

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Determinación del perfil de expresión de genes homólogos de *bol* y *zpg* a lo largo del desarrollo de *Anopheles albimanus*, principal vector de malaria en Guatemala.

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Evelyn Andrea Ramos Nufio
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala,

2017

Determinación del perfil de expresión en genes homólogos de *bol* y *zpg* a lo largo del desarrollo de *An. albimanus*, principal vector de malaria en Guatemala.

Hoja de Firmas de Visto Bueno de Tribunal examinador

Vo. Bo.:

(f) 
Dra. Pamela Pennington

Tribunal Examinador:

(f) 
Dra. Pamela Pennington

(f) 
Dra. Mabel Taracena

(f) 
Lic. Renata Mendizábal

Guatemala, 8 de Diciembre de 2017

PREFACIO

En Guatemala, la malaria sigue siendo un problema de salud. Entre el 2016 y 2017 se registraron alrededor de 6,854 casos de malaria causada por *Plasmodium vivax* (SIGSA, 2017). Los tratamientos para el control del principal vector de malaria en Guatemala, *Anopheles albimanus*, no han sido eficientes. Además, focos de resistencia a insecticidas han sido reportados (WHO, 2016). Técnicas de biología molecular como la interferencia de ARN pueden ser utilizadas para eliminar a este vector. La implementación de esta técnica permitirá el desarrollo de protocolos necesarios para generar insectos estériles mediante el silenciamiento de genes que regulan la espermatogénesis.

Por lo tanto, es necesario conocer el perfil de expresión de dichos genes en *An. albimanus*. En la presente investigación se reporta el perfil de expresión de genes homólogos de espermatogénesis en *An. albimanus*: *boule* (AALB005972) y *zpg* conocido también como *zero population growth* (AALB006050). Los perfiles de expresión se obtuvieron a partir de la extracción de ARN mensajero en los distintos estadios de desarrollo de la cepa “Sanarate” de *An. albimanus*: larva, pupa y adulto. Por último, se generó ADN copia que se utilizó para la cuantificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR por sus siglas en inglés). Este estudio marca el inicio de la búsqueda de la erradicación de la malaria mediante técnicas de biología molecular en Guatemala.

Este trabajo de graduación fue financiado por la Agencia Atómica Internacional y Filantropía Abierta (International Atomic Agency and Open Philantropy) mediante la Fundación del Centro de Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), Centro de Estudios en Biotecnología y Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala.

Le agradezco a mis padres Helion Ramos y Evelyn Nufio, por darme apoyo económico y moral a lo largo de toda mi carrera y por haber creído en mi cuando les dije que quería estudiar Bioquímica y Microbiología. Le agradezco a la Dra. Pamela Pennington, por haberme guiado desde el inicio de mi carrera y darme la oportunidad de hacer mi tesis con ella; a la Dra. Mabel Taracena por su apoyo incondicional que recibí en todo el proceso de mi tesis, su amistad y los consejos que aún recibo de ella en mi vida profesional; a la Lic. Claudia Paiz por su tiempo y paciencia para lograr este reto ordenadamente. Agradezco al personal del insectario- Jorge Sincal y Pedro Peralta- por mantener la cepa de laboratorio. Reconozco a los mencionados anteriormente por haberme ayudado a lo largo de mi primera investigación y que mejor lugar que en la Universidad del Valle de Guatemala.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
RESUMEN.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	3
III. OBJETIVOS.....	5
IV. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.....	7
V. JUSTIFICACIÓN.....	9
VI. MARCO TEÓRICO.....	11
A. Malaria.....	11
B. Transmisión de malaria: mosquitos como vector.....	16
C. Técnicas moleculares para el control de vectores.....	20
D. Genes importantes en espermatogénesis.....	22
1. Gen <i>boll</i>	22
2. Gen <i>zpg</i>	25
E. FUNDAMENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	28
A. ADN.....	28
B. ARN.....	31
1. Estructura.....	31
2. Síntesis de ARN.....	32
3. Tipos de ARN.....	32
4. Extracción y cuantificación de ARN.....	36
5. Traducción.....	35
6. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	38
7. RT-PCR.....	40
8. PCR tiempo real.....	41
VII. METODOLOGÍA.....	47
A. Objetivo 1.....	47
B. Objetivo 2.....	49
C. Objetivo 3.....	51

D. Objetivo 4.....	53
VIII. RESULTADOS.....	55
A. Estandarización de cantidad de tejido de <i>An. albimanus</i> a utilizar.....	55
B. Muestras de ARN extraído tratado con DNasa.....	58
C. Reacción de transcripción reversa.....	59
D. Estándarización de PCR tiempo real.....	61
E. Perfiles de expresión de genes	
AALB005972 (<i>boll</i>) y AALB006050 (<i>zpg</i>) en <i>An. albimanus</i>	62
IX. DISCUSIÓN.....	65
X. CONCLUSIONES.....	71
XI. RECOMENDACIONES.....	73
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	75
XIII. ANEXOS.....	81

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Indicadores de pureza de ácidos nucleicos.....	39
Cuadro 2. Síntesis de primera hebra de ADNc con distintos oligos.....	41
Cuadro 3. Características principales para el diseño de oligos para qPCR.....	46
Cuadro 4. Preparación de reacción de transcripción reversa.....	50
Cuadro 5. Mapa de carga de qPCR para optimización de ADNc de pupa y adulto.....	51
Cuadro 6. Volúmenes de reactivos usados para qPCR.....	52
Cuadro 7. Programa “Ct. <i>An. albimanus</i> ” usado para qPCR.....	52
Cuadro 8. Pasos de amplificación en qPCR.....	52
Cuadro 9. Peso de los estadios de <i>Anopheles albimanus</i>	55
Cuadro 10. Concentraciones de ARN de primera réplica biológica en larvas.....	55
Cuadro 11. Concentraciones de ARN de segunda réplica biológica en larvas.....	56
Cuadro 12. Concentraciones de ARN de tercera réplica biológica en larvas.....	56
Cuadro 13. Concentraciones de ARN de primera réplica biológica L4, pupa y adulto.....	56
Cuadro 14. Concentraciones de ARN de segunda réplica biológica L4, pupa y adulto.....	57
Cuadro 15. Concentraciones de ARN de tercera réplica biológica L4, pupa y adulto.....	57
Cuadro 16. Eficiencia de oligos homólogos de <i>zpg</i> , <i>boll</i> y <i>actina</i> a 0.4uM y 0.6uM.....	61
Cuadro 17. Casos de malaria en Guatemala 2016 y 2017.....	81
Cuadro 18. Secuencia de oligos usados para PCR en tiempo real.....	82
Cuadro 19. Características de oligos de AALB006050 (<i>zpg</i>) sintetizados.....	82
Cuadro 20. Dímero de oligos de <i>zpg</i>	82
Cuadro 21. Heterodímeros de oligos de <i>zpg</i>	83
Cuadro 22. Hairpins de oligos sintetizados de <i>zpg</i>	83
Cuadro 23. Secuencias homólogas de <i>zpg</i> en <i>An. albimanus</i>	84
Cuadro 24. Secuencias homólogas de <i>boll</i> en <i>An. albimanus</i>	85
Cuadro 25. Secuencias de gen de <i>actina</i> en <i>An. albimanus</i>	86
Cuadro 26. Datos crudos de optimización de PCR tiempo real en pupa.....	88
Cuadro 27. Datos crudos de optimización de PCR tiempo real en adulto.....	92
Cuadro 28. Datos crudos de primera réplica de PCR tiempo real larvas (<i>boule</i>).....	96
Cuadro 29. Datos crudos de segunda réplica de PCR tiempo real larvas (<i>boule</i>).....	97
Cuadro 29. Datos crudos de primera réplica de PCR tiempo larvas (<i>zpg</i>).....	98
Cuadro 30. Datos crudos de primera réplica de PCR tiempo real pupas (<i>zpg</i>).....	98

Cuadro 31. Datos crudos de réplicas biológicas de PCR tiempo real pupas (<i>zpg</i>).....	99
Cuadro 32. Datos crudos de réplicas biológicas de PCR tiempo real adultos (<i>zpg</i>).....	100
Cuadro 32. Flujo de troubleshooting de eventos.....	101

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium sp.</i>	12
Figura 2. Huevos de <i>Anopheles sp.</i>	16
Figura 3. Larva de <i>Anopheles sp.</i>	17
Figura 4. Pupa de <i>Anopheles sp.</i>	17
Figura 5. <i>Anopheles albimanus</i> adulto hembra.....	19
Figura 6. <i>Anopheles albimanus</i> adulto hembra.....	19
Figura 7. Técnica de interferencia de ARN mediante entrega de ARN doble hebra.....	21
Figura 8. Diagrama de <i>boll</i> , <i>daz</i> y <i>dazl</i>	23
Figura 9. Expresión de <i>boll</i> , <i>daz</i> y <i>dazl</i> durante gametogénesis.....	24
Figura 10. Modelo evolucionario de genes involucrados en la reproducción masoclinal.....	24
Figura 11. Cromosoma 3L de <i>Anopheles albimanus</i> y transcrito de BOLL.....	25
Figura 12. Estructuras de inxinas de <i>D. melanogaster</i>	26
Figura 13. Topología de proteína ZPG en <i>D. melanogaster</i>	26
Figura 14. Localización de ZPG en células germinales de <i>D. melanogaster</i>	27
Figura 15. Cromosoma 3L de <i>Anopheles albimanus</i> y transcrito de ZPG.....	28
Figura 16. Esquema de estructura de ADN.....	30
Figura 17. Estructura de bases nitrogenadas.....	31
Figura 18. Topología de ARN mensajero (ARNm).....	34
Figura 19. ARN en gel de agarosa al 1.5% y 2%.....	35
Figura 20. Dogma central de la biología molecular.....	36
Figura 21. Espectro de ácidos nucleicos.....	38
Figura 22. Espectros de ácidos nucleicos y sus contaminantes.....	39
Figura 23. Curvas de amplificación PCR tiempo real.....	41
Figura 24. Unión de SYBR Green al ADN en PCR tiempo real.....	43
Figura 25. Curvas de amplificación, fusión y derivada PCR tiempo real.....	44
Figura 26. Curvas de amplificación, fusión y derivada PCR tiempo real.....	45
Figura 27. Resultados de PCR de muestras de ARNm de <i>An. albimanus</i> (1).....	58
Figura 28. Resultados de PCR de muestras de ARNm de <i>An. albimanus</i> (2).....	58
Figura 29. Resultados de PCR de muestras de ADNc sintetizado (1).....	59
Figura 30. Resultados de PCR de muestras de ADNc sintetizado (2).....	60
Figura 31. Gráfica de expresión relativa del ortólogo de <i>boll</i> en larva.....	62

Figura 32. Gráfica de expresión relativa del ortólogo de <i>boll</i> en pupa.....	62
Figura 33. Gráfica de expresión relativa del ortólogo de <i>boll</i> en adulto.....	63
Figura 34. Gráfica de expresión relativa del ortólogo <i>zpg</i> en larva.....	63
Figura 35. Gráfica de expresión relativa del ortólogo <i>zpg</i> en pupa.....	64
Figura 36. Gráfica de expresión relativa del ortólogo de <i>zpg</i> en adulto	64
Figura 37. Gráfica de eficiencia de oligos <i>boll</i> a 0.4uM y 0.6uM qPCR (pupa).....	89
Figura 38. Gráfica de eficiencia de oligos <i>actina</i> a 0.4uM y 0.6uM qPCR (pupa).....	90
Figura 39. Gráfica de eficiencia de oligos <i>zpg</i> a 0.4uM y 0.6uM qPCR (pupa).....	91
Figura 40. Gráfica de eficiencia de oligos <i>boll</i> a 0.4uM y 0.6uM qPCR (adulto).....	93
Figura 41. Gráfica de eficiencia de oligos <i>actina</i> a 0.4uM y 0.6uM qPCR (adulto).....	94
Figura 42. Gráfica de eficiencia de oligos <i>zpg</i> a 0.4uM y 0.6uM qPCR (adulto).....	95

ABSTRACT

Central America is currently working towards malaria elimination. Despite the mass distribution of insecticide treated nets, malaria persists in focalized areas of Guatemala. This has important social and economic consequences for the elimination target, and sustainable and specific methods for mosquito control will be required to reach the regional malaria elimination target. The sterile male technique was successful in the 1970's at controlling *Anopheles albimanus*, the main vector in the region. We propose that sterile males may be produced by silencing genes vital for spermatogenesis. A loss of function of boule (*bol*) and zero population growth (*zpg*) genes in mosquitos generates sterile adults. In the present study, we quantified *bol* and *zpg* expression profiles by real time PCR, to determinate in which life stage of *An. albimanus* these genes will have a higher expression. For that, we extracted RNA from all life stages, using a standardized amount of 30mg of tissue per pool. We generated cDNA from larval, pupal and adult stages, with females and males analyzed separately. Finally, we measured mRNA expression levels for each stage by qPCR. The results showed that *bol* and *zpg* have high expression rates in male adult stages, with three- and 30- fold the initial gene expression observed in first instar larvae, respectively. Interestingly, we also detected expression of both genes in female adults, which could suggest that these genes have other functions on females. According to these results, we propose that continuously feeding dsRNA to larvae for silencing these genes when they begin to be expressed, at first instar larvae, would have a high impact on adult male fertility. If that is the case, using dsRNA to silence one of these genes could lead to adult sterile males that could be used as a complementary strategy for malaria elimination.

RESUMEN

La malaria, también conocida como paludismo, es una enfermedad que ha acompañado a la humanidad por siglos y que afecta millones de personas alrededor del mundo. A pesar de que siguen los esfuerzos para aliviar y eliminar dicha enfermedad, aún no ha sido posible erradicarla. El uso de mosquiteros con insecticidas y el rociamiento intradomiciliario en Guatemala ha sido parcialmente efectivo, lo cual hace que todavía existan regiones focalizadas donde hay transmisión de malaria.

La aparición de resistencia a insecticidas y otros factores sociales y antropológicos, hacen necesaria la aplicación de métodos más eficientes y sostenibles para poder lograr la eliminación de los focos de malaria en el país. La técnica de insecto estéril (SIT por sus siglas en inglés) es un método utilizado para el control de insectos en agricultura. La aplicación de esta técnica a insectos relevantes en salud pública es importante debido a que la irradiación a la que se someten los insectos induce esterilidad. Los insectos estériles son liberados en el campo, en donde copulan con hembras silvestres, y como consecuencia reducen la población del insecto. A pesar de esto, la irradiación en mosquitos se ha encontrado menos eficiente ya que las dosis de radiación requeridas para inducir esterilidad en machos afectan el estado físico de los mismos y reduce su competencia con los machos silvestres. Por lo tanto, nuestro grupo de investigación propone desarrollar un método de esterilización basado en interferencia de ARN (iARN). Este se basa en alimentar larvas con ARN de doble hebra específico para genes de espermatogénesis y lograr producir mosquitos estériles.

El propósito del siguiente estudio fue investigar el perfil de expresión de dos genes de espermatogénesis, *boll* y *zpg*, en todas las etapas de desarrollo de *Anopheles albimanus*. Esto será la base para desarrollar protocolos eficientes y generar mosquitos estériles por medio de interferencia de ARN. Los perfiles de expresión fueron generados mediante PCR tiempo real de ADN complementario sintetizado a partir de ARN mensajero de tejido de *Anopheles albimanus*. Los resultados obtenidos del análisis de la expresión relativa del gen ortólogo de *boll* con respecto a *actina* se tiene que dicho gen posee un patrón de expresión similar en todos los estadios de larva, pupa y adulto macho y hembra de *An. albimanus*. De igual manera, existe una expresión similar del ortólogo de *zpg* en larvas y pupas macho y hembra de *An. albimanus*.

Sorprendentemente, se encontró que *zpg* se expresaba 70 veces más en adulto hembra que en macho. Esto indica que el ortólogo de *zpg* tiene funciones distintas en hembras que en machos y necesitan ser investigadas para saber el papel fisiológico. Se recomienda en estudios posteriores realizar disección de tejidos específicos del mosquito (testículos y ovarios) y evaluar de la misma manera la expresión de estos genes. A partir de esto, se puede concluir que el mejor gen a ser silenciado es *zpg*, porque la disminución de su expresión se observará notoriamente la disminución de este cuando se silencie mediante interferencia de ARN.

I. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria causada por especies de *Plasmodium* como *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale*. El ciclo de esta enfermedad inicia mediante la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles*, infectado con el parásito. En el mosquito ocurre su etapa sexual y en el humano ocurre la etapa asexual del parásito (WHO, 2016).

Se le llama “vector” a un organismo que transmite un agente infeccioso, produciendo una enfermedad (Fraume, 2006). Estos agentes, son el vehículo para que patógenos logren llegar al hospedero objetivo, el cual en la mayoría de los casos es un vertebrado (Berenguer, 2007).

El principal vector de malaria en Guatemala es *Anopheles albimanus*, seguido de *An. pseudopunctipennis*, *Anopheles vetitipennis* y *Anopheles darlingi* (WHO, 2016).

El ciclo de vida de *An. albimanus* comprende cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Luego de alimentarse de sangre, una hembra de *An. albimanus* oviposita alrededor de 200 huevos en agua que eclosionan a larva 2 a 3 días después de haber sido ovipositados. La larva se desarrolla en agua y tiene cuatro instares: L1, L2, L3 y L4. La larva tiene una cabeza desarrollada y un abdomen segmentado. En la naturaleza se alimentan normalmente de algas y al final de cada instar muda su exoesqueleto. Al llegar a L4, la larva se convierte en pupa. El cuerpo de la pupa consiste en un cefalotórax y un abdomen articulado. Para que el adulto emerja, es necesario que la superficie dorsal de las divisiones del cefalotórax de la pupa se rompa. El adulto tiene el cuerpo seccionado en tres partes: cabeza, tórax y abdomen (Mandal, 2015).

Durante el 2016 y 2017 en Guatemala, se han registrado alrededor de 6,864 casos de malaria debido a *Plasmodium vivax* (SIGSA, 2017). Las medidas de control utilizadas como mosquiteros impregnados con insecticida (ITNs, por sus siglas en inglés), rociado intradomiciliar focal y tratamiento de criaderos no han sido eficientes (WHO, 2016). Estos métodos han quedado limitados y producen otros problemas como puntos focales de resistencia a insecticidas (Becker *et al* 2010).

En la actualidad, los departamentos de Guatemala con mayores casos de malaria por *P. vivax* son: Escuintla, Izabal, Alta Verapaz, Suchitepéquez y Retalhuleu (SIGSA, 2017).

Debido a esto es necesario la implementación de técnicas de biología molecular, como el ARN de interferencia, para el control vectorial. Esta técnica consiste en la introducción de ARN de doble hebra a las células que permite hacer modificaciones genéticas en los vectores objetivo (Becker *et al* 2010).

Estudios en especies como *Anopheles gambiae* (Zhang *et al* 2010) y *Aedes aegypti*, tanto en Pridgeon *et al* (2008) como en Whyard *et al* (2015), comprueban que esta técnica definitivamente es una opción para controlar enfermedades transmitidas por mosquitos. Los genes objetivo a ser silenciados mediante interferencia de ARN son genes necesarios para el desarrollo fisiológico y la

adecuada reproducción del vector. Por ejemplo, genes involucrados en la espermatogénesis del mosquito. Algunos genes candidatos a ser silenciados son: *boll* (*boule*) y *zero population growth* (*zpg*).

El gen *boll* es un miembro de la familia de genes DAZ (*Deleted in Azoospermia*) que codifica para proteínas de unión al ARN. Se ha encontrado que una mutación de este gen ocasiona arresto meiótico en la espermatogénesis en mosca y en la oogénesis de nemátodos (Xu *et al* 2001). En la investigación hecha por Whyard *et al* (2015), se identificó mediante hibridización substractiva por supresión (SSH, por sus siglas en inglés) que el gen *boll* está específicamente expresado en los testículos de *Aedes aegypti* y no es expresado en larvas ni en ovarios. En *An.albimanus*, este gen se encontró como *AALB005972* (Vector Base, 2017).

Por otro lado, el gen *zpg* codifica para proteínas de uniones gap o *gap junctions* (GJ). Estas son canales intercelulares que ayudan a la comunicación entre células permitiendo la movilización de compuestos como iones o moléculas en ellos (Cao *et al* 2008). Este gen está involucrado en la formación de gónadas en machos de *D. melanogaster* (Magnusson *et al* 2011) y *An. gambiae* (Tazuke *et al* 2002). De igual manera, este gen es necesario para la diferenciación temprana de células germinales en mosca según Gilboa *et al* (2003). Whyard *et al* (2015), menciona que *zpg* es un gen que se encuentra expresado en los testículos y ovarios de *Ae. aegypti* (Whyard *et al* 2015). En *An. albimanus*, este gen se encuentra como *AALB006050* (Vector Base, 2017).

Los resultados de este estudio muestran el perfil de expresión de genes homólogos de *boule* (*AALB005972*) y *zpg* (*AALB006050*), en larva, pupa y adulto (macho y hembra) de *An. albimanus*.

Esto permitirá el desarrollo de protocolos eficientes de interferencia de ARN de para el control del principal vector de malaria en Guatemala.

II. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

A. General:

¿Cómo varían los perfiles de expresión de los genes homólogos a *bol* y *zpg* entre los estadios del ciclo de vida de *Anopheles albimanus*?

B. Específicas:

- ¿Cuál es el protocolo más adecuado para realizar la extracción y purificación de ARN mensajero de estadios larvarios, pupas sexadas y adultos sexados de *An. albimanus*?
- ¿Cuál es el protocolo para la producción de ADN complementario a partir del ARN extraído de *An. albimanus*?
- ¿Cuáles son las condiciones de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real para los genes homólogos a *bol* y *zpg* de *An. albimanus*?
- ¿Se pueden sugerir estos perfiles de expresión generados como blancos moleculares de los ensayos de silenciamiento con ARN de interferencia?

III. OBJETIVOS

A. General:

Describir la expresión de los genes identificados como posibles homólogos de *bol* (AALB005972, vector base) y “*zero population growth*” (*zpg*) (AALB006050, vector base) a lo largo del ciclo de vida de *Anopheles albimanus*.

B. Específicos:

1. Adaptar los protocolos de extracción y purificación de ARN mensajero de los cuatro estadios larvales, pupas y adultos sexados de *An. albimanus*.
2. Implementar un método que permita la producción de ADN complementario a partir del ARN extraído de *An. albimanus*.
3. Estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real para los genes homólogos a *bol* y *zpg* de *An. albimanus*.
4. Determinar los perfiles de expresión de los genes *bol* y *zpg* en *An. albimanus* para sugerir blancos moleculares de los ensayos de silenciamiento con ARN de interferencia.

IV. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Las secuencias identificadas como homólogos a los genes *bol* y *zpg* tendrán mayores niveles de expresión en pupas y adultos machos que en pupas y adultos hembras.

V. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la malaria causada por *P. vivax* provoca un estimado de casos a nivel mundial del 34%, 42%, 23% y 0.3% en las regiones de Sureste asiático, del Mediterráneo, del Pacífico occidental y en la Región Africana, respectivamente. En América presenta el 64% de los casos de malaria mundiales causados por este parásito (WHO, 2017). En Guatemala, se está trabajando para eliminar esta enfermedad transmitida por mosquitos del género *Anopheles* infectados con *P. vivax*. A pesar de la aplicación de distintos métodos de control vectorial, como la distribución de pabellones tratados con insecticida y debido a que las áreas que se rocían con insecticida son limitadas (WHO *et al* 2017); aún existen áreas focalizadas en donde la malaria sigue siendo un problema de salud (SIGSA, 2017).

En el año 2016 y 2017, las áreas con mayor incidencia de malaria en Guatemala son: Escuintla, Izabal, Retalhuleu, Suchitupéquez y Alta Verapaz, en donde hubo un total de 6,867 casos confirmados de malaria por *P. vivax* (SIGSA, 2017). Debido que los métodos tradicionales de rociamiento son susceptibles a la aparición de resistencia a insecticidas (Brogdon *et al* 1999; Dong, 2007 y Dzul *et al* 2007), es necesario desarrollar otros métodos de control sustentables para alcanzar el objetivo de eliminación de malaria, como la técnica del insecto estéril (SIT por sus siglas en inglés). Esta técnica se ha desarrollado para el control de insectos plaga desde mediados del siglo pasado como la mosca Tsé-Tsé, (Vreysen *et al* 2000); la mosca mediterránea, (Shelly *et al* 1994); y la polilla de la manzana (Bloem & Bloem, 1998) y consiste en producir una población estéril de mosquitos que no producen gametos y cigotos viables. Esto también se puede llevar a cabo mediante radiación o agentes químicos, pero afecta el estado físico y la competencia reproductiva de los mosquitos silvestres (Dyck *et al* 2005).

Es importante mencionar que en los 1970's, se evaluó el uso de *An. albimanus* quimio-esterilizados en El Salvador, mostrando su efectividad en un área lacustre (Lofgren *et al* 1974). Este estudio demostró que es factible la reducción de poblaciones de mosquitos con esta técnica. Recientemente, Zhang *et al* (2010) demostró la eficiencia de la técnica de interferencia de ARN por la vía oral al reprimir genes de quitina sintasa en *An. gambiae*. En *Aedes aegypti*, Whyard *et al* (2015) mostró que el silenciamiento de los genes *boll* y *zero population growth (zpg)* usando esta técnica producía mosquitos estériles. Se propone que mosquitos *An. albimanus* estériles podrían ser generados mediante el silenciamiento de genes vitales para la espermatogénesis.

Por lo tanto, el propósito del siguiente estudio es investigar el perfil de expresión de los genes homólogos de *boll* y *zpg* en todas las etapas de desarrollo de *Anopheles albimanus*. Esto permitirá desarrollar protocolos eficientes para generar mosquitos estériles por medio de interferencia de ARN (iARN) y comparar sus perfiles de expresión.

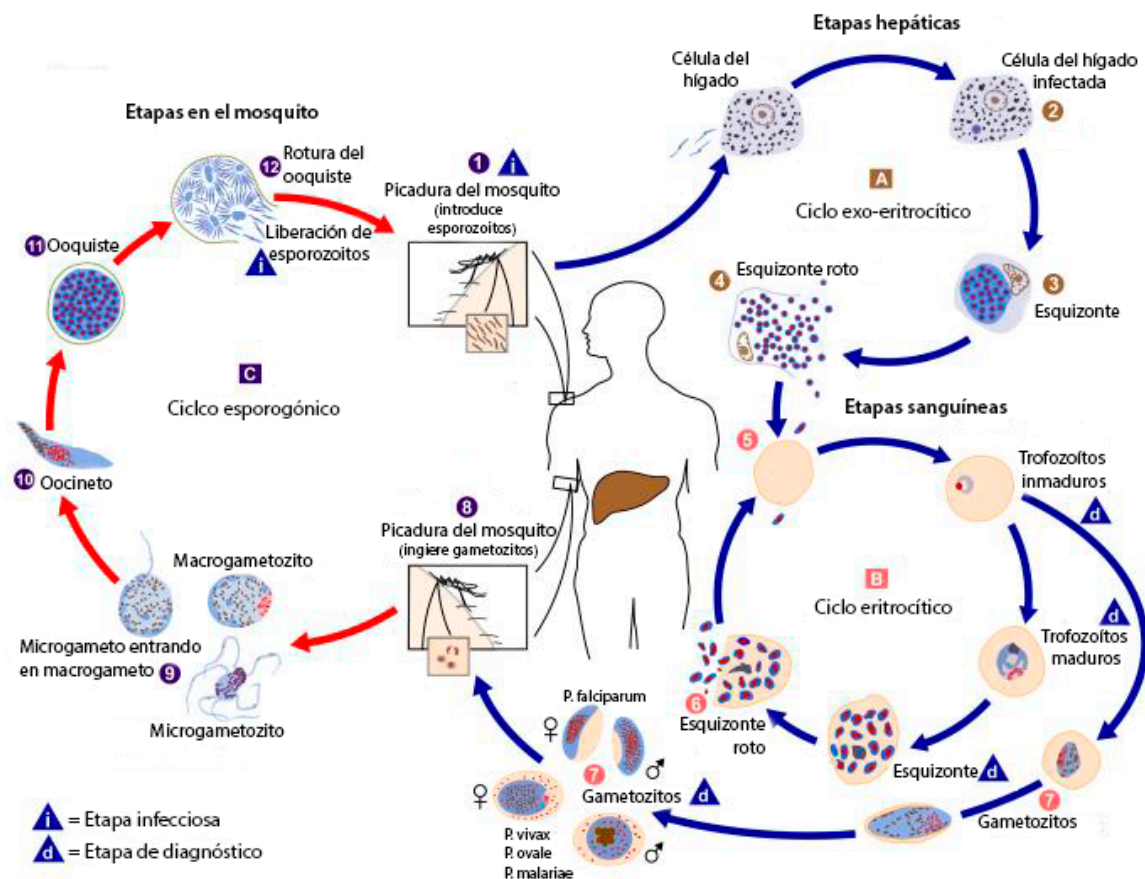
VI. MARCO TEÓRICO

A. MALARIA

La malaria en el humano es una enfermedad transmitida por mosquitos del género *Anopheles* que pueden estar infectados por especies del parásito *Plasmodium* como *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale*. La ecología de *Plasmodium* involucra una etapa sexual que se desarrolla en el mosquito y una etapa reproductiva asexual que ocurre en el humano (Miller *et al* 1994).

El ciclo de la enfermedad se inicia con la picadura del mosquito hembra de *Anopheles* infectado. Durante la alimentación, el mosquito introduce al sistema circulatorio los esporozoitos de *Plasmodium* que son llevados a las células parenquimales del hígado en donde ocurre esquizogonia o reproducción asexual. Esta fase o ciclo exo-eritrocítico tiene una duración entre 8 a 25 días dependiendo de la especie de plasmodio (Murray *et al* 2015). Los plasmodios producidos son liberados mediante la ruptura de los hepatocitos infectados. Estos se unen a receptores específicos en la superficie de los eritrocitos y entran a las células en donde empieza el ciclo eritrocítico. La fase asexual termina con la ruptura del glóbulo rojo que libera alrededor otros plasmodios o merozoitos, que inician otro ciclo de replicación al infectar otros eritrocitos. Los principales síntomas de la malaria se debe a las toxinas que son liberadas cuando se produce la ruptura de los glóbulos rojos (Murray *et al* 2015). Dentro del eritrocito, los merozoitos pueden desarrollarse en gametocitos masculinos o femeninos. El ciclo de reproducción sexual empieza con la formación de esporozoitos en el ciclo esporogónico cuando el mosquito ingiere gametocitos masculinos o femeninos maduros durante la alimentación de sangre. Esto ocurre en el estómago del mosquito cuando se fusionan los gametos para formar cigotos y se desarrollan en un oocineto que significa “huevo en movimiento” (Cox, 2010). Los oocinetos se desarrollan en oocistos al penetrar la barrera del intestino medio. Las células del intestino medio mueren mediante apoptosis (Murray *et al* 2015). Los oocistos producen y liberan miles de esporozoitos que invaden las glándulas salivales del mosquito lo que permite infectar al humano en la siguiente alimentación con sangre (Cox, 2010). El ciclo de vida de *Plasmodium* se muestra a continuación.

Figura 1. Ciclo de vida del *Plasmodium sp.* (A) Ciclo exo-eritrocítico. (B) ciclo eritrocítico, (C) ciclo esporogónico.



(CDC, 2016).

1. Incidencia y distribución geográfica de la malaria. Según el Reporte Mundial de Malaria (2016), ocurrieron alrededor de 212 millones de casos de malaria alrededor del mundo. La tasa de incidencia de casos de malaria ha disminuido un 41% del 2010 al 2015. De los 91 países con malaria en el 2015, 39 alcanzaron a tener una reducción de mortalidad de alrededor del 40%; 14 tuvieron una reducción entre 20-40% y 8 países tuvieron una reducción >20%. Otros 10 países reportaron no haber tenido muertes por malaria entre 2010 y 2015 y los 20 países restantes experimentaron una reducción en mortalidad <20% (WHO & Global Malaria Programme, 2016). En las Américas, el porcentaje de disminución en el número de casos de malaria del 2000 al 2015 fue del 74% y el porcentaje de muertes de malaria disminuyó en un 69% (WHO & Global Malaria Programme, 2015).

Esta disminución de mortalidad, se debe a la intervención de control de vectores, mediante mosquiteros tratados con insecticida (ITNs por sus siglas en inglés, *Insecticed-treated bed nets*) y rociamiento residual de interiores de insecticida (IRS por sus siglas en inglés, *Indoor residual spraying*). Además, alrededor de 31% de la población de mujeres embarazadas recibieron tres dosis

de tratamiento preventivo intermitente (IPTp por sus siglas en inglés, *Intermittent preventive treatment*) en el 2015; las personas de la región africana recibieron pruebas diagnósticas y los casos de malaria fueron tratados con drogas antimaláricas efectivas (WHO & Global Malaria Programme, 2016).

En Guatemala, entre 1940 y 1955, se comprobaron alrededor de 300,000 casos de malaria anuales por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), lo cual evidenció la necesidad de crear medidas para erradicarla. Esto conllevó a la creación del Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SNEM) (Álvarez, 1997).

Al inicio de las actividades del SNEM, hubo un descenso dramático, evidente en 1963 (Alvarez, 1997) probablemente, esta disminución fue debido a la campaña de rociamiento con DDT que se inició en 1956 (Juárez, 2013). A partir de 1976 aumentaron los factores que anulaban los logros de años anteriores, entre los cuales se encontraba el terremoto de 1976, lo que hizo que los casos de malaria aumentaran de 60,000 a 70,000 por año (Álvarez, 1997). La desarticulación del SNEM por el Ministerio de Salud debido a las políticas de descentralización del estado, provocó debilitamiento de la vigilancia y control vectorial a nivel nacional. Para el año 2000 se tenía un registro de 50,000 casos de malaria confirmados. En el 2006, Guatemala fue favorecida por financiamiento del Fondo Global para controlar la malaria en tres áreas altamente endémicas (Petén, Alta Verapaz y Quiché), las estrategias utilizadas se basaron en el control integral del vector con participación comunitaria, fortalecimiento de la red de laboratorios diagnósticos, fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica, investigaciones operativas, elaboración de manuales operativos y participación intra e intersectorial (Juárez, 2013).

Según los datos obtenidos por el Sistema de Información Gerencial de Salud (2017) desde el 2016 hasta la semana del 10 de julio del 2017, se han registrado alrededor de 6,864 casos de malaria por *Plasmodium vivax*. Entre los departamentos con mayores casos de malaria se encuentran: Escuintla, Izabal, Alta Verapaz, Suchitepéquez y Retalhuleu (Cuadro 1, Anexos) (SIGSA, 2017).

2. Manifestaciones físicas de malaria. Los síntomas de malaria son variados, pueden estar ausentes, ser leves, severos e incluso pueden causar la muerte. La malaria se puede dividir en malaria no complicada o severa, la clasificación depende del periodo de incubación que varía de 7 a 30 días luego de la picadura del mosquito Anofelino infectado con *Plasmodium* (Murray *et al* 2015). Los ataques clásicos de malaria no complicada son: Escalofríos, fiebre, dolores de cabeza, vómitos y convulsiones en niños pequeños. La malaria severa ocurre cuando las infecciones se complican debido al fallo de algún órgano o si existen anomalías en el metabolismo de la persona infectada. Los síntomas son: anemia severa, hemoglobinuria, reacciones inflamatorias en los pulmones, coagulación de sangre, baja presión arterial, fallo renal, hiperparasitemia, acidosis metabólica e

hipoglicemia. La malaria causada por *P. vivax* si no es tratada, conlleva a daño renal, pulmonar y hepático (Murray *et al* 2013).

3. Medidas de prevención y tratamientos antimaláricos

a. Medidas de protección personal.

1) Mosquiteros. Los mosquiteros son empleados como barreras físicas para evitar la picadura de mosquito y han sido registrados como una manera eficiente de combatir la malaria (Becher y Kouyaté, 2005). Estudios hechos en África sub-Sahariana donde se han usado mosquiteros tratados con insecticidas (ITNs¹), han demostrado una reducción en las tasas de muertes por malaria a un 44% (Fegan *et al.*, 2007).

En un estudio hecho en varios países de Latinoamérica, se comprobó la eficiencia de mosquiteros con y sin insecticida. Se encontró que en lugares donde se usaban mosquiteros con insecticidas se observaron menor cantidad de mosquitos anofelinos en reposo en el interior de las viviendas que en lugares donde solo se usaban mosquiteros sin tratar. El número promedio de mosquitos atrapado en las ITNs era mayor que en los mosquiteros sin tratar. Esto demuestra la efectividad de los mosquiteros tratados con insecticida (Zimmerman y Voorham, 1997).

Entre los factores asociados a la efectividad del mosquitero, se encuentran los factores sociales y culturales. Para que sea eficiente, los mosquiteros deben de ser utilizados constantemente y correctamente por los usuarios. La falta de educación o las diferencias culturales pueden jugar un factor importante y puede llegar a ser una desventaja. Por ejemplo, en una comunidad pescadora de Kenia, los mosquiteros dados por ONGs² y el Ministerio de Salud especialmente a mujeres embarazadas y a niños, fueron utilizados como una red para secar pescado (Minakawa *et al.*, 2008). En otro estudio, el 30% de la población Keniana usaba mosquiteros para otros propósitos (Alaii *et al* 2003). En Zambia por ejemplo, fueron usados como vestidos de novia (Hopkin, 2008).

4. Vacuna contra la malaria. El progreso para desarrollar una vacuna contra la malaria ha sido lento debido a la variabilidad del genoma y la capacidad de evasión al sistema inmune que el parásito posee. (Abbas *et al.*, 2014). Actualmente, se están investigando varios tipos de vacunas: uno de estos es la vacuna pre-eritrocítica, que evita la entrada de los esporozoitos en los hepatocitos.; Otros tipos son las vacunas eritrocíticas, que previenen la invasión de los protozoos en los eritrocitos y las vacunas de fase sexual, que previenen el desarrollo de esporozoitos infecciosos en las glándulas salivales de los mosquitos anofelinos (Tyagi, Garg y Sahu, 2012). La vacuna RTS,S/AS01 (conocida como Mosquirix®) fue diseñada para prevenir la infección del parásito a los hepatocitos. Se han hecho investigaciones en fase III sobre la eficiencia de la vacuna RTS,S/AS01 en siete países

¹ Insecticide-treated bed nets

² Organización no Gubernamental

Africanos en niños de 5 a 17 meses de edad en infecciones clínicas y contra malaria severa. La eficiencia fue de 56% y 47% respectivamente (Agnandji *et al.*, 2011; RTS,S Clinical Trials Partnership *et al.*, 2012). Mientras que los candidatos de vacunas anti-maláricas se desarrollan, es necesario analizar otras vías más eficientes para controlar brotes de malaria, entre estas se encuentra el control vectorial (Chang *et al* 2013).

a. Medicamentos antimaláricos

1) Malaria transmitida por *P. falciparum*. Las cepas de *P. falciparum* que están presentes en áreas como el África o Suramérica son resistentes a cloroquinas. Si el paciente fue infectado con *P. falciparum* resistente a cloroquina, deben de ser tratados con otros agentes como meloquina, Malarone, quinina, quinidina, Fandisar y Doxiciclina. Cuando no es claro que la infección se deba a *P. falciparum* resistente a cloroquina, se debe asumir que es resistente. En Centroamérica aún se puede utilizar cloroquina o quinina parental ya que no se han encontrado cepas resistentes a estos antimaláricos (CDC, 2015). En situaciones donde se tenga una mezcla de *P. falciparum* y *P. vivax* deben usarse un tratamiento no solo para eliminar *P. falciparum* sino también para eliminar *P. vivax* (Murray *et al* 2013).

2) Malaria transmitida por *P. vivax*. Este tratamiento involucra medidas de apoyo como descanso, regulación del equilibrio de fluidos y en algunos casos transfusiones de sangre. También involucra regímenes quimioterapéuticos supresivos, terapéuticos y gametocidas. La cloroquina es una droga utilizada para el tratamiento terapéutico y de supresión. Seguido por primaquina usada para la cura radical y la eliminación de gametocitos (Murray *et al* 2013).

B. TRANSMISIÓN DE MALARIA: MOSQUITOS COMO VECTOR

Diversas enfermedades dependen de vectores biológicos para que los patógenos sean transmitidos de un hospedero a otro. De esta forma, se le ha denominado “vector” a un organismo que transmite un agente infeccioso, produciendo una enfermedad (Fraume, 2006). Estos agentes son el vehículo para que patógenos (parasitarios o no) logren llegar al hospedero objetivo, el cual en la mayoría de los casos es un vertebrado (Berenguer, 2007).

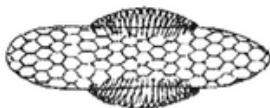
Existen dos tipos de vectores: biológicos y mecánicos. El vector biológico es un organismo, usualmente un artrópodo, en el cual el agente infeccioso completa un estadio de su ciclo de vida (Hernández, 2002). Es decir, el vector necesita tener la capacidad de poder alojar al agente etiológico, permitir su crecimiento o multiplicación; así como poseer la capacidad de transmitir al hospedador (Estébanez, 2005). Sin ese vector biológico, el agente infeccioso no puede vivir, pues ha evolucionado con él y lo necesita para subsistir y preservar su especie (Hernández, 2002). Por otro lado, un vector mecánico se caracteriza porque el agente etiológico infeccioso o parasitario no tiene la necesidad de evolucionar ni de multiplicarse en el vector (Berenguer, 2007; Estébanez, 2005). Este modo de transmisión puede considerarse accidental (Estébanez, 2005). En Guatemala los principales vectores de la malaria son *Anopheles albimanus*, *An. pseudopunctipennis* y *An. darlingi*. La especie de *Plasmodium* responsable de un 98% de las infecciones es *P. vivax* y solamente el 2% es *P. falciparum* (WHO *et al* 2015).

1. Ciclo de vida de mosquitos *Anopheles*. Los mosquitos anofelinos pasan por cuatro etapas en su ciclo de vida. Tres de estas etapas son acuáticas y duran de 5 a 14 días, dependiendo de la temperatura del ambiente en el que se encuentren (Mandal, 2015). Las etapas del ciclo de vida son:

- *Huevo:*

Luego de alimentarse de sangre, la hembra oviposita entre 50 y 200 huevos. Los cuales son colocados en agua y no son resistentes a la desecación. Los huevos eclosionan 2 a 3 días luego de ser ovipositados, pero en climas fríos puede tardar hasta 3 semanas (Mandal, 2015).

Figura 2. Huevos de *Anopheles sp.*

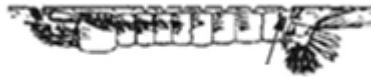


(Modificado de Mandal, 2015).

- *Larva:*

La larva se puede encontrar tanto en agua fresca o salobre y prefieren lugares donde se encuentre expuestas a la luz del sol (Becker *et al* 2010). La larva tiene una cabeza bien desarrollada, un tórax largo, y un abdomen segmentado. Debido a que no tienen piernas, posicionan su cuerpo paralelamente a la superficie del agua. Respiran por medio de espiráculos, los cuales se localizan en el octavo segmento del abdomen. En la naturaleza, las larvas se alimentan mayoritariamente de algas, bacterias y otros microorganismos que existen en la capa superficial del agua. Si son perturbadas nadan hacia el fondo del agua. Nadan mediante movimientos espasmódicos o mediante propulsión por medio de los cepillos bucales. La larva tiene cuatro fases o instares. Al final de cada instar, la larva muda su exoesqueleto para poder seguir creciendo. Al final de los cuatro instares, la larva se convierte en pupa (Mandal, 2015).

Figura 3. Larva de *Anopheles sp.*

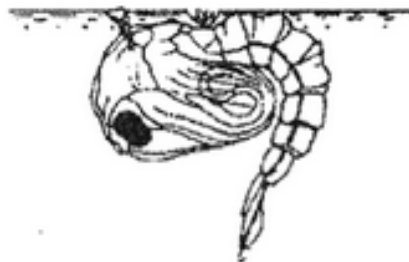


(Modificado de Mandal, 2015).

- *Pupa:*

El cuerpo de la pupa consiste en una porción globular llamado cefalotórax, un abdomen articulado de nueve segmentos que es usado para moverse cuando la pupa es perturbada. En este estadio, la pupa no tiende a alimentarse (Becker *et al* 2010). Cuando se posiciona la pupa de lado tiene forma de “coma”. Tienden a salir con frecuencia a la superficie para respirar por medio de un par de sifones respiratorios localizados en el cefalotórax. Para que el adulto emerja, es necesario que la superficie dorsal de las divisiones del cefalotórax se rompa (Mandal, 2015).

Figura 4. Pupa de *Anopheles sp.*



(Modificado de: Mandal, 2015).

- *Adulto:*

Tienen seccionado su cuerpo en tres partes: cabeza, tórax y abdomen. La cabeza se especializa en obtener información sensorial mediante un par de antenas largas y segmentadas. Las antenas tienen la función de detectar olores de criaderos donde las hembras ponen huevos; así como olores que les permiten alimentarse de sangre. La cabeza tiene forma alargada con una proboscis hacia adelante, usada para alimentarse, junto con dos palpos sensoriales. El tórax es especializado para la locomoción, tiene un par de alas unidas a este y tres pares de patas. El abdomen está especializado para la digestión y cuando las hembras se alimentan de sangre, el abdomen aumenta ligeramente de tamaño. La sangre sirve como fuente de proteína para la producción de huevos, que llenan gradualmente el abdomen de la hembra (Mandal, 2015).

Los mosquitos anofelinos se distinguen por su forma de descansar: no colocan su abdomen paralelo a la superficie del agua, sino que lo mantienen en el aire. Los machos se alimentan de néctares, de donde pueden obtener azúcar. Las hembras también se pueden alimentar de néctar, pero necesitan de la sangre para producir huevos, debido a esto se consideran organismos anautógenos (que requieren la ingesta de sangre para poder madurar la primera serie de oocitos) (Belles, 1988). Una vez los huevos estén completamente desarrollados (de 2 a 3 días), la hembra los oviposita y reanuda la búsqueda nuevamente para alimentarse de sangre. Este ciclo se repite hasta que la hembra se muere. En la naturaleza la hembra vive máximo hasta tres semanas, pero en cautiverio puede vivir hasta más de un mes (CDC, 2015; Mandal, 2015).

Anopheles albimanus es predominantemente exofágico, es decir, que prefiere alimentarse al aire libre y tiene comportamiento exofílico, lo que significa que escoge lugares con gran cobertura vegetal para alimentarse y reproducirse. Aunque hay evidencia de que en áreas ubicadas al norte de México y Centro América esta especie prefiere descansar en el interior de lugares como casas después de alimentarse. Las picaduras de esta especie normalmente son en la tarde y la noche, alrededor de las 18:00 a 24:00 horas según Olano *et al.* (1997). Esta especie también tiene características antropofílicas y zoofílicas, pero esto va a depender de la región, ya que en un estudio hecho en Colombia se definió que *An. albimanus* tenían alta actividad antropofílica. Mientras que en un estudio hecho en México, tenía actividad zoofílica. De igual manera, esto también depende de la disponibilidad de alimento que tenga el mosquito y de las condiciones ecológicas de esta especie (Sinka *et al.*, 2010).

Figura 5. *Anopheles albimanus* adulto hembra.



(Modificada de Carpenter y LaCasse, 1955).

Figura 6. *Anopheles albimanus* adulto hembra



(Modificado de Becker *et al* 2010).

1. Capacidad vectorial de mosquitos *Anopheles*. La eficiencia de transmisión de enfermedades por parte de los vectores biológicos es una medida de su capacidad vectorial. Esta se define como “el promedio de número de inoculaciones de un parásito específico, originado de un caso de malaria en una unidad de tiempo que la población distribuiría si las picaduras de las hembras fueran infectivas” (Cohuet *et al* 2009). Los mosquitos que transmiten la malaria son insectos que pertenecen a la orden Díptera, genero *Anopheles*. Los mosquitos *A. albimanus* son endofágicos, pues se alimentan dentro

de habitaciones, zoofágico-oporutinista y luego de alimentarse descansan en áreas al aire (Foote y Cook 1959). Además, está distribuida a lo largo de Latinoamérica y el Caribe. Taylor (1966), menciona en su estudio “The Ecology of *Anopheles albimanus* (Wied)” que *An. albimanus* se alimenta entre 17:30pm y 21:00pm. *Anopheles gambiae* tiene un comportamiento estrictamente antropofílico. Las hembras normalmente se alimentan en la noche y se describen como endofágicas y endofílicas. Debido a estas características de *An. gambiae*, es considerado uno de los vectores más eficientes de malaria (Mandal, 2015).

2. Medidas de control de malaria basadas en el control del vector. Entre algunas de las medidas usadas alrededor del mundo para reducir la malaria se encuentran los mosquiteros impregnados con insecticidas (ITNs) y control de larvas y criaderos (World Health Organization *et al* 2015). Los insecticidas usados para impregnar mosquiteros y en repelentes contra mosquitos y garrapatas contienen sustancias químicas llamadas piretroides y piretrinas. Según la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de Estados Unidos (2016), estas sustancias aumentan su toxicidad al combinarse y al ser liberados al ambiente mediante aerosoles, pueden entrar en contacto con alimentos, con el agua y los animales presentes en la misma (ASTDR, 2016). Además, en algunos estudios hechos en poblaciones Anofelinas de México y Guatemala se ha presentado que los métodos de control basados en insecticidas pierden sostenibilidad cuando surgen cepas resistentes (Brogdon *et al* 1999; Dong, 2007 y Dzul *et al* 2007).

Por lo tanto, es necesario implementar otros métodos como la técnica del mosquito estéril la cual se basa en introducir esterilidad en la población de mosquitos. Es decir, evita que al reproducirse produzcan gametos y cigotos funcionales mediante químicos o radiación (Dyck *et al* 2005). En los años 1970's, se evaluó el uso de mosquitos machos quimio-estériles en El Salvador. Estos machos fueron liberados en el Lago Apastepeque a lo largo de un periodo de 5 meses. Los resultados de este estudio confirman que la población de larvas y adultos de *An. albimimanus* se redujo en un 99%. La reducción hizo que la población necesitara 4 meses para recuperar su densidad normal. (Lofgren *et al* 1974). Con este estudio demuestra lo sustentable y eficientes que puede llegar a ser esta técnica.

C. TÉCNICAS MOLECULARES PARA CONTROL DE VECTORES

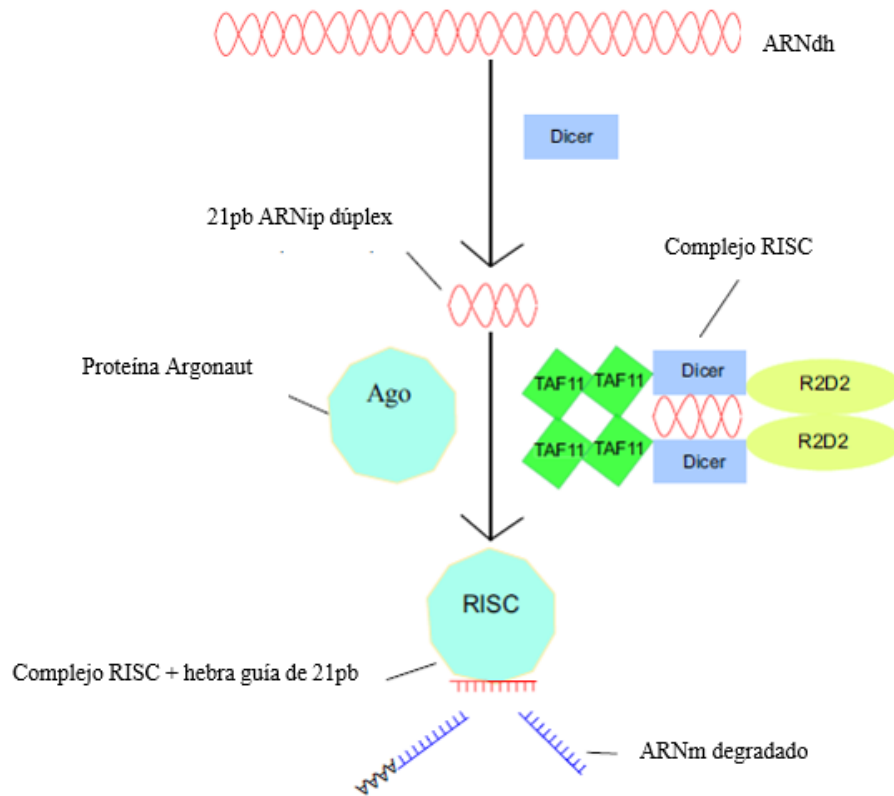
Actualmente, las técnicas de biología molecular son herramientas que se pueden utilizar para auxiliar el control vectorial, ya que las técnicas que utilizan actualmente se quedan limitadas o producen otro tipo de problema como lo es la resistencia a insecticida (Becker *et al* 2010).

Una de las técnicas de biología molecular que permiten la creación de vectores modificados genéticamente es mediante interferencia de ARN, que permite hacer modificaciones transferibles a otros organismos y que no sean transferidos verticalmente.

Estudios en especies como *Anopheles gambiae* (Zhang *et al* 2010) y en *Aedes aegypti* tanto en Pridgeon *et al* (2008) como Whyard *et al* (2015) comprueban que esta técnica definitivamente es una opción para controlar enfermedades transmitidas por mosquitos.

El mecanismo de interferencia de ARN consiste en la introducción de ARN de doble hebra (ARNdh) a las células, el cual es cortado por una endonucleasa llamada “Dicer”, que corta el ARN de doble hebra convirtiéndola en pedazos ARNdh de 21 pares de bases. Este ARN contiene una hebra “pasajera” y otra hebra “guía”, que posteriormente es la que se anilla con el ARN mensajero después de que se forma el complejo “RISC” con moléculas como TAF11, DICER y R2D2, el cual induce la proteína Ago (*Argonaut*) a degradar la hebra “pasajera” del ARNdh de 21pb. La hebra guía se une al ARN mensajero y lo degrada, lo cual no permite que se transcriba a proteína (Figura 7).

Figura 7. Técnica de interferencia de ARN mediante la entrega de ARN doble hebra (dsRNA por sus siglas en inglés).



(Modificado de Darrington *et al* 2017).

Entre los genes candidatos a ser silenciados, se encuentran los genes reguladores del ciclo celular y los genes necesarios para la formación de gametos viables y que son los responsables de espermatogénesis y oogénesis.

D. GENES IMPORTANTES EN ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es un proceso complejo de crecimiento, división y diferenciación celular. Este proceso debe estar coordinado dentro de un organismo para producir gametos funcionales y para que puedan reproducirse. Este proceso es usado como un sistema modelo para entender cómo ocurren las divisiones celulares en vías complejas de desarrollo; así también para entender cómo difiere la regulación meiótica y mitótica en eucariotas (Maines & Wasserman, 1999).

1. Gen *boll*. El gen *boll* (*bol*) fue inicialmente identificado en un estudio hecho por Castrillon *et al* (1993) en el cual realizaron tamizajes de mutantes estériles inducidos por transposones en machos de *Drosophila melanogaster* (Eberhart *et al* 1996). Al secuenciar el ADN complementario de este gen se encontró que codifica para una proteína de 228 aminoácidos que contiene una única ribonucleoproteína (RNP) tipo dominio de unión al ARN (RNA-binding domain) (Kim & Baker, 1992). El gen *boll* es un miembro de la familia de genes DAZ (*Deleted in Azoospermia*) (Xu *et al* 2001) que codifica para proteínas de unión al ARN. Esta familia fue descubierta por primera vez en el estudio de Reijo *et al* (1995) en el cual buscaban los genes del cromosoma Y que al eliminarlos causan infertilidad en hombres.

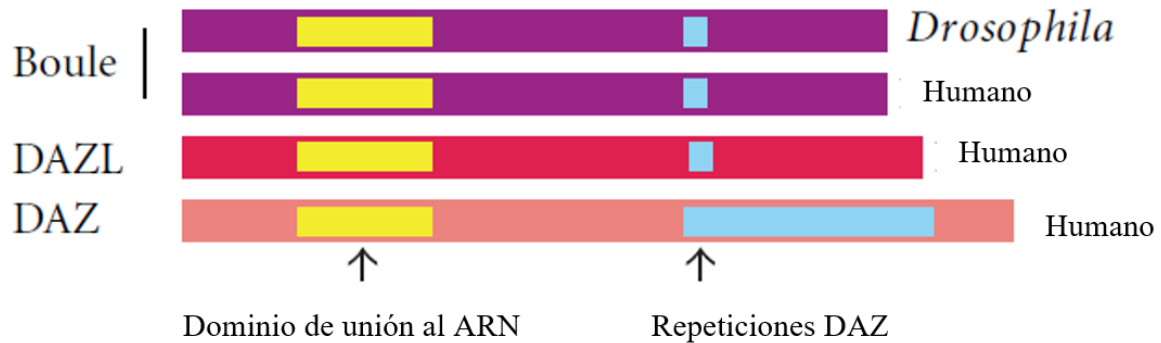
Tanto en *Drosophila melanogaster* (Eberhart *et al* 1996) como en *Caenorhabditis elegans* (Karashima *et al* 1999) se ha encontrado que una mutación de este gen ocasiona arresto meiotico en la espermatogénesis en mosca y en la oogénesis de nemátodos (Xu *et al* 2001).

Además de haber sido identificada la expresión de este gen en los testículos de *D. melanogaster* y en los ovarios de algunos nemátodos como *Caenorhabditis elegans*, también se ha identificado en los testículos del humano y ratón como resume Xu *et al* (2001). En la investigación hecha por Whyard *et al* (2015), se identificó mediante hibridización substractiva por supresión (SSH, por sus siglas en inglés: suppression subtractive hybridization) que el gen *boll* esta específicamente expresado en los testículos de *Aedes aegypti*, no es expresado en larvas ni en ovarios.

Este gen ha sido también identificado en *Bactrocera dorsalis* por Waqar Ali *et al* (2017), en donde se analizó los patrones de expresión de *boll* en la cabeza, intestinos, cuerpo graso, ovarios y testículos de dicho insecto. Como resultados encontró que no había expresión de *boll* en los ovarios únicamente en los testículos.

A partir de los resultados de Xu *et al* (2003), concluyen que *boll* en humanos es ortólogo al gen *boll* en mosca como regulador meiótico del ciclo celular. Las proteínas de ambos genes comparten una similaridad del 42% en la secuencia de la proteína y 80% de similaridad en un nivel de aminoácidos (Xu *et al* 2003) como se muestra en la Figura 8. Además, tienen patrones de expresión idénticos exclusivamente en la meiosis (Xu *et al* 2001).

Figura 8. Diagrama de *boll*, *daz* y *dazl*. Sitios de unión de ARN (amarillo) y repeticiones DAZ (azules).

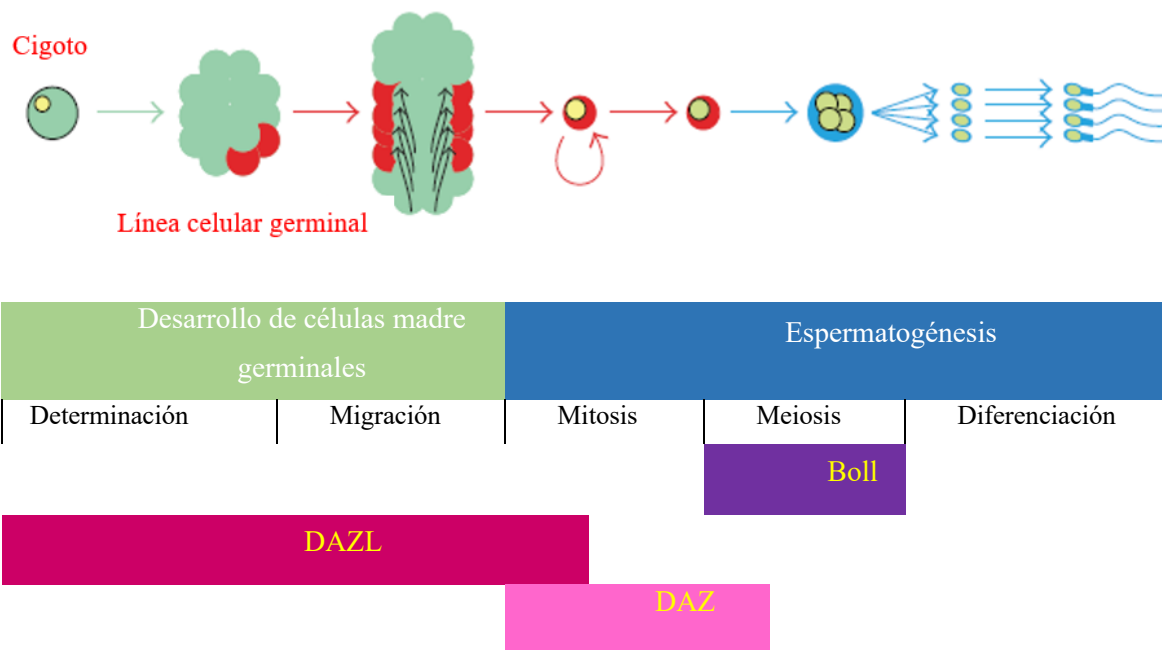


(Modificado de Eirín-López & Ausió, 2011).

En *Drosophila*, según (Maines & Wasserman, 1999), *boll* es un regulador transcripcional del homólogo *cdc25*, llamado *twine*. Este es un regulador del ciclo celular requerido para la transición de la fase G2 a la fase M en el ciclo celular. En la fase G2 la célula crece, hace más proteínas y organelos y comienza a reorganizar su contenido para la mitosis o la fase M, en la cual la célula se divide junto con su ADN duplicado para hacer dos nuevas células. *Twine* codifica a una fosfatasa que regula la actividad del complejo de factor de promoción de maduración (MPF por sus siglas en inglés: *maturation promoting factor*) y permite de manera ordenada que la célula siga los siguientes eventos del ciclo celular meiótico (Maines & Wasserman, 1999).

Por lo tanto, espermatocitos carentes de *twine* fracasan en la transición de las fases G2/M2 y no logran llevar a cabo su completa diferenciación. Por lo tanto, la proteína BOLL es necesaria para la meiosis celular al ser un factor necesario para la translación de ARN mensajero de *twine*, este gen está conservado en todos los metazoos mientras que *daz* y *dazl*, han evolucionado hacia funciones premeióticas relacionadas a proliferación de células germinales como se muestra en la Figura 9.

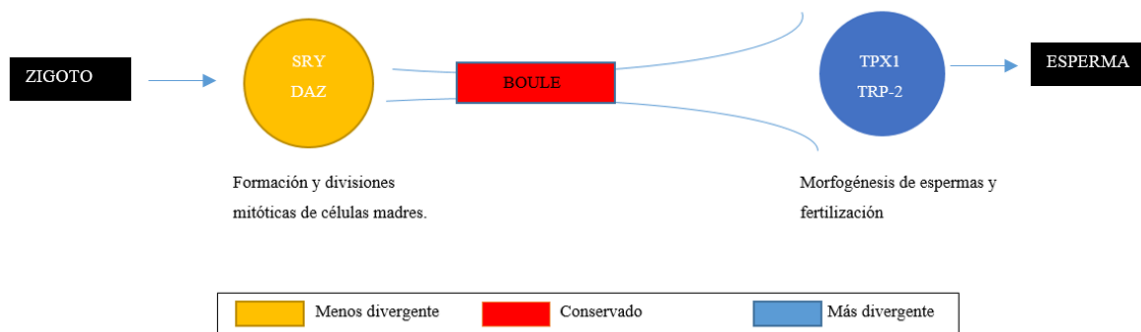
Figura 9. Expresión de *boll*, *daz* y *dazl* durante gametogénesis.



(Modificado de Eirín-López & Ausió 2011).

En la Figura no. 10, se muestra el modelo de genes involucrados en la reproducción masculina. Este modelo indica que los genes requerido para la división meiótica están más conservados que los genes requeridos para la morfogénesis de los espermias o de desarrollo premeiótico de las células germinales. Por lo tanto, meiosis se puede figurar como un sistema del cuello de una botella.

Figura 10. Modelo evolucionario de genes involucrados en la reproducción masculina.

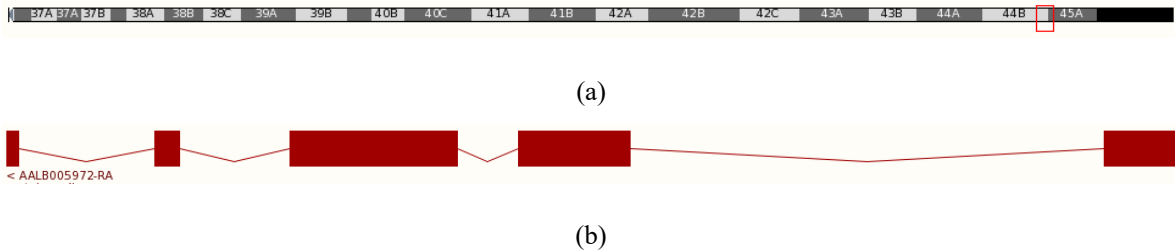


(Modificado de Xu *et al* 2003).

La estructura de este gen en *Anopheles albimanus* (AALB005972, Vector Base) contiene 5 exones y 4 intrones (anexos), codifica para una proteína de 177 residuos y se encuentra ubicado en el

cromosoma 3L (29,877,723-29,879,337) (Vector Base, 2017). La secuencia codificante tiene una longitud de 534pb y se observa junto a los exones e intrones en la sección de anexos.

Figura 11. Cromosoma 3L de *Anopheles albimanus* (a) y transcrito de BOLL. Los exones se encuentran en rojo y los intrones los unen mediante líneas.



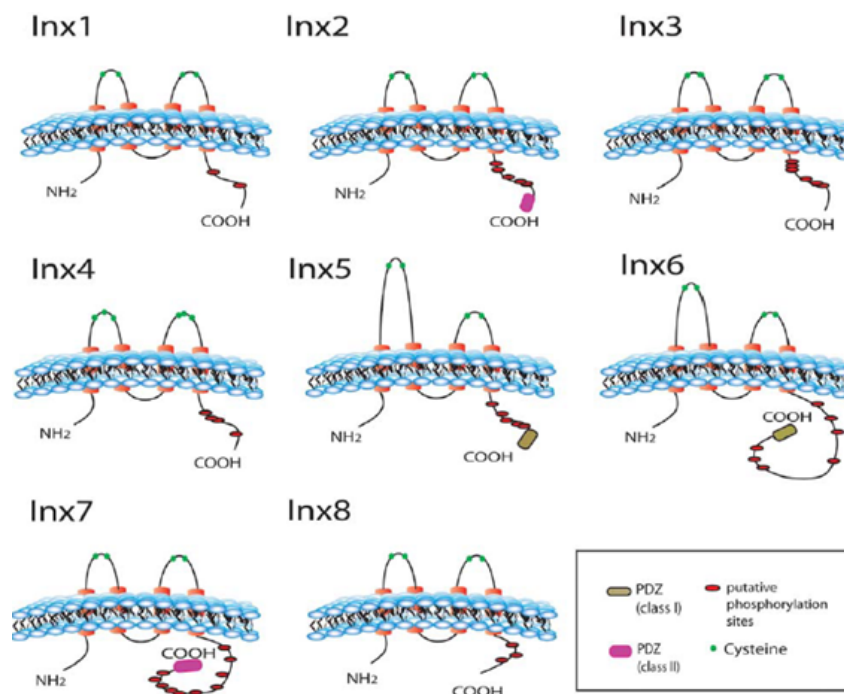
(Modificado de Vector Base, 2017).

2. Gen Zero Population Growth (*zpg*). Las uniones *gap* o *gap junctions* (GJ) son canales intercelulares que permiten la comunicación entre células permitiendo la movilización de compuestos como iones o moléculas en ellos (Cao *et al* 2008). Estas uniones están conformadas por hemicanales en las células. En artrópodos, estos hemicanales son hexámeros compuestos por subunidades proteicas llamadas *inexinas* (Phelan *et al* 1998).

Bauer *et al* (2005) menciona que dichas proteínas tienen importantes roles en fisiológicos en artrópodos. Algunas *inexinas* en *D. melanogaster* cumplen la función de desarrollo de neuronas retinales como la *inexina 1* (Curtin *et al* 2002); son necesarias para el cierre dorsal en embriogénesis como la *inexina 3* (Giuliani *et al* 2013); otras como la *inexina 4*, *zero population growth*, están involucradas en la formación de gónadas en machos tanto de mosca (Magnusson *et al* 2011) como de *An. gambiae* (Tazuke *et al* 2002) y en hembra de *D. melanogaster*, la *inexina 4*, es necesaria para la diferenciación temprana de células germinales (Gilboa *et al* 2003).

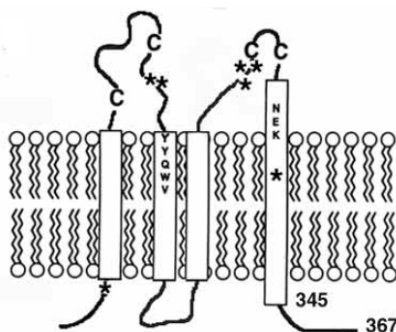
Las estructuras de las *inexinas* tienen dos *loop* extracelulares (EL1 y EL2), cuatro dominios transmembranales hidrofóbicos (TM1-TM4) y tres dominios citoplasmáticos que incluyen un *loop* intracelular (IL) y la terminación amino y carboxílica (NT y CT, respectivamente) (Bauer *et al* 2005). La *inexina 4* (*zpg*) no contiene los dos residuos de cisteínas que tienen otras *inexinas* en mosca, sino que tiene tres residuos entre los dominios de EL1 y EL2, esto puede reflejar los cambios evolucionarios en las secuencias necesarios para la comunicación entre hemicanales (Bauer *et al* 2005). Las terminaciones N, no son consideradas variables entre *inexinas* en mosca como las terminaciones carboxílicas. La estructura de las distintas *inexinas* se observa en la Figura 12 y la topología de ZPG en la Figura 13.

Figura 12. Estructuras de Inexinas de *D. melanogaster*.



(Bauer *et al* 2005).

Figura 13. Topología de proteína ZPG en *D. melanogaster*.

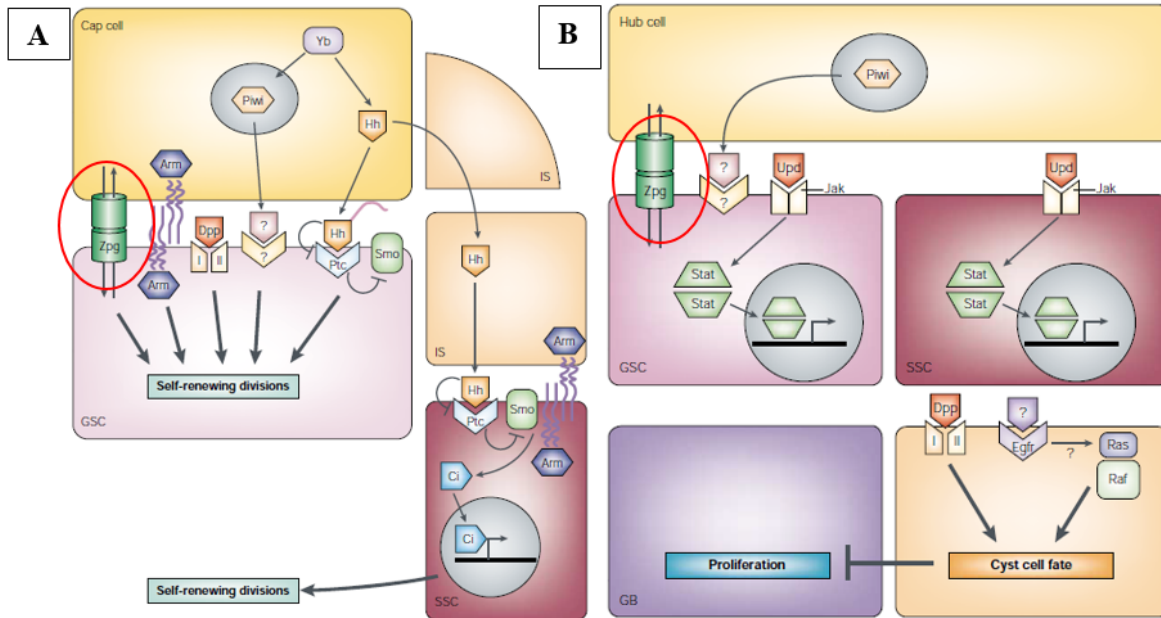


(Modificado de Tazuke *et al* 2002).

En *Drosophila*, la inexina 4 (*zpg*) se encuentran en el cromosoma III y está localizada en la posición 65B5, respectivamente (Bauer *et al* 2005). Esta proteína es necesaria para la diferenciación de células germinales durante la gametogénesis en ambos sexos. Los insectos que no expresan el gen *zpg* son viables, pero son estériles y tienen gónadas pequeñas. Además, tienen un pequeño número de células germinales tempranas y que carecen de etapas posteriores de diferenciación (Tazuke *et al.*, 2002). La figura 14 señala donde se encuentra la proteína de ZPG en el nicho de interacciones de células madres ováricas y testiculares de *D. melanogaster*. Se puede observar que comunican las

células madres germinales de la hembra y del macho con las células somáticas adyacentes, células tapón (*Cap cells*) y células cubo (*Hub cells*).

Figura 14. Localización de ZPG en células germinales de *D. melanogaster*. Donde (A) células madres ováricas y (B) testiculares. GSC: células germinales (Germinal stem cells); Células tapa (cap cells), IS: (Inner sheath cells), SSC: (Somatic Stem Cells), y HB: células cubo (Hub cells).



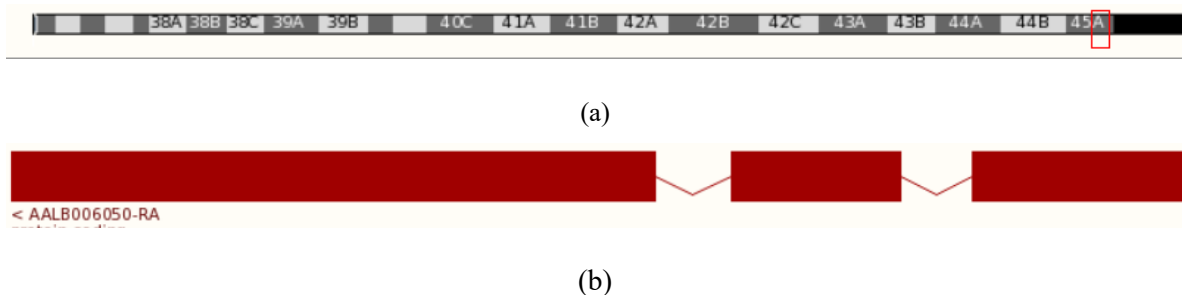
(Lin, 2002)

El gen *zpg* también ha sido identificado en los ovarios y testículos de *Bactrocera dorsalis* en el estudio que hizo Waqar Ali *et al* (2017), en donde analizó los patrones de expresión de *zpg* en la cabeza, intestinos, cuerpo graso, ovarios y testículos de dicho insecto. Como resultados encontró que había una mayor expresión relativa de *zpg* en los testículos de *Bactrocera dorsalis* que en los ovarios en los cuales se expresaban 20 veces menos.

En el estudio hecho por Calkins *et al* (2015), se caracterizó y se comparó por primera vez la expresión de inexas a lo largo del ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti*. Se confirmó que las inexas 1, 2, 3 y 7 son expresadas a lo largo del ciclo de vida y en ambos sexos lo cual puede sugerir que cumplen funciones “house-keeping” a lo largo del ciclo de vida. En contraste las inexas 4 y 8, no son expresadas consistentemente y tienen roles específicos en algunas etapas del ciclo de vida o tienen roles dependientes del sexo. En larvas L4 y pupa de *Aedes aegypti* no fue detectable la expresión inexina 4, al igual que en adulto macho. Por otro lado, en adultos hembra sí hubo una expresión moderada de dicha inexina (Calkins *et al* 2015). Por otro lado, Whyard *et al* (2015), menciona que *zpg* es un gen que se encuentra expresado en los testículos y ovarios de *Ae. aegypti*, pero no es expresado en larva. Esto se realizó mediante un ensayo de SSH (Whyard *et al* 2015).

En *An. albimanus*, el gen de *zpg* (AALB006050, Vector Base) se localiza en el cromosoma 3L: 30,951,561 – 30,952,895 (Fig 15). El transcrito de *zpg* contiene 3 exones y 2 intrones, codifica para una proteína de 389 aminoácidos. La secuencia codificante tiene una longitud de 1,170pb y se observa junto a los exones e intrones en la sección de anexos.

Figura 15. Cromosoma 3L de *Anopheles albimanus* (a) y transcrito de ZPG. Los exones se encuentran en rojo y los intrones los unen mediante líneas.



(Modificado de Vector Base, 2017).

E. FUNDAMENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

1. Ácidos nucleicos. Son componentes celulares de alto peso molecular y estructura compleja. Estos pueden ser de dos tipos: el *ácido desoxirribonucleico* (ADN) y el *ácido ribonucleico* (ARN). Los ácidos nucleicos están formados por nucleótidos que tienen una estructura formada por un grupo fosfato, un azúcar (pentosa o ribosa) y dos tipos de bases nitrogenadas: las pirimidinas, que tiene un solo anillo y las purinas, las cuales poseen dos anillos. En los nucleótidos radica toda la información hereditaria de las células que comprenden los organismos vivos. (Gama, 2007).

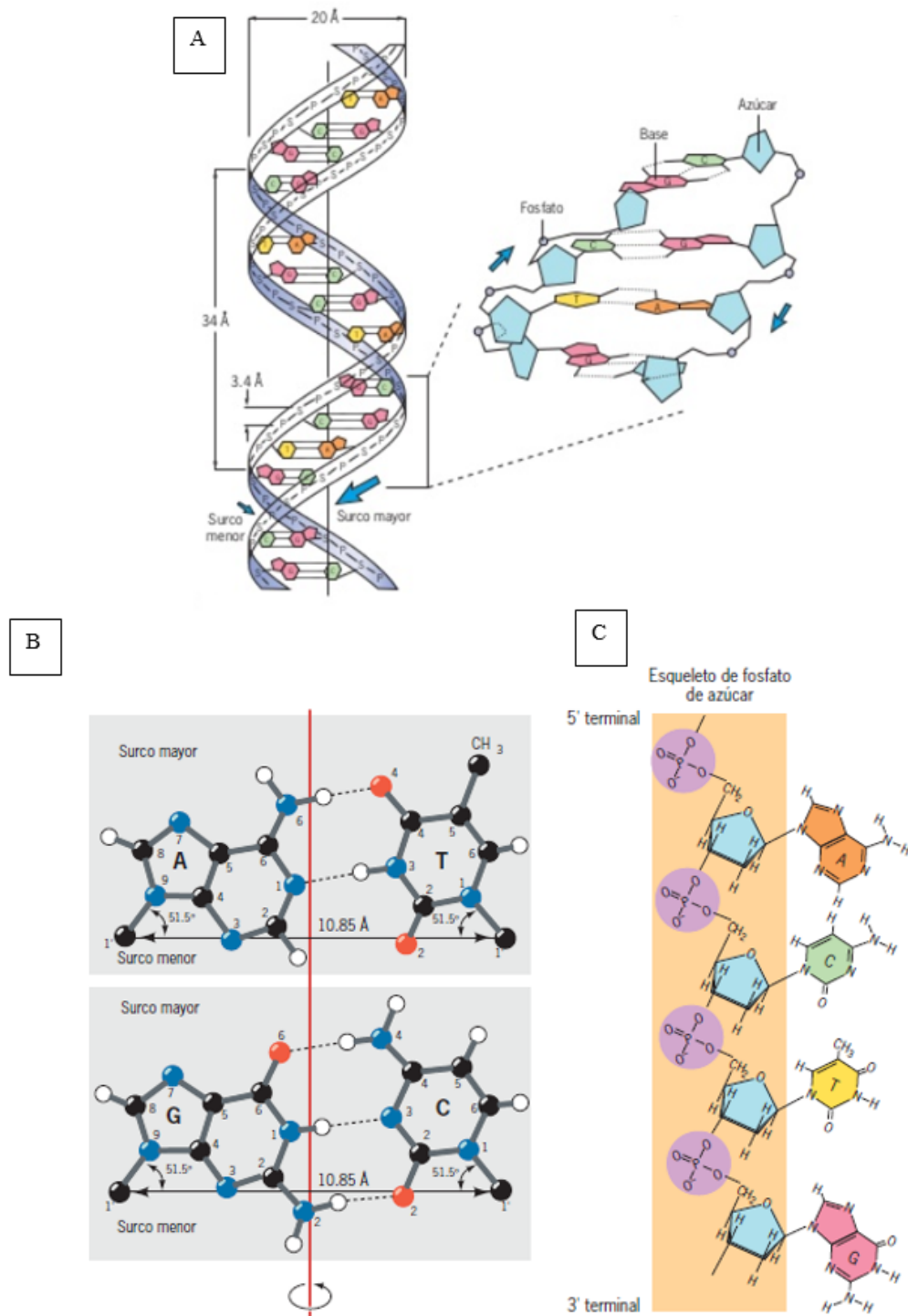
a. ADN

1) Estructura. La estructura del ácido desoxirribonucleico consiste en un azúcar de cinco carbonos, desoxirribosa el cual tiene fijados en la posición 5' del anillo un fosfato esterificado y en la posición 1' tiene una base nitrogenada que pueden ser pirimidinas como la timina (T) y citosina (C) o las purinas como guanina (G) y adenina (A). Los nucleótidos tienen una estructura polarizada. El extremo donde se localiza el fosfato se conoce como *extremo 5'*, mientras que el otro es el *extremo 3'*. A partir de los datos obtenidos de Rosalind Franklin y Maurice Wilkins sobre la estructura del ADN en rayos X, Watson y Crick en 1953, propusieron la estructura del ADN tiene las siguientes características (Figura 16):

- Está integrada por dos cadenas de nucleótidos, que al enrollarse forman una espiral que sigue la dirección de las manecillas del reloj con naturaleza helicoidal (Figura 16, A).
- Las cadenas de la doble hélice son *antiparalelas*. Esto significa que la cadena que está alineada de 5' a 3' la otra cadena está alineada de 3' a 5'.

- El esqueleto de la molécula tiene localizados hacia el exterior el conjunto de *azúcar-fosfato-azúcar-fosfato*, mientras que los grupos de bases nitrogenadas se proyectan hacia el centro del esqueleto (Figura 16, C). Los grupos fosfato le confieren carga negativa a la molécula.
- Las bases nitrogenadas se encuentran en sentido perpendicular al eje longitudinal de la molécula y se colocan como planos apilados. Estas bases le confieren estabilidad a la molécula debido a las interacciones hidrofóbicas y las fuerzas de Van der Waals que hay entre ellas, lo que le dan a la estructura de ADN forma de escalera en caracol.
- Las dos cadenas se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno entre las bases de la cadena y sus correspondientes bases con la otra cadena.
- La distancia de un átomo de fosfato al centro del eje es de 1nm haciendo.
- Una pirimidina está siempre asociada con una purina de la cadena complementaria, lo que produce que la cadena tenga un ancho de 2nm.
- Los átomos de nitrógeno están unidos al cuarto carbono de la citosina y al sexto de la adenina muestran predominantemente la configuración amino (NH_2) y no la forma imino (NH_3).
- Los átomos de oxígeno unidos al sexto carbono de la guanina y el cuarto de la timina muestra predominantemente configuración ceto ($\text{C}=\text{O}$) y no enol ($\text{C}-\text{O}$). A partir de estas restricciones estructurales, la única purina capaz de unirse a la timina estructuralmente es la adenina y que la guanina es la purina que se une a la citosina. Por lo tanto, los únicos pares posibles son A-T y G-C (Figura 16, B).
- Los espacios entre los surcos que forman la hélice crean dos surcos de diferente amplitud: *surco mayor* y *surco menor* (Figura 16, A).
- La doble hélice realiza una vuelta completa cada 10 residuos de nucleótido (3.4nm) o 15° vueltas por cada millón de daltones de masa molecular.
- Las dos cadenas de la doble hélice son complementarias entre sí. Por ejemplo: 5'-AGC-3' es complementario a 3'-TCG-5' (Karp, 2008).

Figura 16. Esquema de estructura de ADN (A). Pares de bases de Watson y Crick (B). Segmento de cadena sencilla de ADN con cuatro nucleóticos (C).



(Karp, 2008).

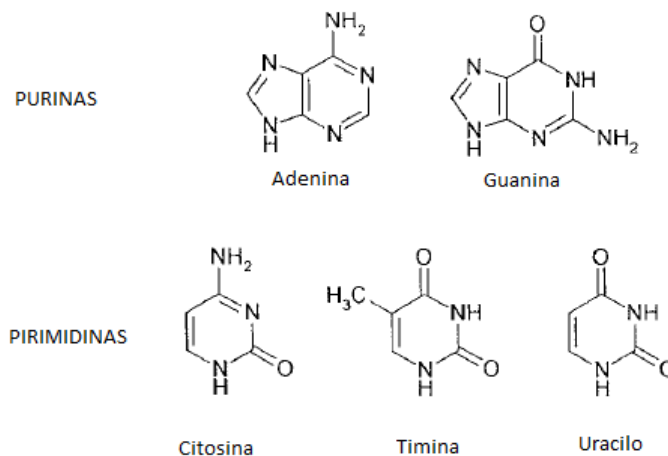
2) Función. El ADN tiene tres funciones principales (Karp, 2008):

- Almacenar información genética, es decir, guarda todas las características heredables del organismo. Contiene información en orden específico de aminoácidos de todas las proteínas que sintetizar para el organismo.
- El ADN contiene información para la síntesis de nuevas cadenas de ADN. La replicación de nuevas cadenas de ADN permite que dichas cadenas se transfieran a células hijas y de un individuo a toda su descendencia.
- La expresión del mensaje genético, más específicamente, el ADN dicta el orden por el cual los aminoácidos se incorporan dentro de la cadena peptídica (Karp, 2008).

b. ARN

1) Estructura. El ácido ribonucleico es una cadena de polímeros de ribonucleósidos (ribosa + base nitrogenada) unidos mediante enlaces fosfodiéster. Las moléculas de ARN de células eucariotas y procariotas son monocatenarias. El ARN tiene ribosa, en lugar de la pentosa del ADN. El carbono 2' de la ribosa tiene unido a un grupo hidroxilo (-OH) que está ausente en el ADN. El ARN es ensamblado a partir de ribonucleótidos y el ADN a partir de deoxinucleótidos. Además, en lugar de timina, el ARN tiene la base nitrogenada llamada *uracilo* (Farrell, 2010). A continuación, en la Figura 17, se muestra las estructuras comunes de bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos.

Figura 17. Estructura de bases nitrogenadas.



(Modificado de Farrell, 2010).

Los ribonucleosidos trifosfátotos son colectivamente referidos como NTP, que se refieren a una cantidad equimolar de ATP (Adenosina-5'-trifosfato), CTP (Cytidina-5'-trifosfato), GTP (Guanosina-5'-trifosfato) y UTP (Uridina-5'-trifosfato). De manera similar, los deoxinucleosidos trifosfátotos (dNTP) hace referencia a uan cantidad equimolar de dATP (2'-deoxyadenosina-5'-trifosfato), dCTP (2'-deoxycitidina-5'-trifosfato), dGTP (2'-deoxyguanosina-5'-trifosfato) y dTTP

(2'-deoxytimidina-5'-trifosfato); lo cuales, son utilizados en la síntesis de cDNA y productos de PCR al ser identificados por la ARN polimerasa y ADN polimerasa (Farrell, 2010).

2) Síntesis de ARN. En la *transcripción* se sintetiza el ARN. En este proceso, los segmentos del ADN sirven como modelo para producir las moléculas complementarias de ARN. En los procariotas este proceso se lleva a cabo en el citoplasma mientras que, en los eucariotas, el ARN se produce en el núcleo de la célula (Miller & Levine, 2011). La síntesis de ARN es mediada por enzimas llamadas ARN polimerasas. Esta enzima en conjunto con factores de transcripción, se unen a regiones altamente conservadas del cromosoma y separa la doble hebra de ADN para ensamblar nucleótidos complementarios a una de estas hebras, formando el ARN (Nelson y Cox, 2009). El ARN pol no se une a cualquier parte del ADN, es decir, se une a regiones de ADN con una secuencia de bases de pares específica o *promotores* que están asociados estructuralmente al gen a transcribir. Los promotores tienen secuencias consenso, es decir, patrones de nucleótidos que promueven o evitan el inicio de la transcripción (Farrell, 2010). Los transcritos de ARN se ensamblan en una dirección de 5' a 3' y el proceso tiene 3 fases (Farrell, 2010):

- **Iniciación:** La RNA pol se adhiere al promotor del ADN y se produce el primer ribonucleótido. En las células eucariotas hay cuatro tipos de RNA pol: I, II, III y IV. Cada uno es responsable de la transcripción de distintas clases de genes.
- **Elongación:** Se añaden los siguientes ribonucleótidos a la cadena naciente.
- **Terminación:** Se completa la síntesis de la cadena de ARN.

3) Tipos de ARN.

a) ARN mensajero (ARNm): Contiene instrucciones para ensamblar aminoácidos en proteínas. Lleva instrucciones del ADN desde núcleo hasta otras partes de la célula, específicamente, a los ribosomas (Miller & Levine, 2011). Constituye del 1-4% del ARN total de la célula. Según Farrell (2010), cada especie de ARNm está clasificado basado en su abundancia citoplasmática: alta, media, baja y *muy baja* abundancia. Los transcritos de alta abundancia están presentes en cientos de copias en células especializadas o funciones diferenciadas. Los ARNm de media abundancia están presentes en docenas de copias en las células, este es el caso de los transcritos de genes con funciones de housekeeping. Los ARNm con baja abundancia están presentes en 10 copias o menos por célula y son difíciles de medir. Los ARNm que considera Farrell (2010) como de *muy baja* abundancia están presentes en la célula como menos de 1 copia por célula, un ejemplo de este caso puede ser una célula de cultivo cancerígeno manifieste en una variable. Una molécula eucariótica de ARNm siempre mostrará las siguientes características:

- **Casquete en 5' (5'Cap):** El *Cap* o *Capping* ocurre tan pronto emerge el ARNm del complejo de la RNA pol, en los primeros 20-30 polinucleótidos nacientes y consiste en una unión rara de trifosfatos 5'-5' entre el primer nucleótido transcrito y el nucleótido de 7-metilguanosa.

(m⁷G). La polaridad formada sella el 5' del transcrito y está representado de la siguiente manera: m⁷G(5')ppp(5')Pu. Esta es una modificación post-transcripcional asociada a la expresión celular del gen y es observada en todas las células eucariotas. La presencia de 5'Cap es necesario para el inicio de la traducción, ya que es como los ribosomas reconocen los transcritos. El ARNr y ARNt no tienen esta estructura, la cual también le confiere estabilidad al transcrito (Farrell, 2010). El 5'Cap protege al ARN de las ribonucleasas (Nelson & Cox, 2009).

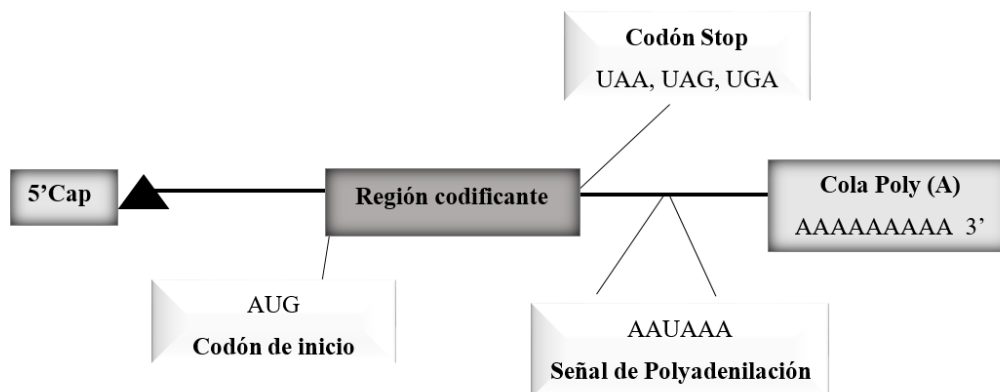
- Secuencia líder: En los primeros nucleótidos posteriores a la estructura 5'Cap, se encuentra la región 5' no transcrita de los genes o, en inglés, *5' untranslated region* (UTR). Es una secuencia, de aproximadamente 30-50bp, necesaria para que el ribosoma se mueva desde la estructura 5'Cap hasta que encuentre el codón de inicio AUG.

- Región codificante: Empieza con el codón de inicio, con mayor frecuencia, el triplete de AUG. Aunque también la traducción puede ser empezada en codones que son parecidos a AUG, pero solo cambian por una base como GUG, ACG y CUG. El codón de inicio tiene tres purinas antes y una G inmediatamente después para la traducción óptima del transcrito ya que señalan donde se encuentra el codón de inicio. Este codón al principio de la región codificante resulta en la colocación de un aminoácido de metionina en el amino terminal de la proteína eucariota citoplasmática. Cada tres nucleótidos, después del codón de inicio, se especifica otro aminoácido que se irá uniendo a la cadena naciente de polipéptido. La elongación continúa de esta manera hasta encontrar el codón *stop* (UAA, UAG o UGA), que es traducida para finalizar la proteína con el respectivo carboxi-terminal en 3'. La región codificante tiene una longitud de 200 a 1500 nucleótidos.

- Secuencia de finalización: Consiste en otra área no traducida llamada 3'UTR. Tiene una longitud de 50-150 nucleótidos, aunque se ha reportado también de 1000 bases. No se ha descubierto alguna función de esta secuencia, pero se cree que le confiere estabilidad a la molécula en el citoplasma e influencia en la expresión de los genes ya que es objetivo de los ARNm.

- Cola Poly(A): Es una secuencia de 50-250 bases de adenina al final 3' de la molécula. Es añadida a la molécula mediante la enzima poliadenilato polimerasa después de la transcripción y no necesita otros nucleótidos plantilla para ser añadida a la molécula (Farrell, 2010). Se cree que el 99% de los ARNm tienen la Cola Poly (A) y es necesaria para el transporte núcleo-citoplasmático. Esta cola sirve de lugar de unión de una o más proteínas específicas y protege al ARN de destrucción enzimática. El sitio del ARNm donde se produce el corte y la adición de poli(A) está indicado por dos secuencias: (1) la secuencia (5')AAUAAA(3'), altamente conservada y situada de 10 a 30 nucleótidos en el lado 5' upstream o corriente arriba del sitio de corte del ARNm; y (2) La secuencia rica en residuos de Guanidina y Uracilo, situada 20 a 40 nucleótidos corriente abajo o downstream (Nelson & Cox, 2009). La transcripción no termina en el inicio de la Cola Poly A, sino que en la mayoría de los casos termina 1000pb downstream en dirección 3' (Farrell, 2010).

Figura 18. Topología de ARN mensajero (ARNm).

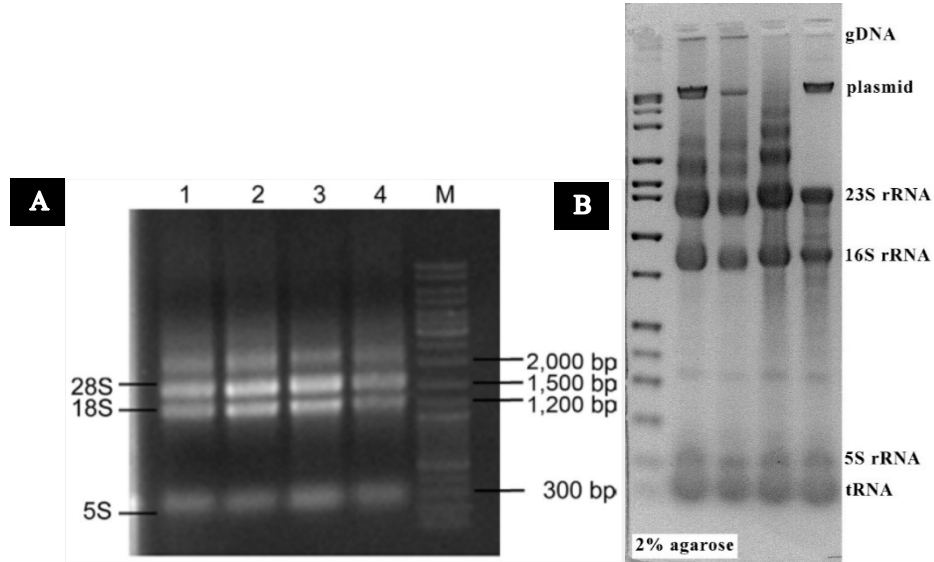


(Modificado de Farrell, 2010).

b) ARN de transferencia (ARNt): Llevan los aminoácidos al ribosoma y los hacen coincidir tal cual se especifica en los mensajes codificados del ARNm. Este ARN lee la información codificada en el mRNA y transfieren el aminoácido al ribosoma adecuado a la cadena polipeptídica en crecimiento durante la síntesis proteica (Miller & Levine, 2011). La RNA pol III es la responsable de la transcripción de genes que codifican para el ARNt y 5S ARNr. El ARNt constituye de un 10-15% del ARN celular total.

c) ARN ribosomal (ARNr): Forma parte de las subunidades de los ribosomas, los cuales son máquinas que sintetizan proteínas y que están formados de alrededor de 80 proteínas (Miller & Levine, 2011). La transcripción de este tipo de ARN es llevada a cabo por la ARN pol I. El ARN ribosomal es el ARN más abundante de los tres principales tipos, se encuentra entre el 80-85% del ARN total de la célula. En células procariotas las especies más abundantes de ARNr son 23S, 16S y 5S ARNr. En las células eucarióticas se encuentra: 28S, 18S, 5S y 5.8S ARNr. S representa las unidades no-métricas Svedberg, para la tasa de sedimentación de una partícula en específica (Farrel, 2010). La calidad de ARN puede ser verificada mediante electroforesis de ARN en un gel de agarosa. En la figura 19 se observan dos gels de electroforesis de ARN de organismos eucariotas y procariotas, estas unidades sirven como marcadores moleculares naturales.

Figura 19. ARN en gel de agarosa 1.5% (A) 2% (B). Escalera HiLo DNA Ladder.



(Gao *et al* 2015) y (Stepanov, 2016).

Existen otros tipos de ARN, los cuales tienen funciones reguladoras o son precursores de estos tres tipos de ARN (Nelson y Cox, 2009). El conjunto de todas las moléculas de ARN producidas en una célula en unas condiciones determinadas se llama transcriptoma celular (Nelson y Cox, 2009).

4) Traducción. La *traducción* es el proceso en el cual los ribosomas utilizan la secuencia de codones en el ARNm para ensamblar aminoácidos en cadenas polipeptídicas. Es decir, decodifican el ARNm para ensamblar proteínas. En las células eucariotas, este proceso sucede en el citoplasma de la célula de la siguiente manera (Nelson & Cox, 2009):

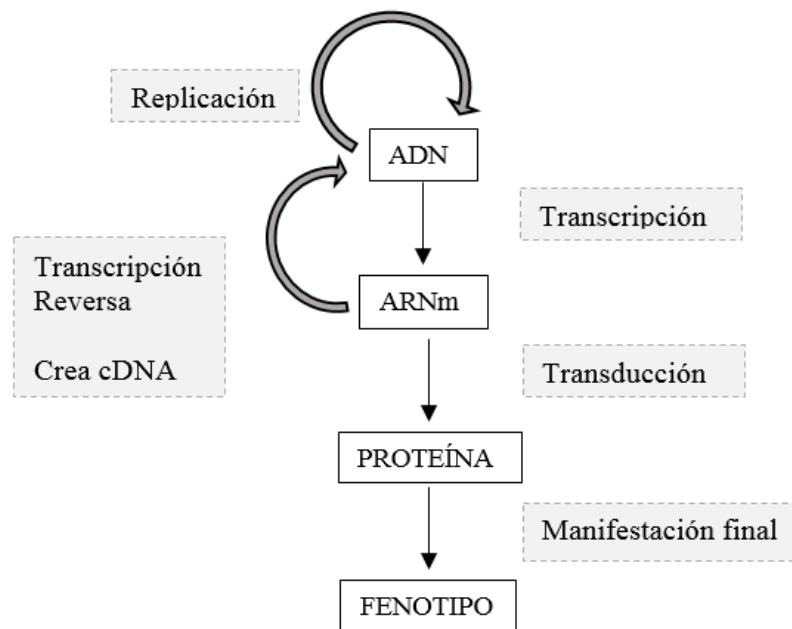
- Inicialmente, el ribosoma se sujeta a una molécula de ARNm en el citoplasma en el codón *AUG* (codón de inicio). Conforme cada codón pasa por el ribosoma, los ARNt llevan aminoácidos correspondientes al ribosoma. Cada molécula de ARNt lleva un tipo de aminoácidos correspondiente a tres bases que no están emparejadas llamadas, *anticodones*. Cada ARN de transferencia tiene un anticodón con bases complementarias a las de un codón de ARNm. El ribosoma posiciona el codón de inicio para atraer al anticodón y une el aminoácido correspondiente, en este caso, metionina.

- El ribosoma ayuda a formar una unión entre el primer aminoácido con el segundo y, al mismo tiempo, rompe la unión del ARNt con su aminoácido. Posteriormente, el ARNt flota afuera del ribosoma lo que permite que este se una a otro ARNt. El ribosoma se mueve de derecha a izquierda a lo largo de todo el ARNm

- La cadena polipeptídica se va formando de otros grupos de aminoácidos hasta que llega a un codón de parada en la molécula de ARNm. En este momento, el ribosoma libera el polipéptido y la molécula de ARNm. Terminando el proceso de traducción.

Como se mencionó anteriormente, en la transcripción, se sintetiza ARNm a partir de ADN. En la traducción, el ARNm aporta los mensajes codificados para que el ARNt lleve los aminoácidos al ribosoma y se formen los polipéptidos a partir de secuencias de aminoácidos. De esta manera, se logra la expresión génica de los organismos eucariotas como manifestación final en su fenotipo. Este proceso se conoce como *dogma de la biología molecular* y se muestra esquematizado en la Figura 18 Farrell (2010).

Figura 20. Dogma central de Biología Molecular.



(Farrell, 2010).

5) Extracción de ARN y cuantificación de ARN. La extracción de ARN de fuentes biológicas ricas en RNasas es todo un reto porque se tienen que utilizar reactivos libres de RNasas que ayuden a eliminar las potenciales fuentes de degradación de ARN. Según Farrell (2010), cualquier estrategia utilizada para llevar a cabo la extracción de ARN debe cumplir con los siguientes objetivos:

- Seleccionar un método apropiado para la solubilización de la membrana. Esto dependerá del tipo de tejido del cual se extraiga el ARN. Por ejemplo, un buffer de lisis que puede ser completamente apropiado para células de cultivo puede ser inapropiado para muestras de tejido enteras. Por lo tanto, los buffers a utilizar dictan los pasos siguientes de la extracción como la remoción del ADN genómico del ARN y si las especies de ARN del citoplasma y las que se encuentran en el núcleo pueden ser purificadas independientemente (Farrell, 2010). En los protocolos de extracción de ARN se pueden utilizar dos tipos de buffer para hacer lisis celular. Los buffers que

consisten en agentes caotrópicos, como tiocianato de guanidina, dodecil sulfato de sodio, sarcosil, urea, fenol o cloroformo. Estos agentes rompen la membrana plasmática, organelos subcelulares y al mismo tiempo desactivan RNAsas. Por otro lado, están los buffes que se solubilizan en la membrana plasmática mientras que mantienen la integridad de los organelos y del núcleo intacta. Estos buffers son hipotónicos y son removidos mediante centrifugación diferenciada.

- Asegurarse de la inhibición de la actividad de nucleasas en todos los instrumentos y reactivos a utilizar.

- Seleccionar un método para la desproteínización de las muestras. Los contaminantes proteicos inhiben reacciones de transcripción reversa y amplificación mediante PCR. Además, quitar las proteínas es necesario para una cuantificación precisa del ARN. La remoción de las proteínas se puede llevar a cabo mediante digestión de la muestra mediante proteinasa K; repetidas extracciones mediante mezcla de solventes orgánicos como fenol y cloroformo; solubilización en buffers de guanidina o separación física mediante una columna cromatográfica de sílica (Farrell, 2010).

- Seleccionar el método para la concentración de ácido nucleicos. Se puede hacer mediante una combinación de alcohol y sales como acetato de sodio 3M a pH 5.2 y la adición de etanol al 95-100%. Precipitar ARN requiere más tiempo de incubación a -20°C que la precipitación de ADN (Farrell, 2010).

- Seleccionar las condiciones adecuadas para el almacenamiento de las muestras ARN purificado y evitar que se degraden. El ARN es más estable cuando es guardado precipitado en etanol a -80°C durante varios meses o incluso años (Farrell, 2010).

El kit de extracción de ARN utilizado en este trabajo de graduación combina tiocianato de guanidina (GTC) y β -mercaptoetanol para inactivar las ribonucleasas presentes en las células y romper los complejos nucleoprotéicos permitiendo que el ARN sea liberado hacia la solución. Las altas concentraciones de GTC permite que ocurra precipitación de proteínas y luego de centrifugación, el ARN es selectivamente precipitado con etanol y se une la superficie de sílica. Los filtros de sílica consisten en microfibras de vidrio posicionada en el fondo de un tubo estándar de 1.5ml. Los ácidos nucleicos se unen a la sílica rápidamente debido a los efectos de las sales caotrópicas sobre el agua mientras que, otros componentes celulares, son eluidos en la columna. La muestra purificada posteriormente es eluida mediante la adición de agua libre de nucleasas listo para ser almacenado a -70°C (Promega TM048, 2016).

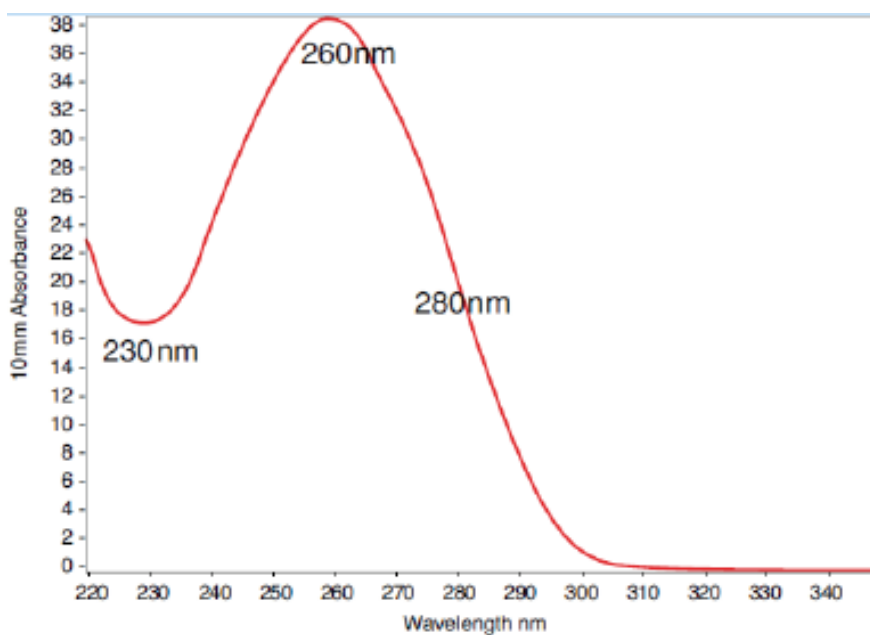
6) Cuantificación de ácidos nucleicos. La concentración y pureza de ARN y ADN puede ser determinada mediante espectrofotometría debido a la habilidad que tienen los ácidos nucleicos de absorber luz ultravioleta (Farrell, 2010). El principio de la espectroscopía UV-Vis se basa en la absorción de luz ultravioleta-visible por una molécula objetivo haciendo que los electrones de las

moléculas lleguen a un estado excitado (Skoog *et al* 2005). Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas, cada una de las cuales tienen un espectro único de absorción y con una absorción máxima a 260nm. Las mediciones de las absorbancias a esta longitud de onda permiten directamente calcular la concentración de los ácidos nucleicos mediante la siguiente fórmula (Farrell, 2010):

$$[ARN] \frac{ug}{ml} = A_{260} \times dilución \times 40$$

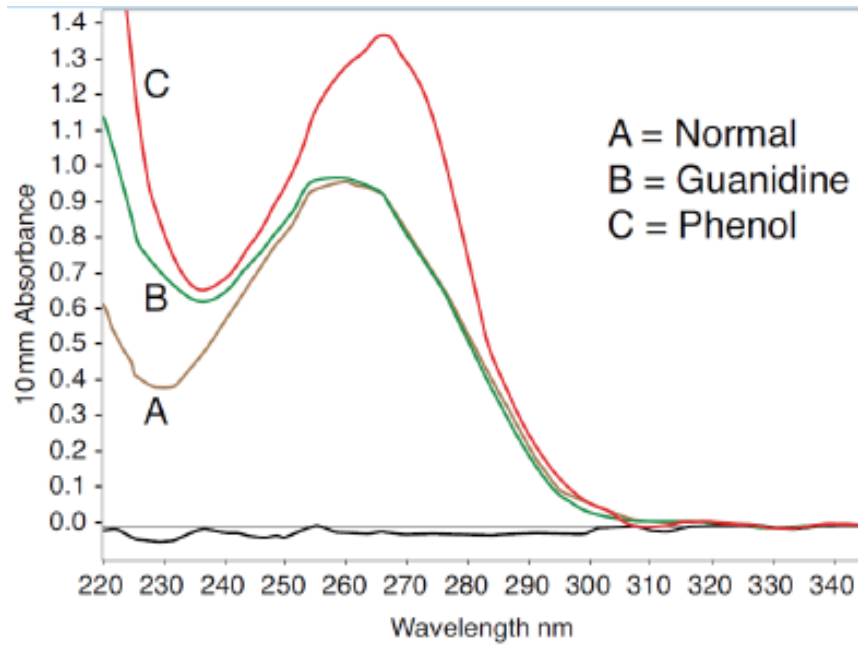
Donde A_{260} es la absorbancia, en densidades ópticas a 260nm (O_{260}) y 40 es la media del coeficiente de extinción del ARN (40ug/ O_{260}) (Farrell, 2010). Muestras puras de ácidos nucleicos tienen un perfil de absorbancia entre 230 y 320nm (Figura 21). Desviaciones de la forma estándar de esta curva demuestran la presencia de contaminantes en las muestras de ácidos nucleicos (Figura 22) (Farrell, 2010).

Figura 21. Espectro de ácidos nucleicos.



(Thermofisher Scientific 2016).

Figura 22. Espectros de ácidos nucleicos y sus contaminantes: guanidina y fenol.



(ThermoFisher Scientific 2016).

Cuadro 1. Indicadores de pureza de ácidos nucleicos.

	ADN	ARN	Problema
A_{260}/A_{280}	~1.8	~2.0	Valores debajo de 1.8 sugieren contaminación proteica. Las soluciones ácidas podrían infrarrepresentar el valor proporcionado en 0.2-0.3; en las soluciones básicas es lo contrario.
A_{260}/A_{230}	~2.0-2.4	~2.0-2.4	Valores debajo de 1.8 sugieren contaminación por compuestos orgánicos.
A_{260}/A_{240}	1.4	1.4	Valores debajo de 1.4 sugieren contaminación excesiva de sales en la muestra.

(Farrell, 2010).

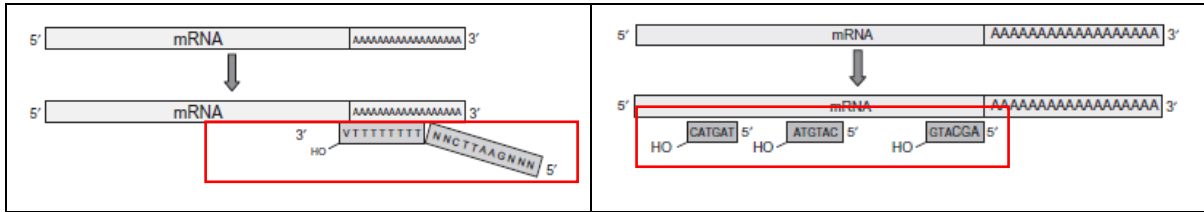
7) RT-PCR El ADN complementario o *cDNA*, por sus siglas en inglés, es una hebra de ADN que tiene una secuencia totalmente complementaria a una hembra de ARNm, a partir de la que

ha sido sintetizada (Farrell, 2010). La síntesis de cDNA ofrece al investigador muchas ventajas para caracterizar la estructura de un gen o su expresión. El requisito más importante para poder llevar a cabo esta reacción es tener ARN de alta calidad que pueda dirigir la síntesis *de novo* de la cadena complementaria. Además, debe haber en la reacción una molécula iniciadora que proporcione el grupo químico 3'-OH, el cual es necesario para que todas las DNA y RNA polimerasas unan nucleótidos individuales y respalden la elongación. La molécula que proporcione el grupo químico 3'-OH debe ser pareada con la base cerca de la terminación 3' de la plantilla de ARNm. Posterior a la desnaturalización térmica de posibles estructuras de ARN secundarias formadas, se anilla un iniciador poly (dT) (ácido oligodeoxitimídico) u oligo (dT), a la cadena poly (A) del ARN maduro. En el proceso de anillamiento se unen otras secuencias adaptadoras que apoyan la adición de enzimas de restricción o de otras secuencias útiles para clonaciones posteriores (Farrell, 2010). Los iniciadores oligo (dT) tienen la siguiente estructura: $T_{(n)}V$. Donde V = Adenina, citosina o guanina, y T es timina. El nucleótido "V" en la terminación 3' obliga a que el iniciador en el 5' de esta secuencia se empareje hasta el final de la cola poly (A). De esta manera, se permite una mayor síntesis de cDNAs representativos y con mayores cantidades de partes codificantes por cada molécula de ARNm (Farrell, 2010).

Es importante mencionar que no todos los ARNm tienen la cola Poly (A) y los cDNAs producidos en la reacción de transcripción reversa utilizando únicamente oligo (dT), corresponden solamente a los ARNm que tiene cola poly (A). Para evitar las deficiencias potenciales de malas interpretaciones debido a los iniciadores utilizados, es necesario agregar a la reacción iniciadores random (*random oligos*), que se unen al azar al ARNm y no solo en el en la terminación 3' de la plantilla como los Oligo (dT). Según Farrell (2010), los oligos random permiten tener cadenas de cDNA más largas que las cadenas de cDNA producido utilizando solamente oligo (dT). Además, afirma que las reacciones más eficientes para la síntesis de cDNA ocurre cuando hay una combinación de oligos random y oligo (dT) en el mismo tubo de la reacción. De esta manera se elimina la posibilidad de exclusión de transcritos poli (A) y se obtienen altos rendimientos de ADN copia de longitudes más completas y de calidad con plena representación de genes (Farrell, 2010).

Cuadro 2. Síntesis de primera hebra de ADNc con distintos oligos (iniciadores).

Oligo (dT)	Oligo random
------------	--------------

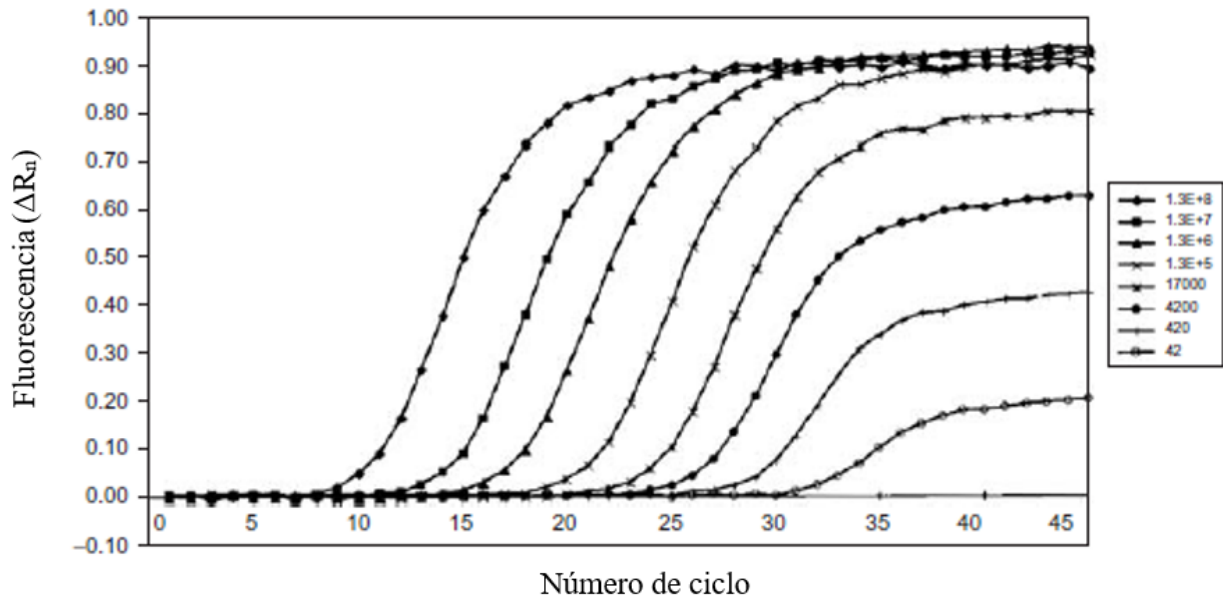


(Farrell, 2010).

8) PCR tiempo real. Técnica que permite conocer y registrar la cinética de amplificación de ADN mediante la fluorescencia producida en la reacción proporcional a la cantidad de ADN sintetizado (Costa, 2004). Esta técnica ofrece muchas ventajas sobre un PCR convencional porque es más rápido, tiene un amplio rango dinámico y puede cuantificar abundancia de un transcrito en muestras (Farrell, 2010). La unidad que se mide en el PCR tiempo real es el *Threshold cycle (Ct)*. En este ciclo la fluorescencia emanada de la muestra cruza el límite de la fluorescencia de fondo o *background* determinada automática o manualmente en el termociclador. Entre mayor sea la cantidad de ADN o ADN copia en la reacción, la fluorescencia será identificada más rápido como se muestra en la Figura 23.

Figura 23. Curvas de amplificación de PCR tiempo real. Cuando la cantidad inicial de material genético de la muestra es pequeño, el Ct es grande.

Gráfica de amplificación de PCR Tiempo Real



(Farrell, 2010).

Los datos obtenidos del PCR tiempo real, se pueden analizar mediante el método de cuantificación relativa y mediante el método de cuantificación absoluta.

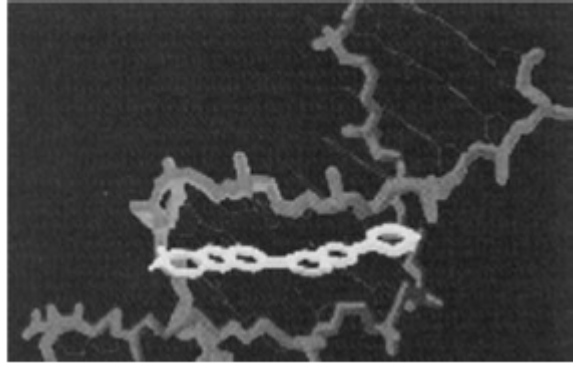
- *Método de cuantificación relativa.* En este método, las curvas de amplificación de varias muestras son comparadas con las curvas de amplificación de un control. Es decir, se comparan los valores de Ct obtenidos de muestras objetivo con los valores de Ct de muestras control utilizando genes constitutivos o *housekeeping genes*. (Farrell, 2010). Los *genes housekeeping* son los genes necesarios para el mantenimiento de las funciones celulares. Por lo tanto, están expresados bajo condiciones normales en todas las células del organismo, independientemente de las funciones específicas que tengan los tejidos en el mismo (Konin, 2000).

- *Método de cuantificación absoluta:* Es utilizada para calcular el número de copias de material genético. Involucra la comparación del comportamiento de las gráficas de amplificación de unas muestras contra curvas estándares. Este método también es llamado el *método de la curva estándar*. Los termocicladores de PCR tiempo real tienen incorporado un lector de fluorescencia que es emitida en los viales donde se produce las reacciones de amplificación. Además, tienen un software que puede hacer mediciones sofisticadas de los datos de Ct obtenidos (Farrell, 2010). Existen dos sistemas de detección por fluorescencia que pueden ser utilizados en PCR tiempo real:

- Sondas específicas marcadas con fluorocromos: Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET). Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis (TaqMan) y las sondas FRET (Costa, 2004).

- Agentes intercaladores: Son fluorocromos que aumentan la emisión de fluorescencia cuando se unen a la doble hembra de ADN; el agente intercalante más utilizado se llama SYBR Green. A pesar de que este sistema se puede optimizar fácilmente y no es tan caro como las sondas específicas, no puede identificar polimorfismos en la secuencia diana y tiene baja especificidad en la reacción. Esto ocurre muy frecuentemente porque se une de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores (oligos). Para mejorar la inespecificidad, se deben de utilizar condiciones óptimas de PCR y seleccionar cuidadosamente los oligos para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Además, es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas: *hot-start PCR*. Las polimerasas usadas en estos casos están modificadas para funcionar únicamente después de ser activadas a temperaturas elevadas, lo cual disminuye el riesgo de amplificaciones inespecíficas. La temperatura de fusión (T_m), es la temperatura a la cual el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado y determina la especificidad de los fragmentos amplificados. Cada fragmento amplificado tiene un T_m con una curva de fusión específica que depende de su longitud y de la composición de sus bases (Costa, 2004).

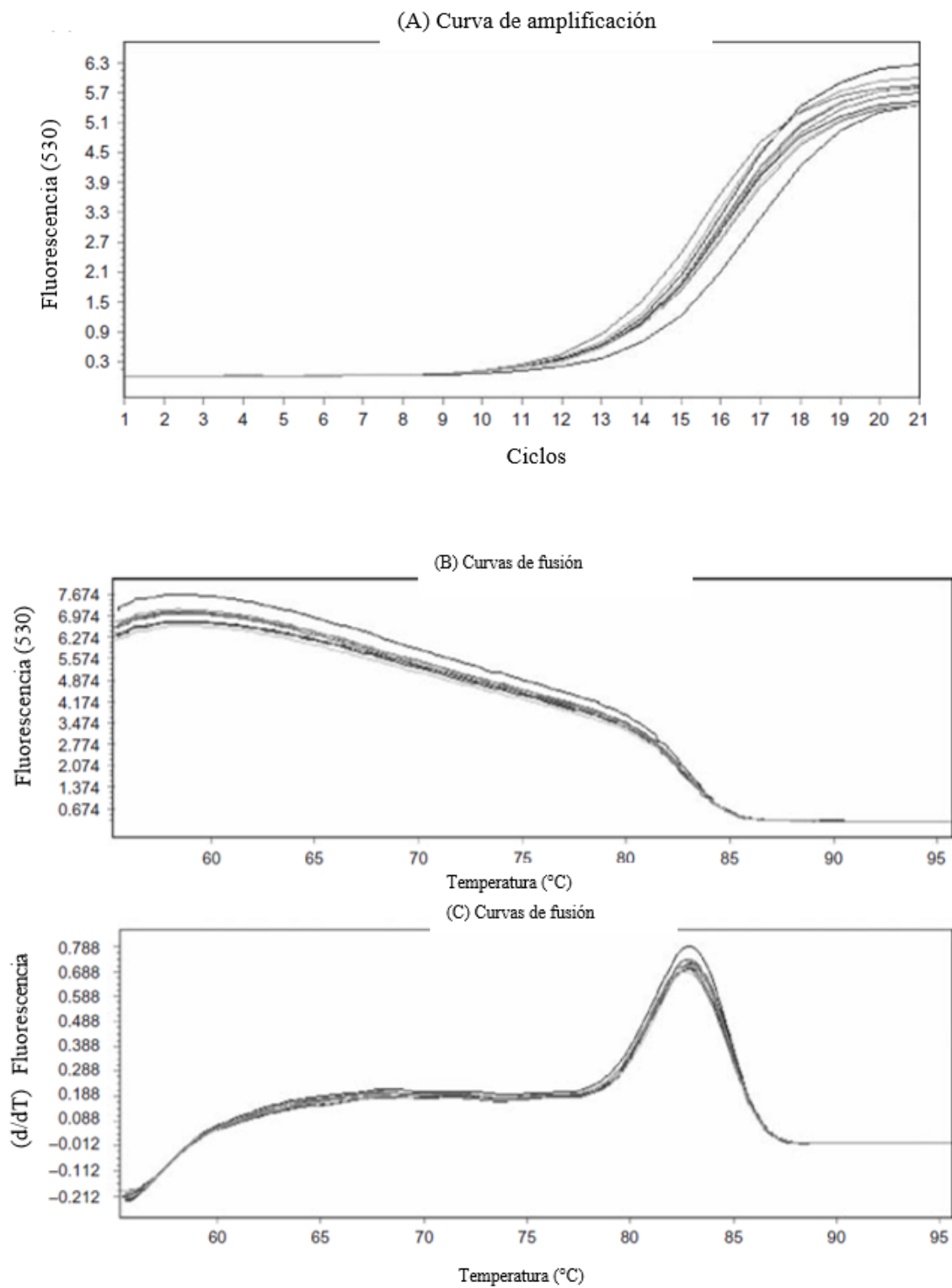
Figura 24. Unión de SYBR Green al ADN en PCR tiempo real.



(Farrel, 2010).

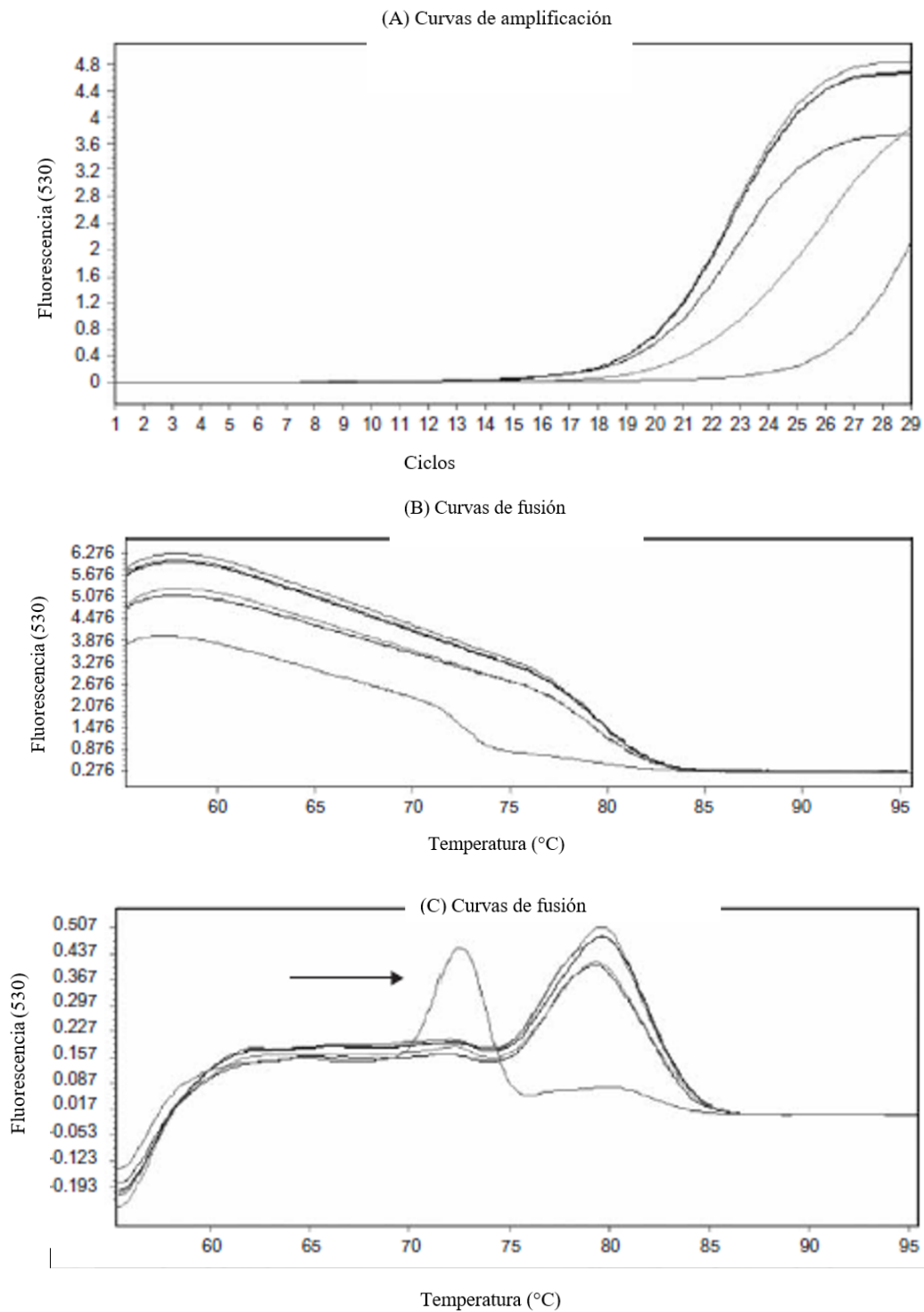
Para determinar si el producto amplificado fue específico o inespecífico se analizan las curvas de fusión. Estas curvas se basan en que las moléculas de distintas longitudes o de distinta composición de pares de bases se disocian o se “derriten” en sus hebras constituyentes a diferentes temperaturas. Estas curvas se obtienen inmediatamente después del último ciclo de amplificación de PCR tiempo real cuando la temperatura de la muestra aumenta, las hebras del ADN se disocian cuando su T_m es alcanzado. Los datos de las curvas de fusión son presentados en la gráfica como derivadas negativas ($-dF/dT$), entonces el T_m de cada producto de PCR es mostrado como un pico. Si se tiene un conocimiento *a priori* de la composición de bases del producto esperado, el investigador puede predecir donde aparecerán los picos de fusión (*melting peaks*). Si en las curvas de fusión se observa un segundo pico a temperaturas más bajas que la del pico original puede deberse a la formación de dímero de cebadores o formación de variantes del producto amplificado y productos inespecíficos. En este caso se debe de examinar los cebadores, recalcular el tamaño del producto esperado, aumentar la temperatura de anillamiento y considerar si hubo contaminación en las muestras.

Figura 25. Curvas de amplificación de ocho muestras idénticas corridas en paralelo (A). Derivada de la gráfica (B). Curvas de fusión (C).



(Farrell, 2010).

Figura 26. Curvas de amplificación de cinco muestras corridas en paralelo (A). Derivada de la gráfica (B). Curvas de fusión (C). Se observa la aparición de un segundo pico que sugiere que son dímeros de cebadores o productos no específicos.



(Farrell, 2010).

Como se mencionó anteriormente, una de las posibles causas de picos de fusión inespecíficos en las curvas de fusión se puede deber al diseño de los oligos. Por lo tanto, es necesario conocer los criterios especiales en su termodinámica y secuencia. En el Cuadro 2, se muestra las características que deben tener los oligos diseñados para PCR tiempo real según Quelhorst & Rulli, (2012).

Cuadro 3. Características principales para el diseño de oligos para qPCR.

Características	Condiciones óptimas
Longitud de amplicón	Entre 50-210pb. Si se amplifican varios genes entonces el tamaño de otros amplicones deben ser cercanos en longitud ya que se produce mayor intensidad cuando el SYBR Green se intercala entre productos más largos que en productos pequeños.
Longitud de oligos	La longitud óptima se encuentra entre:19-23pb. Si tiene una longitud mayor, tardará más tiempo en hibridizarse, extenderse y, por lo tanto, producir menos amplicones.
Contenido GC	Los enlaces de hidrógeno que unen la guanina y citosina son fuertes que los enlaces entre AT. También son más resistente a la desnaturalización por efecto de la temperatura que los enlaces AT. Este debe de estar entre el 35-65%
Temperatura de fusión (T _m)	Se debe de encontrar entre 59-68°C. Entre un par de oligos esta temperatura puede variar por al menos 1°C de diferencia.
Temperatura de anillamiento	Óptimas entre 50-60°C.
Estabilidad de la región 3'	Esto se refiere al ΔG máximo de 5 bases desde la terminación 3' del primer. ΔG se refiere a la energía libre de Gibbs, es decir, la energía requerida para romper enlaces en la terminación 3' del primer. Entre más alta sea la estabilidad de la terminación 3', mayor es la eficiencia del primer.
Complementariedades	Se debe de evitar repeticiones de secuencias como: TCTCTCTCTC o TAAAAACG. Si no se puede evadir, la complementariedad debe de ser no más de 4 pb.

(Quelhorst & Rulli, 2012)

VII. METODOLOGÍA

A. **Objetivo 1: Adaptación de protocolos de extracción y purificación de ARN mensajero para los cuatro estadios larvarios, pupas y adultos de *Anopheles albimanus*.**

1. Obtención y separación de estadios de *Anopheles albimanus*. Los huevos obtenidos de la cepa Sanarate del insectario de la Universidad del Valle de Guatemala, se colocaron en agua posterior al primer día de ovipostura. El número ovipuesto por hembra fue variable, por lo que se calculó un sobreestimado número de hembras (3 hembras más de lo necesario), en total 6 hembras para cada grupo. Los huevos fueron colocados en cubetas con aproximadamente 5 centímetros de altura de agua desclorada. Las larvas del primer estadio fueron colectadas y trasladadas a cajas Petri con 40 ml de agua desclorada. Se colocó 1 larva por centímetro cúbico de agua (40 larvas por 40 ml de agua). Se colectó 150 larvas L1, 120 larvas en L2, 40 larvas L3 y 7 larvas L4. Siete días después de eclosión las larvas pasaron al estadio pupal y se recolectaron 5 pupas macho y 5 pupas hembras. Las pupas sobrantes sexadas se colocaron en vasos de 600 ml. Se separaron hembras y machos entre 1-2 días post-eclosión. Se colocaron 2 vasos con 25 machos y 2 vasos con 15 hembras. Los adultos fueron alimentados con agua azucarada al 10% *ad libitum*.

2. Peso de los distintos estadios de *An. albimanus*. Se pesaron los estadios de *An. albimanus* desde larva L1, L2, L3, L4, pupa y adulto hembra y macho en balanza analítica. Las mediciones se hicieron en triplicado para obtener los pesos promedios de cada individuo.

3. Extracción de ARN de *An. albimanus*. (Ver SOP 1 y 2 en Anexos). Se utilizó el kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Z3100). La cantidad de muestra usada para el uso de este kit debe de ser menor o igual que 30mg. El número de individuos a utilizar son L1, 150; L2,120; L3:40; L4:7; Pupa: 5; adulto macho: 25 y adulto hembra 15 individuos. La extracción de ARN de cada estadio del ciclo de vida se hizo en duplicado. Debido a las particularidades del tejido de larva L1, se probaron distintas cantidades de individuos: 40, 120, 150, 200 y 300. La concentración de ARN utilizando 120 individuos se encontraba aproximadamente entre 20-25 ng/uL, mientras que las concentraciones de ARN obtenidas a partir de 40, 200 y 300 individuos eran menores a 10 ng/uL. La concentración más adecuada se obtuvo al extraer de 150 individuos hasta la tercera réplica biológica. La concentración a partir de 150 individuos fue de 40 ng/uL, el ARN extraído de 120 individuos L1 fue el que se utilizó para hacer la síntesis de ADNc de las primeras dos réplicas biológicas.

Las larvas de cada estadio, pupas macho y hembras fueron colocadas en un tubo de 1.6ml libre de ARNasas en bloque frío con la menor cantidad de agua remanente posible. A cada muestra se le agregó 100 µL de buffer de lisis (RNA Lysis Buffer) y se maceraron con pistilos de plástico previamente tratados y libres de ARNasas para homogeneizar la muestra en frío. Se agregaron 75 µL

RNA Lysis Buffer (para tener un total de 175 μL). Las muestras se dejaron incubando 10 minutos luego de la maceración en frío. Se añadió 350 μL de buffer de dilución (RNA Dilution Buffer) y se mezcló por inversión de 3 a 4 veces. Se centrifugó por 10 minutos (12000 a 14000 x g) y se extrajo el lisado a un nuevo tubo libre de ARNasas. Se añadió 200 μL de etanol al 95% y se mezcló por pipeteo. Este tubo se transfirió a la columna o “Spin Basket Assembly”, se centrifugó por 1 minuto y se descartó el eluido. Se agregó 600 μL de solución de lavado (RNA Wash Solution), se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones y se descartó el eluido. Para cada duplicado se preparó la mezcla de incubación de ADNasa (DNA incubation mix) con 40 μL de buffer amarillo (Yellow Core Buffer), 5 μL de MnCl_2 y 5 μL de DNase I. Se añadió a cada columna 50 μL de la mezcla de incubación de DNasa y se debe de dejó incubar por 30 minutos. Posteriormente, se añadió 200 μL de solución para detener la actividad de la DNasa (DNase Stop Solution) y se centrifugó por 1 minuto. La columna fue lavada con 600 μL de RNA Wash Solution, y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Nuevamente se descartó el eluido y se lavó con 250 μL de RNA Wash Solution. Se centrifugó por dos minutos en las mismas condiciones. La columna fue trasladada hacia el tubo de elución del kit y se agregó 100 μL de agua libre de nucleasas a la columna. Se centrifugó por 1 minuto y se hicieron tres alícuotas de 5 μL , tres de 10 μL y una alícuota de 1 μL a partir del stock. El ARN se guardó estrictamente a -70°C y se etiquetó con la fecha, estadio, número de duplica.

B. Objetivo 2: Implementación de un método que permita la producción de ADN complementario a partir del ARN extraído de *Anopheles Albimanus*. Ver SOP No. 4 (Anexos).

1. Reacción de Transcriptasa Reversa

a. Tratamiento de RNA con DNAsas con kit RQ1 RNase-free DNase (Cat #M6101). Se realizó una solución 1:1 de 31uL de DNAasa y 31uL de Buffer de DNAsas del kit **RQ1 RNase-free DNase (Cat #M6101)**. Se etiquetaron los 30 tubos según la muestra de ARN y se agregó en cada tubo 2 uL de Solución ADNasa más Buffer de ADNAsas. Luego se agregó la cantidad necesaria de agua según corresponda a cada muestra dependiendo de su concentración, para tener un volumen total final de 10uL. Por último, se agregó el volumen de cada muestra de ARN extraído para tener en total 1 ug de RNA en cada tubo. Se incubó a 37°C por 1 ½ hora en el termociclador y se agregó 1uL de RQ1 DNase Stop Solution y se incubó a 65°C por 10 minutos.

b. PCR. Se confirmó que no hubiera contaminación por ADN genómico luego del tratamiento con DNasa mediante PCR. El PCR se hizo con 7.5 uL de GoTaq Hot Start Master Mix 2x (Promega), 1uL oligos de actina forward (5'-CCA TGT ACC CAG GTA TTG CT-3') y 1uL de oligos de actina reverse (5'- ATC TGT TGG AAG GTG GAC AG -3') a 10uM; 1 µL de ARN pretratado con ADNAsas y 4.5 uL de agua libre de nucleasas. Se verificó la presencia de amplificación corriendo 7.5uL de las muestras en un gel de agarosa al 1.5%, 100V por 35 minutos. Programa de PCR: Denaturalización inicial a 95°C/2min/1 ciclo; 45 ciclos de desnaturalación a 95°C/30 segundos, anillamiento a 56°C/30 segundos, extensión a 72°C/30 segundos; extensión final a 72°C/5minutos/1ciclo y finalmente a 4°C por tiempo indefinido.

c. Reacción de Trascricpción Reversa con Kit GoScript Reverse Transcription System, A5000-A5001. Se agregó a cada muestra de ARN pretratado 1 uL de agua libre de nucleasas, 1uL de Random Oligos y 1uL de oligo (dT). Se incubó a 70°C en termociclador por 5 minutos y se colocó en hielo inmediatamente por al menos 5 minutos. Se guardó la muestra en hielo hasta que se agregó la mezcla de reacción para la transcripción reversa.

- Mezcla de reacción de Transcripción Reversa:

Cuadro 4. Preparación de reacción de Transcripción Reversa.

# de Reactivo	Componente	Volumen n=1 (uL)
1	Agua libre de nucleasas (a un volumen final de 15uL)	-
2	Buffer de reacción (GoScript™ 5X Reaction Buffer)	4.0
3	MgCl ₂ (1.5-5.0 mM)	2.0
4	Mezcla de nucleótidos de PCR (concentración final de 0.5mM cada dNTP)	1.0
5	Inhibidor de ribonucleasas (Recombinant RNasin Ribonuclase Inhibitor)	1.0
6	Transcriptasa Reversa (GoScript™ Reverse Transcriptase)	1.0
	Volumen final	9

Se agregó 9 uL de la reacción de Transcripción Reversa a cada tubo de 11 uL del ARN pretratado con ADNAsas, random oligos y Oligo (dT). El anillamiento se realizó en termociclador a 25°C/5 minutos. La extensión a 42°C/1 ½ hora y se inactivó la transcriptasa reversa a 70°C/15 minutos. Se hicieron 2 alícuotas de 2uL al finalizar la reacción y se guardaron las muestras a -70°C.

d.PCR: PCR con las mismas condiciones mencionadas anteriormente. En lugar de agregar 1uL de ARN tratado con DNasa se agrega 1uL de cDNA obtenido de la reacción de transcriptasa reversa.

C. Objetivo 3. Estandarización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo (qPCR) real para los genes ortólogos de *actina*, *boll* y *zpg* de pupa y adulto de *An. albimanus*. Ver SOP 5 (Anexos).

Para hacer la optimización de qPCR se utilizaron concentraciones de oligos de *actina bol* y *zpg* de 0.4 y 0.6uM y ADN copia sintetizado de pupa y adultos a distintas diluciones Se cargaron en la placa como se muestra en el Cuadro 3. Para este procedimiento, se realizó un proceso de desinfección adecuado de campanas de PCR con alcohol al 70% (v/v), al igual que las micropipetas y puntas respectivas de cada volumen a utilizar irradiando con UV 15 minutos. Se hicieron tres diferentes SYBR Green Master Mix en tres tubos de 1.6mL con cada uno con los oligos estipulados (*boll*, *zpg* y *actina*).

Cuadro 5. Mapa de carga de qPCR para optimización con ADN copia de pupa y adulto de *Anopheles albimanus*. *Boll* en verde, *actina* en amarillo y *zpg* en azul.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:10 0.4uM	1:10 0.4uM	1:10 0.4uM	1:10 0.6uM	1:10 0.6uM	1:10 0.6uM	1:25 0.4uM	1:25 0.4uM	1:25 0.4uM	1:25 0.6uM	1:25 0.6uM	1:25 0.6uM
B	1:50 0.4uM	1:50 0.4uM	1:50 0.4uM	1:50 0.6uM	1:50 0.6uM	1:50 0.6uM	1:100 0.4uM	1:100 0.4uM	1:100 0.4uM	1:100 0.6uM	1:100 0.6uM	1:100 0.6uM
C	C-vo 0.4uM	C-vo 0.4uM	C-vo 0.4uM	C-vo 0.6uM	C-vo 0.6uM	C-vo 0.6uM	1:10 0.4uM	1:10 0.4uM	1:10 0.4uM	1:10 0.6uM	1:10 0.6uM	1:10 0.6uM
D	1:25 0.4uM	1:25 0.4uM	1:25 0.4uM	1:25 0.6uM	1:25 0.6uM	1:25 0.6uM	1:50 0.4uM	1:50 0.4uM	1:50 0.4uM	1:50 0.6uM	1:50 0.6uM	1:50 0.6uM
E	1:100 0.4uM	1:100 0.4uM	1:100 0.4uM	1:100 0.6uM	1:100 0.6uM	1:100 0.6uM	C-vo 0.4uM	C-vo 0.4uM	C-vo 0.4uM	C-vo 0.6uM	C-vo 0.6uM	C-vo 0.6uM
F	1:10 0.4uM	1:10 0.4uM	1:10 0.4uM	1:10 0.6uM	1:10 0.6uM	1:10 0.6uM	1:25 0.4uM	1:25 0.4uM	1:25 0.4uM	1:25 0.6uM	1:25 0.6uM	1:25 0.6uM
G	1:50 0.4uM	1:50 0.4uM	1:50 0.4uM	1:50 0.6uM	1:50 0.6uM	1:50 0.6uM	1:100 0.4uM	1:100 0.4uM	1:100 0.4uM	1:100 0.6uM	1:100 0.6uM	1:100 0.6uM
H	C-vo 0.4uM	C-vo 0.4uM	C-vo 0.4uM	C-vo 0.6uM	C-vo 0.6uM	C-vo 0.6uM						

Cuadro 6. Volúmenes de reactivos usados para qPCR

Reactivo	Volumen n=1 0.4uM	Volumen n=1 0.6uM
Master Mix Sybr Green (Fast Start SYBR Green Master Mix 2x Roche)	5 uL	5 uL
Agua libre de nucleasas	1.7 uL	1.3 uL
Primer Forward <i>act/boll/zpg</i> 10uM (Concentración final de 400nM)	0.4 uL	0.6 uL
Primer Reverse <i>act/boll/zpg</i> 10uM (Concentración final de 400nM)	0.4 uL	0.6 uL
Plantilla de cDNA diluída 1:10	2.5 uL	2.5
Volumen total	10 uL	10uL

La placa de 96 pozos de qPCR se mantuvo en bloque frío al agregar cada Master Mix preparado para *boll* (celeste), *zpg* (verde) y *actina* (amarillo) como se observa en el mapa de carga. Se agregó 5uL de la dilución correspondiente de cDNA Posterior a sellar la placa, se centrifugó. Se utilizó el siguiente programa de qPCR en el termociclador LightCycler 96 (Roche):

Cuadro 7. Programa “Ct *An. albimanus*” usado para qPCR.

Programa	Ciclos
Preincubación (95°C por 600 segundos)	1
3 pasos de amplificación	45
Fusión o Melting (95°C x10 segundos; 65°C x 60 segundos y 97°C continuamente)	1

Cuadro 8. Pasos de amplificación en qPCR

Temperatura	Tiempo
95°C	10 segundos
56°C	10 segundos
72°C	10 segundos

Los datos brutos obtenidos fueron analizados utilizando el programa LightCycler 96 de Roche, para obtener los datos de Ct y las gráficas de disociación de cada muestra. Los valores de Ct fueron utilizados posteriormente para el cálculo de expresión relativa de genes *boll* y *zpg* con respecto a *actina* mediante la fórmula de $2^{-\Delta \Delta Ct}$.

D. Objetivo 4: Determinación de perfiles de expresión de los genes ortólogos a *bol* y *zpg* en las etapas del ciclo de vida *An. albimanus* para sugerir blancos moleculares de los ensayos de silenciamiento con ARN de interferencia. Ver mapas de carga en SOP 5 (Anexos).

1. Diseño experimental. El tamaño de la muestra depende del peso del tejido de cada individuo, ya que la columna se sobrecarga si se utiliza más de 30mg de tejido. Por lo tanto, el número de individuos utilizados por columna es el siguiente:

Se hicieron tres réplicas biológicas de extracción de ARN de pupa y adulto de *An. albimanus*. Cada muestra se realizó en duplicado y de cada duplicado se obtuvo ADN complementario. Por cada réplica biológica, se corrieron dos placas de PCR tiempo real para ADN complementario de pupa y dos placas de PCR tiempo real para ADN complementario de adulto. Para larva únicamente se hicieron dos réplicas biológicas y estas no fueron estandarizadas a lug de ARN para hacer ADN complementario. En la reacción de transcripción reversa para estas muestras únicamente se utilizó random oligos. Se hicieron en duplicado.

2. Fundamento de delta delta Ct ($-\Delta\Delta Ct_x$): Análisis de expresión de *bol* y *zpg*. Se analizó la expresión de los genes de interés *bol* (AALB005972, vector base) y *zpg* (AALB006050, vector base) relativa con el gen de control interno de *actina* (AALB015481, vector base) con el método de comparación de Ct también referido como $2^{-\Delta\Delta Ct_x}$.

Ecuación 1: Ecuación utilizada para tener la expresión relativa de *bol* y *zpg* a lo largo del ciclo de vida de *Anopheles albimanus*. Donde el gen de interés se refiere al gen objetivo (*bol* o *zpg*) y el control se refiere al *housekeeping gene* (*actina*). La muestra A son pupas o adultos hembras y la muestra B son las pupas o adultos machos.

$$2^{-\Delta\Delta Ct_x} = [(Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ control interno}) \text{ muestra A} \\ - (Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ control interno}) \text{ muestra B}]$$

3. Análisis de datos

- Prueba estadística: Se utilizó la prueba T con corrección de Welch para muestras independientes con varianzas diferentes. Esta prueba es utilizada para probar la hipótesis que dos poblaciones tienen medias iguales. Se realizó en GraphPad Prism 7.
- La eficiencia de reacción fue evaluada al hacer diluciones en serie de los oligos a utilizar y se hizo una curva estándar utilizando ADN complementario de pupa macho y adulto macho. El programa utilizado para cuantificar la eficiencia de oligos fue: <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/qpcr-efficiency-calculator.html>

- Los resultados de esta optimización se encuentran en Anexos. El programa utilizado en el Termociclador Light Cycler para optimización de estos oligos fue:
 1. 26-08-2017 Placa 1 optimización de oligos actina y boll para cDNA pupa macho E3 AR.
 2. 26-08-2017 Placa 2 optimizacion de actina boll y zpg pupa macho E3 AR.
 3. qPCR optimizacion de adulto act boll y zpg 23_10_2017 10.57

VIII. RESULTADOS

Resultados de estandarización de cantidad de tejido de *An. albimanus* a utilizar por extracción:

En el Cuadro no.9, se observan los pesos experimentales obtenidos de los individuos de *An. albimanus* en todos sus estadios. Según estos valores, se ajustó la cantidad de larvas, pupas y adultos para tener un total de 30 mg en cada réplica de extracción de ARN.

Cuadro 9. Peso de los estadios de *Anopheles albimanus*

Estadio	Peso promedio (mg)	Desviación estándar (mg)
Larva L1	0.15	0.02
Larva L2	0.25	0.02
Larva L3	0.70	0.05
Larva L4	4.30	0.36
Pupa	6.70	0.25
Adulto macho	1.01	0.10
Adulto hembra	2.06	0.01

La normalización de la cantidad de material inicial fue extremadamente importante pues permitió obtener una cantidad de ARN adecuada para la producción de cDNA en todas las muestras, como se puede observar en los Cuadros no. 9 y 10.

Resultados de extracción de ARN de *An. albimanus*.

Cuadro 10. Concentraciones obtenidas de ARN de primera réplica biológica. Razones A260/280 y A260/230 de los estadios de larva (L1, L2, L3) de *An. albimanus*.

ID muestra	[ARN ng/uL]	Promedio	Desviación estándar	A260/A280	A260/A230
L1-1	28.177	27.76	0.419	2.147	0.74
L1-2	27.339			2.1	2.149
L2-1	56.643	121.8	65.14	2.154	2.092
L2-2	186.924			2.169	1.934
L3-1	260.561	335.001	74.44	2.172	1.371
L3-2	409.441			2.209	2.407

Cuadro 11. Concentraciones obtenidas de ARN de segunda réplica biológica. Razones A260/280 y A260/230 de los estadios de larva (L1, L2, L3) de *An. albimanus*.

ID muestra	[ARN ng/uL]	Promedio	Desviación estándar	A260/A280	A260/A230
L1-1	21.014	23.30	2.27	2	0.768
L1-2	25.561			2.086	0.937
L2-1	46.349	62.804	16.45	2.073	1.535
L2-2	79.259			2.071	1.358
L3-1	261.265	217.20	44.06	2.171	2.035
L3-2	173.145			2.108	2.074

Cuadro 12. Concentraciones obtenidas de ARN de tercera réplica biológica. Razones A260/280 y A260/230 de los estadios de larva (L1, L2, L3) de *An. albimanus*.

ID muestra	[ARN ng/uL]	Promedio	Desviación estándar	A260/A280	A260/A230
L1-1	43.3	40.4	2.9	2.18	0.8
L1-2	37.5			2.16	0.81
L2-1	126.7	127.6	0.9	2.16	1.4
L2-2	128.5			2.16	1.5
L3-1	420.1	412.8	44.06	2.22	2.03
L3-2	405.5			2.2	2.01

Cuadro 13. Concentraciones obtenidas de ARN de primera réplica biológica. Razones A260/280 y A260/230 de larva L4, pupa y adulto de *An. albimanus*.

# de muestra	ID muestra	[ARN ng/uL]	Promedio	Desviación estándar	A260/A280	A260/A230
1	L4-1	148.359	193.2	44.8	2.15	1.426
2	L4-2	238.038			2.182	2
3	P♂-1	130.871	137.0	6.08	2.133	1.947
4	P♂-2	143.045			2.144	2.15
5	P♀-1	295.4	213.0	82.3	2.157	1.96
6	P♀-2	130.754			2.164	2.283
7	A♂-1	136.349	146.3	10.0	2.079	1.351
8	A♂-2	156.353			2.099	1.577
9	A♀-1	371	384.8	13.8	2.074	1.333
10	A♀-2	398.629			2.157	2.01

Cuadro 14. Concentraciones obtenidas de ARN de segunda réplica biológica. Razones A260/280 y A260/230 de los estadios de larva L4, pupa y adulto de *An. albimanus*.

# de muestra	ID muestra	[ARN ng/uL]	Promedio	Desviación estándar	A260/A280	A260/A230
11	L4-1	572.438	515.128	57.31	2.147	2.385
12	L4-2	457.818			2.157	2.412
13	P♀-1	333.715	326.9355	6.7795	2.175	1.747
14	P♀-2	320.156			2.18	2.166
15	P♂-1	174.72	185.242	10.522	2.122	1.63
16	P♂-2	195.764			2.135	2.173
17	A♀-1	693.3	820.75	127.45	2.2	2.35
18	A♀-2	948.2			2.19	2.32
19	A♂-1	306.9	333.15	26.25	2.19	2.05
20	A♂-2	359.4			2.2	2.21

Cuadro 15. Concentraciones obtenidas de ARN de tercera réplica biológica. Razones A260/280 y A260/230 de los estadios de larva L4, pupa y adulto de *An. albimanus*.

# de muestra	ID muestra	[ARN ng/uL]	Promedio	Desviación estándar	A260/A280	A260/A230
21	L4-1	268.1	238.3	29.8	2.2	2.074
22	L4-2	208.5			2.19	2.385
23	P♂-1	150.6	180.8	30.2	2.17	2.412
24	P♂-2	211			2.18	1.747
25	P♀-1	231.1	227.6	3.5	2.19	2.166
26	P♀-2	224.1			2.19	1.63
27	A♀-1	326.4	380.85	54.45	2.19	2.173
28	A♀-2	435.3			2.21	2.35
29	A♂-1	225.9	197.3	28.6	2.18	2.32
30	A♂-2	168.7			2.13	2.05

Resultados de muestras de ARN extraído tratado con Dnasa:

Cada una de las muestras de ARN (del Cuadro 9 y 14) fue tratada con DNasa para eliminar el ADN genómico remanente en la muestra. Para verificar que en las muestras de ARN tratados con Dnasa ya no hubiera presencia de ADN genómico, se hizo PCR convencional utilizando oligos de actina, No. de acceso AALB015481 (Vector Base, 2017). Los resultados de dicho análisis se encuentran en las figuras 26 y 27.

Figura 27. Resultados de PCR de muestras de ARNm de *An. albimanus* (1). Gel de agarosa al 1.5% con oligos de actina. Las muestras se encuentran numeradas según Cuadro 12 y 13. Pozo 1 = L4-1, Pozo 2 = L4-2, Pozo 3 = P♂-1, Pozo 4 = P♂-2, Pozo 5 = P♀-1, Pozo 6 = P♀-2, Pozo 7 = A♂-1, Pozo 8 = A♂-2, Pozo 9 = A♀-1, Pozo 10 = A♀-2. Pozo 11 = L4-1, Pozo 12 = L4-2, Pozo 13 = P♀-1, Pozo 14 = P♀-2, Pozo 15 = P♂-1 y Control positivo. Se utilizó una escalera de 50bp (Novagen).

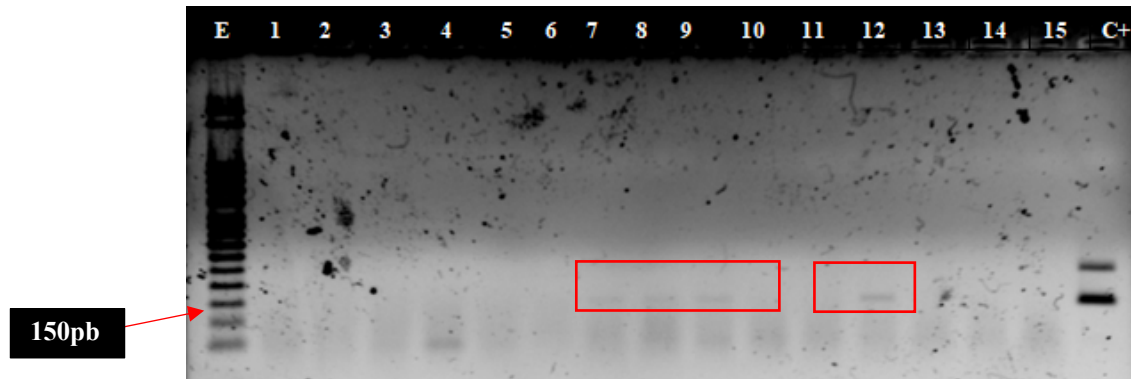
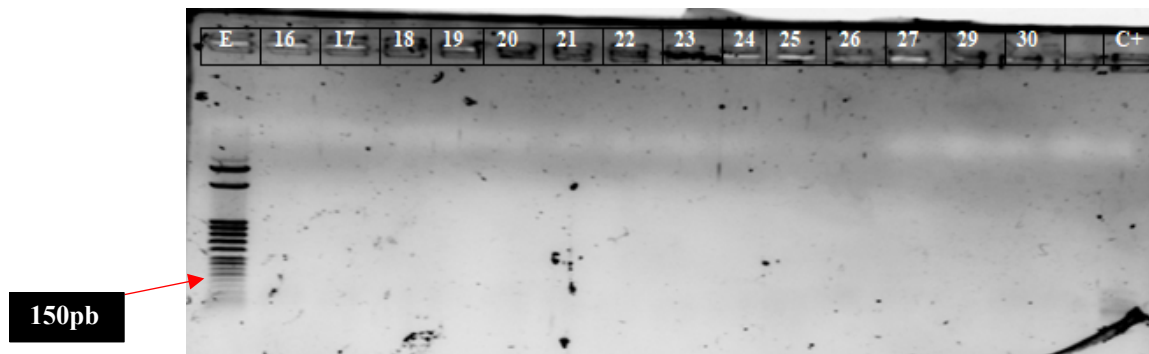


Figura 28. PCR de Muestras de ARNm (2). Gel de agarosa al 1.5% con oligos de actina.

Las muestras se encuentran numeradas según cuadro 13 y 14. Pozo 16 = P♂-2, Pozo 17 = A♀-1, Pozo 18 = A♀-2, Pozo 19 = A♂-1, Pozo 20 = A♂-2, Pozo 21 = L4-1, Pozo 22 = L4-2, Pozo 23 = P♂-1, Pozo 24 = P♂-2, Pozo 25 = P♀-1. Pozo 26 = P♀-2, Pozo 27 = A♀-1, Pozo 28 = A♀-2, Pozo 29 = A♂-1, Pozo 30 = A♂-2, control negativo y control positivo. Se utilizó una escalera de 50bp (Novagen).



Resultados de reacción de transcripción reversa:

Las muestras que no tenían amplificación en los geles mostrados en las figuras 26 y 27, fueron utilizadas para la síntesis de ADN complementario y, posteriormente, para analizar expresión génica de los genes homólogos de *boll* (AALB006050, vector base) y *zpg* (AALB005972, vector base) en *An. albimanus*. A continuación, se muestran geles de amplificación de ADN complementario. Se evaluó la presencia y calidad de ADNc mediante PCR convencional para el gen de actina. En las figuras 18 y 19 se puede observar que todos los ADNc presentan bandas homogéneas de 148 pares de bases, correspondientes al gen de actina. Es importante notar también que todos los controles negativos (C-) muestran que el producto obtenido corresponde al ADNc sintetizado y no es producto de contaminación.

Figura 29. PCR de Muestras de ADNc sintetizado (1). Gel de agarosa al 1.5% con oligos de actina. Las muestras se encuentran en el gen según cuadro 12 y 13. Pozo 1 = L4-1, Pozo 2 = L4-2, Pozo 3 = P♂-1, Pozo 4 = P♂-2, Pozo 5 = P♀-1, Pozo 6 = P♀-2, Pozo 7 = A♂-1, Pozo 8 = A♂-2, Pozo 9 = A♀-1, Pozo 10 = A♀-2. Pozo 11 = L4-1, Pozo 12 = L4-2, Pozo 13 = P♀-1, Pozo 14 = P♀-2, Pozo 15 = P♂-1 y Control negativo. Se utilizó una escalera de 50bp (Novagen).

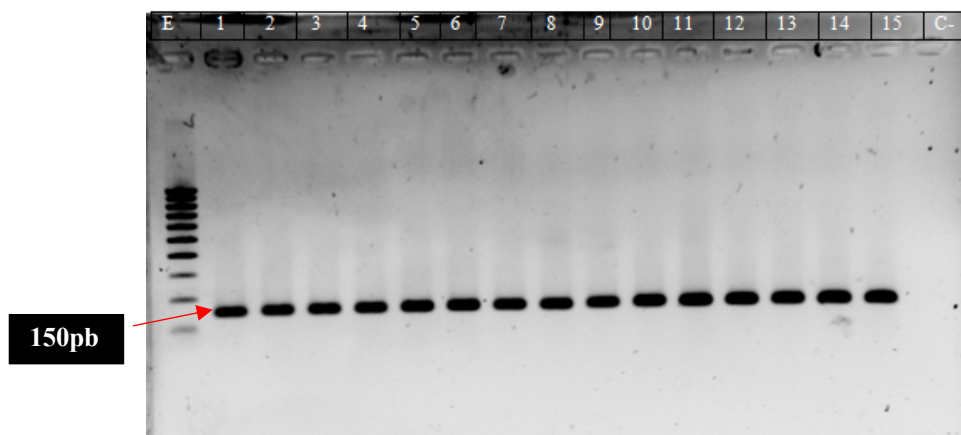
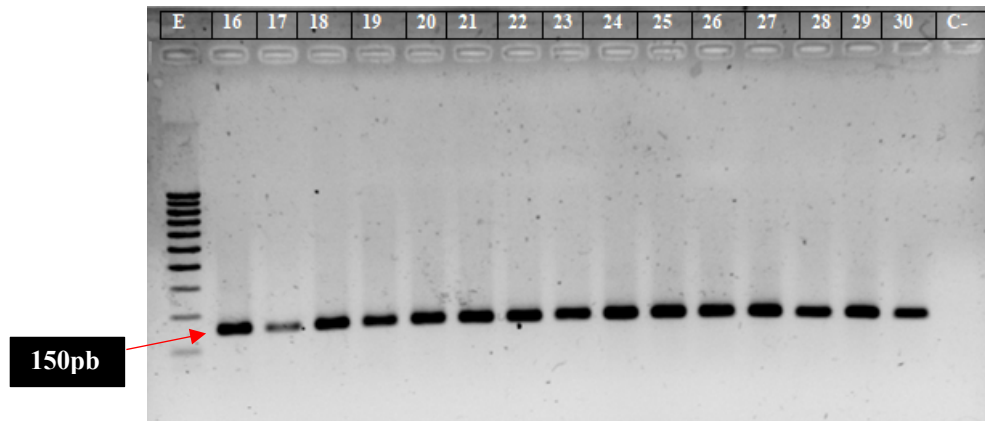


Figura 30. Resultados de PCR de muestras de ADNc sintetizado (2). Gel de agarosa al 1.5% con oligos de actina. Las muestras se encuentran numeradas según cuadro 13 y 14. Pozo 16 = P♂-2, Pozo 17 = A♀-1, Pozo 18= A♀-2, Pozo 19= A♂-1, Pozo 20 = A♂-2, Pozo 21 = L4-1, Pozo 22 = L4-2, Pozo 23 = P♂-1, Pozo 24 = P♂-2, Pozo 25 = P♀-1. Pozo 26= P♀-2, Pozo 27 = A♀-1, Pozo 28 = A♀-2 , Pozo 29= A♂-1, Pozo 30 = A♂-2, control negativo. Se utilizó una escalera de 50bp (Novagen).



Resultados de Estandarización de PCR tiempo real:

Luego de analizar la calidad del ADNc, se realizó la optimización de qPCR para los genes homólogos a *bol* y *zpg* de *An. albimanus*. Para este efecto, oligos específicos para las secuencias homólogas de *zpg* (AALB006050) fueron diseñados mediante el programa Oligo Analyzer Tool 3.1 de IDT gene. Los oligos para la amplificación de *actina* fueron tomados de Taracena *et al* (2015) y los oligos para el gen *boll* fueron tomados de Flores *et al* (2016). La eficiencia de cada set de oligos fue calculada mediante el uso de *qPCR efficiency calculator de ThermoFisher Scientific* para determinar la viabilidad del uso de estos en PCR en tiempo real. Los resultados de la optimización se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 16. Eficiencia de oligos homólogos de *zpg* (verde), *bol* (celeste) y *actina* (amarillo) a 0.4uM y 0.6uM.

Gen	Oligos		Tamaño de amplicón (pb)	Pupa		Adulto	
	Sentido	Antisentido		Eficiencia de PCR 0.4uM	Eficiencia de PCR 0.6uM	Eficiencia de PCR 0.4uM	Eficiencia de PCR 0.6uM
<i>zpg</i> (AALB006050)	5'- CACGACCGATCTCGTCTGG- 3'	5'- TCGAAATGGAGACATCGCCG- 3'	140	89.37%	118.24%	102.28%	124.32%
<i>bol</i> (AALB005972) (Flores & Flores, 2016)	5'- ATGTCCCTACCGAACCCGC- 3'	5'- CCGCTGATGCCGCCGACAAA- 3'	100	150.27%	166.40%	156.10%	167.29%
<i>actina</i> (AALB015481) (Taracena <i>et al</i> 2015)	5'- CCATGTACCCAGGTATTGCT- 3'	5'- ATCTGTTGGAAGGTGGACAG- 3'	148	87.19%	158.29%	85.39%	147.39%

Perfiles de expresión relativa de genes AALB005972 (*boll*) y AALB006050 (*zpg*) en *An. albimanus*:

Como resultado del análisis de expresión relativa de los genes, se determinó que el gen *boll* presenta una expresión similar en todos los estadios de larva, es importante mencionar que el ADNc utilizado para hacer estas gráficas fue sintetizado únicamente a partir de oligos random y con concentraciones de oligos de *actina*, *boll* y *zpg* para PCR tiempo real de 0.6 μ M. En larva L1 es levemente más alta que en los demás estadios larvales, pero no es significativamente diferente. Por otro lado, tanto en pupa y adulto macho y hembra se obtuvieron una expresión relativa similar de genes entre ambos sexos, como se observa en la figura 30-32. Con este tamaño de muestra, no se detectó diferencia significativa de patrones de expresión (prueba t con corrección de Welch >0.05). Sí se encontró diferencia significativa de expresión relativa de *zpg* 70 veces mayor en adulto hembra que en adulto macho. Los datos brutos de donde se obtuvieron estos resultados se encuentran en anexos.

Figura 31. Gráfica de expresión relativa del ortólogo de *boll* en larva.

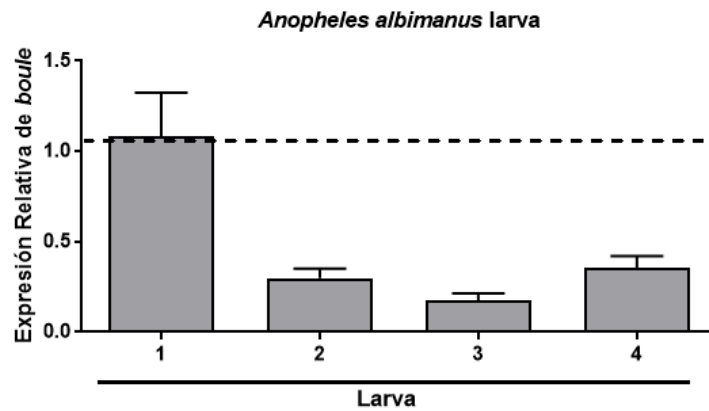


Figura 32. Gráfica de expresión relativa del ortólogo de *boll* en pupa macho y hembra.

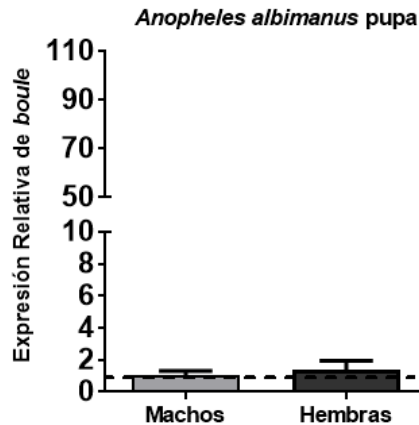
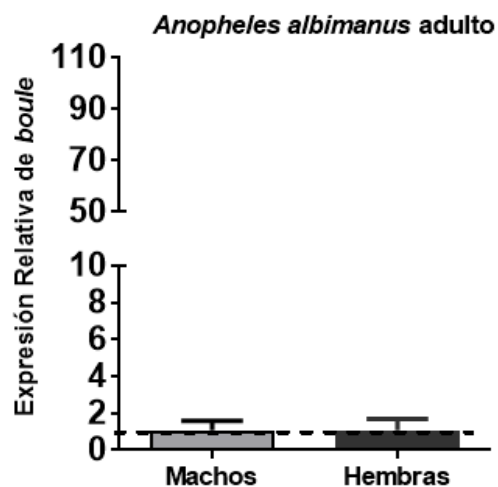


Figura 33. Gráfica de expresión relativa del ortólogo de *boll* en adulto macho y hembra.



En las figuras 33-35, se observa que en larvas el ortólogo de *zpg* tiene una expresión relativa similar en todos los estadios de larva y comparando entre pupa macho y hembra. *Zpg* está más expresado en el adulto hembra que en el macho (figura 35), esta expresión es significativamente diferente (*) a $p < 0.05$ según la prueba t con corrección de Welch.

Figura 34. Gráfica de expresión relativa del ortólogo de *zpg* con respecto en larva.

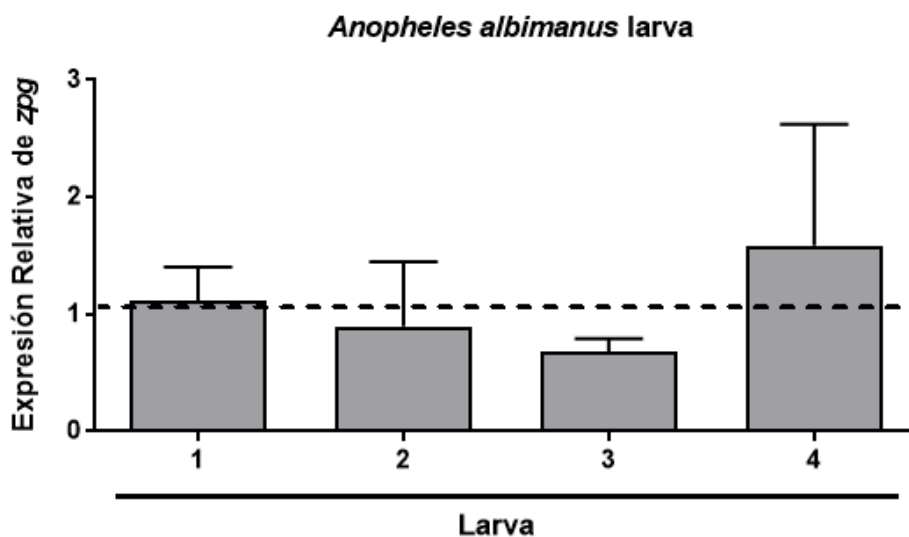


Figura 35. Gráfica de expresión relativa del ortólogo de *zpg* en pupa hembra y macho.

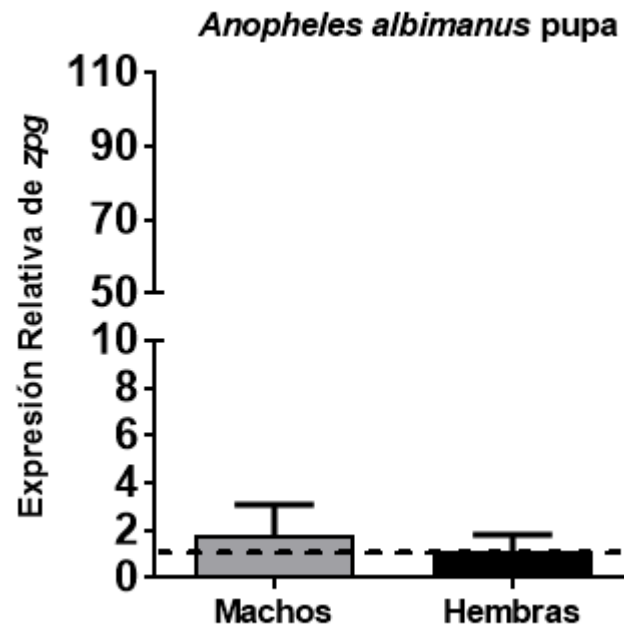
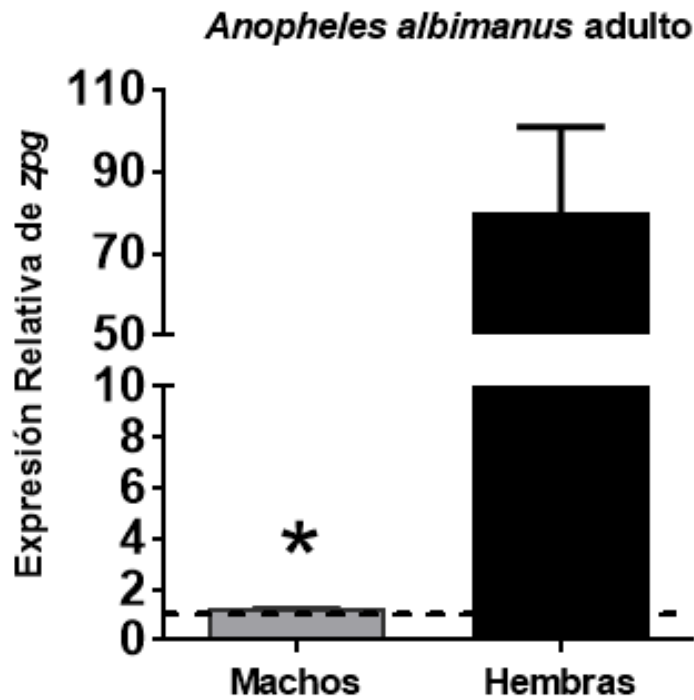


Figura 36. Gráfica de expresión relativa del ortólogo de *zpg* en adulto macho y hembra.



IX. DISCUSIÓN

La finalidad de este trabajo de graduación fue describir el patrón de expresión de dos genes homólogos a *boll* (*boule*) y *zpg* (*zero population growth*) en *Anopheles albimanus*, principal vector de malaria en Guatemala. Para lograr esto, se optimizó y estandarizó los procesos de extracción de ARN mensajero, síntesis de ADN copia y PCR tiempo real. Por último, se cuantificó la expresión relativa de cada uno de estos genes y se utilizó el gen de actina como control interno. Los resultados obtenidos del cálculo del $\Delta\Delta Ct$ de las tres réplicas biológicas, demostraban que no hay diferencia significativa en la expresión relativa de los genes AALB005972 (*boll*) y AALB006050 (*zpg*) en los estadios larvales ni pupales. En adulto macho y hembra se observó un patrón similar de expresión relativa de *boll*. Por otro lado, la expresión relativa de *zpg* se expresaba en promedio 70 veces más en adulto hembra que en adulto macho.

Inicialmente, para la extracción de ARN se utilizó el kit *SV Total RNA Isolation System Z3100* de Promega (Promega TM048, 2016). El protocolo de este kit señala que para tejidos ricos en ARN (como el hígado de ratón) se debe de utilizar una cantidad de 30 mg de tejido por cada columna de purificación. Es importante notar, que los kits comerciales presentan protocolos diseñados y estandarizados para tejidos animales de mamíferos, debido a esto, adaptarlos a las características singulares de los diferentes tejidos en insectos es un reto por sí mismo. Por lo tanto, para optimizar la extracción con el kit, fue necesario pesar el tejido de cada larva, pupa y mosquito (hembra y macho). Con el peso obtenido de cada individuo se calculó el número de organismos necesarios a ser utilizados en la extracción de ARN por muestra (Cuadro 9, Resultados). Las distintas cantidades de ARN obtenidas entre los estadios (Cuadro 9-14), pueden deberse a las diferencias fisiológicas y metabólicas entre cada uno de estos. En insectos hemimetábolos, probablemente estas diferencias podrían ser menores. Sin embargo, en insectos holometábolos, como los mosquitos, las grandes diferencias entre estadios, los requerimientos en la síntesis de proteínas y la composición de macromoléculas de cada instar puede ser fuente de variación.

Entre los puntos relevantes identificados en este proceso, es importante mencionar la cantidad de individuos por dúplica o pool a utilizar. Esto debido a que cuando se hizo la extracción de ARN con un número de individuos de L1 menor a 120, no se lograba una concentración adecuada de ARN necesaria para la síntesis de ADN copia. Por otra parte, cuando se agregaban individuos de más de 150, la columna de extracción se obstruyó y no se tuvo una concentración apropiada de ARN. Por lo tanto, para la primera y segunda réplica de síntesis de ADNc no se logró utilizar ARN estandarizado a 1 μ g para los cuatro estadios de larvas. La concentración más adecuada se obtuvo al extraer de 150

individuos hasta la tercera réplica biológica. La concentración a partir de 150 individuos fue de 40 ng/uL, como mencioné en metodología y adjunté a la tabla de troubleshooting (anexos).

Es importante mencionar que, al momento de hacer la extracción, se debe de quitar toda el agua del tubo remanente de la caja Petri donde se alimentan a las larvas y pupas. Debido a que contamina las muestras con sustancias como cereal usado para alimentar las larvas y ARNasas. Para evitar esto se colocan los tubos con los individuos en un bloque frío, por aproximadamente 40 segundos – 1 minuto. La baja temperatura reduce el movimiento de las larvas y permite que se acumulen en la región inferior del tubo y hace posible extraer el agua del tubo fácilmente sin matar las larvas L1 y L2.

Así mismo, al realizar la extracción de ARN, es necesario dejar incubando las muestras alrededor de 15 minutos luego de agregar el buffer de lisis (*RNA lysis buffer*) y macerar las muestras. De esta manera se obtienen concentraciones de ARN hasta tres veces mayores como se observa en las concentraciones de adulto hembra, muestras 17 y 18 de la segunda réplica (Cuadro 13, Resultados).

En los cuadros 9-14 de los resultados se observan las concentraciones de ARN y la razón de absorbancia obtenida a 260/280 nm y 260/230 nm. Según Walker y Rapley (2008) y Farrell (2010), una razón de 260/280 nm de ~2.0 es aceptado generalmente como ARN puro. Todas las razones de 260/280 nm del ARN extraído se encuentra alrededor de 2.1-2.2. Esta pequeña variación se puede deber a que la solución en la que se encuentra el ARN puede tender a ser levemente básica (Wilfinger *et al* 1997). La razón ideal de absorbancias a 260/230 nm se encuentra entre 2.0 y 2.2 (Walker y Rapley, 2008). Algunas muestras se encuentran por debajo de este valor, lo que significa que hay presencia de contaminantes que absorben a 230nm, los cuales pueden ser guanidina o fenol (Walker y Rapley, 2008). En este caso, la contaminación se debe a el tiocianato de guanidina (GTG) presente en la solución de lisis “RNA Lysis buffer” que se utiliza junto con el β -mercaptoetanol para inactivar las ribonucleasas presentes en los extractos de las células. Las muestras que suelen presentar contaminación por tiocianato de guanidina son las muestras de ARN extraído de L1, L2 y algunas muestras de adulto.

Posterior a la extracción con ARN, se realizó un tratamiento de ADNasa (DNasa) de todas las muestras extraídas de ARN usando el kit *RQ1 RNase-Free DNase* (Cat #M6101, Promega). Las figuras 26 y 27, muestran que la mayoría de las muestras de ARN tratado están libres de ADN genómico excepto las muestras 7, 8, 9 y 12 (Figura 26) que corresponden a las muestras de adulto macho 1 y 2 de la primera réplica y, adulto hembra 1 y larva L4 de la segunda réplica. Estas muestras se trataron nuevamente con Dnasa para que quedaran libres de ADN genómico. Esto se demostró al hacer PCR con oligos de actina descritos por Taracena *et al* (2015).

Esta contaminación de ADN genómico se puede explicar debido a que cuando se agregó la DNasa en la columna donde se encontraba en ARN no se agregó uniformemente a la superficie de fibras de la columna. Por esto, es muy importante esparcir debidamente la DNasa al agregarla a la columna de sílica. Además, se recomienda tener un control negativo para la reacción de transcripción reversa (RT). Es decir, en lugar de agregar ARN de plantilla para la reacción de RT, agregar agua para confirmar que la contaminación de ADN genómico no es por los reactivos ni el lugar en donde se está haciendo la reacción, es decir no viene del ambiente. Se puede confirmar que existe contaminación de ADN genómico cuando al hacer el PCR con oligos de actina en ARN tratado con DNasa se observan dos bandas, una en 148pb y otra en 300-500pb aproximadamente, esto es indicador de ADN genómico. Cuando se hace PCR con ADN copia solamente se observa una banda y esa se encuentra a **148bp**. Es importante aclarar que la contaminación por ADN genómico nos puede dar resultados en los Cts muy bajos o tempranos y en las gráficas de fusión se mostrarán dos picos para actina, pero en este trabajo se verificaba siempre que el ARN no estuviera contaminado por ADN genómico antes de hacer RT y posterior a la reacción de RT y los oligos de *boll* y *zpg* están diseñados únicamente para amplificar en regiones de exones.

Luego de eliminar el ADN genómico de todas las muestras, incluyendo las que habían sido identificadas con remanente de ADN genómico, se llevó a cabo la síntesis de ADNc mediante reacción de transcripción reversa. Según Bustin (2002), es necesario verificar que no hubiera contaminación por ADN genómico para evitar amplificaciones inespecíficas y falsos positivos durante el PCR tiempo real debido al alto nivel de sensibilidad de la técnica, como ya mencioné. Para la reacción de transcriptasa reversa se utilizó el kit *GoScriptTM Reverse Transcription System, A5000-A5001* (Promega). Para la síntesis de ADNc de ARN de pupa y adulto se utilizaron Oligos random y Oligos dT; mientras que para hacer ADNc de larvas solamente se utilizó oligos random, lo cual pudo variar el resultado. Al utilizar oligos random y oligos dT las reacciones de transcripción reversa son más eficientes, se transcriben los ARN maduros, se elimina la posibilidad de excluir transcritos poli-(A⁻) y se obtienen altos rendimientos de ADN copia de longitudes más completas y de calidad con plena representación de genes (Farrell, 2010).

Se verificó la reacción de transcriptasa reversa mediante PCR nuevamente con oligos de actina para confirmar la presencia de ADN copia como se muestra en las figuras 28 y 29 en resultados. Se observa que estos geles muestran producto de amplificación de 148pb y que los controles negativos en el último pozo de cada gel no muestran amplificación. Solamente hay una banda de amplificación en el gel, por lo tanto, se puede confirmar que los oligos de actina son específicos y se comprueba posteriormente en el qPCR. La muestra 17 en la Figura 29, tiene una amplificación leve en comparación con las demás muestras cargadas en otros pozos, debido a que la muestra no se cargó correctamente en el pozo y se salió del gel. A pesar de eso, se muestra la banda amplificada a 148pb

adecuada. Se puede concluir que el ADN copia sintetizado puede ser utilizado para realizar la optimización de PCR tiempo real con los oligos de *actina* (Taracena *et al* 2015), *boll* (Flores y Flores, 2016) y *zpg* diseñados para esta tesis.

El ADNc producido, fue inmediatamente alicuotado y congelado para preservarlo y evitar que se degrade. Se debe de alicuotar para que al momento de hacer PCR tiempo real, esté el ADNc listo para utilizar y así, no descongelar el stock. En el Cuadro 15, se observa las secuencias de los oligos utilizados para qPCR, tamaño esperado de amplicón en cada primer y las eficiencias de cada pareja de oligos para ADNc de adulto y pupa a concentraciones de 0.4uM y 0.6uM. La eficiencia de los oligos debe de encontrarse entre 90 y 110%. Si este porcentaje es menor, quiere decir que el PCR tiene poca eficiencia (ThermoFisher, 2016). Las eficiencias bajas de *zpg* y *actina* a 0.4uM (89.37% y 87.19%) para pupa y para adulto a 0.4uM (102.28% y 85.39%) se pueden deber a que el diseño de los oligos no fue el óptimo, estos están al límite de los valores de porcentajes de GC y de formación de heterodímeros (anexos). Entre otras razones por las cuales la eficiencia no se encuentra en el rango deseado puede ser debido a la presencia de inhibidores en la reacción provenientes de la síntesis de ADN copia.

A partir del análisis de las eficiencias, se concluyó que, para analizar la expresión relativa de los genes de homólogos de espermatogénesis en pupa y adulto, se utilizará la concentración de oligos a 0.4uM, ya que mostraba las mejores eficiencias comparado con las obtenidas utilizando oligos a 0.6uM. A partir de esto, se realizó PCR tiempo real para comparar los genes de interés (*boll* y *zpg*) con el gen endógeno de referencia, *actina*. El ADNc se diluyó 1:10 y el mapa de carga para el PCR en tiempo real se muestra en el SOP 5 (anexos). En este trabajo de graduación no se muestran los resultados de optimización de larvas ya que esos datos no fueron anotados y se perdieron. Las gráficas de expresión relativa mostradas de *boll* y *zpg* de **estadios larvales** se hicieron a partir de ADNc que fue sintetizado con una cantidad menor de 1ug de ARN utilizando únicamente oligos random. Además, la concentración de oligos utilizados para el PCR tiempo real de larvas fue de 0.6uM.

Las gráficas de expresión relativa de los ortólogos de *boll* y *zpg* con respecto a *actina* se muestran en la figura 30 y 33. Se puede observar que tanto *boll* como *zpg*, se expresan de igual manera en todos los estadios larvales, así como en pupa hembra y macho. Es decir, no hay diferencia significativa en la expresión durante el desarrollo larvario de estos dos genes. Así mismo, se puede observar que ambos genes se expresan de igual manera en pupa hembra y macho, no hay diferencia significativa en la expresión entre los sexos en esta fase de desarrollo.

La similitud de niveles de expresión relativa observada de AALB005972, *boll*. (figura 31 y 32) con respecto a *actina* entre el pupa y adulto macho y hembra, puede ser atribuido a que la proteína de BOLL se encuentra expresada de igual manera en los tejidos somáticos y gónadas de ambos sexos en etapa temprana (Sekiné *et al* 2015). Además, este gen se encuentra conservado desde moscas hasta

humanos y ratones con un porcentaje de similitud del 42% en la secuencia de ADN y 80% de similitud en la secuencia de aminoácidos (Xu *et al* 2003). Según la literatura, una mutación del gen *boll* provoca arresto meiótico en la espermatogénesis de mosca (Eberhart *et al* 1996) y en la ovogénesis de nemátodos (Karashima *et al* 1999). En *Aedes aegypti*, este gen, no es expresado en larvas ni en ovarios, solamente en testículos según Whyard *et al* (2015). El estudio llevado a cabo por Waqar Ali *et al* (2017) analizó los patrones de expresión de *boll* en tejidos específicos (como cabeza, intestino, cuerpo graso, ovarios y testículos) de *Bactrocera dorsalis* y encontraron que no había expresión de *boll* en los ovarios, únicamente en los testículos.

La *inexina 4 (zpg)*, en *Drosophila*, es necesaria para la diferenciación de células germinales durante la gametogénesis en ambos sexos (Tazuke *et al.*, 2002) y en *Bactrocera dorsalis*, se encontró que existe mayor expresión de este gen en testículos que en ovarios (Waqar Ali *et al* 2017).

Al observar las figuras 33 y 34 no hay diferencia significativa de la expresión del gen AALB006050 (*zpg*) en larvas y pupas machos y hembras. Esto puede deberse a que la proteína de ZPG se encuentra igualmente expresada en células germinales de ambos sexos en pupa (Lin, 2002) y, además, Whyard *et al* (2015) menciona también que *zpg* no es expresado en larva y concuerda con la baja expresión de *zpg* que se observa en la Figura 33. Calkins *et al* (2015) menciona que en *Aedes aegypti*, no fue detectable *zpg* en L4 ni estadios pupales, pero si se expresa en adultos hembras, pero no en machos. Los resultados obtenidos de la Figura 35, concuerdan con los resultados obtenidos por Whyard *et al* (2015) en donde menciona que *zpg* es un gen que se encuentra expresado en los testículos y ovarios de *Ae. aegypti*. A pesar de esta similitud, en este trabajo de graduación se encontró que en *An. albimanus* el gen *zpg* se encuentra sobre-expresado en hembras. La expresión de AALB006050 (*zpg*) en adultos hembras es, en promedio, 70 veces mayor que en macho (Figura 35). Lo cual sugiere que la demanda de síntesis de la proteína del homólogo de *zpg* es mucho mayor en hembras que en machos para funciones específicas en la hembra que se desconocen.

A partir de los resultados obtenidos, se concluye que es necesario, realizar disección de los tejidos de *An. albimanus* para poder saber qué tanto estos genes son expresados específicamente en testículos y ovarios. Además, es posible que estos genes han tomados vías de evolución alternativa que hace que estos resultados difieran a los resultados encontrados en otras especies.

Como conclusión general, es necesario llevar a cabo otros estudios en los cuales se determine las características particulares a la expresión de estos genes en *An. albimanus*. Asimismo, es factible esperar que el silenciamiento de estos genes por interferencia de ARN tenga consecuencias en las hembras de estos organismos, particularmente con el gen AALB006050 (*zpg*). Además, es necesario realizar la separación de los distintos tejidos de *An. albimanus*, como testículos y ovarios, para saber en qué tejidos hay mayor expresión del gen *boll*, y así poder inferir si se puede utilizar como un gen candidato a ser silenciado en el macho de *An. albimanus* como lo fue en *Aedes aegypti*.

Para finalizar, el análisis de la variabilidad de dichos genes, tanto en secuencia como en función, dentro de los Anophelinos puede generar importante información que permita crear herramientas eficientes y específicas para el control de estos y permita eliminar la transmisión de la malaria y potencialmente otras enfermedades transmitidas por mosquitos.

X. CONCLUSIONES

- 1) Se logró optimizar la extracción de ARN de todos los estadios de *An. albimanus* con el kit *SV Total RNA Isolation System Z3100* de Promega; así como la síntesis de ADN copia de todas las muestras de ARN mensajero extraído de larva, pupa y adulto de *An. albimanus* en las tres réplicas biológicas.
- 2) Se hicieron protocolos estandarizados para cada uno de los objetivos de esta tesis: extracción de ARN, precipitación de ARN, tratamiento de ARN con ADNasas, síntesis de ADNc y PCR tiempo real. Los puede encontrar en anexos.
- 3) Los oligos diseñados de PCR tiempo real para AALB006050 (*zpg*, Vector Base) tienen eficiencias a 0.4uM y 0.6uM de 89.37% y 118.24% para pupa y 102.28% y 124.32% para adulto.
- 4) Los oligos tomados de Flores *et al* (2016) de PCR tiempo real para AALB005972 (*boll*, Vector base) tienen eficiencias a 0.4uM y 0.6uM de 150.27% y 166.40% para pupa y 156.10% y 167.29% para adulto.
- 5) Los oligos de actina de Taracena *et al* (2015) de PCR tiempo real para AALB006050 (*actina*) tienen eficiencias a 0.4uM y 0.6uM de 87.19% y 158.29% para pupa y 85.39% y 147.39% para adulto.
- 6) No se observaron diferencias significativas en las gráficas de expresión relativa de los genes de *boll* y *zpg* en larva ni pupa de *An. albimanus*. En adulto *boll* se obtuvieron valores de expresión relativa similares entre machos y hembras.
- 7) Con respecto al gen homólogo de *zpg*, se observó que se expresaba 70 veces más en adulto hembra que en adulto macho. Se puede concluir también que esta proteína tiene una demanda de síntesis mayor en hembra que en macho de *An. albimanus*. Esto se puede deber a que tiene funciones más específicas en la hembra que desconocemos.

XI. RECOMENDACIONES

1. Precipitar con etanol el ARN de larvas, pupas o adultos solamente cuando la concentración de ARN no es suficiente para tener 1ug de ARN en un volumen menor o igual a 8uL. Verificar integridad de ARN después de precipitación con etanol.
2. Si el ARN tiene una concentración muy baja (20ng/uL), volver a realizar la extracción ya que esto puede deberse a un problema técnico en la extracción de ARN.
3. Tener un control negativo en la reacción de transcripción reversa. En lugar de agregar 1ug de ARN plantilla, agregar agua.
4. Confirmar que no se tenga ADN genómico en la muestra de ARN mediante PCR convencional antes de hacer PCR tiempo real y luego de llevar a cabo RT hacer PCR convencional para verificar que sí se sintetizó ADN copia.
5. Recomiendo para mejorar este trabajo repitiendo los patrones de expresión de larva, porque el ADNc no fue sintetizado a partir de 1ug de ARN. Además, los oligos que fueron utilizados para el PCR tiempo real de ADNc de larva tenían una concentración de 0.6uM y solamente se utilizaron oligos random, lo cual varía la eficiencia de la reacción de transcripción reversa.
6. Revisar nuevamente la eficiencia de los oligos de qPCR para los estadios larvales y volver a hacer las gráficas de expresión relativa si se considera necesario.
7. Realizar disección de los tejidos de *An. albimanus* como testículos y ovarios, para saber los tejidos específicos en los cuales hay mayor expresión de estos genes y si son o no buenos candidatos para producir machos estériles.
8. Recomiendo rediseñar nuevamente oligos de actina, analizar otros genes control para utilizar en lugar de actina 1, como los genes RPS17 (normalmente utilizado como gen de referencia en *Ae. aegypti*), RPL8, RPL32 y α -tubulin que son evaluados por Dzaki *et al* (2017). En esta investigación utilizan algoritmos como BestKeeper, geNorm y NormFinder, que se pueden aplicar para evaluar genes housekeeping para los próximos ensayos de PCR tiempo real a lo largo del ciclo de *An. albimanus*

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S (2014). *Cellular and molecular immunology*. 8va. Ed. Elsevier Health Sciences. USA. 535Pp.
2. Agnandji, S. Lell, T. B., Soulanoudjingar, B. Fernandes, J. F., Abossolo, B. P. & C. Conzelmann (2011) *First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children*. The New England Journal of Medicine, 365(20), 1863–1875.
3. Agencia para sustancias tóxicas y el Registro de Enfermedades. 2016. *Resumen de Salud pública -Piretrinas y piretroides*. Consultado en: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs155.html
4. Agnandji, S. T., Lell, B., Fernandes, J. F., Abossolo, B. P., Methogo, B. & Vansadia, P. (2012). *A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants*. The New England Journal of Medicine, 367(24), 2284–2295. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1208394>
5. Alaii, J. A., Hawley, W. A., Kolczak, M. S., Ter Kuile, F. O., Gimnig, J. E., Vulule, J. M. (2003) *Factors affecting use of permethrin-treated bed nets during a randomized controlled trial in western Kenya*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 68(4 suppl), 137–141.
6. Alaii, J. A., Van den Borne, H., Kachur, S. P., Shelley, K., Mwenesi, H. & Vulule, J. M. (2003). Community reactions to the introduction of permethrin-treated bed nets for malaria control during a randomized controlled trial in western Kenya. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(4 suppl), 128–136.
7. Álvarez, R. 1997. *Salud pública, asistencia social y seguridad social*. Tomo VI. Época contemporánea: De 1945 a la Actualidad. Guatemala. 495Pp.
8. Barrangou, R., Birmingham, A., Wiemann, S., Beijersbergen, R. L., Hornung, V., & Smith, A. (2015). *Advances in CRISPR-Cas9 genome engineering: lessons learned from RNA interference*. Nucleic Acids Research, 43(7), 3407–3419. <http://doi.org/10.1093/nar/gkv226>
9. Bauer, R. B. Loer, K. Ostrowski, J. Martini, A. Weimbs, H. Lechner & M. Hoch. (2005). *Intercellular Communication: the Drosophila Innexin Multiprotein Family of Gap Junction Proteins*. Chemistry & Biology 12: 515-526Pp.
10. Becher, H. y B. Kouyaté. (2005). *Health research in developing countries: a collaboration between Burkina Faso and Germany*. Springer Science & Business Media.
11. Becker, N., D. Petric., C. Boase. M. Madon. M. Zgomba., C. Dahl & A. Kaiser. (2010) *Mosquitos and their control*. Editorial Springer. 2da. Edición. Alemania/USA. 594Pp.
12. Belles, X. 1988. *Insecticidas biorracionales*. Editorial CSIC Press. España. 405Pp.
13. Berenguer, J. (2007). *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. Ediciones Universitat Barcelona. España. 516Pp.
14. Bloem KA, Bloem S. (2000). *SIT for codling moth eradication in British Columbia, Canada*. In: Tan K-H, editor. *Area-Wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests*. Joint Proceedings of the International Conference on Area-wide Control of Insect Pests, and the Fifth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, May–June 1998. Pulau Penang: Penerbit Universiti Sains Malaysia:207– 14Pp.
15. Brogdon, W., J. McAllister, A. Corwin & C. Rosales-Cordón. (1999). *Independent selection of multiple mechanisms for pyrethroid resistance in Guatemalan Anopheles albimanus (Diptera: Culicidae)*. J. Econ Entomology 92: 298-302Pp.
16. Brogdon, W., J. McAllister, A. Corwin & C. Rosales-Cordón. (1999) *Oxidase-based DDT-pyrethroid cross-resistance in Guatemalan Anopheles albimanus*. Pestic Biochem Physiol 64: 101-111Pp.
17. Calkins, T. M. Woods, O. Hildebrands, P. Piermarini. (2015). *The molecular and immunochemical expression of inxins in yellow fever mosquito Aedes aegypti: Insights into*

- putative life stage-and tissue-specific functions of gap junctions*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 183: 11-21Pp.
18. Cao, F. R. Eckeber C. Elfgang, J. Nitsche, S. Snyder & B. Nicholson. 1998. *A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa Transfectants and Xenopus oocytes*. J. Cell Science 111 (Part 1): 31-43Pp.
 19. Carpenter, S.J. & W. J. LaCasse. (1955). *Mosquitoes of North America (North of Mexico)*. University of California Press. 495 pp.
 20. Castrillón, D, P. Gonczy, S. Alexander, R. Rawson, C. Eberhart, (1993). *Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in Drosophila melanogaster: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis*. Genetics Society of America 135: 489-505Pp.
 21. CDC. (2015) *Malaria: About Malaria: Disease*. Consultado en; <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html> Con acceso el 18 de Septiembre de 2016.
 22. CDC. (2016). *Malaria: Biology*. Consultado en: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html> Con acceso el 04 de julio de 2017.
 23. CDC. (2017). *Malaria: About Malaria*. Consultado en: <https://www.cdc.gov/malaria/about/index.html> Con acceso el 04 de julio de 2017.
 24. Chang, C. C., Crane, M., Zhou, J., Mina, M., Post, J. & J., Cameron (2013). *HIV and co-infections*. *Immunological Reviews*, 254(1), 114–142. <http://doi.org/10.1111/imr.12063>
 25. Cohuet, A. C., Harris, V. Robert & D. Fontenille. (2009). *Evolutionary forces on Anopheles: what makes a malaria vector?*. Francia. Trends in parasitology 3 (26): 7Pp.
 26. Correa, M., H. Adjounian & S. Adjounian. (2008). *Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia: Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica (27) 1: 22-26Pp.
 27. Costa, J. (2004). *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real*. Enferm Infecc Microbiol Clin 22 (5): 299-305Pp.
 28. Curtin, K. Z. Zhang & R. Wyman. (2002). *Gap junction proteins expressed during development are required for adult neural function in the Drosophila optical lamina*. Neuroscience 22: 7088-7096Pp.
 29. Dong, K. (2007). *Insect sodium channels and insecticide resistance*. Invert Neurosci 7: 17-30Pp.
 30. Dyck, V., J. Hendrichs & A. Robinson. (2005). *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer. Austria. 747Pp.
 31. Dzul, F. R. Penilla. & A. Rodríguez. (2007). *Susceptibility and insecticide resistance mechanisms in An. Albimanus from the southern Yucatan Peninsula, Mexico*. Salud Pública Mex. 49: 302-311Pp.
 32. Dzaki, N, K. Ramli, A. Azlan, I. Ishak & G. Azzam. (2017). *Evaluation of reference genes at different developmental stages for quantitative real-time PCR in Aedes aegypti*. Nature Scientific Reports 7: 43618. 13Pp. DOI: 10.1038/srep43618.
 33. Eberhart, C. j. Maines & S. Wasserman. (1996). *Meiotic cell cycle requirement for fly homologue of human Deleted in Azoospermia*. Nature 381: 783-785Pp
 34. Eirín-López, J. M., & Ausió, J. (2011). *Boll and the Evolutionary Origin of Metazoan Gametogenesis: A Grandpa's Tale*. International Journal of Evolutionary Biology, 2011, 1–7Pp
 35. Estébanez, P. (2005). *Medicina humanitaria*. Ediciones Díaz Santos. España. 864Pp.
 36. Farrell, R. (2010). *RNA Methodologies: a laboratory Guide for Isolation and Characterization*. 4ta. Ed. Editorial Elsevier. 742Pp.

37. Fegan, G., A. Noor., W., Akhwale, Cousens & R. Snow. 2007. *Effect of expanded insecticide-treated bednet coverage on child survival in rural Kenya: a longitudinal study*. The Lancet, 370(9592), 1035–1039Pp
38. Foote, R. & R. Cook. (1959). *Mosquitoes of medical importance*. U.S.D.A. Agriculture Handbook 152: 158Pp.
39. Gama, M. (2007). *Biología I: Un enfoque constructivista*. Pearson Prentice Hall. 3ra. Ed. México.352Pp.
40. Garrett-Jones, C., & Shidrawi, G. R. (1969). *Malaria vectorial capacity of a population of Anopheles gambiae: An exercise in epidemiological entomology*. Bulletin of the World Health Organization, 40(4), 531–545Pp
41. Giuliani, F. G. Giuliani, R. Bauer & C. Rabouille. (2013). Innexin 3, a new gene required for dorsal closure in Drosophila embryo. Plos One 8: 11Pp.
42. Gilboa, L. A. Forbe, S. Tazuke, M. Fuller & R. Lehmann. (2003). *Germ line stem cell differentiation in Drosophila requires gap junctions and precedes via an intermediate state*. Development 130: 6625-6634Pp.
43. Grewal, S. (2000). *Transcriptional silencing in fission yeast*. J. Cell. Physiol. 184: 311-318Pp
44. Hernández, F. (2002). *Fundamentos de epidemiología: el arte detectivesco de la investigación epidemiológica*. 1ra. Edición. Editorial Estatal Universidad a Distancia. Costa Rica. 528Pp.
45. Hopkin, M. (2008). *Malaria: The big push*. Nature, 451(7182):1047–1049Pp.
46. Juárez, J. (2013). *Paradigmas de control de la malaria en Guatemala, siglos XX y XXI, de la erradicación a la eliminación*. Revista Cubana de Salud Pública, 39(2), 346–353.
47. Karashima, T. A. Sugimoto & M. Yamamoto. (1999). *Caenorhabditis elegans homologue of the human azoospermia factor DAZ is required for oogenesis but not for spermatogenesis*. Development 127: 1069-1079Pp.
48. Karp, G. (2008). *Biología Celular y Molecular: conceptos y experimentos*. 5ta. Ed. McGraw Hill.
49. Kim, Y & B. Baker. (1993). *Isolation of RRM-Type RNA-Binding Protein Genes and the Analysis of their relatedness by using a numerical approach*. Molecular and cellular biology. 13 (1): 174-183Pp.
50. Konnin, E. (2000). *How many genes can make a cell: the minimal gene-set concept*. Rev. Genomics Hum. Genet. 1: 99-116Pp.
51. Krzywinska, E., Dennison, N. J., Lycett, G. J., & Krzywinski, J. (2016). *A maleness gene in the malaria mosquito Anopheles gambiae*. Science, 353(6294), 67–69Pp.
52. Lin, H. (2002). *The stem-cell niche theory: lessons from flies*. Nature Genetic Reviews 3: 931-941Pp.
53. Lofgren, C., D. Dame., S. Breeland, D. Weidhaas., G. Jeffery, R. Kaiser., H. Ford., M. Boston & K. Baldwin. (1974). *Release of Chemosterilized Males for control of Anopheles albimanus in El Salvador*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 23 (2): 288-297Pp.
54. Magnusson, K. A. Mendes, N. Windbichler, P. Papathanos, T. Nolan, T. Dottorini, E. Rizzi, G. Christophides & A. Crisanti (2011). *Transcription regulation of sex biased genes during ontogeny in the malaria vector An.gambie*. Plos One 6: e21572 11Pp.
55. Maines, & Wasserman. (1999). *Post-transcriptional regulation of the meiotic CDC25 protein Twine by the Dazl orthologue Boll*. Nature Cell Biology 1: 171-175Pp.
56. Miller, K. & J. Levine. (2011). *Biología*. Pearson Education. USA. 1034Pp.
57. Mandal, F. B. (2015). *Human Parasitology*. PHI Learning Pvt. Ltd.
58. Minakawa, N., Dida, G. O., Sonye, G. O., Futami, K., & Kaneko, S. (2008). *Unforeseen misuses of bed nets in fishing villages along Lake Victoria*. Malaria Journal, 7(1), 165. Consultado en: <http://doi.org/10.1186/1475-2875-7-165>

59. Moazed, D. (2001). *Common Themes in Mechanisms of gene silencing*. Department of Cell Biology, Harvard Medical School. *Molecular Cell* (8): 489-498Pp.
60. Murray, P. Rosenthal. S. & A. Pfaller. (2013). *Medical Microbiology, with Student Consult Online Access*. Elsevier Health Sciences. 6ta. Edición. Estados Unidos. 839Pp.
61. Murray, P., Rosenthal, S., & A. Pfaller. (2015). *Medical Microbiology*. Elsevier Health Sciences. 8va. Edición. Estados Unidos. 840Pp.
62. Olano, V., G., Carrasquilla & F. Méndez. (1997). *Transmisión de la malaria urbana en Buenaventura, Colombia*. *Rev Panam Salud Pública/Pan Am J Public Health* (4): 287-294Pp.
63. Pan, J.-Y., Zhou, S.-S., Zheng, X., Huang, F., Wang, D.-Q., Shen, Y.-Z. & Jiang, J.-J. (2012). *Vector capacity of Anopheles sinensis in malaria outbreak areas of central China*. *Parasites & Vectors*, 5(1): 136 Pp.
64. Paro, R. (1993). *Mechanisms of heritable gene repression during development of Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88. Pp: 263-267Pp.
65. Pecot, C. V., Calin, G. A., Coleman, R. L., Lopez-Berestein, G., & Sood, A. K. (2011). *RNA interference in the clinic: challenges and future directions*. *Nature Reviews Cancer*, 11(1), 59–67. Consultado en: <http://doi.org/10.1038/nrc2966>
66. Phelan, P. J. Bacon, J. Davies, L. Stebbings, M. Todman, L. Avery, R. Baines, T. Barnes, C. Ford, S. Hemkimi, R. Lee, J. Shaw, T. Starich, K. Curtin, Y. Sun, R. Wayman. 1998. *Innexins: a family of invertebrates gap-junction protein*. *Trends Gent*. 14: 348-349Pp.
67. Pridgeon, J. Zhao L, Becnel J, Strickman D. Clarck G & Linthicum K. (2008). *Topically applied AaeIAP1 double-stranded RNA kills female adults of Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology* 45: 414- 420Pp.
68. Promega TM048. (2016). *SV Total RNA Isolation System Z3100*. Technical manual. Consultado en: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/sv-total-rna-isolation-system-protocol.pdf> Con acceso el: 25 de agosto de 2017.
69. Quelhorst, G. & S. Rulli. (2012). *A systematic guideline for developing the best real-time PCR oligos : Lesson learned from designing assays for mor than 14,000 genes*. Quiagen. 19Pp.
70. Reijo, R., T. Lee, P. Salo, R. Alagappan, L. Rosenberg, M. Rozen, T. Jaffe, O. Hovatta. (1995). *Diverse spermatogenic defects in hymans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-bindind protein gene*. *Nature Genetics* 10: 383-393Pp.
71. Scali, C. (2005). *Identification of sex-specific transcripts of the Anopheles gambiae doublesex gene*. *Journal of Experimental Biology*, 208(19), 3701–3709. Consultado en: <http://doi.org/10.1242/jeb.01819>
72. Shelly TE, Whittier TS, Kaneshiro KY. (1994) *Sterile insect release and the natural mating system of the Mediterranean fruit fly, Ceratitis capitata (diptera: tephritidae)* *Ann Entomol Soc Am.*15:470–81Pp.
73. SIGSA Sistema de Información Gerencial de Salud (2017). Consultado en: <http://sigsa.mspas.gob.gt/datos-de-salud-en-guatemala.html>
74. Sinka, M., Y. Rubio-Palis., S. Manguin. A. Patil. H. Temperley, & W. Gething. (2010). *The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis*. *Parasites & Vectors*, 3(1), 72Pp.
75. Skoog, D., D. West, F. Holler, S. Crouch. (2005). *Fundamentos de química analítica*. Cengage Learning. México. 1065Pp.
76. Starz-Gaiano, M. & R. Lehman. (2001). *Moving towards the next generation*. *Mech. Devl*. 105: 5-18Pp
77. Tazuke, S. I., Schulz, C., Gilboa, L., Fogarty, M., Mahowald, A. P., Guichet, A., & Fuller, M. (2002). *A germline-specific gap junction protein required for survival of differentiating early germ cells*. *Development (Cambridge, England)*, 129(10), 2529–2539.

78. Taylor, R. (1966). *The Ecology of Anopheles albimanus (Wied) in Haiti*. Mosquito News 26 (3): 393-397Pp.
79. Thailayil, J., Magnusson, K., Godfray, H. C. J., Crisanti, A., & Catteruccia, F. (2011). *Spermless males elicit large-scale female responses to mating in the malaria mosquito Anopheles gambiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(33), 13677–13681Pp.
80. ThermoFisher Scientific. (2016). *NanoDrop One: Guía de usuario. Espectrofotómetro micro UV/VIS NanoDrop*. 269-309101.
81. Tyagi, R., N. Garg, y T. Sahu. (2012). *Vaccination Strategies against Malaria novel carrier(s) more than a tour de force*. J. Control Release 162: 242-254Pp.
82. Vector Base (2017). *Anopheles albimanus (AalbS2) Transcript: AALB006050-RA*. Consultado en: https://www.vectorbase.org/Anopheles_albimanus/Transcript/Summary?g=AALB006050;r=3L:30951561-30952895;t=AALB006050-RA
83. Vector Base (2017). *Anopheles albimanus (AalbS2) Transcript: AALB005972*. Consultado en: https://www.vectorbase.org/Anopheles_albimanus/Transcript/Summary?db=core;g=AALB005972;r=3L:29878712-29879034;t=AALB005972-RA Con acceso el 01 de diciembre de 2017
84. Vector Base. (2017). *Anopheles albimanus Gene: AALB005972*. Consultado en: https://www.vectorbase.org/Anopheles_albimanus/Gene/Summary?db=core;g=AALB005972;r=3L:29878712-29879034;t=AALB005972-RA Con acceso el 01 de diciembre de 2017.
85. Vector Base. *Anopheles albimanus Gene: AALB006050*. Consultado en: https://www.vectorbase.org/Anopheles_albimanus/Transcript/Summary?db=core;g=AALB006050;r=3L:30951561-30952895;t=AALB006050-RA Con acceso el 01 de diciembre de 2017.
86. Vreysen MJ, Saleh KM, Ali MY, Abdulla AM, Zhu ZR, Juma KG, Dyck VA, Msangi AR, Mkonyi PA, & Feldmann HU. (2000) *Glossina austeni (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique*. J Econ Entomol. 93(1):123-35Pp.
87. Waqar, M. W. Zheng, S. Sohail, Q. Li, W. Zheng & H. Zhang. (2017) *A genetically enhanced sterile insect technique against the fruit fly, Bactrocera dorsalis (Hendel) by feeding adult double-stranded RNAs*. Nature Scientific Reports 7: 11Pp.
88. Watson, J y F. Crick. (1953). *Molecular structure of Nucleic Acids*. Nature 4356: 737-738Pp. Consultado en: <http://www.sns.ias.edu/~tlusty/courses/landmark/WatsonCrick1953.pdf>
89. Whyard, S., Erdelyan, C., Partridge, A. L., Singh, A. D., Beebe, N. W., & Capina, R. (2015). *Silencing the buzz: a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs*. Parasites & Vectors, 8(1), 96Pp.
90. World Health Organization & Global Malaria Programme (2016). *World Malaria Report 2016*. Consultado en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/252038/1/9789241511711-eng.pdf?ua=1>. Con acceso el 12 de abril de 2017
91. World Health Organization & Global Malaria Programme. (2015). *World Malaria Report 2015*. Consultado en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf Con acceso el 12 de septiembre de 2016.
92. World Health Organization (WHO). (2017). *World Malaria Report 2017*. ISBN 978-92-4-156552-3
93. Xu, E. F. Moore & R. Pera. (2001). *A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in meatazoans*. PNAS 98 (13): 7414-7419Pp.
94. Xu, E. D. Lee. A. Klebes, P. Turek, T. Kornberg & R. Pera. (2003). *Human BOLL gene rescues meiotic defects in infertile flies*. Human Molecular Genetics 12 (2): 169-175Pp.
95. Zhang X, Zhang J & Zhu K. (2010). *Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle mediated RNA Interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (Anophles gambiae)*. Insect Molecular Biology 19: 683-693Pp.

96. Zimmerman, R. y J. Voorham.(1997). *Uso de mosquiteros y otros materiales impregnados con insecticida para el control de la malaria en las Américas*. Rev. Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 2 (5):310- 318Pp.

XIII. ANEXOS

Cuadro 17. Casos de confirmados de malaria en Guatemala en el 2016 hasta la semana del 23 de mayo al 10 de junio el 2017.

DEPARTAMENTO	DIAGNÓSTICO	2,016	2,017
ALTA VERAPAZ	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	526	88
BAJA VERAPAZ	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	8	4
CHIMALTENANGO	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	3	1
CHIQUIMULA	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	1	1
EL PETEN	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	125	46
EL PROGRESO	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	1	1
ESCUINTLA	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	3,426	1,407
GUATEMALA	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	16	5
HUEHUETENANGO	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	21	4
IZABAL	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	385	187
JALAPA	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	2	-
QUETZALTENANGO	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	8	-
QUICHE	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	31	13
RETALHULEU	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	77	24
SAN MARCOS	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	4	-
SANTA ROSA	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	203	14
SOLOLA	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	6	1
SUCHITEPEQUEZ	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	143	69
ZACAPA	Malaria debido a Plasmodium vivax, sin complicaciones	9	4
Total		4995	1869

(SIGSA, 2017).

Cuadro 188. Secuencias de oligos usados para PCR en tiempo real

Oligos	Secuencia
BollqP_L	5'-ATGTCCCTACCGAACCCGGC-3'
BollqP_R	5'-CCGCTGATGCCGCCGACAAA-3'
ZpgP_L	5'-CACGACCGATCTCGTCTGG-3'
ZpgP_R	5'-TCGAAATGGAGACATCGCCG-3'
ActinaqP_L	5'-CCA TGT ACC CAG GTA TTG CT -3'
ActinaqP_R	5'-ATC TGT TGG AAG GTG GAC AG-3'

Cuadro 19. Características de oligos de AALB006050 (*zpg*) hechos utilizando OligoAnalyzer 3.1

Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CACGACCGATCTCGTCTGG	Plus	19	54	72	59.94	63.16	4.00
Reverse primer	TCGAAATGGAGACATCGCCG	Minus	20	190	171	59.53	50.00	4.00
Product length	140							



Cuadro 209. Dímeros de oligos de *zpg*




Forward	Reverse
<p>Delta G: -6.53 kcal/mole Base Pairs: 4</p> <pre> 5' CACGACCGATCTCGTCTGG ::: 3' GGTCTGCTCTAGCCAGCAC </pre>	<p>Delta G: -6.76 kcal/mole Base Pairs: 4</p> <pre> 5' TCGAAATGGAGACATCGCCG 3' GCCGCTACAGAGGTAAGCT </pre>
<p>Delta G: -5.19 kcal/mole Base Pairs: 3</p> <pre> 5' CACGACCGATCTCGTCTGG : ::: 3' GGTCTGCTCTAGCCAGCAC </pre>	<p>Delta G: -5.19 kcal/mole Base Pairs: 3</p> <pre> 5' TCGAAATGGAGACATCGCCG : : ::: 3' GCCGCTACAGAGGTAAGCT </pre>
<p>Delta G: -4.62 kcal/mole Base Pairs: 4</p> <pre> 5' CACGACCGATCTCGTCTGG :: :: 3' GGTCTGCTCTAGCCAGCAC </pre>	<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre> 5' TCGAAATGGAGACATCGCCG : : 3' GCCGCTACAGAGGTAAGCT </pre>
<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre> 5' CACGACCGATCTCGTCTGG 3' GGTCTGCTCTAGCCAGCAC </pre>	<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre> 5' TCGAAATGGAGACATCGCCG : : :: 3' GCCGCTACAGAGGTAAGCT </pre>

Cuadro 2110. Heterodímeros de oligos de *zpg*.

<p>Primary Sequence: 5'- TCGAAATGGAGACATCGCCG -3'</p> <p>Secondary Sequence: 5'- CACGACCGATCTCGTCTGG -3'</p> <p>Maximum Delta G: -41.67 kcal/mole</p>
<p>Delta G: -6.66 kcal/mole Base Pairs4</p> <p>5' TCGAAATGGAGACATCGCCG : :: 3' GGTCTGCTCTAGCCAGCAC</p>
<p>Delta G: -5.19 kcal/mole Base Pairs3</p> <p>5' TCGAAATGGAGACATCGCCG 3' GGTCTGCTCTAGCCAGCAC</p>
<p>Delta G: -5.19 kcal/mole Base Pairs3</p> <p>5' TCGAAATGGAGACATCGCCG : : :: 3' GGTCTGCTCTAGCCAGCAC</p>

Cuadro 22. Hairpins de oligos hechos de *zpg*

(a)Forward							
Structures							
Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output	
1		-1.24	40.6	-24.9	-79.37	<input type="button" value="Ct"/>	<input type="button" value="Det"/>
2		-0.85	35.3	-25.4	-82.36	<input type="button" value="Ct"/>	<input type="button" value="Det"/>

(b)Reverse							
Structures							
Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output	
1		-1.23	46.3	-18.4	-57.6	<input type="button" value="Ct"/>	<input type="button" value="Det"/>
2		-1.03	32.5	-42	-137.4	<input type="button" value="Ct"/>	<input type="button" value="Det"/>
3		-0.72	31.8	-32.2	-105.59	<input type="button" value="Ct"/>	<input type="button" value="Det"/>

Cuadro 23. Secuencias homólogas de *zpg* en *An. albimanus* (Vector Base: AALB006050)

ID	Secuencia (5' a 3')
>AALB006050: AALB006050-RA cdna: _protein_coding	ATGCTGGAACCTCGTGCCTCCATTGCGGGGCATTCTACAGATAAAAAGCGGTCAACACGACCGATCTCGTCTGGCGTTTGCACTGCCGGGTACCAGTTTATCTGT TGCTGTTTCGCGGCCTTGCTACTTCCGACGCAATACTTTGGCAATCCGATCGACTGCGTGGCTGGATCCGGCGATGTCTCCATTTCCGACGATGAACGATTTTC TGCTGGATCATGGGCACCTACATCAGCAAGGATCCGAACCTTTGACTGGAGAGTACGGATTTGGTGAAGATCAACGCCAAAATTGGCCATATTCCGGAGGAG GAGCGCTCGTACCAGAAGTACTACCAGTGGTTCGTGTTACTACTGGCGTTCCAAGCCTGTCTGCTGACCTGCCAATGTGCTGTGGAAGATCTGGGAGGGT GGCCGTCTCGAGGCGCTATGCGAAGGGCTAACGATGCCATACTGCGGGAGCAGTGAAGCAATCAAGCAAGAAAAAGCTGATCCGCTACCTGACGACGGA GTGTAGAACGCACCATCGAGGTTACATGTACCCGACTACTGCTTCTGCATGATCCTCAACTTTGCCAACGTGCTGGCAAACATCTGCTGATGAATACGCTCTTC TCCGGCTTCTGGATGAACTACCATCCGGCCATGATGGCGCTGCTGCTGCTTTCGATTTTCCCTCCTGGAACCGCTACAACCTCGCAAGTATTCCCCAAGCTGGCCA AATGCGACTTCCATTTTCGTGGGACCGAGCGGTTCCAAGCAGAACCAGCGATGGGCTGTGCCTGTGCGGTTGAACGTGGTGAACGAGAAGATATTTGCATTCC TGTGGCTGTGGTTCCGGGATTCTTGGCGTCAATTTCCGGCATTAACTGCTCTTCTGGTGTGCCCTGCTCTGCAGCAAGGGCATCCGCGCCTGGTTGCTGCGCCAG CAAATGCAACCGATCCGTTCCGGTGGTTGTCAACAATGCGCTACGCGGCAATGTATCCGGCAAATGGTTTCTGCTGTTGCAGCTGTGCCGCAATCTGAACCCGC TGGTACGCGTGATATTATGCTCTGTATCTCGAAGAAACGACCCACCGACAGTCTTTACGCTAAACCAAAGAGCATGATGATGACCGCCGATTTCTACCAGG ACCAAGATGGCGATCTAGAGATAGGCGAGGTTAATGTTTAG
>AALB006050:AALB0060 50-RA AALB006050-RA-E1 exon	ATGCTGGAACCTCGTGCCTCCATTGCGGGGCATTCTACAGATAAAAAGCGGTCAACACGACCGATCTCGTCTGGCGTTTGCACTGCCGGGTACCAGTTTATCTGT TGCTGTTTCGCGGCCTTGCTACTTCCGACGCAATACTTTGGCAATCCGATCGACTGCGTGGCTGGATCCGGCGATGTCTCCATTTCCGACGATGAACGATTTTC TGCTGGATCATGGGCACCTACATCAGCAAGGATCCGAACCTTTG
>AALB006050:AALB0060 50-RA AALB006050-RA-E2 exon	TACTGGAGAGTACGGATTTGGTGAAGATCAACGCCAAAATTGGCCATATTCCGGAGGAGGAGCGCTCGTACCAGAAGTACTACCAGTGGGTCGTGTTCCATAC TGGCGTTCCAAGCCTGTCTGCTGACCCTGCCAATGTGCTGTGGAAGATCTGGGAGGGTGGCCGTCTCGAGGCGCTATGCGAAGGGCTAA
>AALB006050:AALB0060 50-RA AALB006050-RA-E3 exon	CGATGCCATACTGCCGGAGCAGTGAAGCAATCAAGCAAGAAAAAGCTGATCCGCTACCTGACGACGGAGTGTAGAACGCACCATCGAGGTTACATGTAC CGCTACTGCTTCTGCATGATCCTCAACTTTGGCAACGTGCTGGCAAACATCCTGCTGATGAATACGCTCTTCTCCGGCTTCTGGATGAACTACCATCCGGCCAT GATGGCGCTGCTGCTGTTTCGATTTTCCCTCCTGGAACCGCTACAACCTCGAAGTATTCCCAAGCTGGCAAATGCGACTTCCATTTTCGTGGGACCGAGCGGT TCGAAGCAGAACCAGCAGTGGGCTGTGCCTGTGCGGTTGACGTGGTGAACGAGAAGATATTGCAATTTCTGCTGCTGGTTCGGGATTCTTGGCGCTATT CGGCCATTAATCTGCTCTTCTGGTGTGCCCTGCTCTGCAGCAAGGGCATCCGCGCCTGGTTGCTGCGCCAGCAAATGCAACCGATCCGTTCCGGTGGTTGTCAA CAATGCGCTACGCGGCAATGTATCGGCAAATGGTTTCTGCTGTTGCAGCTGTGCCGCAATCTGAACCCGCTGGTCAAGCGGTGATATTATGCTCTGTATCTCG AAGAAACGACCCACCGACAGTCTTTACGCTAAACCAAAGAGCATGATGATGACCGCCGATTTCTACCAGGACCAAGATGGCGATCTAGAGATAGGCGAGGT TAATGTTTAG
>AALB006050:AALB0060 50-RA intron 1: _protein_coding	GTAAGAATAATATGGCGCAGCAGCCGGCGAACGACGAAAAAGTGAAGTTATGCTCAATCCTTACTAAATTGTACGGCGCAG
>AALB006050:AALB0060 50-RA intron 2: _protein_coding	GTATGTCACGGAAATGGTCAATCTCCTTAGCTTCTTTTCTTAAATTAATCTCTCGCGTCTGTTTTCTCGGCCGTACATTCTCTAG
>3L dna:chromosome chromosome:AalS2:3L:309515 61:30952895:-1	ATGCTGGAACCTCGTGCCTCCATTGCGGGGCATTCTACAGATAAAAAGCGGTCAACACGACCGATCTCGTCTGGCGTTTGCACTGCCGGGTACCAGTTTATCTGT TGCTGTTTCGCGGCCTTGCTACTTCCGACGCAATACTTTGGCAATCCGATCGACTGCGTGGCTGGATCCGGCGATGTCTCCATTTCCGACGATGAACGATTTTC TGCTGGATCATGGGCACCTACATCAGCAAGGATCCGAACCTTTGGTAAGAATAATATGGCGCAGCAGCCGGCGAACGACGAAAAAGTGAAGTTATGCTCAATC CTTACTAAATTGTACCGGCGCAGTACTGGAGAGTACGGATTTGGTGAAGATCAACGCCAAAATTGGCCATATTCCGGAGGAGGAGCGCTCGTACCAGAAGTAC TACCAGTGGGTCGTGTTACTACTGGCGTTCCAAGCCTGTCTGCTGACCTGCCAATGTGCTGTGGAAGATCTGGGAGGGTGGCCGTCTCGAGGCGCTATGCG AAGGGTAAAGTATGTCACGGAAATGGTCAATCTCCTTAGCTTCTTTTCTTAAATTAATCTCTCGCGTCTGTTTTCTCGGCCGTACATTCTTAGCGATGCCCAT ACTGCCGAGCAGTGAAGCAATCAAGCAAGAAAAAGCTGATCCGCTACCTGACGACGGAGTGTAGAACGCACCATCGAGGTTACATGTACCAGTACTGCT TCTGCATGATCCTCAACTTTGCCAACGTGCTGGCAAACATCCTGCTGATGAATACGCTCTTCTCCGGCTTCTGGATGAACTACCATCCGGCCATGATGGCGCT GCTGTGCTCGATTTTCCCTCCTGGAACCGCTACAACCTCGAAGTATTCCCAAGCTGGCAAATGCGACTTCCATTTTCGTGGGACCGAGCGGTTCCGAAGCAG AACCAGGATGGGCTGTGCCTGTTGCCGTTGAACGTGGTGAACGAGAAGATATTGCAATCCTGTGGCTGTGGTTCGGGATTCTTGGCGTCAATTTCCGGCCATTA ATCTGCTTCTGGTGTGCCCTGCTCTGCAGCAAGGGCATCCGCGCTGGTTGCTGCGCCAGCAAATGCAACCGATCCGTTCCGGTGGTTGTCAACAATGCGCT ACGCGGCGAATGTATCGGCAAATGGTTTCTGCTGTTGCAGCTGTGCCGCAATCTGAACCCGCTGGTCAAGCGGTGATATTATGCTCTGTATCTCGAAGAAACGA CCCACCGACAGTCTTTACGCTAAACCAAAGAGCATGATGATGACCGCCGATTTCTACCAGGACCAAGATGGCGATCTAGAGATAGGCGAGGTTAATGTTTAG

Cuadro 24. Secuencias homólogas de *boll* en *An. albimanus* (Vector Base: AALB005972)

>AALB005972:AALB005972-RA cdna: protein_coding		ATGTCCCTACCGAACCCGGCTGGGCAGCTCGATGGAGGGCTGGCGGCGCCCAAGTACGGTACACTCATACCGAACCCGGGTTTTTGT CGGCGGCATCAGCGGTGACACAACGGAAGCAGAATATGCCGCCTGTTCTCCTCGTACGGCAATGTCAAATCGACAAAGATCATCG TCGACCGGGCCGGTGTGAGCAAAGGGTACGGTTTCGTCACGTTTCAAACCGGAACACGAAAGCAGCAAGCTCCAGAATGATTGTGA TTGTATTGTGCTGCGAGACCCGAAAACCTCAACATTGCGCCCGTATCAAAAAGCAAACGATCTGTGCCACGAAACGGGGCCGTCTACT ACGCGGCGACACCGCCAACGCCCGGATCAACAACATACCGATCGAGCAGTTCGCGGCCGTCTACCCGCCGGTGTGCCAACCATG TATCCGCCAACGTTGCCGTACCAACCGTTCTACCAATACTACAGCGTGCCAATGAACGTGCCACCATCTGGCCTCAAACTATCAA GGAATCTACCCATGCTAA
>AALB005972:AALB005972-RA RA-E1 exon:protein_coding	AALB005972-	ATGTCCCTACCGAACCCGGCTGGGCAGCTCGATGGAGGGCTGGCGGCGCCCAAGTACGGTACACTCATACCGAACCCGGGTTTTTGT CGGCGGCATCAG
>AALB005972:AALB005972-RA RA-E2 exon:protein_coding	AALB005972-	CGGTGACACAACGGAAGCAGAATATGCCGCCTGTTCTCCTCGTACGGCAATGTCAAATCGACAAAGATCATCGTACCGGGCCG GTGTGAGCAAAGGGTACGGTTTCGTCACGTTTCAAACCGGAACACGAAAGCAGAAAGCTCCAGAATGAT
>AALB005972:AALB005972-RA RA-E3 exon:protein_coding	AALB005972-	TGTGATTGTATTGTGCTGCGAGACCCGAAAACCTCAACATTGCGCCCGTATCAAAAAGCAAACGATCTGTGCCACGAAACGGGGCCG TACTACGCGGCGACACCGCCAACGCCCGGATCAACAACATACCGATCGAGCAGTTCGCGGCCGTCTACCCGCCGGTGTGCCAA CCATGTATCCGCCAACGTTGCCGTACCAACCGTTCTACCAATACTACAGCGTGCCAATG
>AALB005972:AALB005972-RA RA-E4 exon:protein_coding	AALB005972-	AACGTGCCACCACATCTGGCCTCAAACTATCAAG
>AALB005972:AALB005972-RA RA-E5 exon:protein_coding	AALB005972-	GAATCTACCCATGCTAA
>AALB005972:AALB005972-RA 1: protein_coding	intron	GTAAGTGGGCTGTTTCATTTCTGGTTCCACAAATCCTCCCGAGCTAAAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAACAACGAAAACCTCCCCAAG TTGCGTGAAGTTCCGCACATTTCCGCTTTCACCATGTTGGTTGTTGTTGTTGCTGTTGATTACCCCTGTTCCCGTTTCTGTTCTATC GTTACACACCCCGGTTCCGAGCGAGGTAGTTGCGTTTTGTAATTCGTTCTCGTTCCATTTTAATCCTTTATTTGTTGTGTTACTA GTTCTGGTCTTATATAAATCAAAAAGAAATGTTTTTTTTTCTGAACGGCCTAAATGACATGATGTGACATTCGATTGTACGGCT TGAGTGGAAAGTATTTAAAAATTGATCTAGTAATCGTATGTCGACTATATGGCGACGGTACATAAGGCAGGATCAAAGTAAAAACCGG GATGTAATGAAGGGACAGGCGAATCAGCATCTCACCGGAGAAGAGCAAAGGGTTCGCTGAGAGATCATATTCGATCGATCGATC ACGCTAGTACCCCAAAAAACAACCTAAACATGATGAAGTCTCAGGCTCGGCATCTAGATTTGATGTACCTTGATTGACTCGTTC TCAAGCCGGCTGTGCAATTGCTCTGTTCTCTTTACTCATGTAG
>AALB005972:AALB005972-RA 2: protein_coding	intron	GTAAGTATGCGCTCGGCACTGACGGTCTTCTCCGCTCTTAATCGCCCTTTGTGACAATTGCCATCCTGTACCCACCACAG
>AALB005972:AALB005972-RA 3: protein_coding	intron	GTGAGTTGCTTTACCGTGCTATGTTCTGCTGCAATCCGGGCACAGGCCGAAATGATCCATTATCGCTCGAATATGTGTATTGTATCT TGCCTTCTCTCTTTTCGCCCTTCTTTTCGACCAACTGGTTCCTCAATGCTTTCCCGCCACAG
>AALB005972:AALB005972-RA 4: protein_coding	intron	GTGAGTTGGGCAACTCATGTCTCATTTGCATGATGGATTGCGTGGCGCGCCGATCGCAATACGCGTGATTGTGTCGTGCAATCAAA TTCGCCAGCTGGGTTATCGAAGTGTGGAAGGAGTTTCATTTTCGAGGAACGAGTCTTCCATTCCGTTTTACTAATTGTTGTTCTCGG GTCTCATCCGCAG
>3L dna:chromosome chromosome:AalBS2:3L:29877723:29879337:-1		ATGTCCCTACCGAACCCGGCTGGGCAGCTCGATGGAGGGCTGGCGGCGCCCAAGTACGGTACACTCATACCGAACCCGGGTTTTTGT CGGCGGCATCAGGTAAGTGGGCTGTTTCATTTCTGGTTCCACAAATCCTCCCGAGCTAAAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAACAACGA AAACCTCCCCAAGTTGCGTGAAGTTCCGCATTTCCGCTTTCACCATGTTGGTTGTTGTTGTTGCTGTTGATTACCCCTGTTCCCG TTTCTGTTTCTATCGTTACACACCCCGGTTCCGAGCGAGGTAGTTGCGTTTTGTAATTCGTTTCTCGTTCCATTTTAATCCTTTATT TTGTTGTTACTAGTTCTTCTGTTTATATAAATCAAAAAGAAATGTTTTTTTTTCTGAACGGCCTAAATGACATGATGTGACATT CGCATGTACGGCTTGAGTGGAAAGTATTTAAAAATTGATCTAGTAATCGTATGTCGACTATAATGGCGACGGTACATAAGGCAGGAT CAAAGTAAAACCGGGATGTAATGAAGGGACAGGCGAATCAGCATCTCACCGGAGAAGAGCAAAGGGTTCGCTGAGAGATCATAT TCGATCGATCGATCAGCTAGTACCCCAAAAAACAACCTAAACATGATGAAGTCTCAGGCTCGGCATGATTTGATGTACCTT GATTCGACTCGTCTCAAGCCGGCTGTGCAATTGCTCTGTTCTTTACTCATGTAGCGGTGACACAACGGAAGCAGAATATGC CGCTGTTCTCCTCGTACGGCAATGTAATCGACAAAGATCATGTCGACCGGGCCGGTGTGAGCAAAGGGTACCGGTTTCTGTCACG TTCGAAACGGAACACGAAGCACAGAAGCTCCAGAATGATGAAGTATGCGCTCGGCCTGACCGGCTGTTCTCCGCTTCTAAATC GCCCTTTGTGACAATTGCCATCCTGTACCCACCACAGTGTGATTGTATTGTGCTGCGAGACCGCAAACCTCAACATTGCGCCCGCTAT CAAAAAGCAAACGATCTGTGCCACGAACGGGGCCGTCTACTACGCGGCGACACCGCCAACGCCCGGATCAACAACATACCGATC GAGCAGTTGCGGGCCGTACCCGCCCGGTGTGCCAACCATGTATCCGCCAACGTTGCCGTACCAACCGTTCTACCAATACTACAGC

	GTGCCAATGGTGAGTTGCTTTACCGTGCTATGTTCTGCTGCAATCCGGGCACAGGCCGAAATGATCCATTATCGCTCGAATATGTGT ATTGTTATCTTGCCCTTTCTCTCTTTTCGCCCTTTCTTTTCGCACCAACTGGTTCCCAATGCTTTCCCGCCACAGAACGTGCCACCAT CTGGCCTCAAACTATCAAGGTGAGTTGGGCAACTCATGTCTCATTTCATGATGGATTGCGTGGCGCGCCGTATCGCAATACGCGT GATTGTGTCGTGCAATCAAATTCGCCAGCTGGGTTATCGAAGTGTGGGAAGGAGTTTCATTTCGAGGAACGAGTCTTCCATTCCGT TTACTAATTGTTGTTCTCGGGTCTCATCCGAGGAATCTACCCATGCTAA
--	---

Cuadro 25. Secuencias de gen de *actina* en *An. albimanus* (Vector base: AALB015481-RA)

>AALB015481-RA cdna: <u>protein_coding</u>	CCGCTTTGTAGCTGTCGGTTTAGAGCGCGTCGTTCCCATATCAGTTCAGTTAAGCACCCACACACAGACCAGCCGGCAAGATGTGTGACGATGATGCGGGAG CACTGGTCTGACACAATGGATCCGGAATGTGCAAGGCCGGATTTCGCGGGCGATGATGCACCGCGCGCCGTCTTCCCGTCGATCGTGGGCCGGCCACGCCACC AGGGCGTGATGGTCGGTATGGGCAACAAGGATGCGTACGTGGGCGACGAGGCACAGTCAAGCGCGGTATCCTGACGCTCAAGTATCCGATCGAGCACGGT ATCATCACGAAGTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCATCACAGTTCTACAACGAGCTGCGCGTGGCTCCGGAGGAGCATCCGGTGTCTGACTGAGGCA CCGCTCAACCCGAAGTCCAACCGCGAGAAGATGACGCAGATCATGTTTCGAGACGTTTTCGCGCGCCGGCAGTGTACGTCGCGATCCAGGCCGTGCTGTCCCTG TACGCATCCGGTCTGATCCACGGGCGTGGTGTGACTCGGGCGATGGTGTTCGATACCGTGGCCATCTACGAGGGTTACGCGCTGCCGCACGCCATCCTGC GCATGGATCTGGCCGGTTCGCGATCTGACCGACTATCTGATGAAGATCCTGACCGAGCGCGGCTACTCGTTCACGACCAGCCGAGCGGGAGATCGTGCCTG ACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTGGCGCTCGACTTCGAGCAGGAAATGCAGGCCGCGCCGCTCGTCTGTCGCGAGAAGTCTGACGAGCTGCCGGACG GTCAGGTCATCACCATCGGCAACGAGCGCTTCCGCGCTCCGGAAGCCCTGTTCCAGCCAGCTTCCCTCGGTATGGAGTGCACCGGTATCCACGAGCCGTCTA CAACTCGATCATGCGGTGCGACGTCGACATCCGTAAGGATCTGTACGCCAACAGTGTCTTCCGGTGGTACCACCATGTACCCAGGTATTGCCGATCGTATG CAGAAGGAGATCACCTCGCTCGCCCCGTCGACCATCAAGATCAAGATCATTGCCCGCGGAGCGTAAAGTACTCGGTCTGGATCGGTGCCATCCTTGGCCCT CGCTGTCCACCTTCCAGACGATGTGGATCTCGAAGCAGGATACGACGAGGGCGCCCGGGCATCGTGCACCGCAAGTGTCTTAAAGCAACGGCGGACCTC ATCCAGTCTGTCGATCTTGTTCGGTTAAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAACCGGCAGAAGCAAAACCAAGCAACATACTATCAAACAGCA GCCGATTGAGCTCTATTGTGGTGTCTGTCTCTGTTCTTTTACCACCAGCATCTTTCTATGATTTCTCTTTTACCATCTCTTTTATTTTTTGTGTTTTGTTCTG TGCAAAATCTTCTTCGACTTGTAACAAACAGCGCTTAGGGCGGTGCTAGAGAAGTAAATATATCTTTTTTGTATTACGT
>AALB015481-RA AALB015481-RA-E1 exon: <u>protein_coding</u>	CCGCTTTGTAGCTGTCGGTTTAGAGCGCGTCGTTCCCATATCAGTTCAGTTAAG
>AALB015481-RA AALB015481-RA-E2 exon: <u>protein_coding</u>	CACCCACACACAGACCAGCCGGCAAGATGTGTGACGATGATGCGGGAGCACTGGTCTGATGACAATGGATCCGGAATGTGCAAGGCCGGATTTCGCGGGCGAT GATGCACCGCGCGCCGTCTTCCCGTCGATCGTGGGCCGGCCACGCCACCAGGGCGTGATGGTTCGGTATGGGCAACAAGGATGCGTACGTGGGCGACGAGGCCA CAGTCGAAGCGCGGTATCCTGACGCTCAAGTATCCGATCGAGCACGGTATCATCACGAAGTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCATCACAGTTCTACAAC GAGCTGCGCGTGGCTCCGGAGGAGCATCCGGTGTCTGCTGACTGAGGCACCGCTCAACCCGAAGTCCAACCGGAGAAGATGACGCAGATCATGTTTCGAGACG TTTTCGCGCGCCGGCAGTGTACGTCGCGATCCAGGCCGTGCTGTCCCTGTACGCATCCGGTCTGATCCACGGGCGTGGTGTGACTCGGGCGATGGTGTTCG ATACCGTGGCCATCTACGAGGGTTACGCGCTGCCGCACGCCATCCTGCGCATGGATCTGGCCGGTTCGCGATCTGACCGACTATCTGATGAAGATCCTGACCGA GCGCGGCTACTCGTTACGACCAGGCCGAGCGGGAGATCGTGCCTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTGGCGCTCGACTTCGAGCAGGAAATGCAGGC CGCGGCCGCTCGTCTGTCGGAGAAGTCTGACGAGCTGCCGGACGGTCAAGGTCATCACCATCGGCAACGAGCGCTTCCGCGCTCCGGAAGCCCTGTTCCA GCCCAGCTTCCCTCGGTATGGAGTGCACCGGTATCCACGAGACCGTCTACAACCTCGATCATGCGGTGCGACGTCGACATCCGTAAGGATCTGTACGCCAACAGT GTCTGTCCGGTGGTACCACCATGTACCCAGGTATTGCCGATCGTATGAGAAGGAGATCAACCTCGTTCGCCCCGTCGACCATCAAGATCAAGATCATTGCC CGCCGAGCGTAAGTACTCGGTCTGGATCGGTGGCTCCATCCTGGCTCGCTGTCACCTTCCAGACGATGTGGATCTCGAAGCACGAGTACGACGAGGGCG GCCCGGCATCGTGCACCGCAAGTGTCTTAAAGCAACCGCGGACCTCAACGATCGTCTGATCTTGTTCGGGTTAAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCA ACACCAACCGGCAGAAGCAAAACCAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGAGCTCTATTGTGGTGTCTGTCTCTGTTCTTTTACCACCAGCATCTT TCTATGATTTCTTTTTACCATCTTTTTATTTTTTGTGTTTTGTTTCTGTGCAAAATCTTCTTCGACTTGTAACAAACAGCGCTTAGGGCGGTGCTAGAGAAGT AAATATATCTTTTTTGTATTACGT

>AALB015481-RA intron 1: protein coding	GTGAGTGTACGGGCCGGCCCCCGGGGAGGACCATTGCAGTGCAGCGGATCGGATATCATAAATTGGACTTCTTAATCCTCCACCCCCGGAAG
>AALB015481-RA utr3: protein coding	GGCAACGGCGGACCTCATCCAGTCGTGATCTTTGTCGGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAACGGCAGAAGCAAACCAAGCAAC ATACTATCAAACAGCAGCCGATTGAGCTCTATTGTGGTGTCTGTCTCTGTTCTTTTACCACCAGCATCTTTTCTATGATTTCTTTTTACCATCTCTTTATTTT TTGTTGTTTTGTTTCTGTGCAAATCTTCTTCGACTTGTAAACAAACAGCGCTTAGGGCGGTGCCTAGAGAAGTAAATATATCTTTTTTTGATTACGT
>AALB015481-RA utr5: protein coding	CCGCTTTGTAGCTGTCGGTTTAGAGCGCGTCGTTCCCATATCAGTTCAGTTAAGGTGAGTGTACGGGCCGGCCCCCGGGGAGGACCATTGCAGTGCAGCGG
>2R dna:chromosome chromosome:AalbS2:2R: 33285660:33287267:1	CCGCTTTGTAGCTGTCGGTTTAGAGCGCGTCGTTCCCATATCAGTTCAGTTAAGGTGAGTGTACGGGCCGGCCCCCGGGGAGGACCATTGCAGTGCAGCGG ATCGGATATCATAAATTGGACTTCTTAATCCTCCACCCCCGGAAGCACCCACACACAGACCAGCCGGCAAGATGTGTGACGATGATGCGGGAGCACTGGTTCG TAGACAATGGATCCGGAATGTGCAAGGCCGATTTCGCGGGCGATGATGCACCGCGCGCCGTCTTCCCGTCGATCGTGGGCCGGCCACGCCACCAGGGCGTGA TGGTCGGTATGGGCAACAAGGATGCGTACGTGGGCGACGAGGCACAGTCGAAGCGCGGTATCCTGACGCTCAAGTATCCGATCGAGCACGGTATCATCACGA ACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCATCACAGTTCTACAACGAGCTGCGCGTGGCTCCGGAGGAGCATCCGGTGTGCTGACTGAGGCACCGCTCAACC CGAAGTCCAACCGCGAGAAGATGACGCAGATCATGTTTCGAGACGTTTGGCGCGCCGGCAGTGTACGTCGCGATCCAGGCCGTGCTGTCCCTGTACGCATCCG GTCGTACCACGGGCGTGGTGTGACTCGGGCGATGGTGTTCGCATACCGTGCCATCTACGAGGGTTACGCGCTGCCGCACGCCATCTGCGCATGGATCT GGCCGGTCGCGATCTGACCGACTATCTGATGAAGATCCTGACCGAGCGCGGCTACTCGTTCACGACCACGGCCGAGCGGGAGATCGTGCCTGACATCAAGGA GAAGCTGTGCTACGTGGCGCTCGACTTCGAGCAGGAAATGCAGGCCGCGGCCGCTCGTGCCTCGTCCGAGAAGTCTACGAGCTGCCGACGGTCAGGTAT CACCATCGGCAACGAGCGCTTCCGCGCTCCGGAAGCCCTGTTCCAGCCCAGCTTCCCTCGGTATGGAGTCGACCGGTATCCACGAGACCGTCTACAACCTCGATC ATGCGGTGCGACGTCGACATCCGTAAGGATCTGTACGCCAACAGTGTCTGTCCGGTGGTACCACCATGTACCCAGGTATTGCCGATCGTATGCAGAAGGAG ATCACCTCGCTCGCCCCGTCGACCATCAAGATCAAGATCATTGCCCGCCGGAGCGTAAGTACTCGGTCTGGATCGGTGGCTCCATCTGGCCTCGCTGTCCA CCTTCCAGACGATGTGGATCTCGAAGCACGAGTACGACGAGGGCGGCCCGGCATCGTGCACCGCAAGTGTCTTAAGGCAACGGCGGACCTCATCCAGTCG TCGATCTTGTGGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAACGGCAGAAGCAAACCAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGA GCTCTATTGTGGTGTCTGTCTCTGTTCTTTTACCACCAGCATCTTTTCTATGATTTCTTTTTACCATCTCTTTTATTTTGTGTTTTTCTGTGCAAATCTT CTTCGACTTGTAAACAAACAGCGCTTAGGGCGGTGCCTAGAGAAGTAAATATATCTTTTTTTGATTACGT

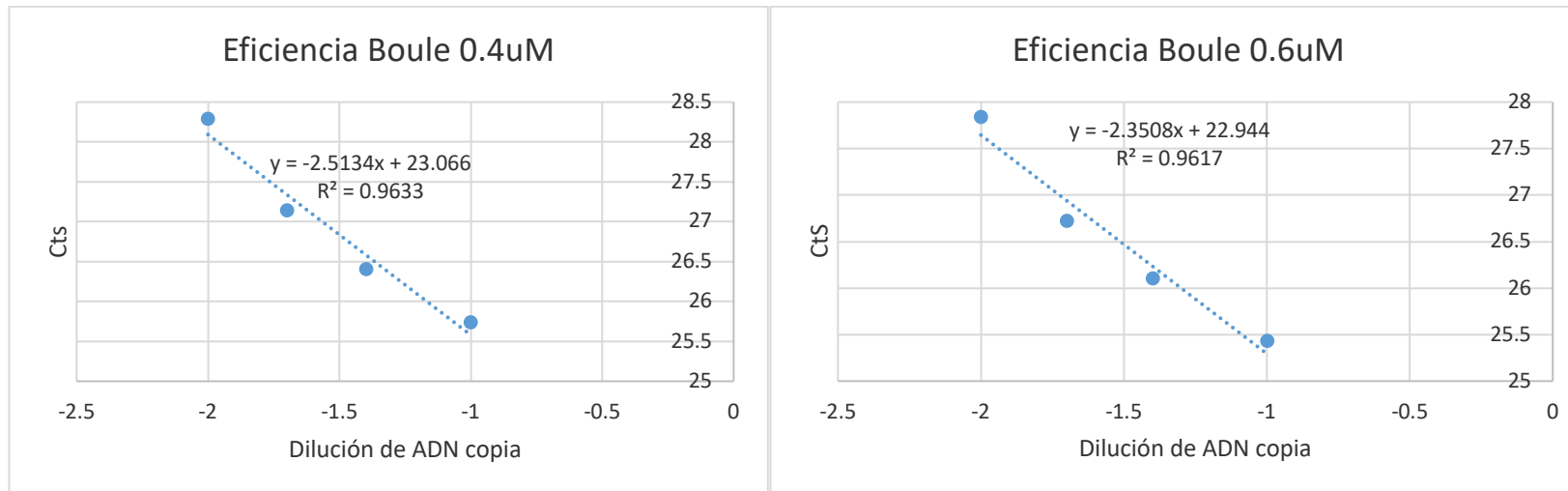
Cuadro 26: Datos crudos de optimización de PCR tiempo real para ADN complementario de pupa de *An. albimanus*. Nombre del Programa en termociclador: 26-08-2017 Placa 2 optimización de actina boule y zpg pupa macho E3 AR.

Primer	<i>Actina</i>				<i>Boule</i>				<i>zpg</i>			
Diluciones de ADN complementario	0.4uM	Promedio	0.6uM	Promedio	0.4uM	Promedio	0.6uM	Promedio	0.4uM	Promedio	0.6uM	Promedio
dil 1:10	35.04	34.98	28.2	27.95	26.01	25.83	25.44	25.50	35.4	35.86	32.75	33.21
	35.05		28.23		25.65		25.43		35.62		33.32	
	34.85		27.44		25.83		25.59		36.57		33.58	
dil 1:25	36.35	35.95	27.56	28.53	26.1	26.31	26.07	26.10	36.81	36.72	34.07	34.17
	36.06		28.54		26.32		26.14		36.73		34.93	
	35.44		28.52		26.5		26.08		36.63		33.52	
dil 1:50	36.83	36.993333	28.29	29.34	27.08	27.12	26.64	26.70	37.02	37.84	35.25	34.79
	37.22		29.76		27.22		26.75		37.28		34.96	
	36.93		29.97		27.07		26.7		39.23		34.16	
dil 1:100	39.12	38..80	30.83	30.26	28.29	28.3	28.01	27.9	40.19	39.12	37.77	36.17
	38.81		30.77		28.31		27.85		37.3		35.5	
	38.45		29.75		28.3		27.84		39.89		35.25	
Eficiencia	87.19		158.29		150.27		166.40		89.37		158.29	

Gráficas de eficiencia de qPCR utilizando distintas concentraciones de primers usados para PCR tiempo real.

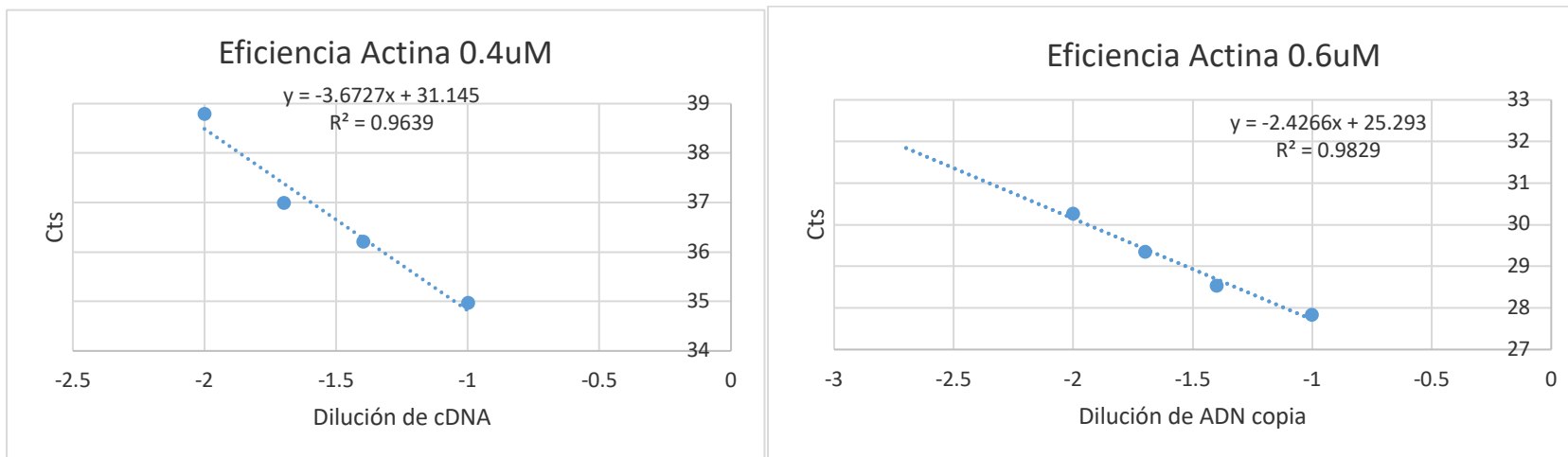
a. Boule

Figura 37. Gráfica de eficiencia de oligos *boll* a 0.4uM y 0.6uM qPCR (pupa).



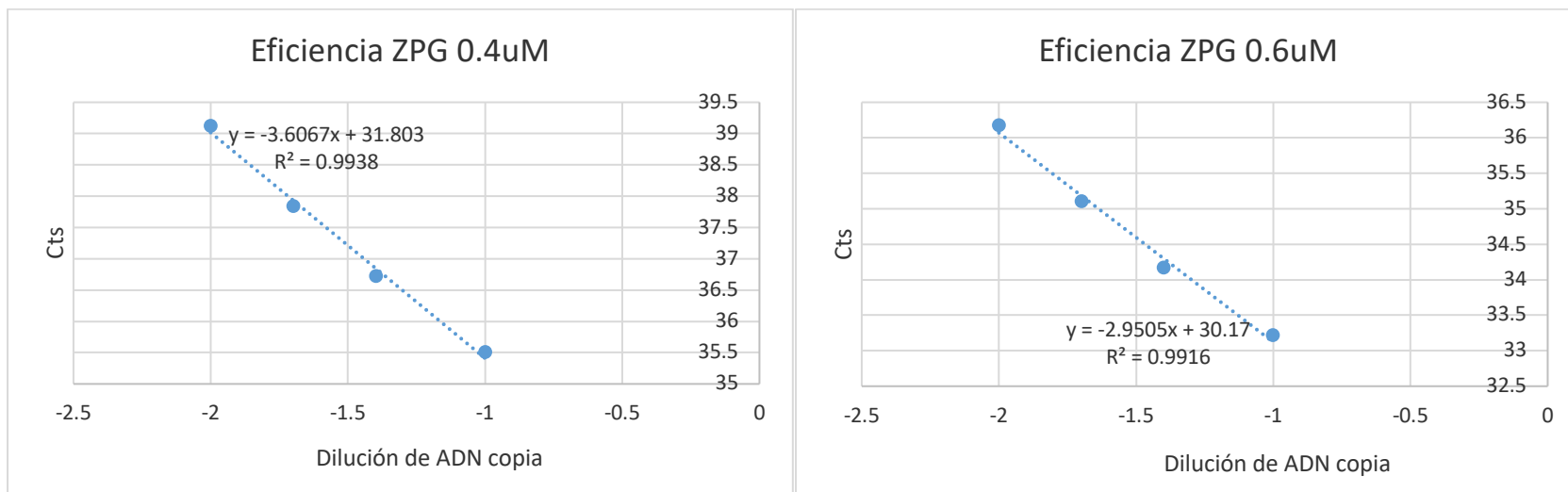
b. Actina

Figura 38. Gráfica de eficiencia de oligos *actina* a 0.4uM y 0.6uM qPCR (pupa).



c. Zpg

Figura 39. Gráfica de eficiencia de oligos *zpg* a 0.4uM y 0.6uM qPCR (pupa).

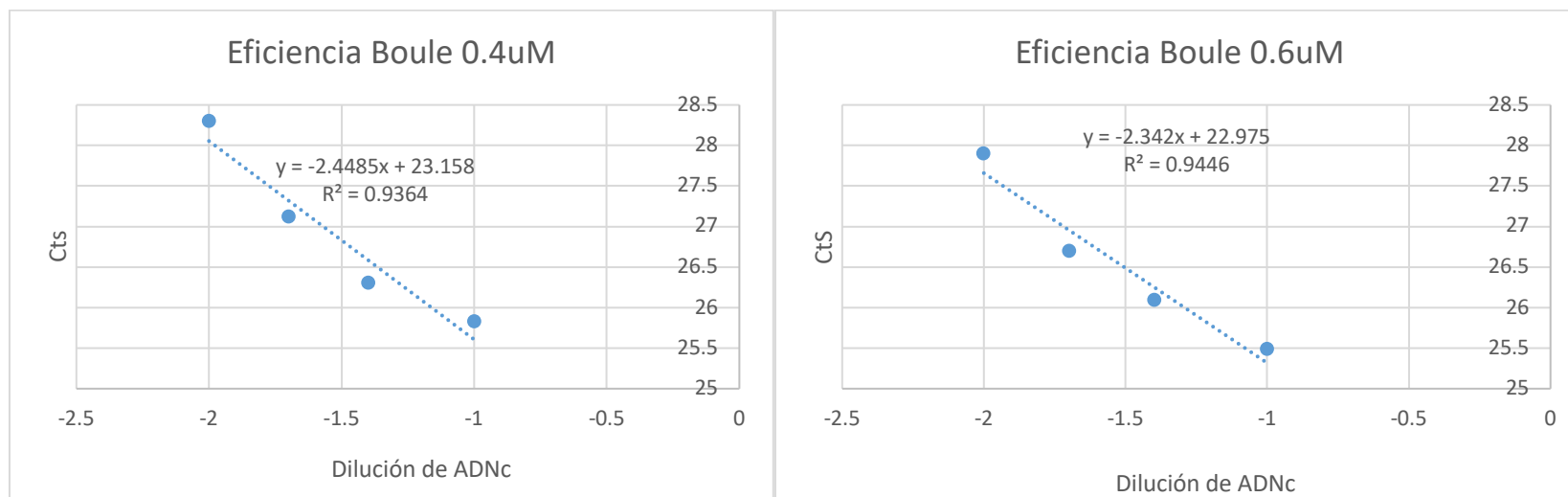


Cuadro 27: Datos crudos de optimización de PCR tiempo real para ADN complementario de adulto de *An. albimanus*. Nombre del Programa en termociclador: qPCR optimización de adulto act boule y zpg 23_10_2017 10.57.

Primer	Actina				Boule				Zpg			
Diluciones de ADN complementario	0.4uM	Mean	0.6uM	Mean	0.4uM	Mean	0.6uM	Mean	0.4uM	Mean	0.6uM	Mean
dil 1:10	34.58	34.12	29.97	29.73333	25.57	25.49333	25.3	25.36	33.16	33.1366667	31.32	31.7066667
	34.02		29.66		25.45		25.41		33.21		32.21	
	33.76		29.57		25.46		25.37		33.04		31.59	
dil 1:25	35.41	35.51	31.35	31.92	27.23	26.87333	26.64	26.89333	34.94	35.0266667	32.81	32.69
	35.47		31.9		26.59		26.56		35.14		32.66	
	35.65		32.51		26.8		27.48		35		32.6	
dil 1:50	37.5	36.87	32.65	32.7	28.08	27.96	27.6	27.76667	35.72	36.5966667	33.07	34.07
	35.88		32.67		27.95		27.79		36.33		35.86	
	37.23		32.78		27.85		27.91		37.74		33.28	
dil 1:100	37.18	37.37	33.54	33.93333	28.43	28.51333	28.44	28.41667	36.94	37.1666667	34.74	34.6833333
	37.4		34.16		28.73		28.55		38.12		34.79	
	37.53		34.1		28.38		28.26		36.44		34.52	
Eficiencia	85.39%		147.39		156.10%		167.29		102.28		124.32	

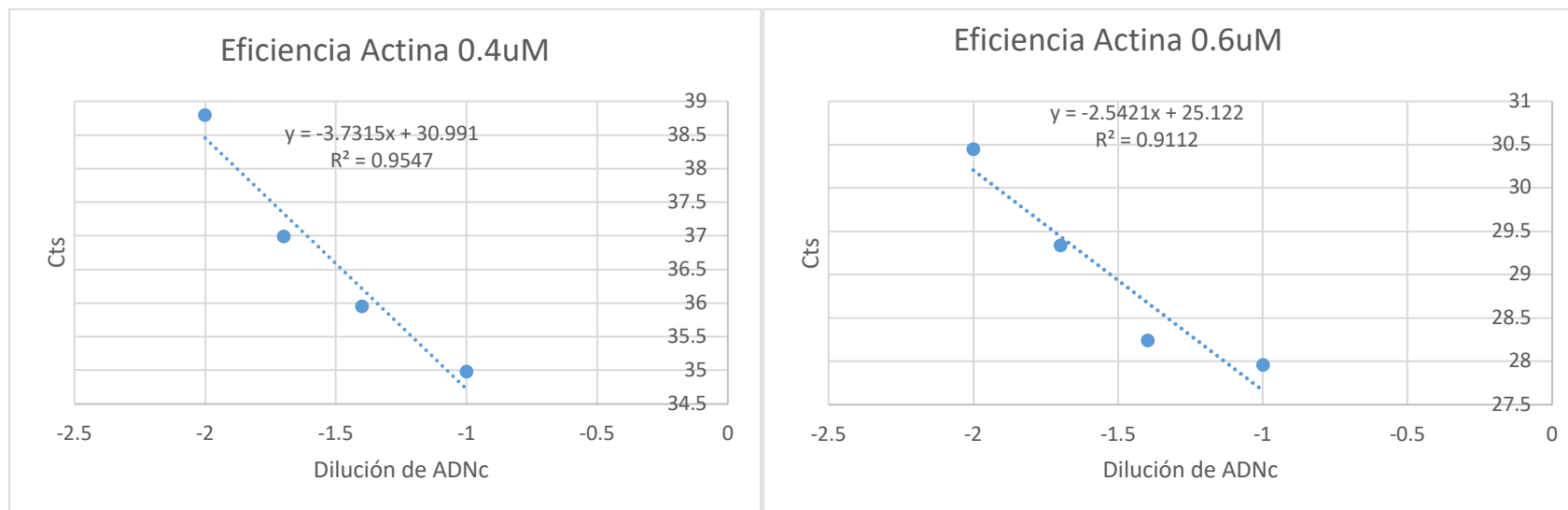
Gráficas de eficiencia de qPCR utilizando distintas concentraciones de primers usados para PCR tiempo real.
d. Boule

Figura 40. Gráfica de eficiencia de oligos *boll* a 0.4uM y 0.6uM qPCR (adulto).



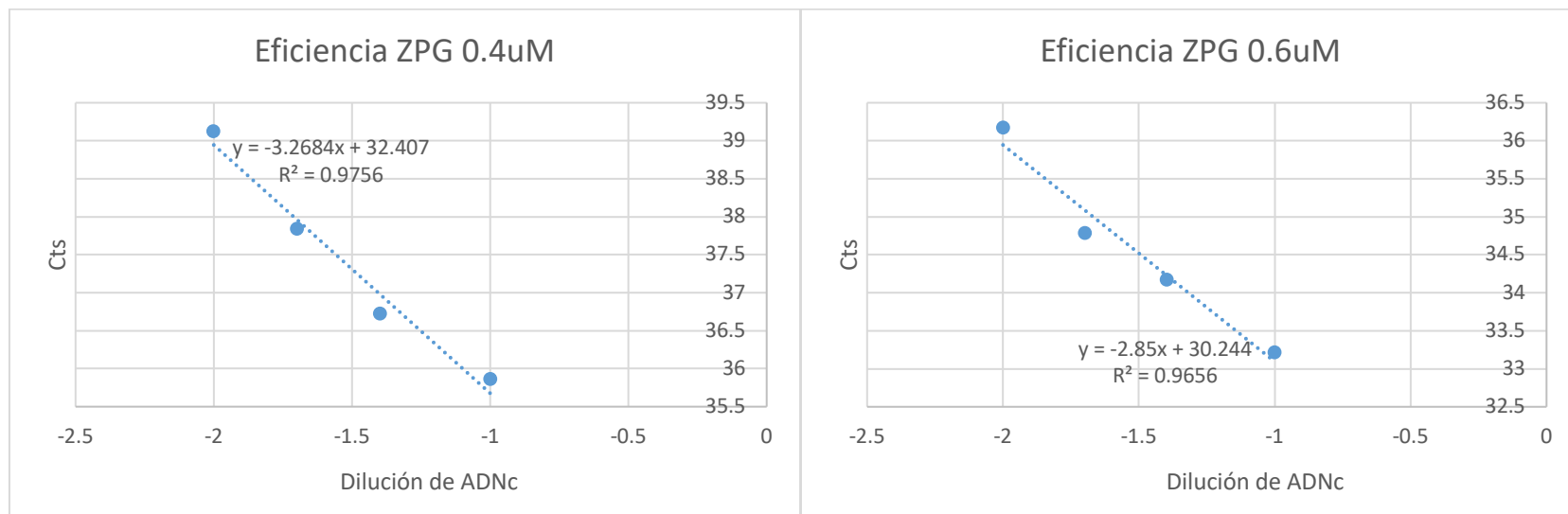
e. Actina

Figura 41. Gráfica de eficiencia de oligos *actina* a 0.4uM y 0.6uM qPCR (adulto).



f. Zpg

Figura 42. Gráfica de eficiencia de oligos *zpg* a 0.4uM y 0.6uM qPCR (adulto).



Cuadro 28. Datos crudos de primera réplica de PCR tiempo real obtenidos de larvas de *An. albimanus* (*boule*). Nombre del Programa en termociclador: Boule y Actina Extracción 1. 30_03_2017.

Nombre de muestra	Gen	Ct	Media Ct	Gen	Ct	Media Ct
L1.1	<i>actina</i>	29	27.39667	<i>boule</i>	24.07	24.87667
L1.1		26.3			24.89	
L1.1		26.89			25.67	
L1.2		29.08	29.54667		27.49	28.09
L1.2		29.63			27.11	
L1.2		29.93			29.67	
L2.1		27.4	27.42333		26.4	26.94667
L2.1		27.32			26.64	
L2.1		27.55			27.8	
L3.1		29.81	29.77		31.12	31.16333
L3.1		29.1			31.19	
L3.1		30.4			31.18	
L3.2		24.48	25.10333		24.94	25.33
L3.2		25.49			25.08	
L3.2		25.34			25.97	
L4.1		28.59	30.39333		26.83	27.59333
L4.1		32.27			27.39	
L4.1		30.32			28.56	
L4.2		27.55	28.01333		27.65	28.06667
L4.2		29.67			28.08	
L4.2	26.82	28.47				

Cuadro 29. Datos crudos de segunda réplica de PCR tiempo real obtenidos de larvas de *An. albimanus* (*boule*). Nombre del Programa en termociclador: Boule y Actina Extraccion 2 30_03_2017.

Nombre de muestra	Gen	Ct	Media Ct	Gen	Ct	Media Ct
L1.1	<i>actina</i>	26.42	27.09333	<i>boule</i>	28.06	28.17333
L1.1	<i>actina</i>	27.13		<i>boule</i>	28.02	
L1.1	<i>actina</i>	27.73		<i>boule</i>	28.44	
L1.2	<i>actina</i>	21.93	22.12	<i>boule</i>	24.64	24.56
L1.2	<i>actina</i>	22.16		<i>boule</i>	24.55	
L1.2	<i>actina</i>	22.27		<i>boule</i>	24.49	
L2.2	<i>actina</i>	21.09	21.37667	<i>boule</i>	25.33	25.09667
L2.2	<i>actina</i>	21.27		<i>boule</i>	25.02	
L2.2	<i>actina</i>	21.77		<i>boule</i>	24.94	
L3.1	<i>actina</i>	18.9	19.34	<i>boule</i>	23.84	23.97333
L3.1	<i>actina</i>	19.32		<i>boule</i>	23.84	
L3.1	<i>actina</i>	19.8		<i>boule</i>	24.24	
L3.2	<i>actina</i>	19.79	19.81	<i>boule</i>	23.35	23.45667
L3.2	<i>actina</i>	19.79		<i>boule</i>	23.43	
L3.2	<i>actina</i>	19.85		<i>boule</i>	23.59	
L4.1	<i>actina</i>	20.58	20.87667	<i>boule</i>	24.55	24.58333
L4.1	<i>actina</i>	20.97		<i>boule</i>	24.64	
L4.1	<i>actina</i>	21.08		<i>boule</i>	24.56	
L4.2	<i>actina</i>	23.51	23.27333	<i>boule</i>	26.13	26.21
L4.2	<i>actina</i>	22.97		<i>boule</i>	26.22	
L4.2	<i>actina</i>	23.34		<i>boule</i>	26.28	

Cuadro 30. Datos crudos de primera réplica de PCR tiempo real obtenidos de larvas de *An. albimanus* (*zpg*). Nombre del Programa en termociclador: Zpg extracción 1 y 2_30_03_2017.

Primera réplica biológica				Segunda réplica biológica			
Nombre de muestra	Gen	Ct	Media Ct	Nombre de muestra	Gen	Ct	Media Ct
L1.1	<i>Zpg</i>	31.39	31.75667	L1.1	<i>zpg</i>	40.07	40.07
L1.1	<i>Zpg</i>	32.54		L1.1	<i>zpg</i>	-	
L1.1	<i>Zpg</i>	31.34		L1.1	<i>zpg</i>	-	
L1.2	<i>Zpg</i>	33.09	33.47	L1.2	<i>zpg</i>	32.63	33.01
L1.2	<i>Zpg</i>	35.12		L1.2	<i>zpg</i>	32.88	
L1.2	<i>Zpg</i>	32.2		L1.2	<i>zpg</i>	33.52	
L2.1	<i>Zpg</i>	33.24	33.11	L2.2	<i>zpg</i>	32.99	32.56
L2.1	<i>Zpg</i>	32.51		L2.2	<i>zpg</i>	32.35	
L2.1	<i>Zpg</i>	33.58		L2.2	<i>zpg</i>	32.34	
L3.1	<i>Zpg</i>	-	35.1	L3.1	<i>zpg</i>	30.97	31.49333
L3.1	<i>Zpg</i>	35.1		L3.1	<i>zpg</i>	32.01	
L3.1	<i>Zpg</i>	-		L3.1	<i>zpg</i>	31.5	
L3.2	<i>Zpg</i>	29.76	30.02	L3.2	<i>zpg</i>	31.2	31.58333
L3.2	<i>Zpg</i>	29.36		L3.2	<i>zpg</i>	32.6	
L3.2	<i>Zpg</i>	30.94		L3.2	<i>zpg</i>	30.95	
L4.1	<i>Zpg</i>	35.21	34.02	L4.1	<i>zpg</i>	34.05	31.89333
L4.1	<i>Zpg</i>	33.55		L4.1	<i>zpg</i>	31.2	
L4.1	<i>Zpg</i>	33.32		L4.1	<i>zpg</i>	30.43	
L4.2	<i>Zpg</i>	33.14	33.90	L4.2	<i>zpg</i>	32.54	32.77
L4.2	<i>Zpg</i>	34.81		L4.2	<i>zpg</i>	32.81	
L4.2	<i>Zpg</i>	33.73		L4.2	<i>zpg</i>	32.96	
L1.1	<i>actina</i>	35.80	36.35	L1.1	<i>actina</i>	32.24	31.54
L1.2	<i>actina</i>	36.91		L1.1	<i>actina</i>	30.84	
AM.1	<i>actina</i>	34.77	33.32	AM.1	<i>actina</i>	34.84	33.17
AM.2	<i>actina</i>	31.88		AM.1	<i>actina</i>	31.51	

Cuadro 31. Datos crudos de réplicas biológicas de PCR tiempo real de pupas primera y segunda dúplica (Replica 1, 2 y 3) de *An. albimanus* (zpg). Programa en termociclador: qPCR pupa macho y hembra 1 19-10-2017 16.52 y qPCR pupa macho y hembra 2 19-10-2017 22.40

	Nombre de muestra	Gen	Ct	Media Ct	Gen	Ct	Media Ct
	Primer réplica biológica	PM1_R1	<i>actina</i>	35.03	35.33	<i>zpg</i>	34.13
PM1_R1		<i>actina</i>	35.47	<i>zpg</i>		33.74	
PM1_R1		<i>actina</i>	35.49	<i>zpg</i>		34.69	
PM2_R1		<i>actina</i>	32.66	34.02	<i>zpg</i>	35.37	34.90
PM2_R1		<i>actina</i>	35.51		<i>zpg</i>	34.8	
PM2_R1		<i>actina</i>	33.89		<i>zpg</i>	34.51	
PH1_R1		<i>actina</i>	34.26	34.9533333	<i>zpg</i>	34.14	33.53
PH1_R1		<i>actina</i>	35.28		<i>zpg</i>	33.46	
PH1_R1		<i>actina</i>	35.32		<i>zpg</i>	33	
PH2_R1		<i>actina</i>	34.54	35.12	<i>zpg</i>	32.27	33.45
PH2_R1		<i>actina</i>	34.98		<i>zpg</i>	33.35	
PH2_R1		<i>actina</i>	35.83		<i>zpg</i>	34.75	
	Nombre de muestra	Gen	Ct	Media Ct	Gen	Ct	Media Ct
	Segunda replica biológica	PM1_R2	<i>actina</i>	34.76	35.80	<i>zpg</i>	34.6
PM1_R2		<i>actina</i>	36.17	<i>zpg</i>		34.13	
PM1_R2		<i>actina</i>	36.49	<i>zpg</i>		35.81	
PM2_R2		<i>actina</i>	34.06	34.02	<i>zpg</i>	33.14	33.09
PM2_R2		<i>actina</i>	34.03		<i>zpg</i>	32.92	
PM2_R2		<i>actina</i>	33.97		<i>zpg</i>	33.21	
PH1_R2		<i>actina</i>	34.29	34.85	<i>zpg</i>	32	32.77
PH1_R2		<i>actina</i>	35.45		<i>zpg</i>	32.44	
PH1_R2		<i>actina</i>	34.83		<i>zpg</i>	33.88	
PH2_R2		<i>actina</i>	33.11	33.14	<i>zpg</i>	32.85	32.57
PH2_R2		<i>actina</i>	32.5		<i>zpg</i>	31.77	
PH2_R2		<i>actina</i>	33.82		<i>zpg</i>	33.09	
	Nombre de muestra	Gen	Ct	Media Ct	Gen	Ct	Media Ct
	Tercer replica biológica	PM1_R3	<i>actina</i>	36.15	35.92	<i>zpg</i>	34.67
PM1_R3		<i>actina</i>	36.07	<i>zpg</i>		34.81	
PM1_R3		<i>actina</i>	35.56	<i>zpg</i>		33.78	
PM2_R3		<i>actina</i>	34.46	34.14	<i>zpg</i>	33.87	34.15
PM2_R3		<i>actina</i>	34.05		<i>zpg</i>	34.25	
PM2_R3		<i>actina</i>	33.91		<i>zpg</i>	34.34	
PH1_R3		<i>actina</i>	35.59	35.40	<i>zpg</i>	33.5	34.90
PH1_R3		<i>actina</i>	35.82		<i>zpg</i>	36.12	
PH1_R3		<i>actina</i>	34.77		<i>zpg</i>	35.07	
PH2_R3		<i>actina</i>	36.02	34.37	<i>zpg</i>	31.87	32.82
PH2_R3		<i>actina</i>	34.19		<i>zpg</i>	31.81	
PH2_R3		<i>actina</i>	32.92		<i>zpg</i>	34.79	

Cuadro 32. Datos crudos de primera réplica de PCR tiempo real obtenidos de adultos primera dúplica (Replica 1, 2 y 3) de *An. albimanus* (*zpg*).

Nombre del Programa en termociclador: qPCR Anopheles adulto 1 27-10-2017 13.21

	Nombre de muestra	Gen	Ct	Media Ct	Gen	Ct	Media Ct
Primera replica	AM1_R1	<i>actina</i>	33.79	33.74	<i>zpg</i>	34.35	34.31
	AM1_R1	<i>actina</i>	33.88		<i>zpg</i>	34.83	
	AM1_R1	<i>actina</i>	33.57		<i>zpg</i>	33.74	
	AH1_R1	<i>actina</i>	34.37	33.30	<i>zpg</i>	28.09	28.74
	AH1_R1	<i>actina</i>	32.95		<i>zpg</i>	28.49	
	AH1_R1	<i>actina</i>	32.59		<i>zpg</i>	29.66	
Segunda replica	AM1_R2	<i>actina</i>	32.73	33.12	<i>zpg</i>	32.98	33.04
	AM1_R2	<i>actina</i>	33.04		<i>zpg</i>	33.26	
	AM1_R2	<i>actina</i>	33.6		<i>zpg</i>	32.9	
	AH1_R2	<i>actina</i>	34.56	34.19	<i>zpg</i>	28.03	27.74
	AH1_R2	<i>actina</i>	33.36		<i>zpg</i>	27.61	
	AH1_R2	<i>actina</i>	34.65		<i>zpg</i>	27.6	
Tercera replica	AM1_R3	<i>actina</i>	33.13	33.04	<i>zpg</i>	33.09	32.81
	AM1_R3	<i>actina</i>	33.11		<i>zpg</i>	33	
	AM1_R3	<i>actina</i>	32.88		<i>zpg</i>	32.36	
	AH1_R3	<i>actina</i>	34.82	34.39	<i>zpg</i>	27.66	27.90
	AH1_R3	<i>actina</i>	34.6		<i>Zpg</i>	28	
	AH1_R3	<i>actina</i>	33.76		<i>Zpg</i>	28.05	

Cuadro 33. Flujo de Troubleshooting de eventos. La siguiente tabla muestra las posibles causas de los errores cometidos al realizar el protocolo y acciones correctivas.

Síntoma	Causa posible	Acción correctiva
Baja concentración de ARN al extraer de larvas L1, esta se encontraba entre 28 y 30ng/uL.	Se utilizó una cantidad de 10mg de larvas (40 larvas) por duplicado en lugar de 30mg como dice el kit SV Total Rna Isolation System. En lugar de utilizar un peso de tejido total de 30mg. Se aumentaron a 120 pero la concentración siguió siendo baja (~20ng/uL).	Se utilizaron 150 larvas por duplicado y el ARN se precipitó con etanol.
Baja concentración de ARN al extraer de larvas L2. Se obtuvieron concentraciones de 50-80ng/ul.	Se utilizaron 40 larvas L2 que pesaban un total de 10mg.	Se utilizó el triple de tejido, es decir 120 larvas. en las siguientes dos extracciones de las siguientes réplicas biológicas.
Bajas concentraciones de ARN en pupas y adultos.	La columna de ARN se sobrecargó de material, ya que se estaba utilizando más de 30mg de tejido por columna.	Se pesaron las larvas, pupas y adultos para tener una cantidad de tejido de mosquito estandarizado a 30mg por muestra en duplicado.
Bajas concentraciones de ARN de adulto.	No se estaba macerando correctamente la muestra. El tejido de mosquito se queda en el fondo del tubo de 1.6mL.	Luego de colocar los mosquitos en cada uno de los tubos correspondientes, se agregó 100 uL de RNA lysis buffer (+BME), se maceró y, como quedo material o una especie de "pellet" en el fondo del tubo con una punta de 10uL, se movió del fondo, se agregaron los 75uL que faltaban de RNA lysis buffer (+BME) y se macero hasta que no se observaban bolas de tejido. Si observa que todavía hay acumulación de tejido en el fondo del tubo, moverlo con una punta esteril y macerarlo hasta que la solución obtenida no tenga grumos. Esta solución quedará de color negro y ya está lista para ser centrifugada.
Bajas concentraciones de ARN de adulto y/o pupa.	La columna de ARN está sobrecargada de debris celular que no se centrifugó correctamente y al agregar etanol al 95%, aún se observan restos de tejido.	Se debe de centrifugar alrededor de 15-20 minutos en lugar de 10 minutos hasta que se observe que no hay debris celular en sobrenadante. Este puede quedar también pegado en la pared, por lo tanto, se debe de evitar tocar la pared al momento de extraer el sobrenadante y transferirlo a un nuevo tubo en donde se le agregará etanol al 95%.
Síntoma	Causa posible	Acción correctiva

Contaminación de ADN genómico en el ARN.	El tratamiento de DNasa que trae el kit de extracción de ARN utilizado se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente para todas las muestras.	Se aumentó el tiempo de incubación de tratamiento con DNasa a 30 minutos. Además, se hizo un tratamiento extra con el kit RQ1 Free Dnase (Promega) luego de la completa extracción de ARN.
Posterior a hacer la reacción de transcripción reversa se hizo PCR de cDNA y el gel mostraba bandas de cDNA degradado.	Al hacer tratamiento con DNasa no se agregó al final la Dnase Stop Solution.	Cada vez que se hacía tratamiento se verificaba que se le agregara Dnase Stop solution antes de hacer la reacción de transcriptasa reversa. Al volver a hacer PCR ya no se obtuvo cDNA degradado al correr las muestras en el gel.
Al hacer la primera optimización del PCR tiempo real se obtuvieron datos de Cts que no se sabía a qué concentración de oligos fueron producidas ni cómo se hicieron dichas diluciones de oligos.	Esto se anotó en hojas, no en cuadernito de laboratorio.	Cada vez que se iba a hacer nuevamente PCR o PCR tiempo real, se empezó a documentar las concentraciones y cantidades de oligos y otros reactivos a utilizar en un documento de excel. Además, se imprimía el mapa de carga hecho en excel para tenerlo al momento de hacer el
Al hacer PCR tiempo real no se observaban curvas de amplificación con cDNA.	No se estaban utilizando las concentraciones adecuadas de oligos.	Se repitió la optimización de oligos con ADN copia de pupa y adulto a distintas concentraciones de oligos y diluciones de ADN copia. A partir de estos resultados, se determinó que para el PCR tiempo real de donde se obtendrán los resultados de Cts se utilizaría oligos a una concentración de 0.4uM.
Al hacer PCR tiempo real no se observaban curvas de amplificación con cDNA de sintetizado del segundo dúplico o pool del adulto.	Se estaba utilizando cDNA degradado que no estaba alicuotado y solo estaba almacenado en el stock. Este cDNA se descongeló dos veces. La primera para hacer la optimización de oligos con cDNA y la segunda para hacer PCR tiempo real de la primera dúplica de réplicas.	Alicuotar el cDNA al finalizar la reacción de transcriptasa reversa en alícuotas de 2uL. Almacenarlos a -70C. Realizar alícuotas de primers de <i>zpg</i> , <i>boule</i> y <i>actina</i> nuevos a partir del stock. Se revisaron las concentraciones de los stocks y se hicieron alícuotas de 600nM.