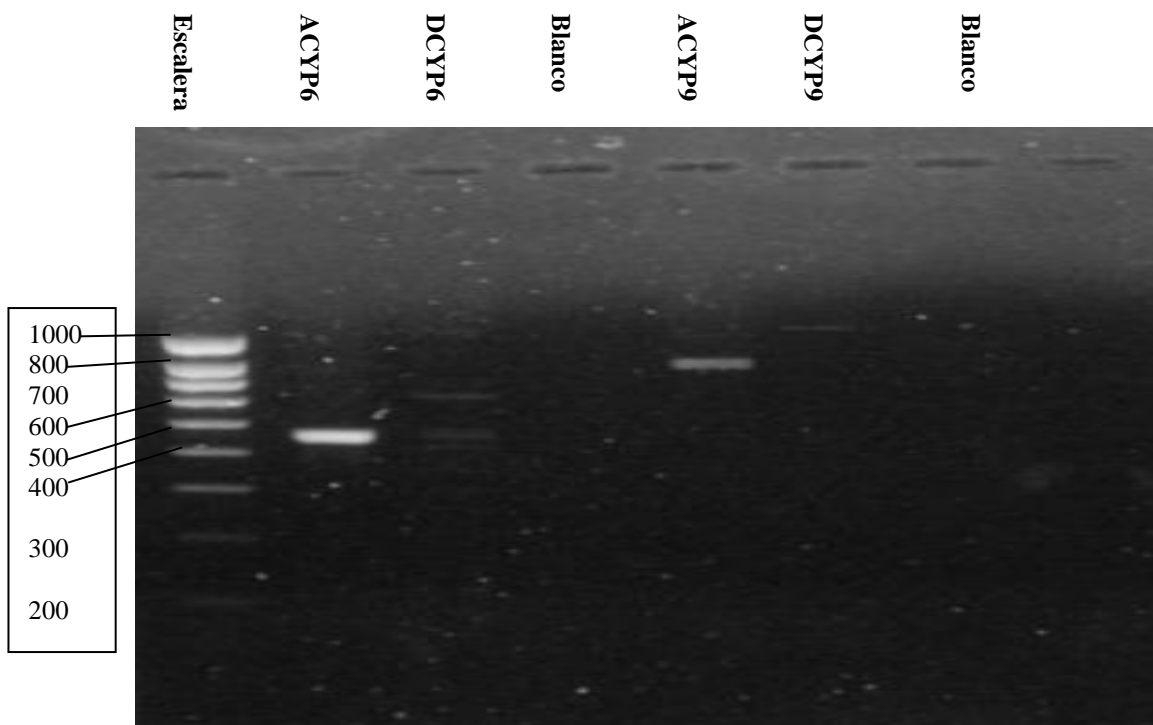
Extracción de ADN genómico de mosquito hembras *An. albimanus* (*D. melanogaster*, control positivo) por el método de Collins *et al.* (1987) y cuantificación por espectrofotometría UV (1). Amplificación de los genes de la familia CYP6 y CYP9 de citocromo P450 (2) utilizando los iniciadores degenerados publicados por Amenyá *et al.* (2005). Ligación (3) de los productos de PCR al plásmido pUC19 (TA Cloning kit, Invitrogen) y transformación (4) de células *E. coli* competentes con el plásmido recombinante (TA Cloning kit, Invitrogen). Recuperación de las células transformadas en agar LB suplementados con X-Gal 40mg/mL y Ampicilina 100mg/mL (5). Extracción del plásmido recombinante de los clones por lisis alcalina (Ausubel *et al.*, 1999),

purificación con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y cuantificación por espectrofotometría UV (6). Secuenciación de la reacción “Forward” de los plásmidos de los clones utilizando el iniciador M13F (7). Edición Las secuencias “Forward” de los iniciadores de la familia CYP6 y CYP9 (VecScreen, NCBI), análisis a nivel de ADN (Nucleotide BLAST "More dissimilar sequences", NCBI) y aminoácidos (BLASTX, Nelsón, 2009; Conserved Domain Search Service, NCBI) (8). Alineamiento de aminoácidos (ClustalW2, EBI) y análisis filogenético (MEGA 5.0) (9).

III. RESULTADOS

La validación de los iniciadores degenerados requirió la optimización de las condiciones de amplificación del PCR genómico de la familia CYP6 y CYP9. La optimización indicó que una muestra de ADN diluida 1/10 de *An. Albimanus* o *D. melanogaster* y una temperatura de alineamiento de 55°C (Ver Figura 28 y 29, anexos) fueron eficientes para amplificar bandas de los tamaños esperados. En la Figura 22, se observan los productos de amplificación del PCR genómico de la familia CYP6 y CYP9 bajo las condiciones establecidas. En el caso de *An. albimanus* se amplificó una banda aproximadamente de 450pb para CYP6 y una de 800pb para CYP9; mientras que se amplificó una banda de 450pb y otra entre 600 a 700pb para CYP6 y una de 1000pb para CYP9 en *D. melanogaster*.

Figura 22. Productos de amplificación de los genes de la familia CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* y *D. melanogaster* por PCR genómico. Escalera 100pb DNA Ladder II (Gene Choice); A: *An. albimanus*; D: *D. melanogaster*; CYP: citocromo P450, 6: familia 6, 9: familia 9.



Los productos del PCR genómico de la familia CYP6 y CYP9 fueron clonados y se obtuvieron 17 clones de la familia CYP6 y 12 clones de la familia CYP9 (Ver Cuadro 6 y 7, anexos). Los clones CYP6 y CYP9 fueron analizados con los iniciadores degenerados para verificar la presencia del inserto en el plásmido (Ver Figura 30 a la 32, anexos). Los productos de amplificación de cada clon, indicaron que los clones contenían insertos del tamaño esperado para ambas familias. Posteriormente, se obtuvo la secuencia “Forward” de 13 de estos clones.

Las secuencias de ADN genómico editadas de los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* fueron comparadas contra la base de datos de *Anopheles* del sitio web de citocromo P450 del Dr. Nelson (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>) mediante la herramienta “BLASTX”. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 4. Como puede observarse, para los clones CYP6 el porcentaje de similitud de aminoácidos varía entre un rango de 68 a 72, y el de CYP9 de 72 a 80. Esto sugiere que los fragmentos amplificados sí corresponden a genes de la familia CYP6 y CYP9 de citocromo P450, según la regla de nomenclatura de Nelson *et. al.*, 1996.

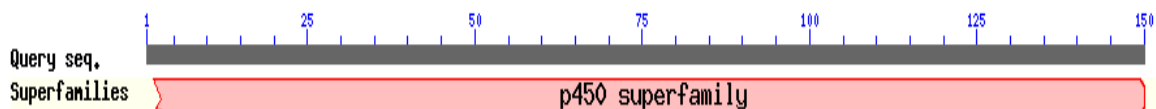
Cuadro 4. Análisis “BLASTX” de las secuencias de ADN genómico de los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* contra la base de datos de *Anopheles gambiae*.

Clon	Tamaño de secuencia (aa*)	Citocromo homólogo de <i>An. gambiae</i>	Puntuación	Valor E	Porcentaje de similitud de aminoácidos (%)
CA601	124	CYP6P4	126	8e-48	68
CA603	150	CYP6M2	223	4e-61	72
CA610	149	CYP6M2	221	1e-60	72
CA612	124	CYP6P4	126	8e-48	68
CA613	124	CYP6P4	126	8e-48	68
CA615	124	CYP6P4	126	8e-48	68
CA904	76	CYP9M2	126	2e-32	80
CA906	253	CYP9M1	380	e-108	75
CA909	262	CYP9J3	381	e-108	72

aa: aminoácidos

Según el análisis a nivel de aminoácidos de los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus*, todas las secuencias presentaron el dominio putativo conservado de la superfamilia P450 corroborando los resultados del “BLASTX” (Figura 23).

Figura 23. Dominio putativo conservado de la superfamilia P450 de las secuencias de aminoácidos de los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus*.



Se realizaron alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los clones CYP6 y CYP9 por separado para establecer regiones conservadas mediante ClustalW2 (Figura 24 y 25). Se identificó el dominio EXXR en los clones CYP6 y CY9, y el FXXGXRXCXG solo en los clones CYP6. Otras regiones conservadas para la familia CYP6 fueron YXX(P/D) y PERF. Los clones CA603 y CA610 fueron los únicos que presentaron una región no homóloga al resto de las secuencias de los clones CYP6.

Figura 24. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de los clones CYP6 de *An. albimanus*. Dominios y regiones conservadas de la familia de citocromo P450 encerrados en un rectángulo y resaltados con una línea en negrita. Los residuos similares y altamente conservados están señalados por dos puntos y asteriscos.

```

CA613      -LYELAKNPDIQERLREEINGAIEANGGQLTYDVAMNIAAYLDQVIN----- 45
CA615      -LYELAKNPDIQERLREEINGAIEANGGQLTYDVAMNIAAYLDQVIN----- 45
CA612      -LYELAKNPDIQERLREEINGAIEANGGQLTYDVAMNIAAYLDQVIN----- 45
CA601      -LYELAKNPDIQERLREEINGAIEANGGQLTYDVAMNIAAYLDQVIN----- 45
CA603      TLYELALNQDVQEKGRQCVREVLERHDGKMSYEAVVEMKYLDQILNGNVS RGMPLGSKQL 60
CA610      -LYELALNQDVQEKGRQCVREVLERHDGKMSYEAVVEMKYLDQILNG-FPRGMPLGSKQL 58
          ***** * *:***: * :. .:* :.*::*:.....: *****: * Región no homóloga
          Hélice K
CA613      -----ETLRKYPPLESVNRC PVRDYTIIPGTTTHVIPRGVLVQVPIYAIHHDPEYYLEP 97
CA615      -----ETLRKYPPLESVNRC PVRDYTIIPGTTTHVIPRGVLVQVPIYAIHHDPEYYLEP 97
CA612      -----ETLRKYPPLESVNRC PVRDYTIIPGTTTHVIPRGVLVQVPIYAIHHDPEYYLEP 97
CA601      -----ETLRKYPPLESVNRC PVRDYTIIPGTTTHVIPRGVLVQVPIYAIHHDPEYYLEP 97
CA603      RLNCFLITETLRKYPPVPIHFRIASKDYQVPGTKSVLEAGTAVMVPVHAIHHDPEIFPEP 120
CA610      -LNCFLITETLRKYPPVPIHFRIASKDYQVPGTKSVLEAGTAVMVPVHAIHHDPEIFPEP 117
          *****: * . :** :***. *: * . * **::*****: **
          Región de unión al grupo hemo
CA613      ERFDPDRFTEEAVKARVPYTFLEFGEG 124
CA615      ERFDPDRFTEEAVKARVPYTFLEFGEG 124
CA612      ERFDPDRFTEEAVKARVPYTFLEFGEG 124
CA601      ERFDPDRFTEEAVKARVPYTFLEFGEG 124
CA603      ARYDPERFSPEEESKRHPYAWTFEGEG 147
CA610      SRYDPERFSPEEESKRHPYAWTFEGEG 144
          *::***: * . * **:: *****
          Firma de clado

```

Figura 25. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de los clones CYP9 de *An. albimanus*. Dominios conservados de la familia P450 encerrados en un rectángulo. Los residuos similares y altamente conservados están señalados por dos puntos y asteriscos.

```

CA904      -----
CA906      FTGSKMRNMFVLIKSKSAGDAMERLVA---YSKGEPFAMELRDLYSRLGNDAMT SISFGV 56
CA909      FTGSKMRIMFELIAECGQSMVDHLRSEEARQAAGSGLQLEMKDVMSRFGNDVIGTAAFGI 60

CA904      -----
CA906      EVDSLTDNRDNEFFLKGGKRLAQIDG-WPGFKLLLSGMPWLLRWLHIGLLYKDVNEFYLEA 115
CA909      KVDSFPRENEFISMARSIMNQSPVKVIKMMGFSLFPKLSRLKIDFLSKEEDRFFRQT 120

CA904      -----
CA906      VSMNIRHRLQNLIKRPFDFIHLLLQARKDELCCQEEDASLES-----AGFSMATTHAVDGD 170
CA909      ITETMRVRQEKGI FRPDMIELLMQAKKGS LKHQQEGEGEEKKSGTETEEGFATVEESQIGRR 180

CA904      -----WEDIDITAAGASFFFGGIETTTLLCFASYELAINPSIQNRLREEIDEVREGLPD 55
CA906      GERLEWQDIDITAAAVSFFFGGIETTATLLCFMSYELAVNPSIQNRLRLREIDSVRGELAD 230
CA909      AHDRAWTDSELIAQAFIFFFAGYETVSWSISFALYELAVAEDIQRKLREEIDEATEATLAD 240
          * * :: * . ***.* **.: :.* *****: .**.:** **... *.*
          * * :: * . ***.* **.: :.* *****: .**.:** **... *.*

          Hélice K
CA904      RKTPTYEVLQKMKYLDMVVIE- 76
CA906      GVTPTYEVPQKMKYLDMVVIET 252
CA909      GAVIDYEKLQSMRYMDMVVIET 262
          . ** *.*:*****

```

Seguidamente se estableció la relación filogenética entre los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* con los citocromos homólogos de *An. gambiae*. Para esto, se realizaron alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los clones CYP6 y CYP9 con sus citocromos homólogos (Ver Figura 57 y 58, anexos) mediante ClustalW2. Con base a estos alineamientos, se generaron árboles filogenéticos tipo UPGMA por el método bootstrap con un valor de 1000 réplicas utilizando el programa MEGA 5.0. Como outgroup se utilizó el CYP303A1 de *D. melanogaster*. Los árboles filogenéticos consenso de los clones CYP6 y CYP9 se muestran en la Figura 26 y 27. Como puede observarse, estos árboles corroboraron los resultados del “BLASTX” de los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* (Cuadro 4) e indican que son ortólogos a los citocromos homólogos de *An. gambiae*.

Figura 26. Árbol filogenético tipo UPGMA de la relación entre *An. albimanus* y *An. gambiae* de la familia CYP6 de citocromo P450. Las secuencias de *An. albimanus* son designadas con la letra a, las de *An. gambiae* con la g y *D. melanogaster* con la d.

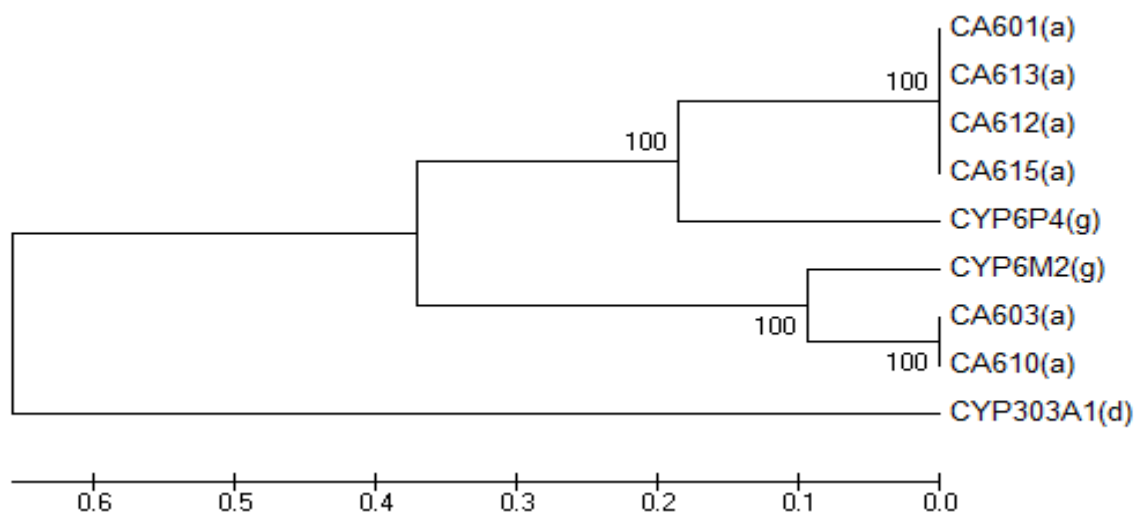
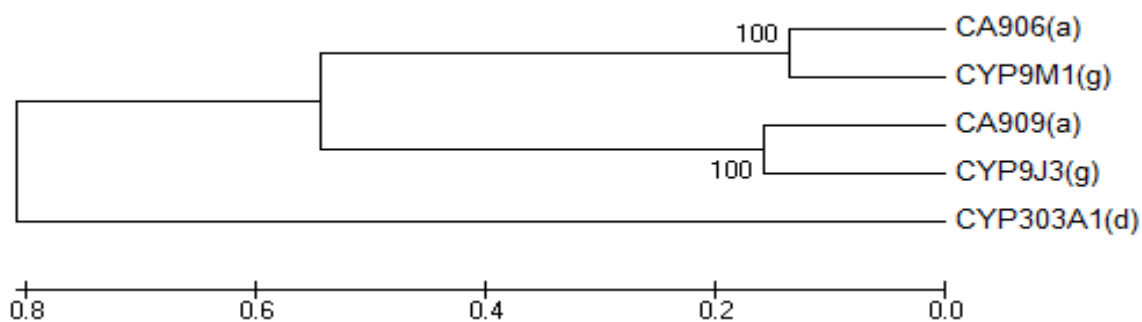


Figura 27. Árbol filogenético tipo UPGMA de la relación entre *An. albimanus* y *An. gambiae* de la familia CYP9 de citocromo P450. Las secuencias de *An. albimanus* son designadas con la letra a, las de *An. gambiae* con la g y *D. melanogaster* con la d.



Finalmente, con base en las regiones conservadas de aminoácidos de los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* se propusieron iniciadores “Forward” degenerados para amplificar a partir de ARNm (Cuadro 5). En el caso de la familia CYP6, el iniciador “Forward” 1 fue diseñado con base a la región YLDQ(V/D)(I/L)N, el “Forward” 2 con base a DY(T/Q)(I/V)PGT y el “Forward” 3 con base en VP(I/V)(Y/H)AI. Para la familia CYP9, el iniciador “Forward” 1 fue diseñado con base a la región FFF(G/A)G(I/Y)E y el “Forward” 2 con base en IQ(N/R)(R/G)L.

Cuadro 5. Iniciadores “Forward” degenerados para amplificar genes de las familias CYP6 y CYP9 citocromo P450 en *An. albimanus* por RT-PCR.

Familia	Iniciador “Forward” (5′-3′)
CYP6	1) ATGGASCTAGTTYAGKAKTTA 2) CTAATRKKYYWWGGGCCG 3) CAMGGSYAKRTGSGSTAG
CYP9	1) AAGAARAAGCSDCCGWWG 2) TAGCTCKYSKYWRAC

Según la nomenclatura de NC-IUB(2008): W(A/T), S(C/G), K(G/T), Y(C/T), M(A/C), D(A/G/T) y R(G/A).

IV. DISCUSIÓN

Estudios realizados en Guatemala, indican que la resistencia a piretroides, organofosforados y organoclorados en *An. albimanus* es mediada principalmente por enzimas de la familia de citocromos P450 y esterasas (Beach y Cordón-Rosales, 1989; Brogdon *et al.*, 1992; Brogdon *et al.*, 1999 y Penilla *et al.*, 2007), aunque no se descarta el desarrollo de resistencia por mutaciones en el sitio blanco como el gen *kdr*. Los genes de las familias de citocromos P450 en *An. albimanus* han sido poco estudiadas, ya que en la literatura solo se cuenta con 17 secuencias parciales de genes de la familia CYP4 (Scott, 1994). Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue la validación *in vivo* de iniciadores degenerados para amplificar genes de las familias de citocromo P450 CYP6 y CYP9 en *An. albimanus*. Estos resultados podrían ser útiles en el futuro para el estudio de estos genes en la resistencia a insecticidas.

La validación *in vivo* de los iniciadores degenerados para la familia CYP6 y CYP9, se realizó por amplificación por PCR genómico, clonación de los productos de PCR, secuenciación de los clones, análisis de secuencias y filogenia.

Los iniciadores degenerados de la familia CYP6 y CYP9 a validar fueron diseñados para amplificar ADNc a partir de ARNm. Los iniciadores degenerados también amplifican a partir de ADN genómico según Amenya *et al.*, 2005. Por lo tanto, se realizó la validación a partir de ADN genómico de *An. albimanus*.

Las secuencias nucleotídicas de los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* obtenidas fueron editadas y comparadas con la base de datos de *An. gambiae*, *An. funestus* y *An. minimus* del GenBank (Ver Cuadro 8, anexos) mediante “Nucleotide BLAST”. Se obtuvieron valores mayores al 50% para el rango de consulta e identidad máxima, lo cual indicaba similitud con genes de las familias CYP6 y CYP9 de otros anofelinos. En el caso de los clones CA602 y CA611, fueron descartados del análisis por mala calidad de la secuencia, según el electroferograma (Ver Figura 34 y 37, anexos).

El “Nucleotide BLAST” realizado de los clones de *D. melanogaster*, indicó que estos no tenían homología con ningún citocromo reportado para esta especie. Por lo que se cree, que estos iniciadores degenerados no fueron aptos para amplificar la familia CYP6 y CYP9 a nivel de orden como se esperaba, ya que estos fueron diseñados con base a secuencias del mosquito *An. gambiae* y pudieron amplificar otros genes. La elección de este insecto, se basó en que fue utilizado para la validación *in silico* tanto para la familia CYP6 y CYP9 y era el que estaba más al alcance. Se realizó un “Nucleotide BLAST” de los iniciadores degenerados de la familia CYP6 y CYP9 contra secuencias de ADNc de citocromos CYP6 y CYP9 de *D. melanogaster* (Ver Cuadro 9 y 10, anexos). Los resultados indicaron que los iniciadores degenerados no se hibridaron completamente, en algunos casos solo se hibridizó el iniciador “Forward” o el “Reverse”, y otros donde no se hibridizó ninguno. Esto confirma que los iniciadores no amplificarían en *D. melanogaster* y por tanto sugieren que no serían útiles a nivel de orden.

Debido a que la identidad de los citocromos P450 se establece con base al porcentaje de similitud de aminoácidos, se realizó un “BLASTX” de los clones CYP6 y CYP9 (Ver Cuadro 4, resultados). Éste reveló que los clones tenían un porcentaje de similitud de aminoácidos mayor al 60% con los citocromos homólogos. Según el sistema de nomenclatura de los citocromos P450, los citocromos de una misma familia muestran un porcentaje de similitud de aminoácidos mayor al 40% y los de una misma subfamilia mayor al 55% (Nelson *et. al.*, 1996). Por lo tanto, se puede decir que se obtuvieron secuencias parciales de 2 genes de la familia CYP6 (subfamilia P y M) y 2 de la familia CYP9 (subfamilia M y J) en *An. albimanus*. Aunque, esto no significa que solo estas subfamilias y genes existan en *An. albimanus* ya que aún hay clones de *An. albimanus* pendientes de secuenciar. También se ha pensado, que la optimización pudo haber eliminado otros citocromos ya que las condiciones de amplificación presentaron preferencia por los citocromos identificados en el presente trabajo.

La longitud promedio de las secuencia de aminoácidos de los clones CYP6 fue de 130 aminoácidos y para los clones CYP9 fue de 257 aminoácidos, lo cual corresponde a la cuarta parte del tamaño total de aminoácidos de genes de la familia CYP6 y la mitad para

la familia CYP9 (Ver Cuadro 4, resultados). Sin embargo, la longitud de aminoácidos del clon CA904 fue de 75 aminoácidos. Al comparar la longitud de la secuencia de ADN genómico del clon CA904 con los resultados de la confirmación del inserto en cada clon (Ver Figura 32, anexos), éste debería tener un tamaño de 700pb aproximadamente dando una longitud de aminoácidos parecida a los otros clones CYP9. Esto probablemente sea el resultado de la degradación de la muestra de ADN del clon CA904 antes de la secuenciación, por lo que se debería volver a extraer el plásmido del clon y secuenciarlo nuevamente para corroborar los resultados de este clon.

Seguidamente, se realizaron alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus*. De los tres dominios altamente conservados en la familia de citocromo P450 (Werck-Reichert y Feyereisen, 2000), se identificó el de la región de unión al grupo hemo y hélice K (Ver Figura 24 y 25, resultados). El dominio EXXR identificado en los clones CYP6 está involucrado en la estabilización de la estructura base de los citocromos P450 y sitio de transferencia de protones al grupo hemo. Otro dominio identificado fue PERF, el cual puede variar en PSRF, PDNF y PQRW (Nelson, 2004). En los clones CYP6 se identificó PERF y la variación PDRF (identificada en *An. funestus* por Amenia *et. al.*, 2005). Este dominio se caracteriza por ser la firma del clado 3, al que pertenecen la familia CYP6 y CYP9.

En el caso de los clones CYP9 solo se identificó la parte ET del dominio ETLR (Ver Figura 25, resultados). En *An. funestus*, el dominio ETLR fue acortado a ETL (Amenya *et al.*, 2005). Esto probablemente pudo ser efecto de los iniciadores degenerados y no de que el dominio altamente conservado haya sido acortado. Para confirmar los resultados, es necesario obtener la secuencia completa de la región C terminal de los clones CYP9.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los clones CYP6 de *An. albimanus* (Ver Figura 24 y 25, resultados) indicó que los clones CA601, CA612, CA613 y CA615 son idénticas entre sí, y por tanto corresponden a la misma región del gen. En cambio, los clones CA603 y CA610 muestran alta similitud entre ellos pero difieren en un aminoácido. Esta variación en un solo aminoácido entre estos clones indica que pueden

ser alelos del mismo gen. Al analizar los electroferogramas de estos clones, se determinó que no fue un error de lectura del secuenciador lo que respalda la teoría de variación alélica. También, se identificó una región no homóloga en los clones CYP6 (CA603 y CA610) la cual puede ser resultado de un intrón ya que se amplificó a partir de ADN genómico. Aunque, es necesario obtener las secuencias de ADNc de estos genes de *An. albimanus* para poder establecer la presencia de intrones.

Finalmente, se estableció la relación de los genes de citocromo P450 entre *An. albimanus* y *An. gambiae* por análisis filogenético molecular. La filogenia de mosquitos del género *Anopheles* ha sido muy poco estudiada, debido a que no se ha secuenciado el genoma de todas las especies que lo conforman (excepción de *An. gambiae*). Se han realizado análisis filogenéticos con base a secuencias de ADN mitocondrial y ribosomal (Sallum *et al.*, 2002) y características morfológicas (Sallum *et al.*, 2000; Harbach y Kitching, 2005) de diferentes especies del género de *Anopheles*. Estos ubican a *An. albimanus* en el subgénero *Nyssorhynchus* el cual está separado del subgénero *Cellia* (*An. gambiae* y *An. funestus*) por 2 subgéneros. Amenity *et al.* (2005) reportó que existía una alta similitud y baja divergencia entre los genes de la familia CYP4, CYP6 y CYP9 de citocromo P450 entre *An. gambiae* y *An. funestus*.

Los árboles filogenéticos generados en este estudio de los genes de la familia CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* y *An. gambiae* (Ver Figura 26 y 27, resultados) reveló que había similitud entre estos por lo que se consideraron genes ortólogos. Los valores bootstrap de 100 para los genes ortólogos, indicaron que la divergencia entre los genes en las dos especies fue baja a pesar que estas dos especies están separadas geográficamente. Lo cual hace pensar, que estos genes a nivel de género se han conservado y por lo tanto estos mismos iniciadores podrían utilizarse para amplificar genes de la familia CYP6 y CYP9 en otros vectores de la malaria.

Adicionalmente, se propusieron iniciadores “Forward” degenerados a partir de regiones conservadas de aminoácidos de las secuencias parciales de los citocromos de las familias CYP6 y CYP9 amplificados en *An. albimanus* (Ver Cuadro 5, resultados). Se

planea utilizar estos iniciadores “Forward” en conjunto con un iniciador oligo d(T), para amplificar la región C terminal de los citocromos P450. Lo cual permitirá amplificar una mayor región y diversidad de citocromos de estas familias en *An. albimanus*.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se lograron amplificar genes de la subfamilia P y M para la familia CYP6 y subfamilia M y J para la familia CYP9 de citocromo P450 en *An. albimanus* utilizando los iniciadores degenerados publicados por Amenyá *et al.* (2005) y modificados por Ramírez (2009).

Se generó una biblioteca genómica de los genes de las familias de citocromo P450 CYP6 y CYP9 amplificados en *An. albimanus*.

Se estableció que los genes de las familias CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* son ortólogos a los genes de *An. gambiae*.

Se comprobó que los iniciadores degenerados se pueden utilizar para amplificar genes de las familias de citocromo P450 CYP6 y CYP9 en otros vectores de la malaria, como *An. albimanus* a partir de ADN genómico.

Se recomienda secuenciar la reacción “Reverse” de los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* analizadas. También, se recomienda secuenciar los clones restantes para determinar la identidad de éstos.

Se recomienda amplificar los genes de las familias de citocromo P450 CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* a partir de ARN para obtener la secuencia del gen funcional (ADNc) y establecer presencia de intrones.

Se recomienda validar in silico los iniciadores “Forward” degenerados propuestos para la familia CYP6 y CYP9 de *An. albimanus*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M.; Celniker, S. y Holt, R. 2000. *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. Science, 287: 2185-2195.
- Amenya, D.; Koekemoer, L.; Vaughan, A.; Morgan, J.; Brooke, B.; Hunt, R.; Ranson, H.; Hemingway, J. y Coetzee, M. 2005. *Isolation and sequence analysis of P450 genes from a pyrethroid resistant colony of the major malaria vector Anopheles funestus*. DNA Sequence, 16(6): 437-445.
- ANLIS. 2009. *Malaria*. [Web en línea] en: <<http://www.anlis.gov.ar/consulta/infecciosas/malaria/malaria.htm>> [consultado el 14 de septiembre del 2010].
- Ausubel, F.; Brent, R.; Kingston, R.; Moore, D.; Seidman, J.; Smith, J. y Struhl, K. 1999. *Short Protocols in Molecular Biology*. Fourth edition. Published by John Wiley & Sons, Inc. pp. 1200.
- Beach, R. y Cerdón-Rosales, C. 1989. *Detoxifying esterases may limit use of pyrethroids for malaria vector control in the Americas*. Parasitology Today, 5(10): 326-327.
- Beach, R.; Brogdon, W.; Castañaza, L.; Cerdón-Rosales, C. y Calderón, M. 1989. *Effect of temperature on an enzyme assay to detect fenitrothion resistance in Anopheles albimanus mosquitoes*. Bulletin of the World Health Organization, 67(2): 203-208.
- Belzabel, T. 2001. *Diagnóstico situacional del uso del DDT y el control de la malaria*. [Web en línea] en: <<http://www.cepis.org.pe/bvsdepl/fulltext/ddt/GUT.pdf>> [consultado el 14 de septiembre del 2010].
- Berge, J.; Feyereisen, R. y Amichot, M. 1998. *Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, 353: 1701-1705.
- Bisset, A. 2002. *Uso correcto de insecticidas: control de resistencia*. Revista Cubana de Medicina Tropical, 54(3): 202-219.
- Bloiland, P. 2001. Drug resistance in malaria. OMS.
- Brattsten, L. 1990. *Resistance mechanisms to carbamate and organophosphate insecticide*. In: Managing resistance to agrochemicals. American Chemical Society [Washington, D.C.]: 24-60.
- Brogdon, W.; Beach, R.; Barber, A. y Cerdón-Rosales, C. 1992. *A generalized approach to detection of organophosphate resistance in mosquitoes*. Medical and Veterinary Entomology, 6: 110-114.

- Brogdon, W. y McAllister J. 1998a. *Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles*. Journal of the American Mosquito Control Association 14: 159-164.
- Brogdon W. y McAllister J. 1998b. *Insecticide resistance and vector control*. Emerging Infectious Diseases, 4(4): octubre-diciembre.
- Brogdon, W.; McAllister, J.; Corwin, A. y Cordón-Rosales, C. 1999. *Oxidase-Based DDT-Pyrethroid Cross-Resistance in Guatemalan Anopheles albimanus*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 64: 101-111.
- Brun, A.; Cuany, A.; Le Mouel, T.; Berge, J. y Amichot, M. 1996. *Inducibility of the Drosophila melanogaster cytochrome P450 gene, CYP6A2, by phenobarbital in insecticide susceptible or resistant strains*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 26(7): 697-703.
- CDC (1). 2010. *About Malaria*. [Web en línea] en: <http://www.cdc.gov/malaria/about/faqs.html> [consultado el 2 de Agosto del 2010].
- CDC (2). 2010. *Malaria's Impact*. [Web en línea] en: http://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html [consultado el 2 de agosto del 2010].
- CDC (3). 2010. *Malaria Worldwide: Diagnosis and Treatment*. [Web en línea] en: http://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/dx_tx.html [consultado el 2 de agosto del 2010].
- CDC (4). 2010. *Vector control*. [Web en línea] en: http://www.cdc.gov/malaria/control_prevention/vector_control.htm [consultado el 2 de agosto del 2010].
- Chaverri, G. 2003. *Mosquito de la Malaria: An. albimanus*. [Web en línea] en: <http://darnis.inbio.ac.cr/ubis/FMPro?-DB=UBIPUB.fp3&-lay=WebAll&-error=norec.html&-Format=detail.html&-Op=eq&id=4934&-Find> [consultado el 14 de septiembre del 2010].
- CINU (Centro de Información de las Naciones Unidas). 2008. *Combatiendo la malaria*. [Web en línea] en: http://www.cinu.org.mx/prensa/especiales/2008/combatiendo_la_malaria/antecedentes.html [consultado el 18 de septiembre del 2010].
- Collins, F.; Mendez, M.; Rasmussen, P.; Mehaffey, N.; Besansky, J., et al. 1987. *A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the Anopheles gambiae complex*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 37: 37-41.

- Curtis, C. 1996. *Control de vectores de la malaria en África y Asia*. [Web en línea] en: <http://ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/CurtisSp.htm> [consultado el 14 de noviembre del 2010].
- Curtis, C.; Miller, J.; Hassan, M.; Kolaczinski, J. y Kasumba, I. 1998. *Can anything be done to maintain the effectiveness of pyrethroid impregnated bednets against malaria vectors?*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 353: 1769-21775.
- David, J.; Strode, C.; Vontas, J.; Nikou, D.; Vaughan, A.; Pignatelli, P.; Louis, C.; Hemingway, J. y Ranson, H. 2005. *The Anopheles gambiae detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(11): 4080-4084.
- Feyereisen, R. 1999. *Insect P450 enzymes*. *Annual Review of Entomology*, 44: 507-533.
- Greenwood, B. y Mutabingwa, T. 2002. *Malaria in 2002*. *Nature*, 415: 670-672.
- Georghiou, G. 1994. *Principles of insecticide resistance management*. *Phytoprotection*, 75: 51-59.
- Georghiou, G. y Taylor, C. 1986. *Factors influencing the evolution of resistance*. In: *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*. National Academy.
- Harbach, R. y Kitching, I. 2005. *Reconsideration of anopheline mosquito phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data*. *Systematics and Biodiversity*, 3: 345-374.
- Hemingway, J. y Ranson, H. 2000. *Insecticide resistance in insect vectors of human disease*. *Annual Review of Entomology*, 45: 371-391.
- Hemingway, J.; Hawkes, N.; McCarroll, L. y Ranson H. 2004. *The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 653-665.
- Hougaard, J.; Duchon, S.; Zaim, M. y Guillet, P. 2002. *Bifenthrin: a useful pyrethroid insecticide for treatment of mosquito nets*. *Journal of Medical Entomology*, 39: 526-533.
- Kasai, S. y Scott, J. 2000. *Over expression of cytochrome P450 CYP6D1 is associated with monooxygenase-mediated pyrethroid resistance in houseflies from Georgia*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68: 34-41.
- Kasai, S.; Weerasinghe, I.; Shono, T. y Yamakawa, M. 2000. *Molecular cloning, nucleotide sequence and gene expression of a cytochrome P450 (CYP6F1) from the*

- pyrethroid-resistant mosquito, Culex quinquefasciatus Say.* *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 163-171.
- Kiszewski *et al.* 2004. *Global distribution (Robinson projection) of dominant or potentially important malaria vectors.* *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70(5):486-498.
- Kumar, S; Tamura, K; Peterson, D; Peterson, N; Stecher, G y Nei, M. 2011. *MEGA 5.0: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.* *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Martinez-Torres, D.; Chandre, F.; Williamson, M.; Darriet, F.; Bergé, J.; Devonshire, A.; Quillet, P.; Pasteur, N. y Pauron, D. 1998. *Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector Anopheles gambiae s.s.* *Insect Molecular Biology*, 7(2): 179-184.
- Milani, R. 1954. *Comportamento mendeliano de lla resistenza alla azione abbatante del DDT: correlazione tranabbatimento e mortalia in Musca domestica.* *L. Riv. Parasitol.* 15: 513-542.
- Miller, T. 1988. *Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticides.* *Parasitology Today*, 4: 8-12.
- Miyazaki, M.; Ohyama, K.; Dunlap, D. y Matsumura, F. 1996. *Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (Blattella germanica) and house fly (Musca domestica).* *Molecular and General Genetics*, 252: 61-68.
- Müller, P.; Donnelly, M. y Ranson, H. 2007. *Transcription profiling of a recently colonized pyrethroid resistant Anopheles gambiae strain from Ghana.* *BMC Genomics*, 8(36).
- Nájera, J. y Zaim, M. 2002. *Lucha antivectorial para el control del paludismo: Criterios para guiar la toma de decisiones y procedimiento para el uso sensato de insecticidas.* OMS, Revisión 1.
- NC-IUB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry). 2008. *Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences.* [Web en línea] en: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html> [consultado el 2 de agosto del 2010].
- Nebert, D.; Adesnik, M.; Coon, M.; Estabrook, R.; Gonzalez, F.; Guengerich, P.; Gunsalus, I.; Johnson, E.; Kemper, B.; Levin, W.; Phillips, I.; Sato, R. y Waterman, M. 1987. *The P450 gene superfamily: recommended nomenclature.* *DNA*, 6: 1–11.

- Nelson, D.; Koymans, L.; Kamataki, T.; Stegeman, J.; Feyereisen, R.; Waxman, D.; Waterman, M.; Gotoh, O.; Coon, M.; Estabrook, R.; Gunsalus, I. y Nebert, D. 1996. *P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature*. *Pharmacogenetics*, 6: 1–42.
- Nelson, D. 2009. *The Cytochrome P450 Homepage*. *Human Genomics* 4, 59-65.
- OMS. 1957. *Seventh report Expert Committee on insecticides*. WHO Tech Report Ser: 125:37.
- OMS. 1980. *Resistance of vectors of disease to pesticides: 5th report of expert committee on vector biology and control*. WHO. Tech. Rep. Ser. 655.
- OMS. 1998. *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, Bio-Efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces*. (WHO/CDS/CPC/MAL/98.12), WHO, Geneva.
- OMS (1). 2006. *Malaria*. [Web en línea] en: <http://www.who.int/mediacentre/events/2006/g8summit/malaria/es/index.html> [consultado el 14 de noviembre del 2010].
- OMS (2). 2006. *Guidelines for the treatment of malaria*. World Health Organization, WHO/HTM/MAL/2006.1108
- OMS. 2008. *Monitoring of insecticide resistance in malaria vectors*. Regional office for the eastern Mediterranean. Roll Back Malaria 2003. Third Inter-Country Meeting of National Malaria Programme Managers Lahore, Pakistán. [Web en línea] en: <http://www.emro.who.int/RBM/Publications/InsecticideResistance.pdf> [consultado el 14 de noviembre del 2010].
- OMS. 2010. *World malaria report*. Global malaria programme.
- OPS. 2001. *Informe de la situación de los programas regionales de malaria en América: Los parásitos de la malaria*. [Web en línea] en: <http://www.paho.org/Spanish/ad/dpc/cd/programas-nacionales.pdf> [consultado el 14 de noviembre del 2010].
- OPS. 2008. *Malaria: Informe sobre la situación actual*. [Web en línea] en: <http://www.paho.org/spanish/gov/ce/ce142-16-s.pdf> [consultado el 14 de noviembre del 2010].
- Orozco, M. 2008. *Situación de la malaria en Guatemala*. Ministerio de Salud y Asistencia Social, Guatemala. [Web en línea] en: http://epidemiologia.mspas.gob.gt/semanas/sem2008/Semana21_2008.pdf [consultado el 10 de noviembre de 2010].

- Orozco, M. 2009. *Situación de la malaria en Guatemala 2009, semana epidemiológica 1-39*. Ministerio de Salud y Asistencia Social, Guatemala. [Web en línea] en: <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/vigepi/Situaci%F3n%20de%20la%20malaria%20%20en%20Guatemala%201-39,%202009.pdf> [consultado el 2 de agosto del 2010].
- Park, Y. y Taylor, M. 1997. *A novel mutation L1029H in sodium channel gene hscp associated with pyrethroid resistance for Heliothis virescens (Lepidoptera: Noctuidae)*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 9-13.
- Penilla, P.; Rodríguez, A.; Hemingway, J.; Torres, L.; Arrendo-Jimenez, J. y Rodríguez, M. 1998. *Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large scale field trial against Anopheles albimanus in Mexico*. *Medical and Veterinary Entomology* 12, 217–233.
- Penilla, P.; Rodríguez, A.; Hemingway, J.; Trejo, A.; López, A. y Rodríguez, M. 2007. *Cytochrome P450-based resistance mechanism and pyrethroid resistance in the field Anopheles albimanus resistance management trial*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89: 111-117.
- Ramírez, M. 2009. *Validación in silico de iniciadores para la amplificación de genes de las familias de citocromo P450 CYP6 y CYP9 en Anopheles albimanus*. Trabajo de graduación de Licenciatura en Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala.
- Ranasinghe, C. y Hobbs, A. 1998. *Isolation and characterization of two cytochrome P450 cDNA clones for CYP6B6 and CYP6B7 from Helicoverpa armigera (Hubber): possible involvement of CYP6B7 in pyrethroid resistance*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28: 571-580.
- Ranson, H.; Jensen, B.; Vulule, J.; Wang, X.; Hemingway, J. y Collins, F. 2000. *Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan Anopheles gambiae associated with resistance to DDT and pyrethroids*. *Insect Molecular Biology*, 9(5): 941-947.
- Ranson, H.; Nikou, D.; Hutchinson, M.; Wang, X.; Roth, C.; Hemingway, J. y Collins, F. 2002. *Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 11(5): 409-418.
- Rodríguez, M. 2004. *Malaria and dengue vector biology and control in Latin America*. [Web en línea] en: http://library.wur.nl/frontis/disease_vectors/11_rodriguez.pdf [consultado el 14 de noviembre de 2010].
- Rodríguez, J. y Silva G. 2003. *Manejo de la resistencia a los insecticidas: bases para el manejo racional de insecticidas*. Universidad de Concepción-FIA, Chillán, Chile.

- Rongnoparut, P.; Boonsuepsakul, S.; Chareonviriyaphap, T. y Thanomsing, N. 2003. *Cloning of cytochrome P450, CYP6P5, and CYP6AA2 from Anopheles minimus resistant to deltamethrin*. Journal of Vector Ecology, 28(2): 150-158.
- Rose, R.; Goh, D.; Thompson, D.; Verma, K.; Heckel, D.; Gahan, L.; Roe, R. y Hodgson, E. 1997. *Cytochrome P450 (CYP) 9A1 in Heliothis virescens: the first member of a new CYP family*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 27: 605-615.
- Sabourault, C.; Guzov, V.; Koener, J.; Claudianos, C.; Plapp, Jr. y Feyereisen, R. 2001. *Overproduction of a P450 that metabolizes diazinon is linked to a loss-of-function in the chromosome 2 ali-esterase (MdalphaE7) gene in resistant house flies*. Insect Molecular Biology, 10: 609-618.
- Sallum, M.; Schultz, T.; Foster, P.; Aronstein, K.; Wirtz, A.; Wilkersons, C. 2002. *Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences*. Systematic Entomology 27, 361-381.
- Sallum, M.; Schultz, T y Wilkerson, R. 2000. *Phylogeny of Anophelinae (Diptera Culicidae) based on morphological characters*. Entomological Society of America, Vol. 93, No. 4.
- Scott, J.; Collins, F. y Feyereisen, R. 1994. *Diversity of cytochrome P450 genes in the mosquito Anopheles albimanus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 205(2):1452-1459.
- Scott, J.; Liu, N. y Wen, Z. 1998. *Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 121: 147-155.
- Scott, J. y Wen, Z. 2001. *Cytochrome P450 of insects: the tip of the iceberg*. Pesticide Management Science, 57: 958-967.
- University of California. 2001. *Integrated pest management for floriculture and nurseries*. Statewide integrated pest management project. Publication 3402. Oakland, USA. pp. 422.
- Vulule, J.; Beach, F.; Atieli, F.; McAllister, J.; Brogdon, W.; Roberts, J., *et al.* 1999. *Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in Anopheles gambiae from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets*. Medical Veterinary Entomology, 13: 239-244.
- Ware, G. y Whitacre, D. 2004. *Introducción a los insecticidas*. The Pesticide Book. Sexta edición. [Web en línea] en: <http://ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/W&WinsectSP.htm> [consultada el 2 de agosto del 2010].

- Werck-Reichhart, D. y Feyereisen, R. 2000. *Cytochromes P450: a success story*. *Genome Biology*, 1(6): reviews 3003.1-3003.9.
- Wood, R. y Bishop, R. 1981. *Insecticide resistance: populations and evolution*. In: *Genetic of consequences of man made change*. Bishop, J. A. & Cook, L. M. Academic Press. pp. 400.
- Xiao-Ping, W. y Hobbs, A. 1995. *Isolation and sequence analysis of a cDNA clone for a pyrethroid inducible P450 from Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25: 1001-1009.
- Yaicharoen, R.; Kiatfuengfoo, R.; Chareonviriyaphap, T. y Rongnoparut, P. 2005. *Characterization of deltamethrin resistance in field populations of Aedes aegypti in Thailand*. *Journal of Vector Ecology*, 30(1): 144-150.
- Yang, Y.; Chen, S.; Wu, S.; Yue, L. y Wu, Y. 2006. *Constitutive over-expression of multiple cytochrome P450 genes associated with pyrethroid resistance in Helicoverpa armigera*. *Journal of Economic Entomology*, 99(5): 1784-1789.
- Zaim, M. y Jambulingam, P. 2007. *Global insecticide use for vector borne disease control*. Tercera edición. OMS.
- Zimmerman, R. 1992. *Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 87 (Suppl. 3), 371

VII. ANEXOS

A. Optimización de las condiciones de amplificación del PCR genómico de la familia CYP6 y CYP9

La amplificación de las familias CYP6 y CYP9 se realizó a partir de ADN genómico, para esto se realizó la extracción del material genético de *An. albimanus* y *D. melanogaster*. La concentración y pureza del ADN para *An. albimanus* fue 53.45ug/mL y 1.97, para *D. melanogaster* fue 63.45ug/mL y 1.52. Posteriormente, se realizó la optimización de la amplificación modificando las condiciones de concentración de ADN y la temperatura de alineamiento de los iniciadores degenerados. Primero, se realizó la amplificación a una temperatura de alineamiento de 50°C utilizando diferentes concentraciones de ADN (muestra no diluida, dilución 1/5 y dilución 1/10). En este caso, la amplificación fue eficiente en la dilución 1/10 de ADN tanto de *An. albimanus* y *D. melanogaster* para la familia CYP6 y CYP9, aunque la amplificación aún era inespecífica.

Por lo tanto, se procedió a optimizar la temperatura de alineamiento para mejorar la especificidad de los iniciadores degenerados. La optimización consistió en realizar amplificaciones de las familias CYP6 y CYP9 a 50°C, 53°C, 55°C, 58°C y 60°C (Figura 28 y 29). Según los resultados obtenidos de cada amplificación, sí se amplificó para la familia CYP6 en todas las temperaturas. Sin embargo, no se amplificó para la familia CYP9 a una temperatura mayor de 55°C. En el caso de *D. melanogaster*, se amplificaba una banda similar a la de *An. albimanus* a una temperatura mayor a 55°C. No se sabía si esta banda correspondía a la familia CYP6 con un menor tamaño o si se trataba de otro gen. Por estas razones, la temperatura de 55°C fue la más eficiente y específica para la familia CYP6 y CYP9.

Figura 28. Optimización de la amplificación de la familia CYP6 de *An. albimanus* y *D. melanogaster* a diferentes temperaturas. Escalera 100pb DNA Ladder II (Gene Choice),

A: *An. albimanus* y D: *D. melanogaster*.

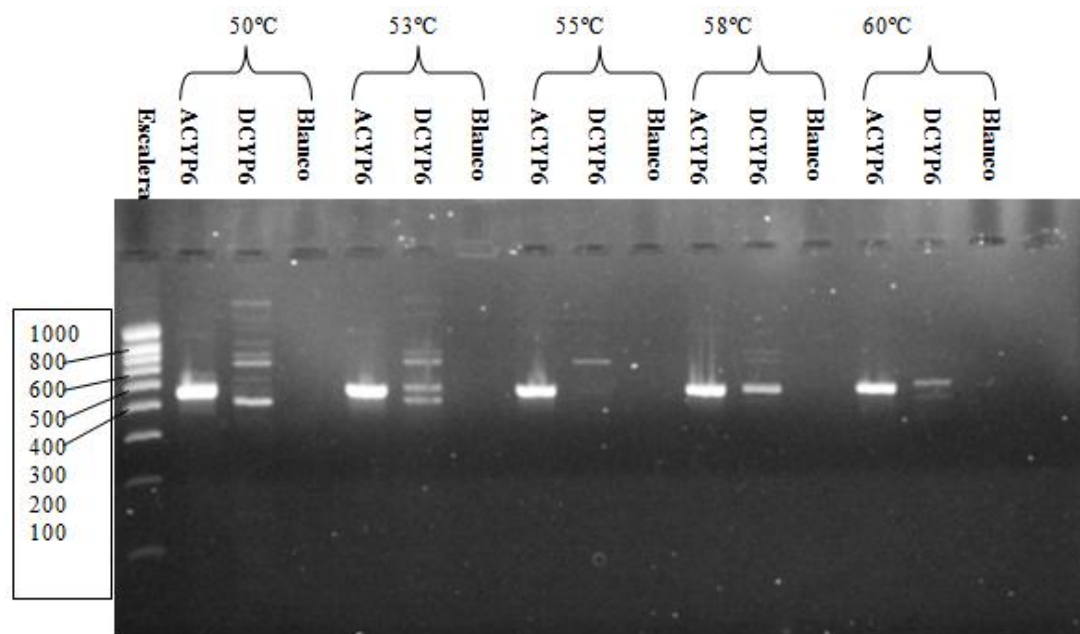
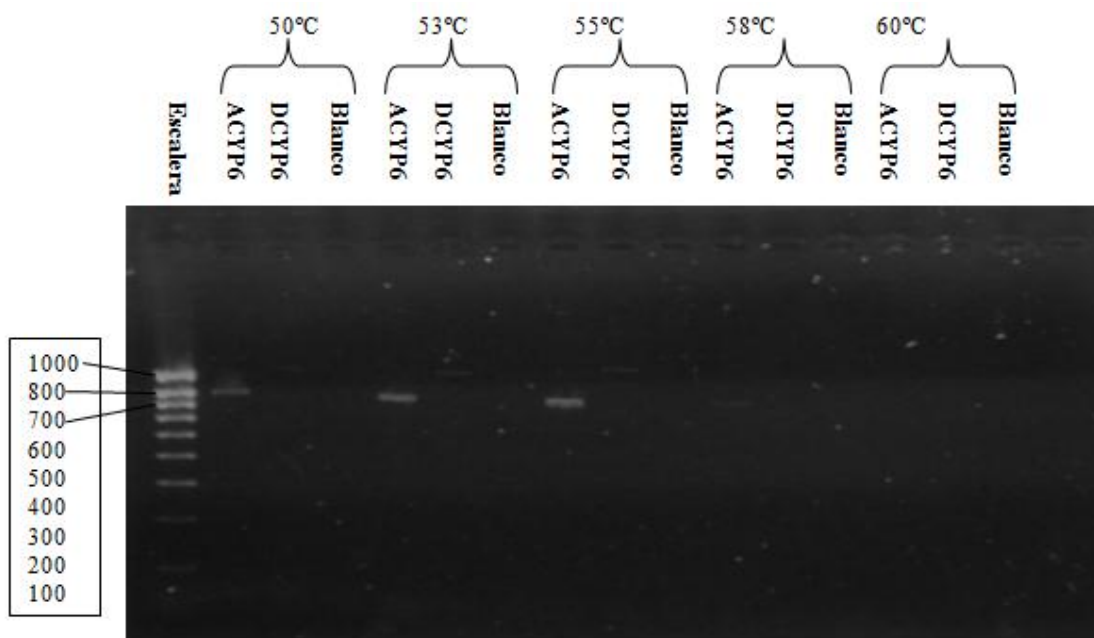


Figura 29. Optimización de la amplificación de la familia CYP9 de *An. albimanus* y *D. melanogaster* a diferentes temperaturas. Escalera 100pb DNA Ladder II (Gene Choice),

A: *An. albimanus* y D: *D. melanogaster*.



B. Clones de la familia CYP6 y CYP9

Cuadro 6. Clones de *An. albimanus*.

Clones CYP6	Clones CYP9
CA601	CA901
CA602	CA902
CA603	CA903
CA604	CA904
CA605	CA905
CA606	CA906
CA607	CA907
CA608	CA908
CA609	CA909
CA610	CA910
CA611	
CA612	
CA613	
CA614	
CA615	

Cuadro 7. Clones de *D. melanogaster*.

Clones CYP 6	Clones CYP9
CD601	CD901
CD602	CD902

C. Verificación de inserto en el plásmido de los clones CYP6 y CYP9

En los clones CYP6 de *An. albimanus* se amplificaron insertos entre 400 a 500pb y para *D. melanogaster* de 400 a 600pb (Figura 30 y 31). En el caso de los clones CYP9 de *An. albimanus* fueron amplificados insertos de 700 a 800pb, aunque el clon CA901 y CA908 amplificaron insertos mayores a 800pb (Figura 32). En cambio, los clones CYP9 de *D. melanogaster* amplificaron insertos de 1000pb.

Figura 30. Insertos de los plásmidos de los clones CYP6 de *An. albimanus*. Escalera 100pb DNA Ladder II (Gene Choice), A: *An. albimanus*, C: Clon y 6: familia CYP6.

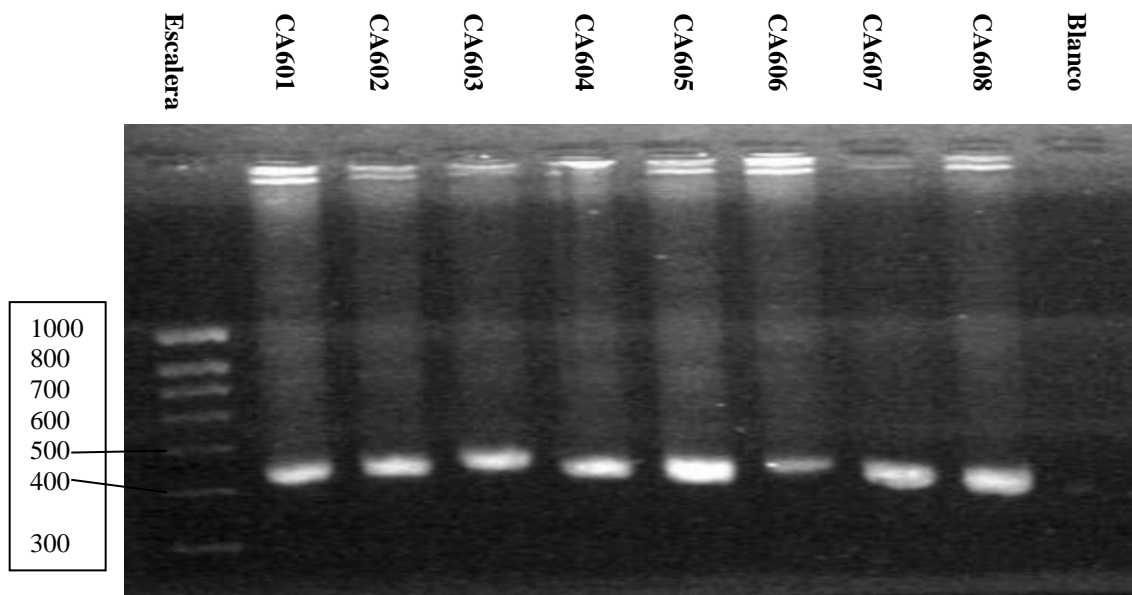


Figura 31. Insertos de los plásmidos de los clones CYP6 de *An. albimanus* y *D. melanogaster*. Escalera 100pb DNA Ladder II (Gene Choice), A: *An. albimanus*, C: Clon, 6: familia CYP6 y D: *D. melanogaster*.

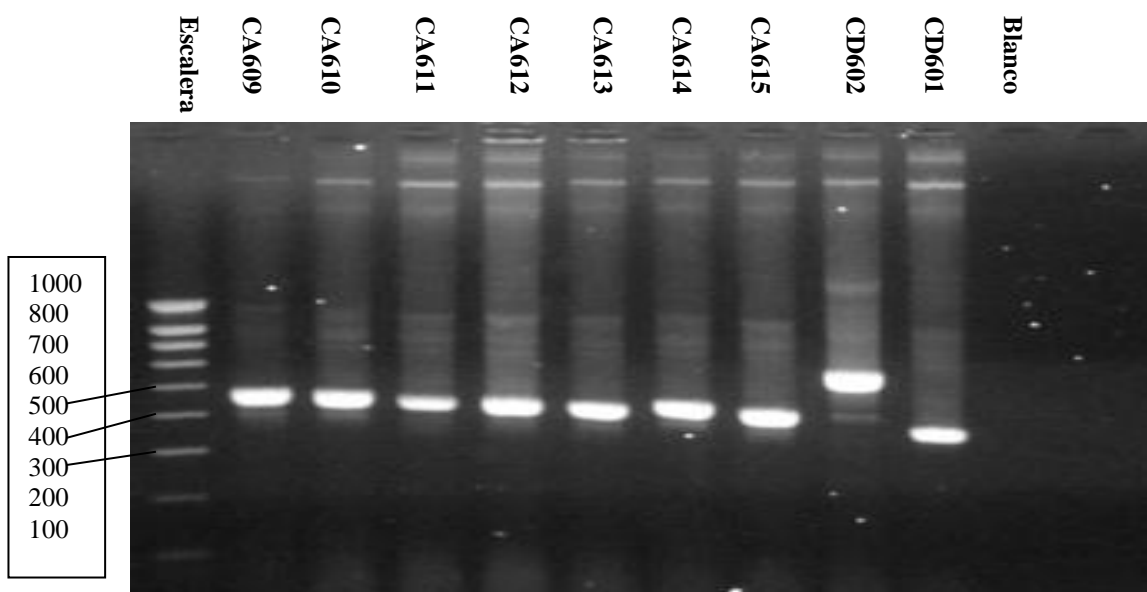
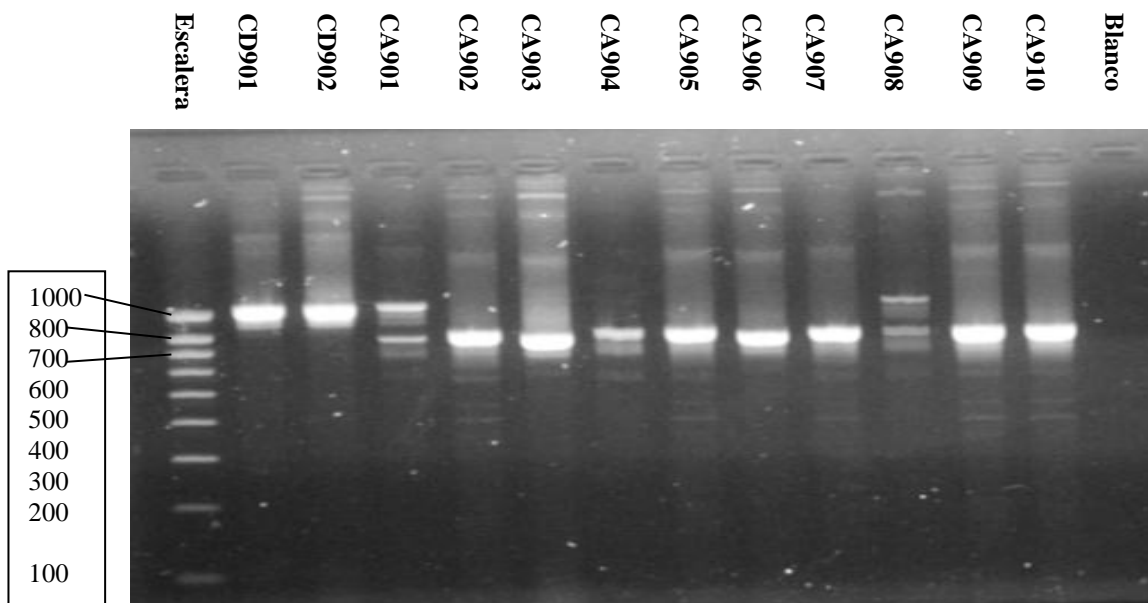


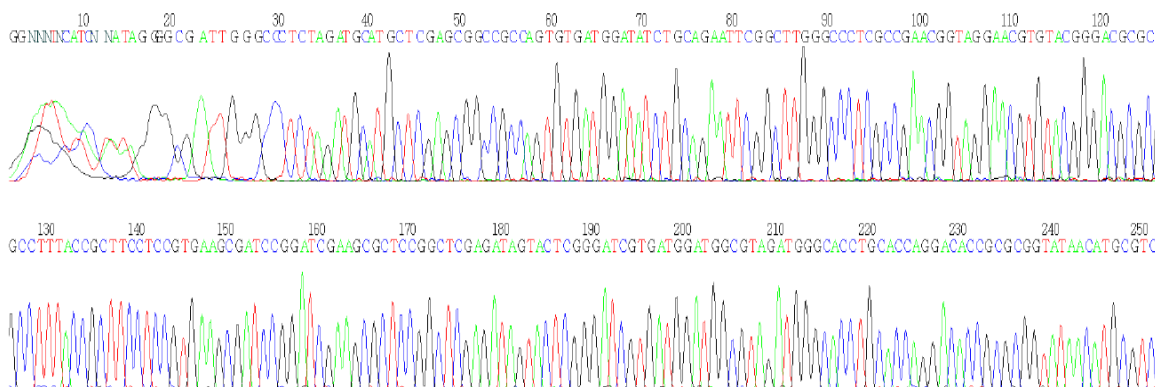
Figura 32. Insertos de los plásmidos de los clones CYP9 de *An. albimanus* y *D. melanogaster*. Escalera 100pb DNA Ladder II (Gene Choice), A: *An. albimanus*, C: Clon, 9: familia CYP9 y D: *D. melanogaster*.



D. Secuenciación de los clones CYP6 y CYP9

La secuenciación de los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* y *D. melanogaster* dio como resultado electroferogramas. De la Figura 33 a la 45, se presentan una parte de los electroferogramas de los clones secuenciados.

Figura 33. Electroferograma del clon CA601 de *An. albimanus*.



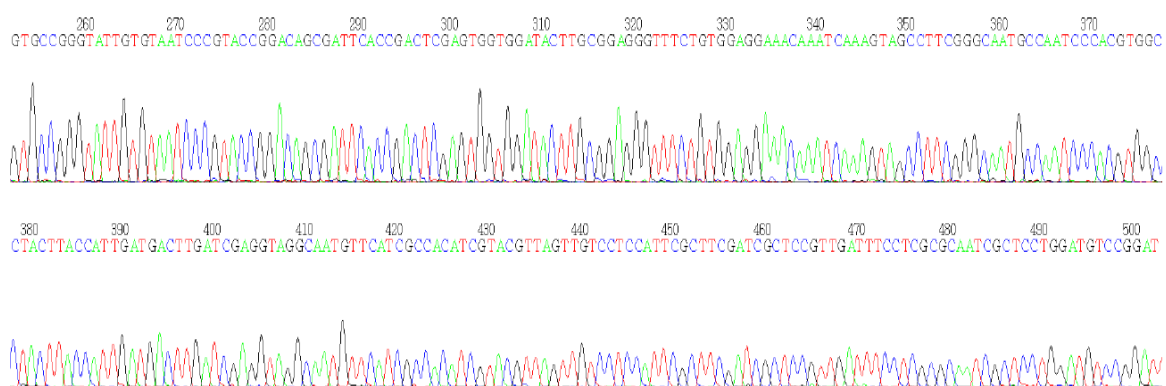


Figura 34. Electroferograma del clon CA602 de *An. albimanus*.

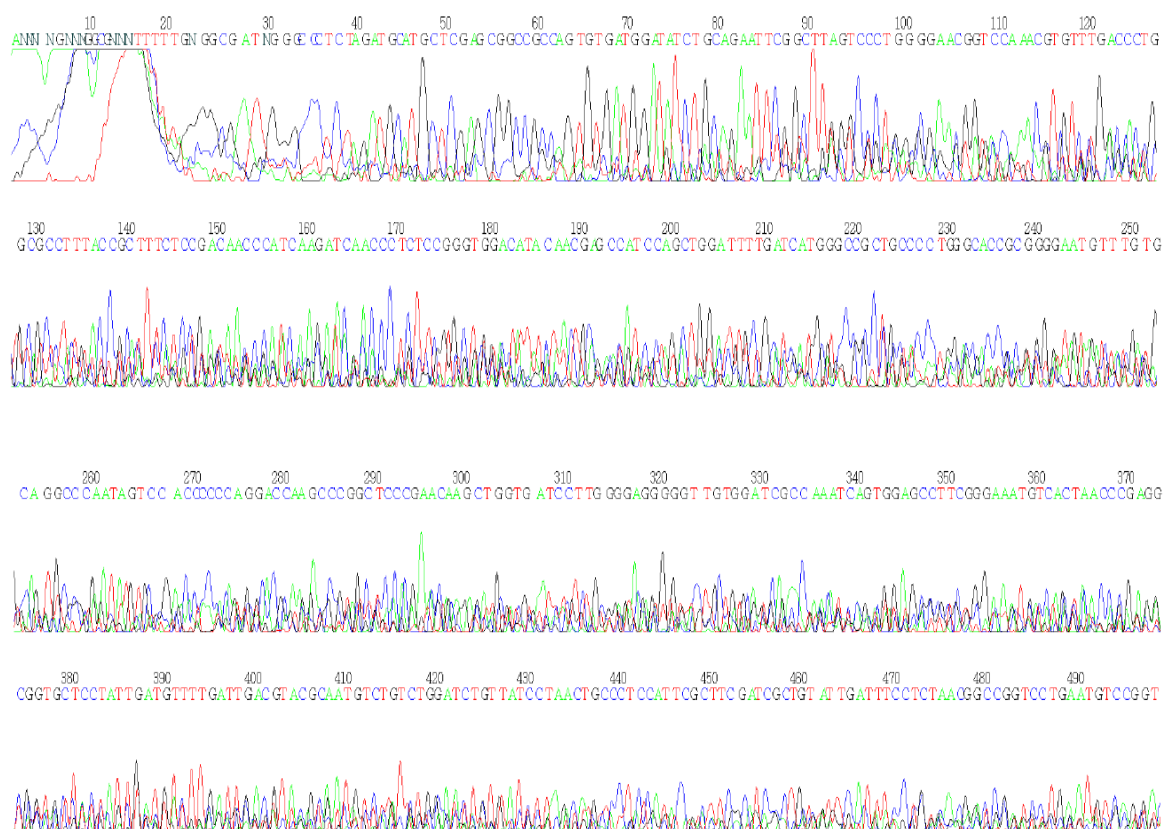


Figura 35. Electroferograma del clon CA603 de *An. albimanus*.

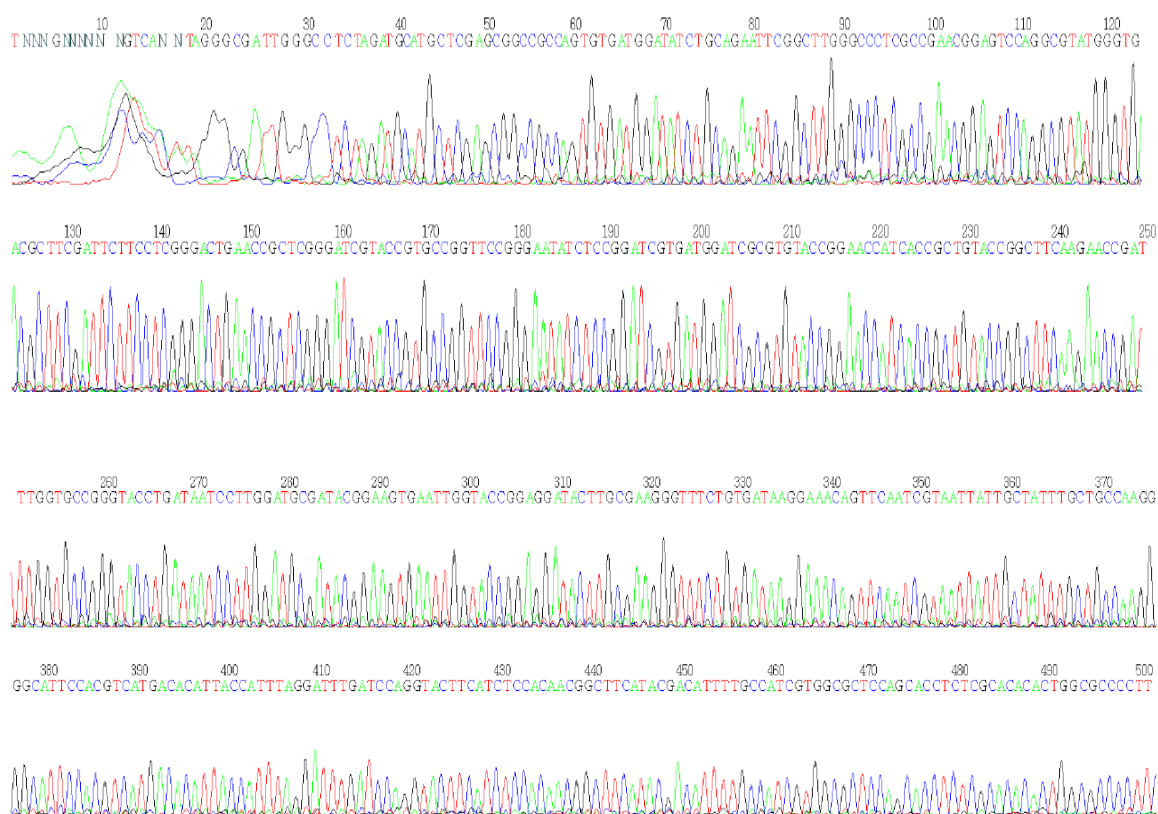
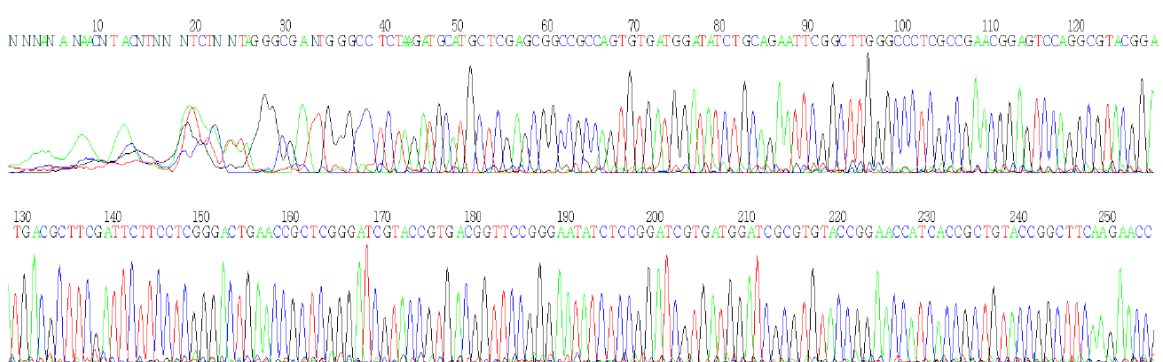


Figura 36. Electroferograma del clon CA610 de *An. albimanus*.



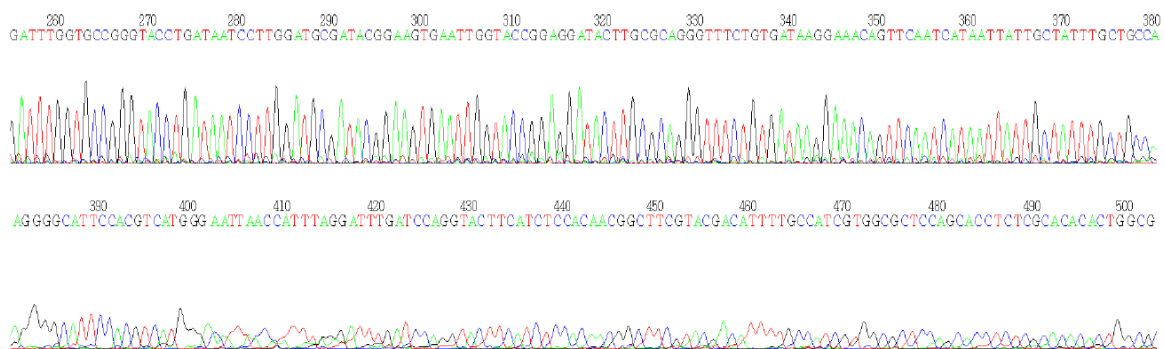


Figura 37. Electroferograma del clon CA611 de *An. albimanus*.

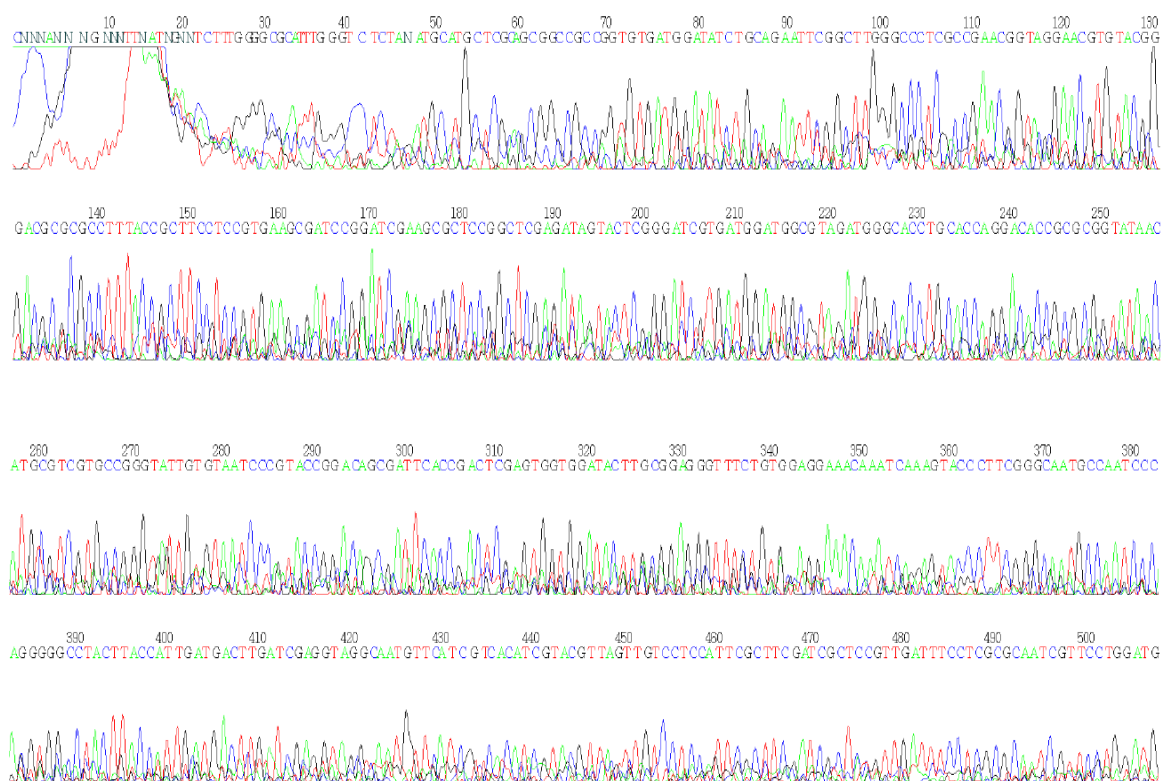


Figura 38. Electroferograma del clon CA612 de *An. albimanus*.

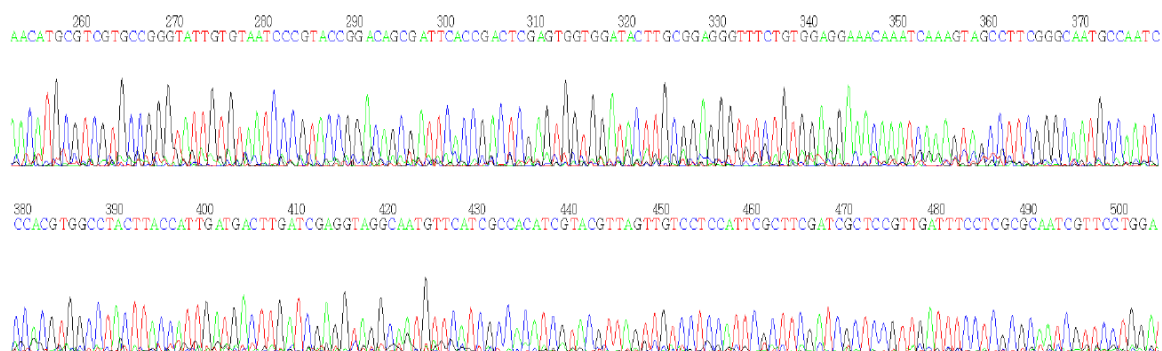


Figura 39. Electroferograma del clon CA613 de *An. albimanus*.

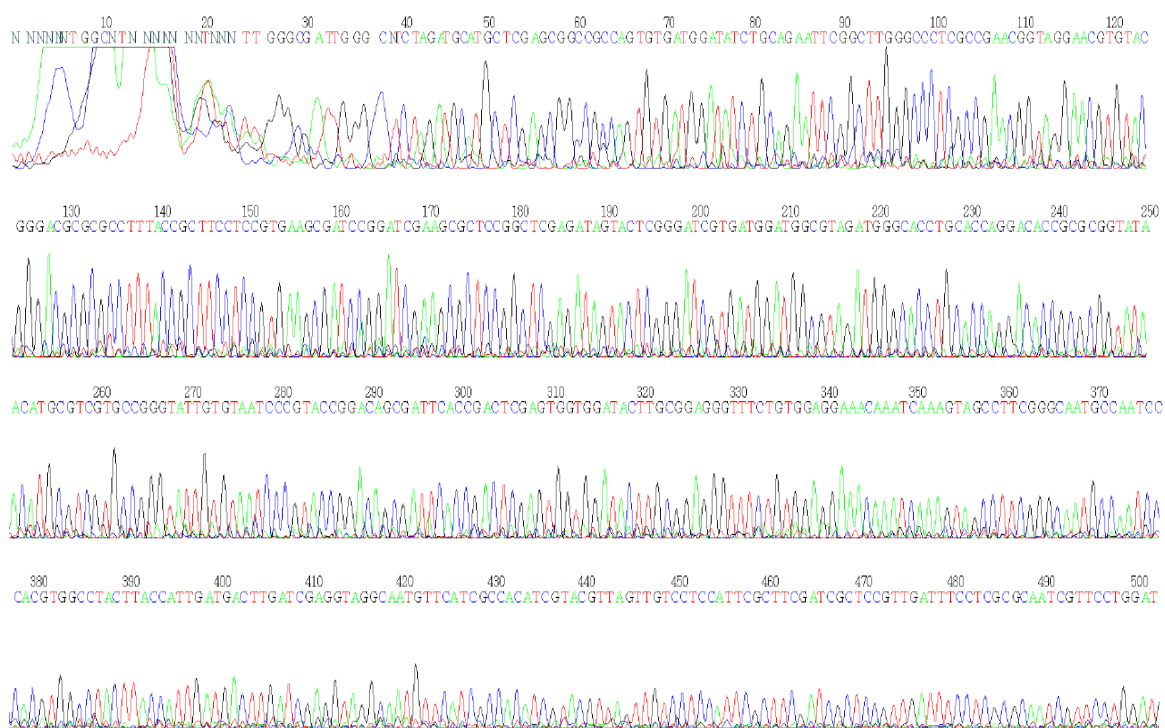


Figura 40. Electroferograma del clon CA615 de *An. albimanus*.

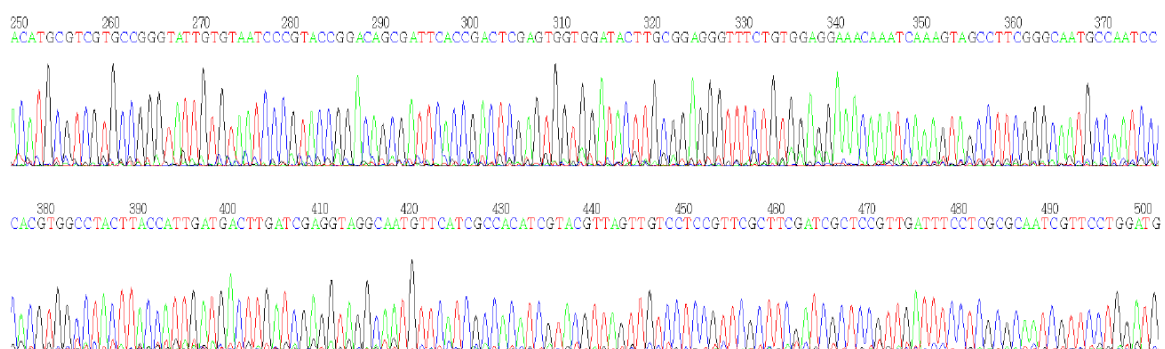
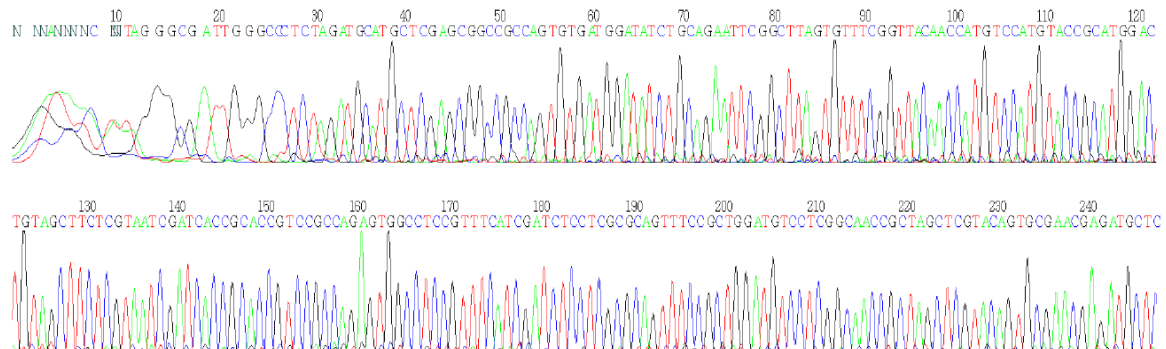


Figura 41. Electroferograma del clon CA904 de *An. albimanus*.



Figura 42. Electroferograma del clon CA906 de *An. albimanus*.Figura 43. Electroferograma del clon CA909 de *An. albimanus*.

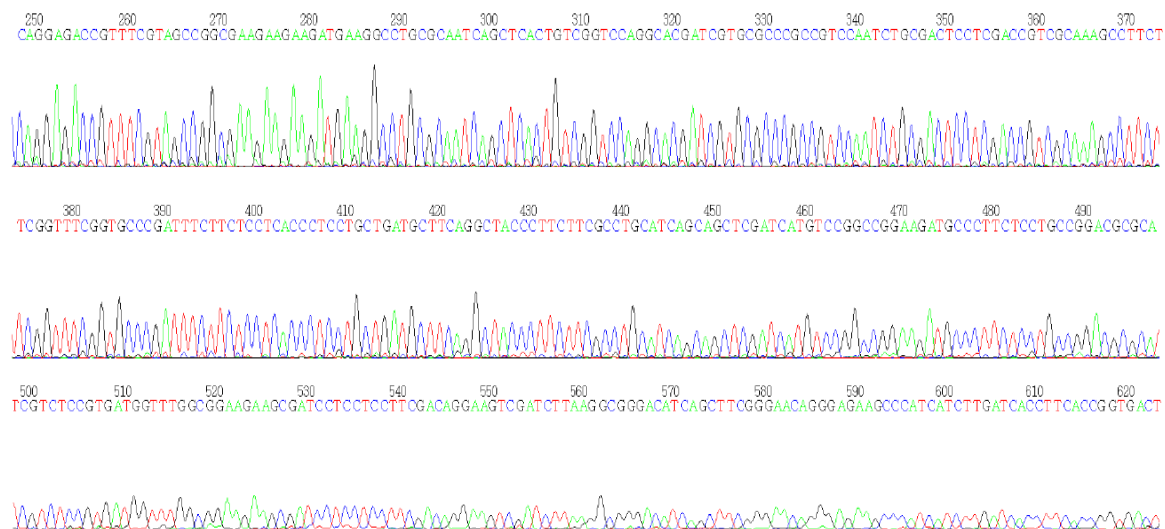


Figura 44. Electroferograma del clon CD601 de *D. melanogaster*.

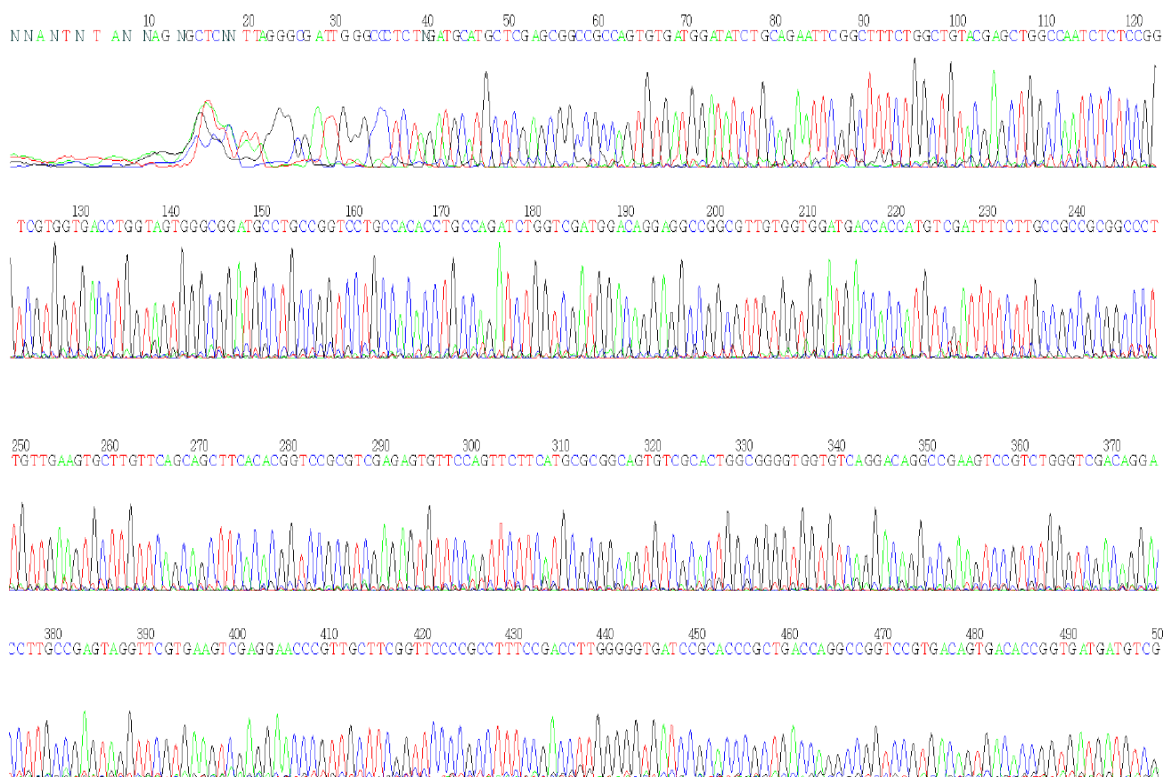
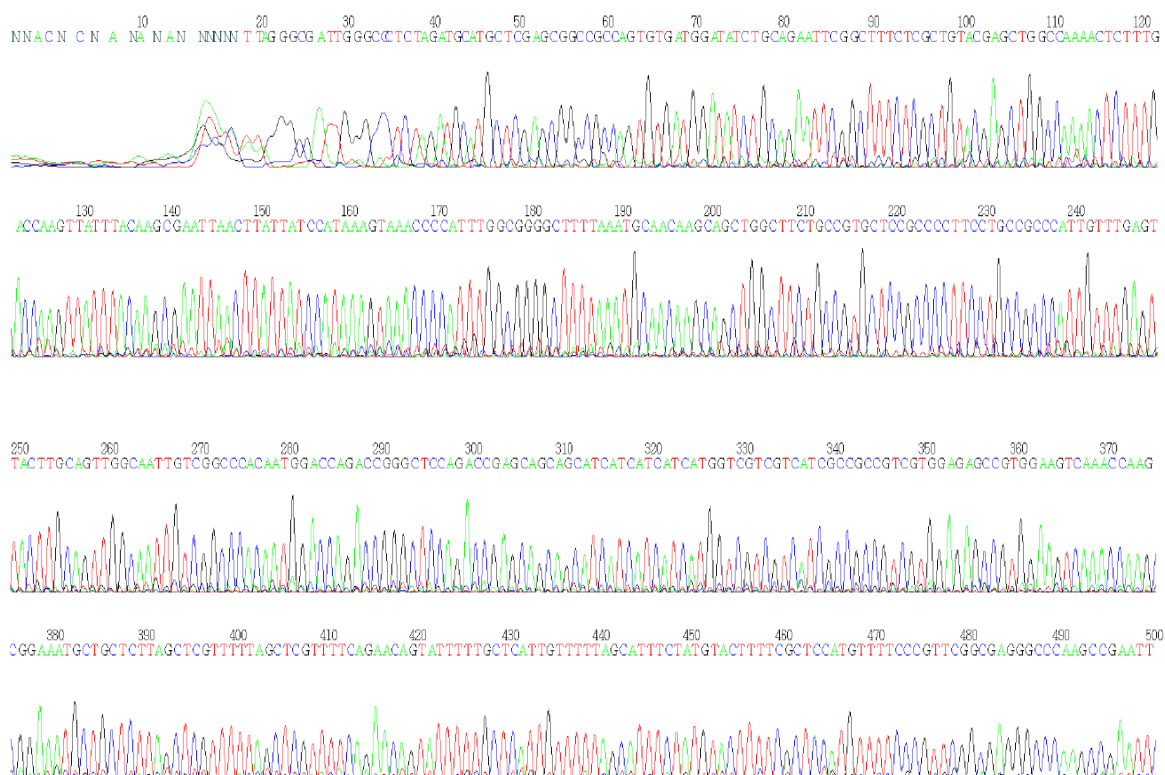


Figura 45. Electroferograma del clon CD602 de *D. melanogaster*.

E. Análisis de los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* y *D. melanogaster* a nivel de ADN

Las secuencias de ADN genómico obtenidas de los clones CYP6 y CYP9 fueron editadas (Figura 46 a la 56) para eliminar contaminación por el vector pUC19 mediante la herramienta VecScreen.

Figura 46. Secuencia de ADN genómico del clon CA601 sin vector pUC19.

```

1 GGGCCCTCGC CGAACGGTAG GAACGTGTAC GGGACGCGCG CCTTTACCGC TTCTCCGIG
61 AAGCGATCCG GATCGAAGCG CTCCGGCTCG AGATAGTACT CGGGATCGTG ATGGATGGCG
121 TAGATGGGCA CCTGCACCAG GACACCGCGC GGTATAACAT GCGTCGTGCC GGTATTGTG
181 TAATCCCGTA CCGGACAGCG ATTCACCGAC TCGAGTGGTG GATACTTGCG GAGGGTITCT
241 GTGGAGGAAA CAAATCAAAG TAGCCTTCGG GCAATGCCAA TCCCACGTGG CCTACTIACC
301 ATGATGACT TGATCGAGGT AGGCAATGTT CATCGCCACA TCGTACGTTA GTTGTCCCTC
361 ATTCGCTTCG ATCGCTCCGT TGATTTCCTC GCGCAATCGC TCCTGGATGT CCGGATTCTT
421 GGCCAGCTCG TACAGCGTGA

```

Figura 47. Secuencia de ADN genómico del clon CA603 sin vector pUC19.

```

1 GGGCCCTCGC CGAACGGAGT CCAGGCGTAT GGGTGACGCT TCGATTCTTC CTCGGGACTG
61 AACCGCTCGG GATCGTACCG TGCCGGTTCC GGAATATCT CCGGATCGTG ATGGATCGCG
121 TGTACCGGAA CCATCACCGC TGTACCGGCT TCAAGAACCG ATTGGTGCC GGTACCTGA
181 TAATCCTTGG ATGCGATACG GAAGTGAATT GGTACCGGAG GATACTTGCG AAGGGTTTCT
241 GTGATAAGGA AACAGTTCAA TCGTAATTAT TGCTATTTGC TGCCAAGGGG CATTCCACGT
301 CATGACACAT TACCATTTAG GATTTGATCC AGGTACTTCA TCTCCACAAC GGCTTCATAC
361 GACATTTTGC CATCGTGGCG CTCCAGCACC TCTCGCACAC ACTGGCGCCC CTCTCCTGT
421 ACGTCTTGAT TCAATGCCAG CTCGTACAGC GTGA

```

Figura 48. Secuencia de ADN genómico del clon CA610 sin vector pUC19.

```

1 GGGCCCTCGC CGAACGGAGT CCAGGCGTAC GGATGACGCT TCGATTCTTC CTCGGGACTG
61 AACCGCTCGG GATCGTACCG TGACGGTTCC GGAATATCT CCGGATCGTG ATGGATCGCG
121 TGTACCGGAA CCATCACCGC TGTACCGGCT TCAAGAACCG ATTGGTGCC GGTACCTGA
181 TAATCCTTGG ATGCGATACG GAAGTGAATT GGTACCGGAG GATACTTGCG CAGGGTTTCT
241 GTGATAAGGA AACAGTTCAA TCATAATTAT TGCTATTTGC TGCCAAGGGG CATTCCACGT
301 CATGGGAATT AACCATTTAG GATTTGATCC AGGTACTTCA TCTCCACAAC GGCTTCGTAC
361 GACATTTTGC CATCGTGGCG CTCCAGCACC TCTCGCACAC ACTGGCGCCC CTCTCCTGT
421 ACGTCTTGAT TCAATGCCAG CTCGTACAGC CAGA

```

Figura 49. Secuencia de ADN genómico del clon CA612 sin vector pUC19.

```

1 GGGCCCTCGC CGAACGGTAG GAACGTGTAC GGGACGCGCG CTTTACCGC TTCTCCGTG
61 AAGCGATCCG GATCGAAGCG CTCCGGCTCG AGATAGTACT CCGGATCGTG ATGGATGGCG
121 TAGATGGGCA CCTGCACCAG GACACCGCGC GGTATAACAT GCGTCGTGCC GGTATTGTG
181 TAATCCCGTA CCGGACAGCG ATTCACCGAC TCGAGTGGTG GATACTTGCG GAGGGTTTCT
241 GTGGAGGAAA CAAATCAAAG TAGCCTTCGG GCAATGCCAA TCCCACGTGG CTTACTTACC
301 ATTGATGACT TGATCGAGGT AGGCAATGTT CATCGCCACA TCGTACGTTA GTTGTCTCC
361 ATTCGCTTCG ATCGCTCCGT TGATTTCTTC GCGCAATCGT TCCTGGATGT CCGGATTCTT
421 GGCCAGCTCG TACAGCG

```

Figura 50. Secuencia de ADN genómico del clon CA613 sin vector pUC19.

```

1 GGGCCCTCGC CGAACGGTAG GAACGTGTAC GGGACGCGCG CTTTACCGC TTCTCCGTG
61 AAGCGATCCG GATCGAAGCG CTCCGGCTCG AGATAGTACT CCGGATCGTG ATGGATGGCG
121 TAGATGGGCA CCTGCACCAG GACACCGCGC GGTATAACAT GCGTCGTGCC GGTATTGTG
181 TAATCCCGTA CCGGACAGCG ATTCACCGAC TCGAGTGGTG GATACTTGCG GAGGGTTTCT
241 GTGGAGGAAA CAAATCAAAG TAGCCTTCGG GCAATGCCAA TCCCACGTGG CTTACTTACC
301 ATTGATGACT TGATCGAGGT AGGCAATGTT CATCGCCACA TCGTACGTTA GTTGTCTCC
361 ATTCGCTTCG ATCGCTCCGT TGATTTCTTC GCGCAATCGT TCCTGGATGT CCGGATTCTT
421 GGCCAGCTCG TACAGCC

```

Figura 51. Secuencia de ADN genómico del clon CA615 sin vector pUC19.

```

1 GGGCCCTCGC CGAACGGTAG GAACGTGTAC GGGACGCGCG CCTTTACCGC TTCCTCCGTG
61 AAGCGATCCG GATCGAAGCG CTCCGGCTCG AGATAGTACT CGGGATCGTG ATGGATGGCG
121 TAGATGGGCA CCTGCACCAG GACACCGCGC GGTATAACAT GCGTCGTGCC GGGTATTGTG
181 TAATCCCGTA CCGGACAGCG ATTCACCGAC TCGAGTGGTG GATACTTGGC GAGGGTTTCT
241 GTGGAGGAAA CAAATCAAAG TAGCCTTCGG GCAATGCCAA TCCCACGTGG CCTACTTACC
301 ATTGATGACT TGATCGAGGT AGGCAATGTT CATCGCCACA TCGTACGTTA GTTGTCTCC
361 GTTCGCTTCG ATCGCTCCGT TGATTTCTC GCGCAATCGT TCCTGGATGT CCGGATTCTT
421 GGCCAGCTCG TACAGCCAGA

```

Figura 52. Secuencia de ADN genómico del clon CA904 sin vector pUC19.

```

1 TGAATGGGA GGATATCGAC ATTACGGCCG CCGGTGCATC GTTCTTCTTC GGTGGCATCG
61 AGACGACGAC GACCCTGCTT TGCTTTGCCA GCTACGAGCT GGCCATCAAT CCCTCGATCC
121 AGAACCGTIT GAGAGAGGAA ATCGATGAAG TCGCGGAGGG ACTGCCAGAT AGAAAGACAC
181 CGACCTACGA GGTGCTGCAG AAGATGAAGT ACCTCGACAT GGTCGTAACC GAAACGC

```

Figura 53. Secuencia de ADN genómico del clon CA906 sin vector pUC19.

```

1 TTTACCGGCA GCAAGATGCG CAACATGTTT GTGCTGATAT CGAAGAGCGC GGGTGAATGCA
61 ATGGAGCGTT TGGTGGCGTA CTCCAAGGGG GAACCGTTTG CGATGGAGCT GCGGGATCTG
121 TACTCGCGGC TCGGCAACGA CGCGATGACC TCGATCTCGT TCGGCGTGGG GGTGGACTCG
181 CTCACCGATC GCGACAATGA GTTCTTCTTC AAGGGTAAGC GGTGGCCCA GATCGATGGG
241 TGGCCCGGGT TCAAGTTGTT ACTGTCCGGT ATGATGCCCT GGTGTTACG CTGGTTGCAC
301 ATCGGATTGC TGTACAAGGA CGTGAATGAG TTCTAICTGG AAGCGGTTTC GATGAACATT
361 CGGCATCGGT TGCAGAACCT TATCAAACGG CCCGACTTTA TCCATTGCT GCTGCAGGCG
421 AGAAAGGATG AGCTGTGCTG TGAGTAGCAG GAGGATGCAT CGCTCGAGAG CGCCGGTTTT
481 TCGATGGCCA CAACGCATGC CGTCGATGGC GATGGGGAGC GGCTCGAGTG GCAGGATATC
541 GACATTACGG CGGCTGCGGT ATCCTTCTTT TTCGGTGGCA TCGAGACGAC CGCAACGTTG
601 CTGTGCTTCA TGAGCTACGA GCTGGCTGTG AATCCATCGA TCCAGAACCG TTTGCGATTG
661 GAGATCGACT CCGTGCGGGG CGAGCTGGCT GATGGTGTGA CGCCGACCTA CGAAGTGCCG
721 CAGAAGATGA AGTACCTCGA CATGGTCGTA ACCGAAACG

```

Figura 54. Secuencia de ADN genómico del clon CA909 sin vector pUC19.

```

1 GTGTTTCGGT TACAACCATG TCCATGTACC GCATGGACTG TAGCTTCTCG TAATCGATCA
61 CCGCACCGTC CGCCAGAGTG GCCTCCGTTT CATCGATCTC CTCGCGCAGT TTCCGCTGGA
121 TGTCCTCGGC AACCGCTAGC TCGTACAGTG CGAACGAGAT GCTCCAGGAG ACCGTTTCGT
181 AGCCGGCGAA GAAGAAGATG AAGGCCTGCG CAATCAGCTC ACTGTCGGTC CAGGCACGAT
241 CGTGCGCCCG CCGTCCAATC TGC GACTCCT CGACCGTCGC AAAGCCTTCT TCGGTTTCGG
301 TGCCCGAATT CTTCTCCTCA CCCTCCTGCT GATGCTTCAG GCTACCCTTC TTCGCCTGCA
361 TCAGCAGCTC GATCATGTCC GGCCGGAAGA TGCCCTTCTC CTGCCGGACG CGCATCGTCT
421 CCGTGAATGGT TTGGCGGAAG AAGCGATCCT CCTCCTTCGA CAGGAAGTCG ATCTTAAGGC
481 GGGACATCAG CTTCCGGAAC AGGGAGAAGC CCATCATCTT GATCACCTTC ACCGGTGACT
541 GCTGGTTCAT GATCGAGCGG GCCATGCTGA TGAACTCGTT CTCGGGTTTCG CGGAACGAGT
601 CCACCTTAAT GCCGAACGCG GCCGTACCGA TGACATCGTT CCCGAACCGT GACATTACAT
661 CCTTCATCTC AAGCTGCAGC CCGCTACCGG CGGCTTGCCG GGCTTCCTCG CTCCGGAGAT
721 GGTCCACCAT CGATTGGCCG CACTCGGCCA TCAGCTCGAA CATGATGCGC ATCTTGCTGC
781 CCGTAAA

```

Figura 55. Secuencia de ADN genómico del clon CD601 sin vector pUC19.

```

1 TCTGGCTGTA CGAGCTGGCC AATCTCTCCG GTCGTGGTGA CCTGGTAGTG GCGGATGCC
61 TGCCGGTCTT GCCACACCTG CCAGATCTGG TCGATGGACA GGAGGCCGGC GTTGTGGTGG
121 ATGACCACCA TGTCGATTTT CTTGCCGCCG CGGCCCTTGT TGAAGTGCTT GTTCAGCAGC
181 TTCACACGGT CCGCGTCGAG AGTGTTCCAG TTCTTCATGC GCGGCAGTGT CGCACTGGCG
241 GGGTGGTGTG AGGACAGGCC GAAGTCCGTC TGGGTCGACA GGACCTTGCC GAGTAGGTTT
301 GTGAAGTCGA GGAACCCGTT GCTTCGGTTC CCCGCCTTTC CGACCTTGGG GGTGATCCGC
361 ACCCGCTGAC CAGGCCGGTC CGTGACAGTG ACACCGGTGA TGATGTCGGA GACGACCGCT
421 CCGGACAGGT GCTCTTCGAA CGTGACCCGG TCGCCGATAC GCCACCCGTG GCGGGTCTTG
481 CCATTCTCTG CGATCTGGTC GTCTCCCATG ACCTTGCTGA TGCCGTCCGC TATGGCGATC
541 TCGAIGGACT GCCCGCCAGC GGTCTCCACC AGGCGCCGTT CCGCGAGGGC CC

```

Figura 56. Secuencia de ADN genómico del clon CD602 sin vector pUC19.

```

1 TCTCGCTGTA CGAGCTGGCC AAAACTCTTT GACCAAGTTA TTTACAAGCG AATTAECTTA
61 TTATCCATAA AGTAAACCCC ATTTGGCGGG GCTTTTAAAT GCAACAAGCA GCTGGCTTCT
121 GCCGTGCTCC GCCCCTTCTT GCCGCCCATT GTTTGAGTTA CTTGCAGTTG GCAATTGTCG
181 GCCACAATG GACCAGACCG GGCTCCAGAC CGAGCAGCAG CATCATCATC ATCATGGTTCG
241 TCGTCAICGC CGCCGTCGTG GAGAGCCGTG GAAGTCAAAC CAAGCGGAAA TGCTGCTCTT
301 AGCTCGTTTT TAGCTCGTTT TCAGAACAGT ATTTTGTCTC ATTGTTTTTA GCATTTCTAT
361 GTACTTTTCG CTCCATGTTT TCCCGTTCGG CGAGGGCCC

```

Las secuencias de ADN genómico editadas de los clones CYP6 y CYP9 fueron comparadas contra la base de datos de *An. gambiae*, *An. funestus* y *An. minimus* del GenBank, mediante la herramienta “Nucleotide BLAST” optimizada para “More dissimilar sequences”. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 7. Los resultados presentados en el Cuadro 7, no incluyen a los clones CD601 y CD602 debido a

que no tuvieron homología con algún citocromo P450 de la familia CYP6 y CYP9 de *D. melanogaster*.

Cuadro 8. Análisis “BLAST” de las secuencias de ADN genómico de los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus*.

Clon	Tamaño (pb)	Número de acceso*	Citocromo homólogo	Rango de consulta (%)	Valor E	Identidad máxima (%)
CA601	440	AY028785.1	CYP6P1 (g ^a)	78	2e-41	80
		AY987358.1	CYP6P2 (f ^b)	100	6e-39	67
		AY128947.1	CYP6P6 (m ^c)	98	4e-41	70
CA603	454	AY193730.1	CYP6M3 (g)	81	6e-41	75
		AY729660.1	CYP6M8 (f)	52	4e-42	75
CA610	454	AY193730.1	CYP6M3 (g)	80	6e-41	75
		AY729660.1	CYP6M8 (f)	52	7e-45	76
CA612	437	AY028785.1	CYP6P1 (g)	78	1e-41	79
		AY987358.1	CYP6P2 (f)	100	2e-38	67
		AY128947.1	CYP6P6 (m)	99	2e-39	69
CA613	437	AY028785.1	CYP6P1 (g)	78	1e-41	79
		AY987358.1	CYP6P2 (f)	99	8e-38	67
		AY128947.1	CYP6P6 (m)	99	2e-39	69
CA615	440	AY028785.1	CYP6P1 (g)	79	1e-41	78
		AY987352.1	CYP6P1 (f)	100	5e-34	68
		AY128947.1	CYP6P6 (m)	100	2e-39	69
CA904	237	AY748851.1	CYP9M2 (g)	95	8e-47	78
CA906	759	AY729666.1	CYP9M3 (f)	99	5e-24	63
CA909	787	AY729663.1	CYP9J12 (f)	85	2e-73	69

*Número de acceso obtenido del GenBank.

a: *An. gambiae*

b: *An. funestus*

c: *An. minimus*

Los iniciadores degenerados para la familia CYP6 y CYP9 fueron alineados contra los citocromos de *D. melanogaster* utilizados en la validación *in silico* por Ramírez (2009) mediante la herramienta “Nucleotide BLAST” optimizada para “More dissimilar sequences”. Para esto, se obtuvieron las secuencias de ADNc de los citocromos CYP6G1 (AY081960.1), CYP6A2 (NM_078904.1), CYP6A8 (NM_079025.4), CYP9C1 (NM_079126.2) y CYP9B1 (NM_078921.3) de *D. melanogaster*. Los resultados se presentan en el Cuadro 8 y 9.

Cuadro 9. Análisis de los iniciadores degenerados para la familia CYP6 contra los citocromos de *D. melanogaster*.

Citocromo P450	Iniciador "Forward"	Iniciador "Reverse"
CYP6G1	Hibridación de 9 bases	No hubo hibridación
CYP6A2	No hubo hibridación	Hibridación de 8 bases
CYP6A8	No hubo hibridación	No hubo hibridación

Cuadro 10. Análisis de los iniciadores degenerados para la familia CYP9 contra los citocromos de *D. melanogaster*.

Citocromo P450	Iniciador "Forward"	Iniciador "Reverse"
CYP9B1	No hubo hibridación	No hubo hibridación
CYP9C1	Hibridación de 5 bases	No hubo hibridación

F. Análisis filogenético de los clones CYP6 y CYP9 de *An. albimanus* a nivel de aminoácido

El primer paso en el análisis filogenético fue realizar los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los clones CYP6 y CYP9 con sus citocromos homólogos de *An. gambiae* mediante ClustalW2 (Figura 57 y 58).

Figura 57. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los clones CYP6 de *An. albimanus* y sus citocromos homólogos de *An. gambiae*. Los residuos similares y altamente conservados están señalados por dos puntos y asteriscos.

```

CA613_An.albimanus      NPDIQERLREEINGAIEANGGQLTYDVAMNIAYLDQVIN----- 39
CA615_An.albimanus      NPDIQERLREEINGAIEANGGQLTYDVAMNIAYLDQVIN----- 39
CA612_An.albimanus      NPDIQERLREEINGAIEANGGQLTYDVAMNIAYLDQVIN----- 39
CA601_An.albimanus      NPDIQERLREEINGAIEANGGQLTYDVAMNIAYLDQVIN----- 39
CYP6P4_An.gambiae       NPDIQDRLREEIERAVEENGGEVTYDMVMNVQYLDNVIN----- 39
CA603_An.albimanus      NQDVQEKGRQCVRVLERHDGKMSYEAVVEMKYLDQILNGNVSRGMPLGSKQLRLNCFI 60
CA610_An.albimanus      NQDVQEKGRQCVRVLERHDGKMSYEAVVEMKYLDQILNG-FPRGMPLGSKQL-LNCFI 58
CYP6M2_An.gambiae       NPEVQEKGRECVREILQKHNGEMSYDAVVEMKYLDQILN----- 39
* :*: : * : : . : : : .*: : : * : : : * : : : * : : : *

CA613_An.albimanus      -ETLRKYPPLESVNRCFVRDYTIIPGTTTHVIPRGVLVQVPIYAIHHDPEYYLEPERFDPDR 98
CA615_An.albimanus      -ETLRKYPPLESVNRCFVRDYTIIPGTTTHVIPRGVLVQVPIYAIHHDPEYYLEPERFDPDR 98
CA612_An.albimanus      -ETLRKYPPLESVNRCFVRDYTIIPGTTTHVIPRGVLVQVPIYAIHHDPEYYLEPERFDPDR 98
CA601_An.albimanus      -ETLRKYPPLESVNRCFVRDYTIIPGTTTHVIPRGVLVQVPIYAIHHDPEYYLEPERFDPDR 98
CYP6P4_An.gambiae       -ETLRKYPPIESLSRVPMRDYTVPGTKHVI PKDTFIQIFVYALHRDFEFYFEPDQFNPD 98
CA603_An.albimanus      TETLRKYPFVPIHFRIASKDYQVPGTKSVLEAGTAVMVPVHAIHHDPEIFPEPARYDPER 120
CA610_An.albimanus      TETLRKYPFVPIHFRIASKDYQVPGTKSVLEAGTAVMVPVHAIHHDPEIFPEPSRYDPER 118
CYP6M2_An.gambiae       -ESLRKYPFVPIHFVASKDYHVPGTKSVLEAGTAVMIPVHAIHHDPEVFPNPEQDFPER 98
*:*****: * . :*: :*: . * : . . : :*: :*: :*: : * : :*: :*

CA613_An.albimanus      FTTEEAVKARVPYIFL 113
CA615_An.albimanus      FTTEEAVKARVPYIFL 113
CA612_An.albimanus      FTTEEAVKARVPYIFL 113
CA601_An.albimanus      FTTEEAVKARVPYIFL 113
CYP6P4_An.gambiae       FLPEEVKKRHPYVFL 113
CA603_An.albimanus      FSPEEESKRHPYAWT 135
CA610_An.albimanus      FSPEEESKRHPYAWT 133
CYP6M2_An.gambiae       FSPEQEAKRHPYAWT 113
* * * * * :

```

Figura 58. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los clones CYP9 de *An. albimanus* con sus citocromos homólogos de *An. gambiae*. Los residuos similares y altamente conservados están señalados por dos puntos y asteriscos.

```

CA909_An.albimanus      RIMFELIAECGQSMVDHLRSEE--ARQAAGSGLQLEMKDVMSRFNDVIGTAAFGIKVDS 58
CYP9J3_An.gambiae      RIMFALIADCGKSMVEHFREEDKKARAAGGTGYQLEMKDVMTRFANDVIGTAAFGIKVDS 60
CA906_An.albimanus      RNMFVLISKSAGDAMERLVAYS-----KGEFFAMELRDLYSRLGNDAMTSISFGVEVDS 54
CYP9M1_An.gambiae      ---FVLLSKSAGDAMKRLVVFA-----RGKPFAMELRDLYSKLGNDAMTSISFGVDVDS 51
          * *::... . ::::          *   ::::: : ::::*:: : : *:::***
          .

CA909_An.albimanus      FREPENEFISMARSIMNQSPVKVIMMGFSLFPKLMSRLKIDFLSKEEDRFFRQITITET 118
CYP9J3_An.gambiae      FRDPTNVFISMARSVTNQESLVKVLKMIGYTFAPKLMTRLNIDFLTPEEDQFFRNTILET 120
CA906_An.albimanus      LTDRDNEFFLKGKRLAQIDG-WPGFKLLSGMMPWLLRWLHIGLLYKDVNEFYLEAVSMN 113
CYP9M1_An.gambiae      LTDPDNEFFLKGKRLAQIDG-LPGLKLLMTTILPGLFKFLRLGVLYKDVNEFYLEAVSTN 110
          : : * * : . : : : .          :::: : * * : *...* : :.*: :: .
          .

CA909_An.albimanus      MRVRQEKGIFRPDMIELLMQAKKGSLKHQQEGEKKSGTETEEGFATVEESQIG---RRA 175
CYP9J3_An.gambiae      MRTRQEKGIFRPDMIELLMQAKKGSLKHQQ-AEEPRTDSETGEGFATVEESHVG---RRA 176
CA906_An.albimanus      IRHRLQNLIKRPDFIHLLLQARKDELCEQ-EDASLES----AGFSMATTHAVD---GDG 165
CYP9M1_An.gambiae      IRYRERNLIKRPDFFIHLLLQARRNELNSEQTEDDALES----AGFSTAETHTVEQRGATG 166
          :* * .: * **:*.*:**:..* :* : . **: . : .
          .

CA909_An.albimanus      HDRAWIDSELIAQAFIFFFAGYETVSWSISFALYELAVAEDIQRKLREEIDETEATLADG 235
CYP9J3_An.gambiae      HDRVWIDTELIAQAFIFFFAGFETISWTISFALYELAVNEDIQARLYEEVRDAEQSLEEG 236
CA906_An.albimanus      ERLEWQDIDITAAAVSFFFGGIETTATLLCFMSYELAVNPSIQNRLRLEIDSVRGELADG 225
CYP9M1_An.gambiae      ETLQWHDVDITAAAASFFFGGIETTTTVLCFTSYELAVNPPIQERLRAEIDSARDELIDG 226
          . * * :: * * **.* ** : :.* ***** ** :* * : ... * :*
          .

CA909_An.albimanus      AVIDYEKLQSMRYMDMVVT 254
CYP9J3_An.gambiae      KILTYEQLQSLPYLDMVVS 255
CA906_An.albimanus      VTPTYEVPQKMKYLDMVVT 244
CYP9M1_An.gambiae      ATPTYEILQKMKYLDMVVS 245
          . ** *.: *::***:
  
```