

# UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Bacterias transgénicas para el control de enfermedades  
transmitidas por vectores

Trabajo de graduación en modalidad de **Megaproyecto** presentado por

Diana Pamela Flores Ayuso

María Natalia Flores Ramos

Luis Augusto Franco López

Mayra Alejandra Valey Turcios

para optar al grado académico de Licenciados en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala,

2016



Bacterias transgénicas para el control de enfermedades transmitidas por vectores

# UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Bacterias transgénicas para el control de enfermedades  
transmitidas por vectores

Trabajo de graduación en modalidad de **Megaproyecto** presentado por

Diana Pamela Flores Ayuso

María Natalia Flores Ramos

Luis Augusto Franco López

Mayra Alejandra Valey Turcios

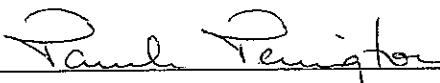
para optar al grado académico de Licenciados en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala,


2016

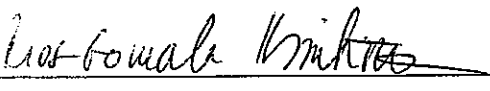
Aprobación del trabajo de graduación «Bacterias transgénicas para el control de enfermedades transmitidas por vectores» presentado por Natalia Flores, Pamela Flores, Augusto Franco y Mayra Valey.


Vo. Bo. :

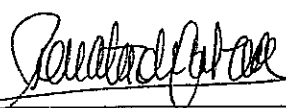
(f)   
Ph.D. Pamela Pennington  
Asesora

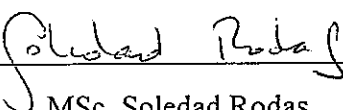
Tribunal Examinador:

(f)   
Ph.D. Pamela Pennington  
Asesora

(f)   
Ph.D. Kriztina Ríos

(f)   
Ph.D. Mabel Taracena

(f)   
MSc. Renata Medizábal

(f)   
MSc. Soledad Rodas

Fecha de aprobación: Guatemala, 19 noviembre de 2016

## PREFACIO

Queremos agradecer a todas las personas que han permitido la realización de este proyecto y que nos han brindado su apoyo a lo largo de todo este tiempo. Especialmente agradecemos a:

**A nuestra asesora de megaproyecto**, Ph.D. Pamela Pennington, por habernos permitido trabajar a su lado para realizar este proyecto y enseñarnos que la paciencia y la perseverancia son virtudes esenciales en un investigador. Gracias por su tiempo, guía, asesoramiento y apoyo en todo momento. Gracias por contribuir en nuestra formación y por brindarnos una educación de excelencia. Este proyecto no solo nos permitió adquirir más conocimiento sino también contribuyó a nuestro crecimiento personal.

**Al colaborador**, Ph.D. Job Lopez y su equipo en Baylor College of Medicine en Houston: Apama Krishnavajhala, Brittany Armstrong, Allan Kelleher, y Olowatoyin Asojo por su asesoría durante todo el proyecto, así como en la donación de material de trabajo ya que sin su su voluntad de servicio y enseñanza no hubiera podido alcanzar el éxito de este proyecto.

**Al colaborador**, Ph.D. Álvaro Molina, por la disposición de tomar parte de su tiempo para apoyar este proyecto, por los consejos acertados que guiaron a la toma de decisiones importantes en este proyecto y por la donación de muestras y reactivos desde el “National Institute of Health” de Estados Unidos, sin los cuales no hubiera podido alcanzar el éxito de este proyecto.

**A la colaboradora**, Ph.D. Ellen Dotson, por haber permitido utilizar su laboratorio en el Centers for Disease Control and Prevention (CDC) en Atlanta, Estados Unidos para realizar parte del proyecto. Gracias por su tiempo, supervisión, consejos y asesoramiento durante la semana de trabajo en el CDC y el resto del proyecto.

**Al financista de la fase de silenciamiento de genes en *Anopheles albimanus*,** International Atomic Energy Agency (IAEA), por brindar los fondos necesarios para realizar el proyecto. Sin su apoyo no se habría logrado alcanzar ningún resultado. Gracias por apoyar el avance de la ciencia para mejorar la salud del ser humano.

**A nuestra casa de estudios,** Universidad del Valle de Guatemala, por brindarnos educación de excelencia y contribuir en nuestra formación como profesionales íntegros que busquen el desarrollo de Guatemala.

## Índice

	Página
PREFACIO.....	V
ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE CUADROS.....	XV
LISTA DE ECUACIONES.....	XVII
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	XVIII
RESUMEN.....	XX
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	3
III. OBJETIVOS.....	6
IV. ANTECEDENTES – ENFERMEDADES TROPICALES.....	7
A. BORRELIOSIS.....	7
1. Descripción general.....	7
2. Causas.....	11
3. Incidencia global.....	12
4. Transmisión (vector).....	13
5. Síntomas.....	14
6. Diagnóstico.....	15
7. Tratamiento.....	17
B. MALARIA.....	17
1. Descripción general.....	17
2. Incidencia.....	17
3. Causas.....	21
4. Vector.....	23
5. Diagnóstico y tratamiento.....	29
6. Medidas y estrategias para el control del vector.....	31
V. ANTECEDENTES – EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.....	42
A. EXPRESIÓN DE PROTEÍNA.....	42
1. Proteínas recombinantes.....	43
2. Bacterias.....	44
3. Vectores de expresión.....	48
4. Sistemas de purificación.....	49
5. Sistemas de cuantificación.....	51
6. Sistemas de detección.....	51
7. Verificación de la estabilidad de la proteína recombinante.....	53
B. EXPRESIÓN DE ARN.....	54

1.	ARN.....	54
2.	Bacterias transgénicas para la expresión de ARN de interferencia.....	67
VI.	METODOLOGÍA.....	79
A.	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DETECCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	79
1.	Diseño, enfoque y tipo de investigación.....	79
2.	Variables.....	79
3.	Metodología.....	82
B.	DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA EL SILENCIAMIENTO DE LOS GENES <i>BOL</i> Y <i>ZPG</i> DE MACHOS DE <i>Anopheles albimanus</i> MEDIANTE EL USO DE ARN DE INTERFERENCIA.....	86
1.	Sitio de estudio.....	86
2.	Sujetos de estudio.....	87
3.	Enfoque, diseño y tipo de investigación.....	87
4.	Tipo y tamaño de muestra.....	87
5.	Variables.....	87
6.	Hipótesis.....	92
7.	Metodología.....	93
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	108
A.	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DETECCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	108
B.	DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA EL SILENCIAMIENTO DE LOS GENES <i>BOL</i> Y <i>ZPG</i> DE MACHOS DE <i>Anopheles albimanus</i> MEDIANTE EL USO DE ARN DE INTERFERENCIA.....	123
1.	Resultado 1: Diseño de “primers” de los genes de interés ( <i>BOL</i> y <i>ZPG</i> ) y determinación de la estabilidad de los insertos de dichos genes en cepas de <i>E. coli</i> .....	124
2.	Resultado 2: Estandarización de un método de alimentación para administrar las bacterias <i>E. coli</i> HT115 (DE3) p <i>GEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL</i> y <i>E. coli</i> HT115 (DE3) p <i>GEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG</i> a larvas de <i>An. albimanus</i> .....	147
3.	Resultado 3: Diseño y evaluación de “primers” para genes de control y de espermatogénesis en <i>An. albimanus</i> .....	184
VIII.	CONCLUSIONES.....	206
IX.	RECOMENDACIONES.....	209
X.	REFERENCIAS.....	211
XI.	ANEXOS.....	225
A.	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DETECCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	225
1.	<i>Geles adicionales</i> .....	225

2.	Procedimiento operacional estandarizado para obtención de proteína recombinante.....	228
B.	DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA EL SILENCIAMIENTO DE LOS GENES <i>BOL</i> Y <i>ZPG</i> DE MACHOS DE <i>Anopheles albimanus</i> MEDIANTE EL USO DE ARN DE INTERFERENCIA.....	245
1.	Análisis de sitios de restricción para la enzima EcoRI en secuencia de los genes <i>BOL</i> y <i>ZPG</i> .....	245
2.	Comparación de bacterias presentes en el agua de las bandejas y el agua de oviposición según fenotipo y tinción de Gram.....	247
3.	Comprobación de alimentación con bacteria <i>E. coli</i> XL1-BLUE <i>pUC 19</i> en el fondo de la placa.....	253
4.	Comprobación de ausencia de bacterias azules resistentes a ampicilina y tetraciclina en microbiota habitual de larvas de <i>An. albimanus</i> .....	254
5.	Comprobación de alimentación de larvas de <i>An. albimanus</i> con mezcla de alimento con goma guar y comida de pescado separada por colores....	255
6.	Metodología estandarizada de un método de alimentación con la bacteria transgénica <i>E. coli</i> HT115 (DE3) que permita evaluar el desarrollo larvario de <i>An. albimanus</i> .....	256
7.	Comparación de curvas de supervivencia de eclosión de pupa a adulto para los tratamientos ZPG, BOL y ZPG+BOL según el tratamiento CEREAL.....	270
8.	Pruebas estadísticas utilizadas para analizar el número de huevos por hembra y número de larvas por hembra.....	272
XII.	GLOSARIO.....	278

## Lista de figuras

	Página
1. Fotografía de las espiroquetas presentes en una muestra de sangre de un soldado de Texas observadas al microscopio.....	8
2. Diagrama de una espiroqueta.....	9
3. Distribución de agentes causales de Borreliosis y su vector a nivel mundial.....	12
4. Localización de <i>O. turicata</i> .....	13
5. Ciclo de vida de <i>O. turicata</i> vector de la bacteria <i>Borrelia turicatae</i> , agente causal de las fiebres recurrentes.....	14
6. Fotografía de espiroquetas vistas al microscopio, de una muestra de sangre de perro teñida con tinción de Wright.....	16
7. Casos de malaria por cada 1000 habitantes de los países de América.....	19
8. Distribución e incidencia de casos de malaria calculados por cada 1000 habitantes en Guatemala.....	20
9. Ciclo de vida del parásito <i>Plasmodium</i> spp.....	22
10. Distribución mundial de <i>Anopheles</i> .....	23
11. Ciclo de vida de <i>Anopheles</i> .....	25
12. Funcionamiento del mecanismo del ARN de interferencia.....	39
13. Diagrama procedimiento producción de proteína recombinante y purificación.....	44
14. Elementos de control de sistema pET.....	46
15. Mapa del plásmido pET19b.....	49
16. Espectro de absorción del ARN.....	59
17. Secuencia de interés es flanqueada por los extremos 5' de ambos "primers".....	60
18. Sensibilidad relativa de diversas técnicas de cuantificación del ARN.....	64
19. Acumulación de la fluorescencia al aumentar el número de ciclos de PCR.....	65
20. Estructura de un "hairpin".....	67
21. Plásmido con dos promotores de ARN polimerasa T7.....	69
22. A) Mecanismo de acción del operón lac, B) Mecanismo de acción del promotor lac para controlar expresión de ARN polimersa T7 y C) Mecanismo de expresión de ARNi en cepa <i>E. coli</i> HT115 (DE3).....	69

23.	Árbol filogenético de la distribución de espermias motiles y presencia de homólogos <i>BOL</i> y <i>DazI</i> en los linajes más importantes de animales y hongos.....	73
24.	Alineamiento de comparación de la secuencia de aminoácidos que corresponde al gen <i>BOL</i> en varias especies de Animalia.....	74
25.	Esquema de los dos modelos de decisiones de las células germinales en la gametogénesis.....	75
26.	(A) Estructura molecular de genes de la familia DAZ y (B) patrón de expresión de estos genes durante la gametogénesis.....	76
27.	Localización del ARNm del gen <i>ZPG</i> en el polo posterior de un embrión de <i>Aedes aegypti</i> .....	77
28.	Localización de la proteína <i>ZPG</i> (inexina 4) en la interfase entre células germinales de los testículos de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	77
29.	Diagrama general de metodología.....	94
30.	Programa de PCR tiempo real.....	107
31.	Transformación de células BL21 DE3 + GlpQ en placas con LB y ampicilina (50mg/mL).....	114
32.	Transformación de células BL21 DE3 + Bt BipA en placas con LB y ampicilina (50mg/mL).....	116
33.	Gel de poliacrilamida desnaturizante SDS-PAGE 12% de la proteína BipA inducida con IPTG en <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	118
34.	Curva de calibración y modelo de regresión lineal para la estimación de concentración de rBipA.....	120
35.	Gel de poliacrilamida desnaturizante SDS-PAGE 12% de la proteína BipAr purificada con la columna HisTrap FF marca General Electric.....	123
36.	Señalización de parejas de "primers" en la secuencia del gen <i>ZPG</i> .....	124
37.	Señalización de parejas de "primers" en la secuencia del gen <i>BOL</i> .....	125
38.	Productos de PCR de genes <i>BOL</i> y <i>ZPG</i> amplificados a partir de cDNA de hembras de <i>An. albimanus</i> utilizando los "primers" BouleExt1 y ZPGExt1, respectivamente.....	132
39.	Productos de PCR anidada de los genes A) <i>BOL</i> y B) <i>ZPG</i> de <i>An. albimanus</i> utilizando los "primers" BouleInt1 y ZPGInt1, respectivamente.....	133
40.	Producto de PCR de los genes <i>BOL</i> y <i>ZPG</i> de <i>An. albimanus</i> utilizando "primers" BouleExt1T7 y ZPGExt1T7, respectivamente.....	134
41.	Diagrama del plásmido <i>pGEMT easy</i> .....	135

42.	Crecimiento de (A) <i>E. coli</i> NOVA BLUE <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL</i> y (B) <i>E. coli</i> NOVA BLUE <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG</i> , resistentes a ampicilina [50 µg/mL] (c.f.) y tetraciclina [12.5 µg/mL] (c.f.).....	136
43.	Producto de PCR de colonias de <i>E. coli</i> NOVA BLUE <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL</i> y <i>E. coli</i> NOVA BLUE <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG</i> utilizando los “primers” BouleExt1T7 y ZPGExt1T7.....	138
44.	Extracción de plásmidos <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL</i> a partir de <i>E. coli</i> NOVA BLUE <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL</i> .....	139
45.	Crecimiento de (A) <i>E. coli</i> HT115 (DE3) <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL</i> y (B) <i>E. coli</i> HT115 (DE3) <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG</i> , resistentes a ampicilina [50 µg/mL] (c.f.) y tetraciclina [12.5 µg/mL] (c.f.).....	140
46.	Productos de PCR de colonias de <i>E. coli</i> HT115 (DE3) <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL</i> y <i>E. coli</i> HT115 (DE3) <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG</i> utilizando los “primers” BouleExt1 y ZPGExt1, respectivamente.....	141
47.	Productos de PCR de colonias de <i>E. coli</i> HT115 (DE3) <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL</i> y <i>E. coli</i> HT115 (DE3) <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG</i> utilizando los "primers" M13.....	143
48.	Productos de la digestión de plásmidos extraídos de <i>E. coli</i> HT115 (DE3) <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL</i> y <i>E. coli</i> HT115 (DE3) <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG</i> utilizando la enzima EcoRI.....	144
49.	Crecimiento de <i>E. coli</i> JM 109 <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL</i> en presencia de (A) X-gal [35.2 µg/mL] (c.f.) y (B) X-gal [35.2 µg/mL] (c.f.) e IPTG [0.1 mM] (c.f.) y crecimiento de <i>E. coli</i> JM 109 <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG</i> en presencia de (C) X-gal [35.2 µg/mL] (c.f.) y (D) X-gal [35.2 µg/mL] (c.f.) e IPTG [0.1 mM] (c.f.).....	146
50.	Disección de intestinos de larvas de <i>An. albimanus</i> alimentadas con alimento a base de cereal de bebé.....	168
51.	Disección de intestinos de larvas de <i>An. albimanus</i> alimentadas con alimento a base de cereal de bebé.....	169
52.	Disección de intestinos de larvas de <i>An. albimanus</i> alimentadas con el ABC combinada con cultivo de la cepa <i>E. coli</i> HT115 (DE3) <i>pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ANT</i> .....	170
53.	Curvas de supervivencia acumulada (evento de interés: eclosión a adulto).....	171
54.	Curvas de supervivencia acumulada (evento de interés: eclosión a adulto).....	173
55.	Gráfico de caja y bigotes de (A) número de huevos por hembra y (B) número de larvas por hebra según la comparación de los tratamientos ANT y CEREAL.....	180

56.	Gráfico de caja y bigotes de (A) número de huevos por hembra y (B) número de larvas por hembra según la comparación de múltiples tratamientos.....	183
57.	Señalización de parejas de "primers" en la secuencia del gen <i>AaRpL19</i> .....	185
58.	Señalización de parejas de "primers" en la secuencia del gen <i>AaRpS19</i> .....	186
59.	Señalización de parejas de "primers" en la secuencia del gen <i>AaCHS1</i> .....	187
60.	Señalización de parejas de "primers" en la secuencia del gen <i>AaCHS2</i> .....	188
61.	Señalización de parejas de "primers" en la secuencia de los genes <i>AaRIB43A1</i> y <i>AaRIB43A2</i> . Los exones están representados por diferentes colores.....	189
62.	Señalización de parejas de "primers" en la secuencia de los genes <i>AaRpS7</i> .....	190
63.	Productos de PCR amplificados utilizando los "primers" control <i>AaRpS19</i> , <i>AaCHS2</i> , <i>AaRIB43A1</i> , <i>AaRIB43A2</i> , <i>AaCHS1</i> , <i>AaRpL19</i> y <i>AaRpS7</i> .....	195
64.	Productos de PCR amplificados utilizando los "primers" <i>ZPGqP</i> y <i>BouleqP</i> .....	197
65.	Gráfica de fluorescencia de SYBR Green con respecto a la temperatura de fusión para cada "primer" utilizando A) ADNc de larvas y pupas y B) ADNc de adultos de <i>An. albimanus</i> .....	198
66.	Amplificación de ADNc de larva-pupa con los "primers" de control y espermatogénesis.....	200
67.	Amplificación de ADNc de adulto con los "primers" de control y espermatogénesis.....	201
68.	Porcentaje de éxito de determinación de un CT válido para las parejas de "primers" control y de espermatogénesis con ADNc de larva-pupa y adulto.....	204
69.	Gel de poliacrilamida desnaturalizante SDS-PAGE 12% con estándares de BSA.....	225
70.	Gel de poliacrilamida desnaturalizante SDS-PAGE 12% muestras de estándares de BSA.....	226
71.	Ruptura del gel de poliacrilamida desnaturalizante SDS-PAGE 12%.....	226
72.	Gel de poliacrilamida desnaturalizante SDS-PAGE 12 %, muestras de proteína recombinante.....	227
73.	Análisis de sitios de restricción dentro de la secuencia del inserto <i>BOL</i> .....	245

74.	Análisis de sitios de restricción dentro de la secuencia del inserto ZPG.....	246
75.	Comprobación de alimentación con cepa <i>E. coli</i> XL1-BLUE pUC 19 mediante la disección del intestino de <i>An. albimanus</i> .....	253
76.	Crecimiento de la microbiota habitual de larvas de <i>An. albimanus</i> en sus diferentes estadios larvarios.....	253
77.	Comprobación de alimentación con mezcla de alimento de goma guar y comida de pescado de diferentes colores mediante la disección del intestino de <i>An. albimanus</i> .....	255
78.	Curvas de supervivencia de comparación individual de los tratamientos ZPG, BOL y ZPG+BOL contra CEREAL en (A) réplica 1 y (B) réplica 3.....	270

## Lista de cuadros

		Página
1.	Ventajas y desventajas de la microscopía y el inmunoensayo para el diagnóstico de la Borreliosis.....	16
2.	Posibles estrategias para el uso del mecanismo de silenciamiento de genes mediante ARNi.....	40
3.	Rendimiento de la purificación de proteínas recombinantes.....	50
4.	Variables de interés en el presente estudio.....	79
5.	Variables de interés en el presente estudio.....	87
6.	Variables intervinientes que serán controladas por el investigador.....	89
7.	Variables intervinientes que no serán controladas por el investigador.....	92
8.	Componentes de la mezcla de reacción de la PCR (para una reacción de amplificación).....	96
9.	Componentes de la mezcla de reacción de la PCR de colonias (para una reacción de amplificación).....	98
10.	Componentes de la mezcla de reacción de la PCR (para una reacción).....	104
11.	Componentes de una reacción de PCR.....	106
12.	Problemas y soluciones enfrentados durante la fase experimental.....	109
13.	Tasa de células transformadas con pET19b- GlpQ.....	114
14.	Concentración de cada estándar de BSA con tampón de elución y la absorbancia respectiva.....	120
15.	Concentración de proteína purificada.....	121
16.	Rendimiento de la purificación de BipAr.....	122
17.	Nombre y secuencia de los “primers” diseñados para amplificar el gen <i>BOL</i> .....	127
18.	Características de los “primers” diseñados para amplificar el gen <i>BOL</i> .....	128
19.	Nombre y secuencia de los "primers" diseñados para amplificar el gen <i>ZPG</i> de <i>An. albimanus</i> .....	129
20.	Características de los "primers" diseñados para amplificar el gen <i>ZPG</i> de <i>An. albimanus</i> .....	130
21.	Optimización de condiciones experimentales para el desarrollo de larvas de <i>An. albimanus</i> .....	148

22.	Optimización de condiciones experimentales para la obtención de adultos de <i>An. albimanus</i> y la evaluación de ovipostura.....	160
23.	Comparación de oviposición, en diferentes condiciones, de hembras de <i>An. albimanus</i> expuestas al alimento a base de cereal.....	176
24.	Nombre y secuencia de los "primers" diseñados para amplificar genes de control y de espermatogénesis de <i>An. albimanus</i> .....	191
25.	Características de los "primers" diseñados para amplificar genes de control y de espermatogénesis de <i>An. albimanus</i> .....	193
26.	Valores de CT obtenidos para los "primers" de control y espermatogénesis utilizando ADNc de larva-pupa.....	202
27.	Valores de CT obtenidos para los "primers" de control y espermatogénesis utilizando ADNc de adulto.....	203
28.	Fenotipo de bacterias presentes en el agua de bandejas del insectario.....	247
29.	Tinción de Gram de bacterias presentes en el agua de bandejas del insectario.....	248
30.	Fenotipo de bacterias presentes en el agua de oviposición de huevos de <i>An. albimanus</i> .....	249
31.	Tinción de Gram de bacterias presentes en el agua de oviposición de huevos de <i>An. albimanus</i> .....	252

## Lista de ecuaciones

	Página
1. Tasa de transformación.....	45
2. Porcentaje de rendimiento transformación.....	45
3. Concentración del ARN según la absorbancia de la muestra.....	57
4. Concentración del ADN según la absorbancia de la muestra.....	58
5. Tamaño adecuado de un “primer” según la especie.....	62
6. Temperatura de anillamiento de un “primer”.....	63
7. Concentración proteína pura.....	85
8. Corrección concentración proteína.....	85
9. Ecuación de modelo lineal.....	86
10. Porcentaje de éxito de determinación de un CT válido.....	107

## LISTADO DE ABREVIATURAS

- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- Amp: ampicilina.
- *E. coli* HT115 (DE3): cepa bacteriana que cuenta con mutaciones que le permiten producir grandes cantidades de ARN de interferencia y ser resistente a tetraciclina.
- *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT* -*Amp*<sup>R</sup>-*BOL*: cepa de *E. coli* HT115 (DE3) modificada genéticamente con el plásmido *pGEMT*-*Amp*<sup>R</sup>-*BOL* que le confiere resistencia a ampicilina y capacidad de producir ARN de interferencia específico al gen *BOL* de *An. albimanus*.
- *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT*-*Amp*<sup>R</sup>-*ZPG*: cepa de *E. coli* HT115 (DE3) modificada genéticamente con el plásmido *pGEMT*-*Amp*<sup>R</sup>-*ZPG* que le confiere resistencia a ampicilina y capacidad de producir ARN de interferencia específico al gen *ZPG* de *An. albimanus*.
- *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT* -*Amp*<sup>R</sup>-*ANT*: cepa de *E. coli* HT115 (DE3) modificada genéticamente con el plásmido *pGEMT*-*Amp*<sup>R</sup>-*ANT* que le confiere resistencia a ampicilina y capacidad de producir ARN de interferencia específico al gen *ANT* de *Arabidopsis thaliana*.
- FR: Fiebre recurrente.
- IMAC: por sus siglas en inglés *Immobilized metal affinity chromatography*
- IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.
- LB: medio Lauria Bertani.
- MCS: por sus siglas en inglés *multiple cloning sites*.
- OD<sub>x</sub>: densidad óptica medida a una cierta longitud de onda “x”.
- O/N: toda la noche.

- PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida por sus siglas en inglés *Polyacrylamide gel electrophoresis*.
- pb: pares de bases.
- PMSF: por sus siglas en inglés *PhenylMethylSulfonyl Fluoride* que significa. fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
- RPM: revoluciones por minuto.
- SDS: dodecilsulfato sódico.
- SOB: medio de crecimiento por sus siglas en inglés *Super Optimal Broth*.
- UV: ultravioleta.
- (c.f.): concentraciones finales.

## RESUMEN

Este trabajo de investigación surge por la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías para el control vectorial de enfermedades tropicales. La enfermedad de Borreliosis, causada por la bacteria *Borrelia turicatae*, presenta síntomas muy parecidos a los presentados por otras enfermedades. Esto complica el diagnóstico de la enfermedad y resulta en una subestimación de la incidencia reportada. Actualmente no existe un método estándar para el diagnóstico de la Borreliosis. Por lo tanto, en este trabajo se trata de estandarizar un método de producción y purificación de una proteína recombinante BipA de *B. turicatae*. Actualmente no existe un método estándar para el diagnóstico de la Borreliosis, dado esto es necesario desarrollar pruebas diagnósticas para la enfermedad. Por lo tanto esta investigación transformó una cepa especializada de *E.coli* (BL21(DE3)) y plásmido pET-19B para producción de proteínas recombinantes GlpQ de *Borrelia* spp. y BipA de *B. turicatae*. Las bacterias transformadas fueron inducidas y luego, partir de optimización de metodología de lisado, se eligió el lisado enzimático para aumentar rendimiento de liberación de proteína recombinante. Posteriormente se purificó BipAr marcada por histidinas mediante columnas de níquel HisTrap FF (General Electric). Se analizó el rendimiento mediante espectrofotometría 280 nm y la estabilidad en presencia y ausencia de un inhibidor de proteasas (PMSF 1 mM) en la fracción eluida. Se determinó que la estabilidad de la proteína durante el procedimiento de lisis y purificación mejora con la adición de PMSF. La concentración de la proteína purificada fue de 0.1107 mg/ml. Se concluye que la proteína BipAr fue purificada exitosamente.

Por otro lado, la enfermedad de malaria es causada por el parásito del género *Plasmodium* transmitido por la picadura de mosquitos del género *Anopheles*. En Guatemala esta enfermedad ha sido controlada recientemente con la distribución masiva de pabellones impregnados con insecticidas; pero la eficacia de este método de control está disminuyendo

debido al surgimiento de resistencias. El presente trabajo de investigación describe la optimización de métodos para desarrollar una nueva tecnología de control vectorial de malaria, basada en la producción de machos estériles de *An. albimanus*. Se logró clonar el inserto del gen *BOL* y del gen *ZPG* en las cepas de *E. coli* y se determinó que los insertos no son estables (son tóxicos e inducen reordenamientos en el plásmido *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL/ZPG*). El método de alimentación para larvas de *An. albimanus* conteniendo *E. coli* expresando ARNdh de *Arabidopsis thaliana*, permite el desarrollo larvario adecuado y no interfiere con el tiempo de eclosión de pupa a adulto ni con la ovipostura. Se encontró que existe más de una pareja de oligonucleótidos de genes control y de espermatogénesis que podrían ser utilizados para monitorear la expresión de los genes *BOL* y *ZPG* a través de electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio o PCR tiempo real. El mejor oligonucleótido de genes control para el monitoreo en larvas y pupas de *An. albimanus* es AaRpS7, mientras que para el monitoreo en adultos el mejor es AaRIB43A2. Se puede decir que el método de alimentación para larvas de *An. albimanus* con bacteria transgénica sí puede utilizarse en estudios posteriores para evaluar efectividad del silenciamiento de genes a través del fenotipo y cuantificación de reducción de expresión con PCR tiempo real. Sin embargo, es necesario seleccionar regiones más cortas de los genes *BOL* y *ZPG* para clonar en las cepas de *E. coli*. Posteriormente, se podría extrapolar la tecnología para otros genes y otras especies de mosquitos que presenten dichos genes.

# I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades tropicales son características de climas calientes y húmedos, provocan la muerte de millones de personas anualmente y en muchos casos son desatendidas por los programas de salud, tanto a nivel mundial como nacional (Organización Mundial de la Salud, 2012). Este trabajo de investigación surge por la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías para el control vectorial de enfermedades tropicales. La enfermedad de Borreliosis, causada por la bacteria *Borrelia turicatae*, presenta síntomas muy parecidos a los presentados por otras enfermedades. Esto complica el diagnóstico de la enfermedad y resulta en una subestimación de la incidencia reportada. Actualmente no existe un método estándar para el diagnóstico de la Borreliosis. Por lo tanto, en este trabajo se trata de estandarizar un método de diagnóstico de la enfermedad a través de la detección de la proteína BipA característica de *B. turicatae*; utilizando las técnicas de ELISA y Western Blot. A partir de los resultados obtenidos se podría desarrollar un kit de diagnóstico que pueda aplicarse en los centros de Salud de Guatemala y otros países en donde se sospecha una alta incidencia de Borreliosis. Para esto se transformó una cepa especializada de *E.coli* (BL21(DE3)) con el plásmido pET-19B modificado para la producción de proteínas recombinantes GlpQ de *Borrelia* spp. y BipA de *B. turicatae*. Además, se estandarizó una metodología para la extracción y purificación de las proteínas recombinantes. Se analizó el rendimiento mediante espectrofotometría 280nm y se evaluó su estabilidad en presencia de PMSF.

Por otro lado, la enfermedad de malaria es una enfermedad tropical que actualmente se encuentra en proceso de eliminación en Guatemala. Esta es ocasionada por la infección de parásitos del género *Plasmodium*, transmitidos por la picadura de mosquitos del género *Anopheles*. La transmisión por *Anopheles albimanus*, especie más abundante en Guatemala, ha sido controlada recientemente con la distribución masiva de pabellones impregnados con insecticidas; pero la eficacia de este método de control está disminuyendo debido al surgimiento de resistencias. El presente trabajo de

investigación describe la optimización de métodos para desarrollar una nueva tecnología, que no dependa de insecticidas, para el control vectorial de la malaria. Se pretende desarrollar una técnica molecular para producir machos estériles de *An. albimanus*, a ser liberados en reservorios del mosquito, para reducir su población con la técnica del insecto estéril. Se propone usar bacterias *Escherichia coli* transgénicas, productoras de moléculas de ARN de doble hebra (ARNdh) de los genes “Zero Population Growth” (*ZPG*) y *BOULE* (*BOL*) del mosquito. Dichos genes están involucrados en la espermatogénesis en estados larvarios y se espera que su silenciamiento mediante ARN de interferencia produzca machos sin espermias o con espermias que no produzcan progenie. Se propone alimentar larvas de *An. albimanus* con la bacteria transgénica.

El estudio se enfocó en clonar el ADN copia de *ZPG* y *BOL* en tres cepas de *E. coli*, evaluando con biología molecular la estabilidad del inserto. Se estandarizó un método para alimentar los mosquitos con una bacteria transgénica productora de ARNdh de un gen de *Arabidopsis thaliana* como control, garantizando el desarrollo (de huevo hasta adulto) y ovipostura de mosquitos de *An. albimanus* (cepa Sanarate). Adicionalmente, se diseñaron y evaluaron oligonucleótidos para su futura utilización en estudios de la expresión de *BOL* y *ZPG* en relación a un gen constitutivo como control. Posteriormente, se podría extrapolar la tecnología para otros genes y otras especies de mosquitos que presenten dichos genes.

## II. JUSTIFICACIÓN

Esta investigación tiene como propósito utilizar bacterias transgénicas para resolver problemas de salud relacionados con las enfermedades de malaria y borreliosis que se presentan en Guatemala y en muchos países en vías de desarrollo. Dichas enfermedades suelen afectar a la población más desprotegida que vive en condiciones de pobreza y hacinamiento. En el caso de malaria se desea aportar al desarrollo de nuevas técnicas que permitan controlar al vector y apoyar los esfuerzos de eliminación de la enfermedad. Esto debido a que Guatemala aún se encuentra en la fase de pre-eliminación, lo que significa que es un área de baja transmisión, es decir, “donde las condiciones naturales o los esfuerzos de control han limitado la intensidad de la transmisión a un punto marginal en el que el riesgo es bajo y circunscrito a áreas geográficas bien definidas” (Juárez, 2012). A pesar de esto, aún sigue habiendo casos de malaria en áreas de transmisión bien definidas. Para el año 2015 se reportaron 5,368 casos en el país los cuales ocurrieron en los siguientes principales focos de transmisión (ordenados de mayor a menor número de casos): Escuintla, Alta Verapaz, Izabal, Petén y Retalhuleu (MSPAS, 2015).

En este caso se buscará controlar la población del vector mediante la generación de mosquitos macho de *Anopheles albimanus* (*An. albimanus*) estériles. Esto se logrará mediante el silenciamiento de dos genes esenciales para el mantenimiento de la fertilidad utilizando ARNi producido por la bacteria transgénica. Es importante trabajar con esta especie de mosquito ya que puede funcionar como vector del parásito *Plasmodium* sp. responsable de causar la enfermedad de malaria, además de ser el vector más común en Guatemala. Utilizando la técnica del insecto estéril (SIT, por sus siglas en inglés), se planea liberar machos estériles de *An. albimanus* en los principales focos de transmisión. Se espera que los machos estériles sean capaces de competir con los machos silvestres para copular con hembras y obtener como resultado progenie no viable, reduciendo así la población del vector. En Guatemala sí es viable utilizar la técnica SIT debido a que la enfermedad se presenta en focos centralizados y, por ende, no se requiere de una liberación masiva de machos estériles en todo el país. Además, la técnica SIT debido a que ya ha mostrado ser efectiva para generar machos estériles de otras especies, por ejemplo en *Aedes aegypti* – mosquito vector del virus del dengue (Whyard *et al.*, 2015) y en *Anopheles gambiae* –

mosquito que transmite al parásito más agresivo causante de malaria *Plasmodium falciparum* (Thailayil, Magnusson, Godfray, Crisanti, y Catteruccia, 2011).

La dificultad para controlar los mosquitos e implementar estrategias de vigilancia, ha provocado que aún existan muertes debido a esta enfermedad, junto con el incremento de otras enfermedades transmitidas por insectos (Wilke y Marelli 2015). La falta de vacunas efectivas o medicamentos para tratar la malaria causan que el control de esta enfermedad siga dependiendo del uso de insecticidas (Larramendy y Soloneski 2012) o del control de poblaciones de mosquitos. En el último siglo el control de mosquitos se basaba en el uso de insecticidas como el difenil-tricloroetano (DDT). Aunque los insecticidas se han utilizado exitosamente para controlar poblaciones de *Anopheles*, estándares actuales de protección ecológicos y ambientales prohíben su uso debido a sus efectos adversos en el humano, su impacto ambiental, la contaminación del agua y suelos, y el desarrollo de mosquitos resistentes a insecticidas (Wilke y Marelli 2015). En Guatemala ya se han reportado poblaciones de mosquito resistentes a insecticidas, especialmente a la deltametrina (Lol, 2016).

Tomando en cuenta lo anterior, se considera que la técnica de SIT podría ser una estrategia bastante efectiva por las siguientes razones: 1) no depende del uso de insecticidas para los cuales los mosquitos ya presentan resistencias o los cuales no son permitidos de usar debido a sus efectos tóxicos sobre el humano (Juárez, 2012); 2) reduciría los casos de malaria al reducir las poblaciones de mosquitos que pueden transmitir la enfermedad, con lo que también se reduciría el uso de los medicamentos antimaláricos para los cuales el parásito ya muestra resistencia en muchas regiones del mundo (Juárez, 2012) y 3) no depende del desarrollo de una vacuna para evitar la infección. Si se obtiene un resultado exitoso se lograría reducir la población fértil del vector silvestre generando una menor probabilidad de que el parásito sea transmitido al humano (Whyard *et al.*, 2015).

Por otro lado, las bacterias transgénicas también pueden producir proteínas recombinantes. En este caso se desea generar proteínas recombinantes para validar un método de detección de borreliosis. La borreliosis, provocada por la espiroqueta *Borrelia* spp., es una enfermedad que genera fiebres recurrentes y que actualmente es clasificada como una de las enfermedades desatendidas a nivel mundial. Infecciones causadas por

*Borrelia* spp. pueden ser transmitidas por piojos o garrapatas. El impacto global de esta enfermedad es prácticamente enmascarado por no causar síntomas específicos, por lo que en muchas ocasiones se puede atribuir los síntomas a otros patógenos que son más frecuentes en la población.

Los primeros casos de fiebres recurrentes causados por espiroquetas en humanos fueron descubiertos en 1905 por J. Everett Dutton y John L. Todd. Luego en el año de 1907 la oficina Internacional de Higiene Pública estableció y registró datos epidemiológicos sobre las espiroquetas causantes de fiebres recurrentes. Además se dio a conocer la gravedad de la enfermedad de fiebre recurrente causada por *Borrelia* (Cossio *et al.*, 2012). En la actualidad hay dos antígenos que se utilizan para el diagnóstico y diferenciación entre la enfermedad de Lyme y la Borreliosis. Cuando se trata de Lyme se utiliza GpQ que es un antígeno de fosfodiesterasa glicerofosfodiéster y cuando se sospecha de borreliosis BipA, proteína inmunogénica de *Borrelia* (Lopez *et al.*, 2010).

Como segunda forma de utilizar a las bacterias transgénicas, se pretende inducir la producción de la proteína BipA, proteína inmunogénica de *Borrelia*. La utilización de esta proteína recombinante en el diagnóstico diferencial de fiebres será de ayuda como medida de control, para ofrecer un diagnóstico correcto a los pacientes en áreas donde estos casos son frecuentes y poco identificados. Es importante realizar el estudio y la caracterización de posibles perros infectados con *B. turicatae* para determinar un tratamiento a seguir. Además, actualmente en Guatemala no hay estudios sobre las infecciones generadas por *B. turicatae*, por lo que es importante generar información sobre este tipo de enfermedades tropicales desatendidas.

Las ventajas de utilizar bacterias genéticamente modificadas (paratransgénesis) en lugar de utilizar los organismos modificados, es que las bacterias son más sencillas de manipular y representan un método que permite que el transgen se propague rápidamente dentro de una población (Wilke *et al.* 2015). Es por ello que la paratransgénesis puede ser una estrategia útil que no conlleva el problema de liberar organismos transgénicos o genéticamente modificados al ambiente (Whyard *et al.*, 2015). Con base en todo lo anteriormente mencionado, es evidente la importancia de realizar esta investigación con las bacterias transgénicas.

### III. OBJETIVOS

#### A. Objetivo general grupal

- Utilizar bacterias transgénicas para desarrollar productos para el control de enfermedades tropicales transmitidas por artrópodos.

#### B. Objetivos específicos

- Desarrollar una tecnología para la producción de proteínas recombinantes de *Borrelia turicatae* en *E. coli*, con el objetivo de desarrollar pruebas para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra *Borrelia turicatae* en sangre de mamíferos.
- Desarrollar un método para alimentar larvas de *Anopheles albimanus* con bacterias *Escherichia coli* que expresen ARNdh específico para los genes *ZPG* y *BOL*, con el objetivo de silenciar genes de espermatogénesis y producir machos estériles para el control vectorial.

## **IV. ANTECEDENTES – ENFERMEDADES TROPICALES**

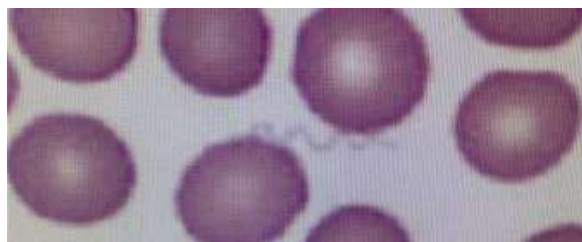
Las enfermedades tropicales son enfermedades infecciosas que ocurren principalmente en los trópicos, donde el clima es caliente y húmedo. Algunos ejemplos de este tipo de enfermedades son: malaria, borreliosis, leishmaniasis, oncocercosis, filariasis linfática, esquistosomiasis, dengue, Zika, tripanosomiasis africana, enfermedad de Chagas, entre otros (Organización Mundial de la Salud, 2016). Algunas de estas enfermedades son clasificadas como desatendidas, ya que reciben poca atención y fondos para su estudio debido a que las poblaciones afectadas tienen poca influencia política o económica (Organización Mundial de la Salud, 2012). Principalmente afectan las poblaciones en pobreza que no tienen buenos hábitos de salud y que están en constante contacto con animales domésticos, ganado y vectores infecciosos. Se estima que estas enfermedades afectan a más de 1 billón de personas en 149 países, además de causar grandes pérdidas económicas cada año. De las enfermedades de interés para este estudio únicamente la borreliosis clasifica como enfermedad desatendida (Organización Mundial de la Salud, 2016). Algunas de las nuevas estrategias para el control de estas enfermedades hacen uso de bacterias transgénicas, bacterias a las cuales se le ha modificado su material genético original mediante la introducción de fragmentos de material genético de otros organismos. Es por eso que a los organismos transgénicos también se les conoce como organismos genéticamente modificados (OGMs) (Birge, 2013).

### **A. BORRELIOSIS**

1. Descripción general. Los primeros casos de fiebres recurrentes causados por espiroquetas en humanos fueron descubiertos en 1905 por J. Everett Dutton y John L. Todd en Europa y África. Luego en el año de 1907 la oficina Internacional de Higiene Pública estableció y registró datos epidemiológicos sobre las espiroquetas causantes de fiebres recurrentes y dio a conocer la gravedad de la enfermedad (Embers , 2012). La FR es una enfermedad infecciosa transmitida de forma vectorial a humanos y otros mamíferos por

medio de garrapatas suaves. En Estados Unidos esta enfermedad fue diagnosticada en humanos por primera vez cerca de los años noventa. En Guatemala hay reporte de casos de FR causada por *Borrelia* spp. transmitada por garrapata (*Ornithodoros*) de ratón (Berger, 2016). Sin embargo a la fecha el diagnóstico es todavía muy vago, pues hay pocas pruebas disponibles (Schwan *et al.*, 2005). Las fiebres recurrentes se caracterizan por presentar episodios febriles severos con presencia de espiroquetas en sangre, alternándose con periodos libres de síntomas. Algunas especies como *B. turicatae* y *B. hermsii* han sido reconocidas como agentes etiológicos de la enfermedad. Las fiebres recurrentes pueden afectar al sistema nervioso; puede generarse encefalitis, meningitis, neuritis y trastornos neuropsiquiátricos (Marti *et al.*, 2000). Actualmente las fiebres recurrentes transmitidas por *B. turicatae* han sido mayormente descritas en perros. En un estudio de “*American Society for Veterinary Clinical Pathology*” se analizó la sangre y sueros de tres perros, dos Huskies y un Rottweiler, en los que se encontró espiroquetas. Además, se utilizó la técnica de Western Blot en donde se obtuvo múltiples bandas positivas con lisado de *B. turicatae*. Sin embargo, en el mes de enero del 2016 el “96th Medical Group laboratory” identificó la primera muestra de humano infectada con *B. turicatae*. Se trata de un soldado que presentaba episodios febriles con sospecha de padecer malaria, por lo que se le realizó diversas pruebas y en uno de los análisis de sangre realizados en el microscopio, se observaron espiroquetas, Figura 1, lo cual no es normal. Por esto, se decidió enviar la muestra a los CDC (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de EEUU) para analizar el ADN de la bacteria, y como resultado se obtuvo que la especie de la bacteria presente era *B. turicatae*. El soldado explicó que una garrapata lo picó durante un ejercicio de cambio en el oeste de Texas (Eglin Air Force Base, 2016).

**Figura 1:** Fotografía de las espiroquetas presentes en una muestra de sangre de un soldado de Texas observadas al microscopio

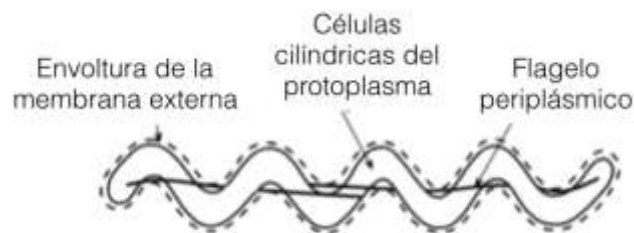


(Eglin Air Force Base, 2016)

a. Espiroquetas. El orden de las espiroquetas contiene tres familias que abarcan nueve géneros, de los cuales tres causan enfermedades en humanos: *Borrelia*, *Leptospira* y *Treponema*. Estas bacterias son móviles, ya que cuentan con endoflagelos, dichos endoflagelos se encuentran en la parte exterior del protoplasma pero dentro de una vaina externa, lo cual permite que puedan moverse en forma giratoria. La mayoría tiene forma helicoidal como se muestra en la Figura 2, sin embargo hay especies que tiene forma sinusoidal o serpenteante plana (Charon y Goldstein, 2002). Una de las características más importantes de este orden es que las espiroquetas tienen mecanismos de adaptación que les permiten combatir al sistema inmune de su huésped y así poder persistir por largos periodos de tiempo. El curso de las enfermedades que causan y los síntomas de estos patógenos sistémicos reflejan su capacidad de propagarse a través del huésped sin generar una respuesta inmune aguda. Algunos científicos consideran que las espiroquetas son los patógenos maestros en la evasión del sistema inmune y la persistencia en el huésped (Embers, 2012).

Se sabe que estas bacterias regularmente se alojan en el tracto digestivo de los animales y que algunas pueden formar parte de la microbiota oral humana. Los papeles ecológicos de las espiroquetas son variados; El grupo incluye tanto especies aerobias como anaerobias, y formas de vida libre y parasitarias. En los rumiantes, se sabe que las espiroquetas son beneficiosas ya que sus actividades químicas ayudan a la vaca y a otros rumiantes a digerir los alimentos de mejor manera; Otros organismos en donde se sabe son beneficiosas son los mejillones y las ostras, donde las bacterias ayudan en la alimentación al actuar como cilios para llevar los alimentos al molusco (Charon y Goldstein, 2002).

**Figura 2:** Diagrama de una espiroqueta. Se observa la estructura celular integrada por membrana externa, el cilindro de las células protoplásmicas y el flagelo periplásmico



(Adaptado de Charon y Goldstein, 2002)

b. *Borrelia*. Las bacterias de género *Borrelia* son bacterias Gram negativo y anaerobios, -por lo que pueden crecer sin oxígeno- o soportar concentraciones bajas del mismo. Esta familia se caracteriza porque su forma es similar a espirales grandes separados e irregulares las cuales pueden ser visualizadas con un microscopio óptico, mediante tinción de Giemsa o Wright. Además, tienen mecanismos de variación génica con los cuales aumenta su patogenicidad; son bacterias no capsulares y tampoco producen esporas. Se considera que por lo menos diez especies de este género pueden ser patógenos (Romero, 2007).

1) *Borrelia turicatae*. Es una de las especies patógenas de la familia *Borrelia*. El genoma de esta especie tiene un tamaño de 917.33 Kb, conformado de ADN lineal y organizado en un solo cromosoma bacteriano (Porcella *et al.*, 2006). Se caracteriza por tener diversos mecanismos de variación génica, causando así diversos episodios febriles en su huésped (Pennington *et al.*, 1999). Esta especie utiliza como vector a una garrapata, *Ornithodoros turicata*. Las garrapatas son consideradas actualmente como el segundo vector de enfermedades infecciosas en humanos, después de los mosquitos. La especie *O. turicata* se encuentra ampliamente distribuida en el sureste y norte de Estados Unidos, Canadá, y el norte de México, sin embargo no se cuenta con información sobre la distribución de *O. turicata* en Guatemala. Se sabe que esta especie es capaz de infectar a roedores y todo tipo de mamíferos, especialmente perros y humanos (Parola y Raoult, 2001). En perros según estudios hechos por Boyle y colaboradores en 2014 se ha observado que la ingesta de sangre de la garrapata en el perro puede durar entre 5-60 minutos.

Esta especie es causante de la fiebre recurrente, cuya patogenicidad y virulencia son poco conocidos (Pennington *et al.*, 1997) (Cadavid *et al.*, 1997). Sin embargo, un mecanismo muy estudiado a la fecha describe que las especies de *Borrelia* tienen la capacidad de escapar de la respuesta inmune de su hospedero, mediante la variación antigénica de la superficie expuesta de la bacteria, incluyendo lipoproteínas de la membrana externa (Marti *et al.*, 2000). Es importante mencionar que algunos estudios sugieren que la evidencia epidemiológica de *B. turicatae* como agente causal de infecciones humanas es sólida, dada la distribución geográfica, considerables habilidades

de adaptabilidad y plasticidad genética del vector, pues éste puede colonizar lugares peridomésticos como cuevas, nidos y madrigueras (Donaldson *et al.*, 2016).

La fiebre recurrente es de suma importancia para países en vías de desarrollo ya que no hay un método de diagnóstico adecuado; además existe casos de FR de etiología desconocida a los cuales se les diagnostica de una manera correcta. Esto da lugar a propiciar la resistencia a antibióticos, un desbalance en la economía en el sujeto. Sin un diagnóstico se puede dar un mal tratamiento al paciente que padece de ella. El impacto global de esta enfermedad es prácticamente enmascarado por no causar síntomas específicos, por lo que en muchas ocasiones se puede atribuir los síntomas a otros patógenos que son más frecuentes en la población (Balicer *et al.*, 2010).

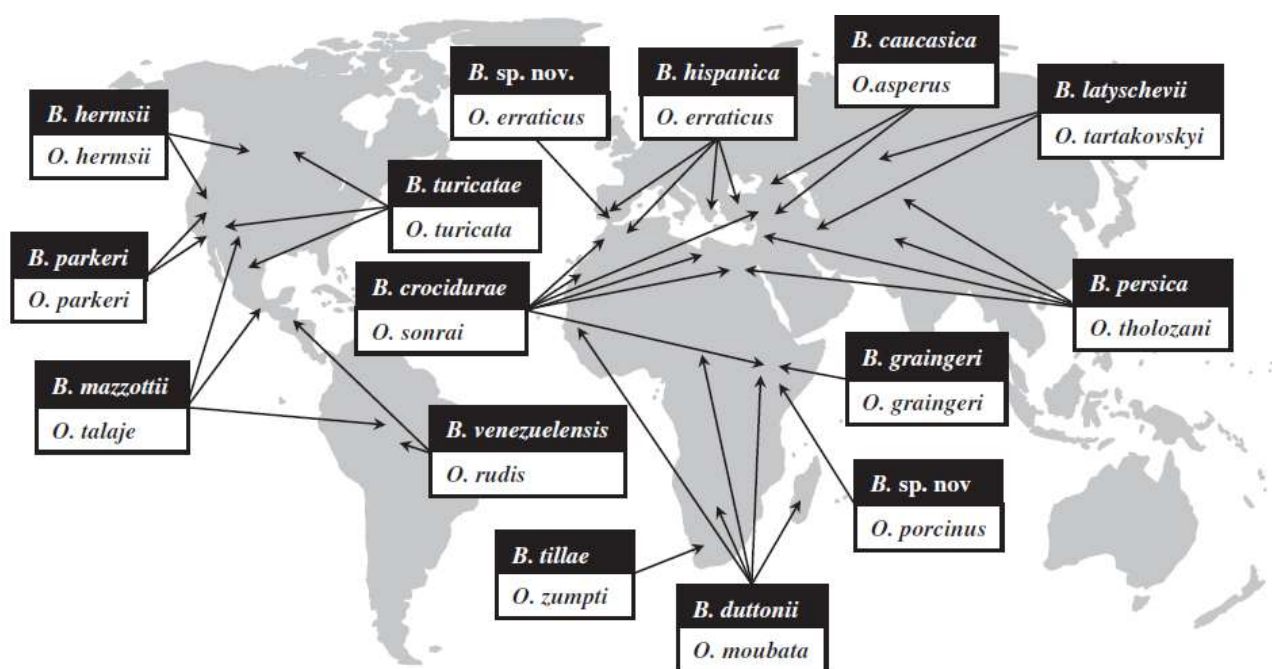
2. Causas. La fiebre recurrente es una enfermedad causada por una bacteria del género *Borrelia*. La forma de transmisión de esta bacteria se da por picaduras de garrapatas de cuerpo blando. La FR se presenta como cuadros febriles de temperaturas altas de 39-40 grados centígrados los cuales se presentan en la vida del hospedero durante un lapso de dos meses. FR se presenta debido a la capacidad de la bacteria para mutar y generar variación antigénica que propicia los episodios febriles (Larsson *et al.*, 2006). La fiebre recurrente provocada por espiroquetas tiene un proceso de rearreglo de ADN que permite que se dé un cambio periódicamente de moléculas en su superficie. Este proceso se conoce como variación antigénica, que permite que espiroqueta evada el sistema inmune y cause Cuadros febriles y los demás síntomas (Balicer, *et al.*, 2010) (Pennington *et al.*, 1997) (Cadavid, *et al.*, 1997).

Se sabe que hay condiciones que pueden propiciar esta enfermedad dentro de las cuales se puede mencionar el hacinamiento, la precariedad, falta de higiene y malas condiciones de salud. Además por lo anteriormente mencionado esta enfermedad es característica de poblaciones que se encuentran en vías de desarrollo, donde las condiciones de salud aun son bajas o deficientes. Algunos estudios también han revelado que el movimiento excesivo de masas como los desplazamientos y congregaciones pueden ocasionar epidemias de este tipo de fiebre. También es importante mencionar que hay condiciones geográficas que pueden influir en la presencia o ausencia de la fiebre, pues el

vector de la enfermedad puede estar presente en diversos ambientes y de esta forma puede llegar a ser un reservorio de la enfermedad (Embers, 2012).

3. Incidencia global. Históricamente se han presentado casos masivos de FR en Europa y África, especialmente cuando las temperaturas son altas y en los sitios donde prevalecen las infecciones con piojos. Comúnmente estas enfermedades se encuentran en Etiopia y en países vecinos, pero hay evidencia infecciones en personas de escasos recursos de ciudades europeas. La fiebre recurrente es una enfermedad transmitida mundialmente por garrapatas de cuerpo suave del género *Ornithodoros*. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en África en donde se reportaron Cuadros febriles en nativos que estuvieron expuestos a las picaduras de estos insectos. Esta enfermedad también se reportó en Norte y Suramérica América. En cada una de ellas se encuentra un vector del género *Ornithodoros* y una especie de *Borrelia*. En la Figura 3 se puede observar la distribución de vectores y agentes causales alrededor del mundo (Rebaudet y Parola, 2006).

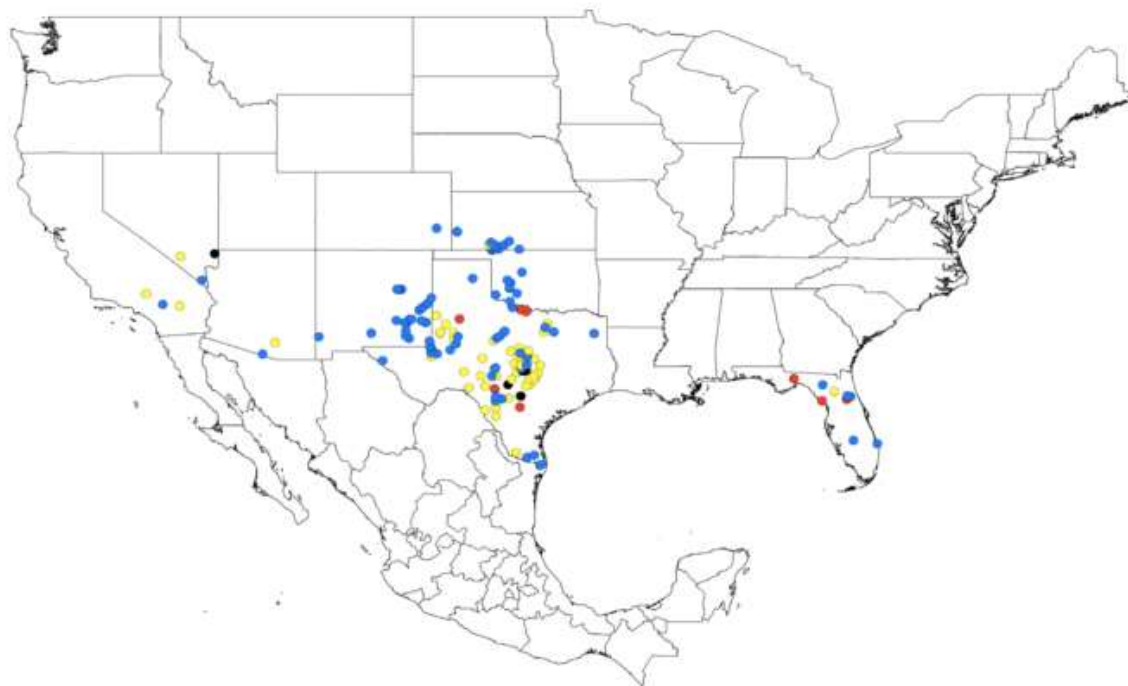
**Figura 3:** Distribución de agentes causales de Borreliosis y su vector a nivel mundial



(Rebaudet y Parola, 2006)

4. Transmisión (vector). El contagio de las fiebres recurrentes es frecuente entre personas sin hogar y refugiados, por lo que se puede presentar epidemias en estos grupos de personas. En México y Estados Unidos los casos reportados corresponden a personas que estuvieron en contacto con garrapatas, que probablemente adquirieron la bacteria al alimentarse de sangre de otros roedores o mamíferos, y que entran en contacto con humanos cuando éstos se hospedan en cabañas, albergues o en ocasiones en visitas de campo a cuevas infestadas de roedores (Cruz y Mayoral, 2012). Un estudio retrospectivo muestra las posibles condiciones climáticas que favorecen al vector, *O. turicata*, sin embargo no está mapeada la distribución de *O. turicata* en América, salvo en EEUU (Figura 4). Dentro de este estudio se menciona que en lugares con temperaturas entre los 20-30 °C y con precipitación de 90-200mm de precipitación es posible encontrar al vector (Donaldson *et al.*, 2016).

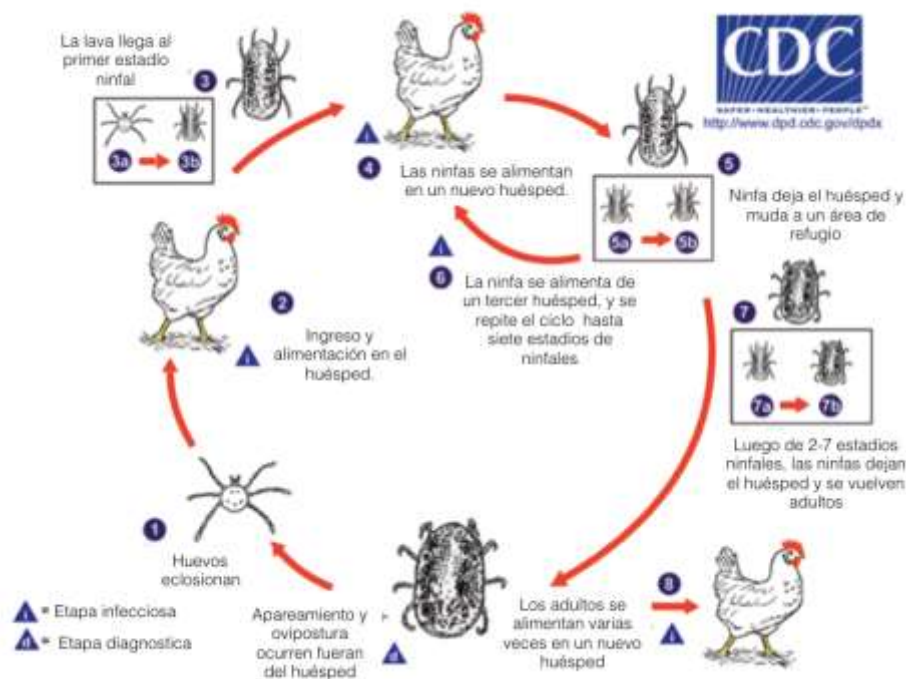
**Figura 4:** Localización de *O. turicata*. Los círculos negros indican especímenes para los que no se cuenta con el año del reporte: los azules, amarillo y rojo indican que se reportó localización entre 1800-1950, 1950-2000 y del 2000 hasta la fecha respectivamente



(Donaldson *et al.*, 2016)

También es importante considerar el ciclo de vida del vector, Figura 5, las garrapatas blandas, pues puede tener hasta seis estadios larvales y sobrevivir largos periodos entre cada ingesta de sangre. Los adultos pueden picar y alimentarse varias veces con intervalos variables. Su ciclo de vida consta de huevo, larva, uno a varios estadios ninfales y adulto; son los únicos ácaros que llegan a tener más de tres estadios ninfales, que en algunas especies pueden llegar hasta ocho. Además, después de haber alcanzado el estado adulto pueden seguir mudando. La hembra pone huevos durante meses, con interrupciones de duración variable, y en total llega a depositar entre 300 y 500 huevos sueltos o en agrupaciones de dos a tres unidades (Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2009).

**Figura 5:** Ciclo de vida de *O. turicata* vector de la bacteria *Borrelia turicatae*, agente causal de las fiebres recurrentes



(Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2009)

5. Síntomas. Los síntomas de las FR son sumamente comunes, pues en mamíferos pueden producir dolores de cabeza, anemia, neutrofilia, náuseas, vómitos, diarrea y escalofríos; así como un aumento de la temperatura corporal que puede llegar hasta los 39

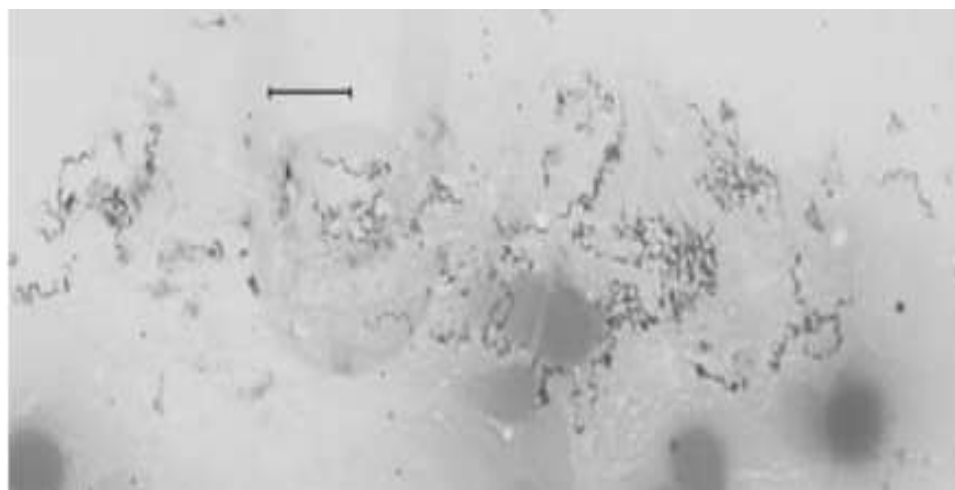
grados Celsius (Embers, 2012) . Además una vez en la sangre, las especies de *Borrelia* causantes de FR alcanzan densidades tan altas como  $10^7$  células por mililitro (Marcisisin *et al.*, 2012). Además la enfermedad puede generar un patrón de presencia durante tres días, seguido de una ventana de 7 días sin fiebre y posteriormente tres días con fiebre (Escudero-Nieto y Guerrero-Espejo, 2005). Esta alternancia de cuadros febriles es un resultado directo de la variación antigénica. Mediante esta variación, variantes antigénicas de la proteína superficial principal (Vmp, por sus siglas en inglés) cambian periódicamente, logrando así evadir el sistema inmune y volviendo a producir espiroquetemia (Embers, 2012).

6. Diagnóstico. El diagnóstico de casos de borreliosis se basa principalmente en la detección de espiroquetas en sangre periférica por microscopía, las cuales se pueden observar únicamente cuando los hospederos, personas o animales, presentan un episodio febril. Sin embargo, cuando este no es el caso, es necesario recurrir a otros métodos como los inmunológicos. Este patógeno tiende a evadir la respuesta inmune adaptativa del hospedero por medio de cambios en la expresión de las proteínas de superficie de su membrana, producto de la variación antigénica (Embers, 2012). Esta variación antigénica provoca la presencia de serotipos, es por esto que se necesita un inmunoensayo como Western blot. El inmunoensayo Western-Blot es importante para determinar anticuerpos específicos de *Borrelia turicatae* y así determinar anticuerpos como IgG e IgM. Es importante saber la diferencia entre estos anticuerpos ya que el IgG permite determinar si el hospedero estuvo expuesto a bacteria, mientras que IgM es para determinar presencia actual de infección. Para esto, las proteínas se separan por medio de una electroforesis; los resultados se transfieren a una membrana, y esta membrana es incubada con anticuerpos específicos a la proteína de interés. Se obtiene la detección de anticuerpos ligados a la proteína de interés; lo cual indica la presencia de proteína. El grosor de la banda, indica la cantidad de proteína presente. En el Cuadro 1 se puede observar métodos de diagnósticos, ventajas y desventajas del mismo (Mahmood y Yang, 2012).

En la actualidad hay dos antígenos que se utilizan para el diagnóstico y para poder discernir entre la enfermedad de Lyme y la Borreliosis (Fiebre recurrente causada por *B. turicatae*). Cuando se trata de la enfermedad de Lyme se utiliza GlpQ que es un antígeno

de fosfodiesterasa glicerofosfodiéster y cuando se sospecha de borreliosis se utiliza BipA, proteína inmunogénica de *Borrelia* (Lopez *et al.*, 2010). Para realizar los análisis se ha implementado el uso inmunoensayos como la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS PAGE por sus siglas en inglés) y el Western Blot, en conjunto con técnicas moleculares (Boyle *et al.*, 2014). Dado que no hay suficientes métodos de detección, surge la necesidad de optimizar los métodos ya existentes para que éstos puedan ser utilizados por instituciones médicas y centros de investigación.

**Figura 6:** Fotografía de espiroquetas vistas al microscopio, de una muestra de sangre de perro teñida con tinción de Wright. La barra representa 10 cm



(Whitney *et al.*, 2007)

a. Ventajas y desventajas de los métodos de diagnóstico

**Cuadro 1:** Ventajas y desventajas de la microscopía y el inmunoensayo para el diagnóstico de la Borreliosis

Método de detección	Ventajas	Desventajas
Microscopía	<p>Altas concentraciones de espiroquetas en sangre.</p> <p>Microscopía de luz accesible.</p> <p>Se puede utilizar tinción Wright o Giemsa.</p>	<p>Microscopía de campo oscuro poco accesible.</p> <p>Solo se puede detectar cuando los Cuadros febriles están presentes.</p>

Continuación Cuadro 1.

Método de detección	Ventajas	Desventajas
Inmunoensayos	Confiables. Específicos. Valor para analizar estadísticamente. Sensibles.	Reactivos caros. Laboriosos. Persona capacitada para saber analizarlos. Reacciones cruzadas.

(Lopez *et al.*, 2013)

7. Tratamiento. La espiroqueta causante de fiebre recurrente comúnmente es sensible a la penicilina u otro antibiótico como tetraciclinas, macrólidos y floroquinolonas. Algunos expertos en esta enfermedad recomiendan 500mg de tetraciclina cada 6 horas por 10 días para adultos. Cuando la tetraciclina está contraindicada, también se utiliza eritromicina de 500 mg cada seis horas por 10 días. Para pacientes con alteraciones del sistema nervioso se recomienda ceftriazona (Furst *et al.*, 2006).

## B. MALARIA

1. Descripción general. La malaria, también conocida como paludismo, es una enfermedad infecciosa causada por protozoos del género *Plasmodium*. Los protozoos son transmitidos a humanos por la picadura de mosquitos del género *Anopheles*. Actualmente la malaria es considerada la infección parasítica más importante a nivel mundial debido a que se registran millones de casos anuales (Despommier, Gwadz, Hotez y Knirsch, 2005). La malaria es endémica de las regiones tropicales y subtropicales. Sin embargo, los viajes internacionales y la capacidad del mosquito para sobrevivir en diferentes ambientes representan una amenaza de introducir la enfermedad en poblaciones que no son endémicas (Despommier *et al.*, 2005).

2. Incidencia. La incidencia de malaria mundial ha disminuido enormemente desde el año 2000 hasta el año 2015. Se estima que en el año 2000 había un total de 262 millones

de casos de malaria anualmente, cifra que disminuyó a los 214 millones de casos para el año 2015. Esto representa un porcentaje de disminución de casos del 37%. Además, el número de muertes provocadas por la enfermedad disminuyó de 839,000 en el año 2000 a 438,000 en el año 2015. Esto representa un porcentaje del 60% (Organización Mundial de la Salud, 2015). Asimismo, se estima que el número de muertes en niños menores de cinco años disminuyó de 723,000 en el año 2000 a 306,000 en el año 2015 (disminución del 42%). Esto es importante ya que la malaria ha dejado de ser la causa principal de muerte en niños menores de cinco años en la región sub-Sahariana de África (Organización Mundial de la Salud, 2015). La mayoría de los casos de malaria se presentan en África (88%), seguida por el Sudeste Asiático (10%) y el este del Mediterráneo (2%). Las muertes se presentan de manera similar empezando por África (90%) y siguiendo con el Sudeste Asiático (7%) y el este del Mediterráneo (2%) (Organización Mundial de la Salud, 2015).

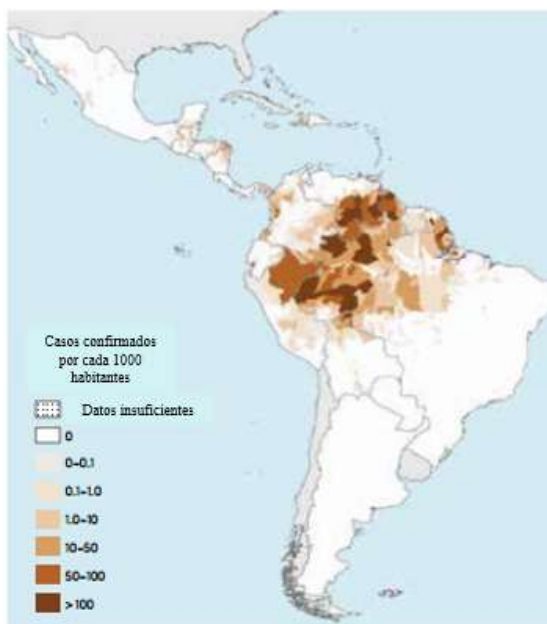
La incidencia de casos de malaria ha disminuido en la mayoría de los 106 países en los que la enfermedad es transmitida. Sin embargo, existen países en los que dicha incidencia ha aumentado. Por ejemplo, este es el caso de la República Bolivariana de Venezuela. Guatemala es uno de los países en los que la incidencia ha disminuido en un 75% desde el año 2000 al año 2015 (Organización Mundial de la Salud, 2015). *P. vivax* se considera el segundo parásito causante de malaria más importante ya que fue responsable de alrededor del 8% de las muertes por malaria a nivel mundial, porcentaje que aumenta al 47% en las regiones fuera de África (Organización Mundial de la Salud, 2014). Se estima que en el año 2015 *P. vivax* fue responsable de 13.8 millones de casos de malaria a nivel mundial. Es el parásito más común en todas las áreas fuera de África y es endémico de ciertas regiones de Oceanía, Asia, Suramérica, Centroamérica y el Medio Oriente. Actualmente las regiones con la mayor cantidad de casos de malaria provocados por *P. vivax* son el sudeste asiático (74%), el este del mediterráneo (11%) y África (10%). Los países con mayor número de casos de malaria (más del 80%) provocados por esta especie son Etiopía, India y Pakistán (Organización Mundial de la Salud, 2015).

En las áreas donde *P. vivax* es prevalente, la transmisión de malaria es baja por lo que es difícil que las personas generen inmunidad ante el parásito. Esto por eso que

personas de toda edad tienen riesgo de infectarse y desarrollar la enfermedad (Organización Mundial de la Salud, 2014).

a. América. En América solamente se han reportado casos de malaria en el Caribe, Centro América y Sur América. En el área de Norte América se han reportado casos únicamente en México; todos los casos, al igual que en Belice y Panamá, son provocados por *P. vivax*. Por otro lado, en República Dominicana y Haití todos los casos son provocados por *P. falciparum*. En el resto de países, incluyendo Guatemala, los casos de malaria son provocados por ambos *P. vivax* y *P. falciparum* en distintas proporciones (Organización Mundial de la Salud, 2015). En la Figura 7 se muestra un mapa de la incidencia de casos de malaria por cada 1000 habitantes de los diferentes países de América.

**Figura 7:** Casos de malaria por cada 1000 habitantes de los países de América



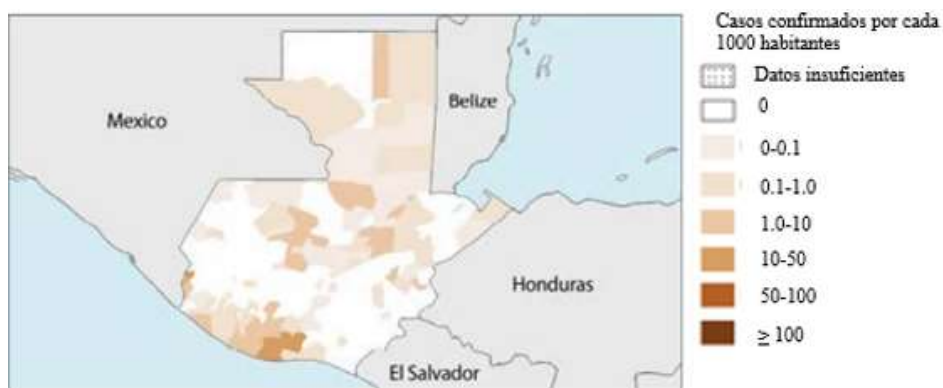
(Organización Mundial de la Salud, 2015)

b. Guatemala. A nivel centroamericano, Guatemala es uno de los países con mayor riesgo ya que aporta el 40% del total de casos de malaria (García, 2007). Se estima que el 45% de la población guatemalteca (aproximadamente siete millones de habitantes) se encuentra en riesgo de ser infectada, debido a la presencia de las poblaciones de los

vectores *An. albimanus*, *An. darlingi*, *An. pseudopunctipennis*, y *An. vestitipennis* en el país; siendo *An. albimanus* el más abundante. Para el año 2015 se reportó un total de 5, 358 casos en Guatemala. Los principales focos de transmisión en Guatemala se encuentran en los departamentos de: Escuintla (3,714 casos), Alta Verapaz (678), Izabal (383), Petén (131) y Retalhuleu (110) (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2015). En Escuintla la mayoría de los casos se concentran en el municipio de La Gomera. El hecho que la enfermedad se localice en focos específicos es importante porque facilitaría la aplicación de un método de control focalizado.

Generalmente esta enfermedad se presenta en grupos que sufren de extrema pobreza y es más común en las áreas rurales. El grupo étnico más afectado por la malaria es el grupo indígena en donde los más afectados suelen ser los jóvenes menores de 15 años (Organización Panamericana de la Salud, 2011). Se considera que de los aproximadamente 15 millones de habitantes en Guatemala: el 15% (aprox. 2 millones) se encuentra en áreas de alta transmisión de malaria (más de un caso por cada 1000 habitantes); el 31% (aprox. 5 millones) se encuentra en áreas de baja transmisión de malaria (de 0 a 1 casos por cada 1000 habitantes); y el 54% (aprox. 8 millones) se encuentra en áreas libres de la transmisión de malaria (0 casos) (Organización Mundial de la Salud, 2014). A continuación (Figura 8) se muestra un mapa de Guatemala en el que se observa la distribución y el número de casos de malaria por cada 1000 habitantes.

**Figura 8:** Distribución e incidencia de casos de malaria calculados por cada 1000 habitantes en Guatemala



(Organización Mundial de la Salud, 2015)

Actualmente Guatemala se encuentra en la fase de pre-eliminación de la malaria. Según la OMS un país en esta fase es considerado un Área de Baja Trasmisión “donde las condiciones naturales o los esfuerzos de control han limitado la intensidad de la transmisión a un punto marginal en el que el riesgo es bajo y circunscrito a áreas geográficas bien definidas” (Juárez, 2012). A pesar de que Guatemala sea considerada por la OMS como un Área de Baja Trasmisión, aún sigue habiendo casos de malaria que no permiten alcanzar la fase de eliminación de esta enfermedad. No obstante, no se han reportado muertes debido a malaria desde el 2009 (PNUD, 2013). La mayoría del financiamiento para el programa de control de la malaria en Guatemala proviene del gobierno local seguido por el Fondo mundial para la lucha contra el VIH/sida, la tuberculosis y la malaria. Otras organizaciones que aportan son el Banco Mundial, UNICEF, la Organización Mundial de la Salud, USAID, entre otras (Organización Mundial de la Salud, 2014).

3. Causas. La malaria es una enfermedad parasitaria ocasionada por parásitos del género *Plasmodium*. Los humanos son infectados principalmente por cuatro especies: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae* y en raras ocasiones *P. knowlesi*, que usualmente infecta a los simios. Para estar infectada una persona tuvo que haber sido picada por un mosquito del género *Anopheles* infectado con el parásito. También existe la transmisión congénita, en la que la madre transmite la enfermedad al feto, así como casos en que las personas se infectan por recibir transfusiones de sangre contaminada por el parásito (Organización Mundial de la Salud, 2015).

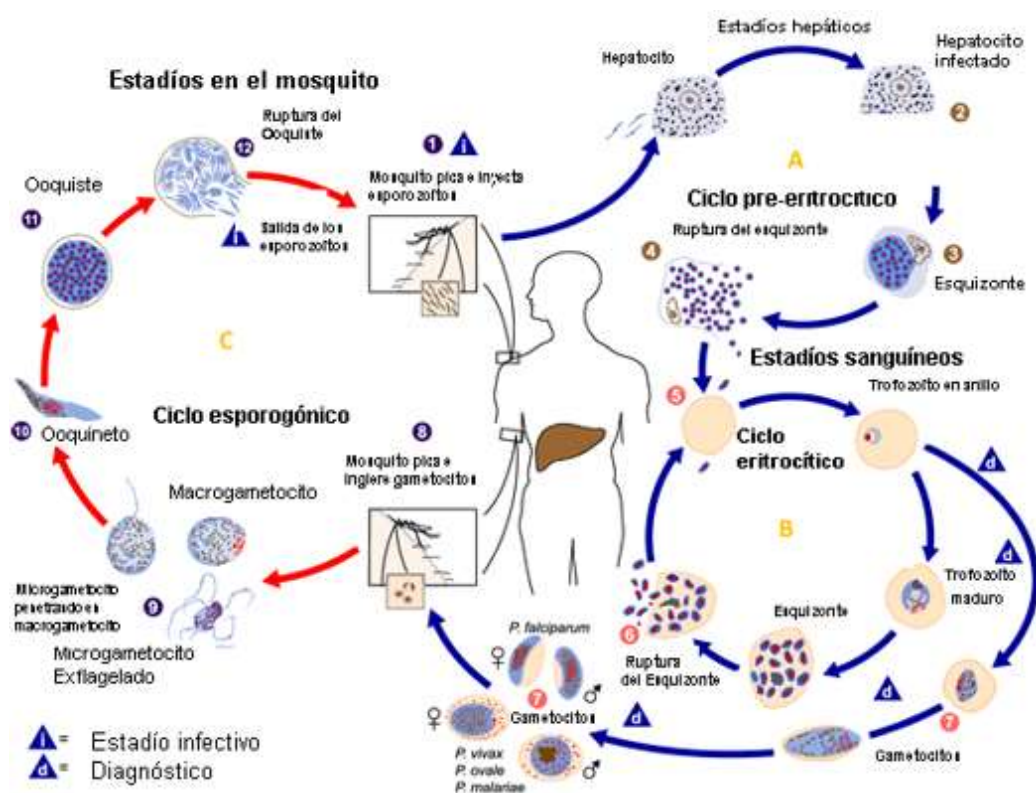
a. Parásito. El parásito que transmite la malaria es un protozooario perteneciente al género *Plasmodium*. Estos organismos se caracterizan por tener alto potencial para reproducirse y generar gran cantidad de progenie tanto mediante reproducción asexual como sexual (O'Donoghue, 2010). Dentro del reino de los protozoos, *Plasmodium* pertenece al filo Apicomplexa, que son obligadamente intracelulares por lo que sobreviven poco fuera de su hospedero (American Society for Microbiology, 2006).

De las cinco especies del género *Plasmodium* que se han identificado como causantes de malaria en humanos se considera que las más importantes han sido *P. falciparum* y *P. vivax* debido a su distribución y a su patogenicidad. *P. falciparum* es considerado el parásito más patogénico de todos ya que provoca los casos más graves de

malaria. Esta especie se encuentra distribuida principalmente en el continente africano (Liu *et al.*, 2010). En cambio, *P. vivax* es la especie que provoca más casos de malaria en América Latina, Asia y en algunas partes de África, pero no se encuentra presente en la región central de África. Se considera que la ausencia de esta especie en dicha región del continente africano se debe a que sus habitantes poseen una mutación que les confiere resistencia a dicha especie (Escalante *et al.*, 2005).

1) Ciclo de vida. El ciclo de vida de *Plasmodium spp.* se caracteriza por que el parásito infecta a dos hospederos: la hembra de *Anopheles sp.* y al ser humano. En el humano el parásito conlleva su reproducción asexual, mientras que en el mosquito se reproduce sexualmente. El ciclo de vida es complejo, se divide en eritrocítico y exoeritrocítico en el humano y esporogónico en el mosquito. Además, se requiere de la interacción entre receptores en las células del hospedero y ligandos del parásito (Prajapati y Singh, 2013). En la Figura 9 se presenta un diagrama del ciclo de vida del parásito.

**Figura 9:** Ciclo de vida del parásito *Plasmodium spp.*

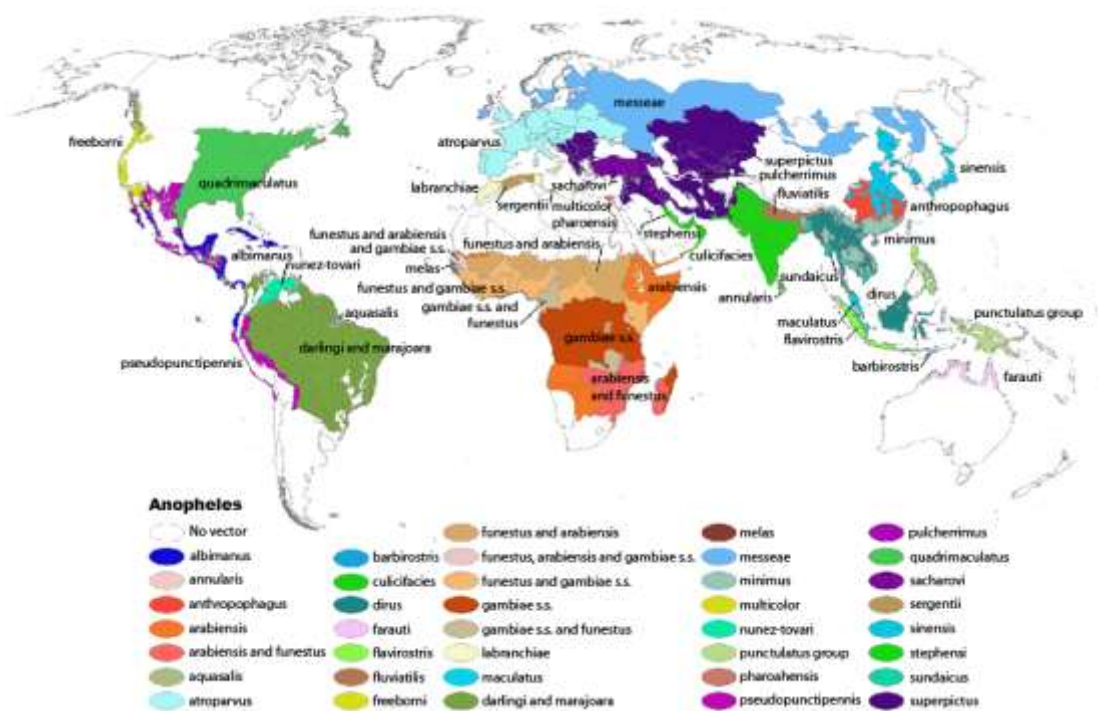


(Modificado de Centers for Disease Control and Prevention, 2012)

#### 4. Vector

a. Ecología. Los mosquitos del género *Anopheles* son responsables de la transmisión de diversas enfermedades como la filariasis y la malaria (Afrane, Githeko y Yan, 2012). Existen aproximadamente 430 especies de mosquitos del género *Anopheles*, de las cuales solamente entre 30-40 transmiten el parásito causante de la malaria. La distribución de los mosquitos de este género es mundial y cubre todos los continentes, excepto la Antártica (Figura 10).

**Figura 10:** Distribución mundial de *Anopheles*



(Kiszewski *et al.*, 2004)

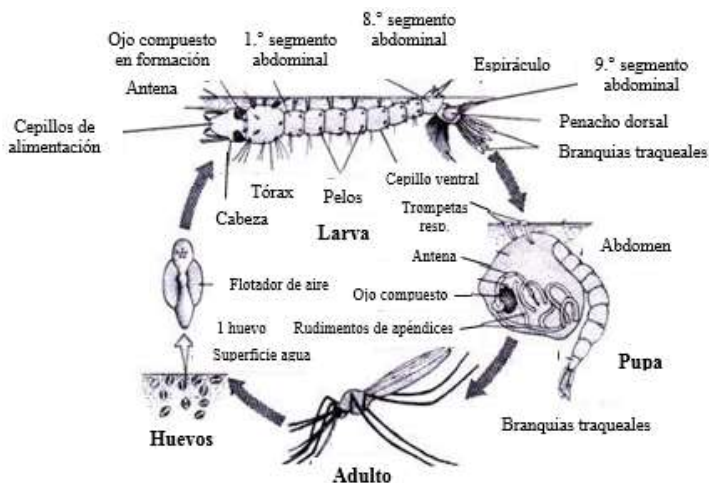
Los mosquitos *Anopheles* son poiquilotermos lo que implica que muchas de sus características o procesos que llevan a cabo dependen de la temperatura del entorno. Dichas características y procesos incluyen: tasa de picaduras, sobrevivencia, desarrollo larvario, fecundidad, duración de los ciclos gonotróficos, entre otros. Esto es importante ya que cualquier cambio en la temperatura puede incidir directamente sobre la transmisión de la malaria (Afrane *et al.*, 2012). Los mosquitos deben permanecer a una temperatura promedio entre 21-32°C y una humedad relativa de por lo menos 60% para completar su

ciclo de vida en el menor tiempo posible y sobrevivir por más tiempo (Depinay *et al.*, 2004). Conocer esto también es importante para el mantenimiento de una colonia de mosquitos dentro de un laboratorio.

La abundancia de los mosquitos *Anopheles* tiende a incrementarse en las épocas lluviosas ya que hay gran cantidad de agua estancada sobre la cual las hembras pueden depositar sus huevos. Por el contrario, en las zonas riparias la reproducción se incrementa en la época seca ya que el agua de los ríos se estabiliza y no amenaza con arrastrar los huevos por la corriente (Hiwat y Bretas, 2011).

Es importante saber que la especie del vector puede variar según la especie del parásito que transmite. Se considera que esto se debe principalmente a la coexistencia del vector y el parásito en una misma región. El vector principal de *P. falciparum* en África es el mosquito *Anopheles gambiae* (Boissiere *et al.*, 2012), a diferencia de *P. vivax* cuyo vector, entre otros, es *An. albimanus* (Baton y Ranford-Cartwright, 2012). En esta investigación es de mayor interés *P. vivax* debido a que es la especie que provoca más casos de malaria en América y en Guatemala (aproximadamente el 98% de los casos). Además, dicha especie del parásito infecta al sujeto de estudio de la investigación, *An. albimanus*, que es la especie del vector más abundante en Guatemala y en el resto de Centroamérica (Rozeboom, 1969). Esta especie es de climas cálidos y húmedos y requiere de abundante luz solar para reproducirse. *An. albimanus* se puede reproducir en gran variedad de fuentes de agua con la condición de que el agua esté expuesta a la luz y sea rica en microorganismos. El agua no puede encontrarse en estado de putrefacción ya que esto frena el crecimiento de los mosquitos. Es por ello que no se reproducen en charcos temporales de agua de lluvia (Rozeboom, 1969).

b. Ciclo de vida del vector. Los mosquitos del género *Anopheles* cuentan con cuatro etapas de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 11). Esto significa que son organismos holometábolos (Centers for Disease Control and Prevention, 2012). Las primeras tres etapas ocurren dentro del agua. El ciclo de vida puede tardar entre 10-15 días hasta que emergen los adultos. La velocidad del ciclo de vida puede incrementarse dependiendo de los nutrientes disponibles y de la temperatura y humedad del ambiente (Centers for Disease Control and Prevention, 2012).

**Figura 11:** Ciclo de vida de *Anopheles*

(Centers for Disease Control and Prevention, 2012)

Las hembras se caracterizan por depositar sus huevos de manera individual sobre la superficie del agua por las mañanas. Se estima que ovipositan en promedio entre 50 y 200 huevos por oviposición. Los huevos se caracterizan por tener flotadores a los costados y se estima que eclosionan entre 2-3 días después de la oviposición. En climas fríos los huevos tienden a eclosionar hasta dos semanas después de la oviposición (Centers for Disease Control and Prevention, 2012).

Las larvas se caracterizan por tener: 1) una cabeza grande con filtros bucales que utilizan para comer; 2) un tórax largo y 3) un abdomen segmentado. Respiran utilizando espiráculos localizados en su octavo segmento abdominal. A diferencia de otros géneros, deben procurar colocar su cuerpo paralelo a la superficie del agua ya que no poseen un sifón respiratorio. Esto significa que deben dirigirse constantemente a la superficie para respirar. Por lo tanto, es común que las larvas permanezcan todo el tiempo en la superficie, a menos que se les moleste y comiencen a nadar en el fondo del agua. Nadan mediante movimientos espasmódicos o por propulsión con ayuda de los filtros bucales (Centers for Disease Control and Prevention, 2012). La dieta se compone principalmente de bacterias, algas y otros microorganismos que se encuentren en la superficie del agua. Por ello pueden crecer en diversos hábitats siempre y cuando el agua no se encuentre contaminada y putrefacta. Las larvas atraviesan cuatro estadios, o “instars”, antes de convertirse en pupas.

Al finalizar cada estadio las larvas mudan el exoesqueleto para poder crecer más (Centers for Disease Control and Prevention, 2012).

Las pupas se desarrollan por la unión de la cabeza con el tórax para formar un cefalotórax con el abdomen curvo por debajo. Es por ello que tienen una forma de coma si se les observa de lado. También deben subir constantemente a la superficie para poder respirar por medio de trompetas respiratorias ubicadas en el cefalotórax. En esta etapa las pupas no se alimentan y solamente utilizan sus reservas energéticas, almacenadas en la etapa larvaria, para convertirse en adultos. Luego de que transcurran un par de días, la superficie dorsal del cefalotórax se rompe para que pueda emerger el mosquito adulto (Centers for Disease Control and Prevention, 2012).

Los adultos utilizan su cabeza para comer y para adquirir y analizar información del entorno. La cabeza tiene ojos, probóscide, dos palpos sensoriales y un par de antenas largas y segmentadas. La probóscide es utilizada para comer. Las antenas son utilizadas para detectar aromas tanto de hospederos como de criaderos donde las hembras pueden depositar sus huevos (Centers for Disease Control and Prevention, 2012). Por otro lado, el tórax está implicado en la locomoción ya que de él surgen tres pares de patas y un par de alas. El abdomen interviene en la digestión de los alimentos y el desarrollo de los huevos. Cuando una hembra se alimenta de sangre, el abdomen se expande y vuelve a su tamaño original luego de que es digerida. Los nutrientes de la sangre se utilizan como fuentes de proteína para la producción de huevos (Centers for Disease Control and Prevention, 2012).

La reproducción de los adultos comienza hasta un par de días después de que estos emergieron a partir de las pupas. En la mayoría de especies, para reproducirse los machos forman enjambres a los que las hembras vuelan. Los machos se alimentan únicamente de néctares y otras fuentes de azúcar. En cambio las hembras, pueden alimentarse también de diversas fuentes de azúcar pero necesitan de sangre para que los huevos se desarrollen (Centers for Disease Control and Prevention, 2012). Por lo general transcurren entre dos a tres días desde la alimentación de la hembra con la sangre hasta la oviposición de los huevos. Luego de la oviposición la hembra suele buscar otro hospedero para alimentarse de más sangre. Este ciclo se repite hasta la muerte de la hembra, la cual ocurre generalmente dos semanas después de que la hembra emergió de pupa. Sin embargo, en condiciones de

laboratorio, una hembra adulta puede vivir hasta un mes (Centers for Disease Control and Prevention, 2012).

b. Comportamiento reproductivo de *Anopheles*. A continuación, se describen algunos aspectos importantes del comportamiento reproductivo del vector tanto en el ambiente natural como en condiciones de laboratorio.

1) Comportamiento reproductivo y su evaluación en cepas silvestres. La espermatogénesis (desarrollo de los espermias) en el macho ocurre en las últimas etapas del estadio de pupa. Los machos no son competentes para reproducirse cuando recién acaban de emerger de la pupa debido a que sus órganos sexuales y antenas aún no poseen la madurez requerida. El tiempo en que alcanzan dicha madurez depende de la especie, aunque se estima que los machos alcanzan la madurez sexual requerida hasta 48 horas después de haber emergido de la pupa. Sin embargo, aún en ese tiempo tienen bajas tasas de inseminación. Por otro lado, las fibras de las antenas maduran hasta 12 horas después de que los adultos emergieron de la pupa. Dichas fibras permiten a los mosquitos localizar los tonos que producen las hembras al batir sus alas para poder dirigirse a ellas y copular (Howell y Knols, 2009).

En la mayoría de casos, los machos de *Anopheles* deben formar un enjambre (desde 5 hasta 5,000 individuos) para poder reproducirse con la hembra. Los machos suelen utilizar marcadores espaciales para orientarse y determinar dónde debe formarse el enjambre. La formación del enjambre tiende a ocurrir en cierta presencia de luz y se disuelve a medida que anochece. Sin embargo, la reproducción en el mosquito no se debe a la presencia o intensidad de la luz, sino más bien a los ciclos circadianos del mismo. *Anopheles* abandona sus sitios de descanso en tiempos específicos para empezar la formación del enjambre. Luego, las fibras de sus antenas se erigen por una o dos horas para detectar a las hembras por el batir de sus alas. El enjambre se moviliza como una unidad para detectar más fácilmente a las hembras. La reproducción ocurre a medida que las hembras van ingresando al enjambre, lo cual sucede aproximadamente entre 5-20 minutos después de la formación del enjambre. También existen casos en los que el macho se separa levemente del enjambre para reproducirse con una hembra que esté volando cerca. La cópula dura únicamente 30 segundos, pero el macho suele permanecer más tiempo (entre

10-30 minutos) cerca de la hembra para impedir que otro macho la insemine. El macho traspasa a la hembra señales que la vuelven no receptiva para otro macho. Luego de cuidar a la hembra, el macho regresa al enjambre para probar inseminar a otras hembras. Al caer la noche, el enjambre se disuelve y los machos se alimentan de néctar para reestablecer sus reservas energéticas (Howell y Knols, 2009).

2) Comportamiento reproductivo y su evaluación en colonias de laboratorio. El mantenimiento de una colonia de mosquitos dentro del laboratorio es difícil debido a que muchas especies son eurigámicas, es decir no pueden copular libremente bajo las condiciones de laboratorio (Giglio *et al.*, 2015). Por lo tanto, en muchos casos es necesario inducir la reproducción para que la colonia siga creciendo. Esto requiere de una técnica cuidadosa y de bastante tiempo. Además, no siempre es posible obtener gran número de mosquitos mediante la reproducción asistida. El éxito limitado en la aplicación de dicha técnica representa un verdadero problema para el mantenimiento de las colonias en insectarios (Villarreal-Treviño *et al.*, 2015). Con el paso del tiempo, algunas colonias que se reproducen de manera asistida llegan a convertirse en estenogámicas con lo que aprenden a copular libremente en las condiciones de laboratorio (Giglio *et al.*, 2015). En las colonias suele existir menor diversidad genética ya que aumenta la cópula consanguínea. Esto puede representar una desventaja con respecto a las colonias silvestres (Achinko *et al.*, 2016). No se conoce con certeza los factores principales que determinan el comportamiento sexual del mosquito dentro de una colonia de laboratorio. Asimismo, se desconoce la regulación de la productividad de la colonia. A la fecha no se ha reportado nada acerca de los parámetros de adaptación de los mosquitos a las condiciones de laboratorio.

c. Alimentación de larvas de *Anopheles*. Gran cantidad de estudios para la eliminación de la malaria se enfocan en desarrollar alimento para las larvas. A partir de dichos estudios se obtiene conocimiento sobre ciertos recursos que utilizan las larvas de sus hábitats para alimentarse y crecer (Kivuyo *et al.*, 2014). Las algas son consideradas el alimento principal de larvas en condiciones naturales ya que se encuentran en grandes cantidades dentro de sus estómagos (Garros *et al.*, 2008). En cambio, en condiciones de laboratorio se suele alimentar a las larvas con: comida de conejo, polvo de hígado de vaca,

hígado de cerdo, leche descremada, galletas para perros, comida de ratón, comida de pez, cereal de arroz, pan, paja, cereal de trigo, grama y levadura (Khan *et al.*, 2013).

Históricamente, la mayoría de los componentes mayores de la dieta de larvas eran productos de dieta animal debido a la facilidad de obtenerlos en grandes cantidades (Asahina, 1964). La cantidad y calidad de la comida ingerida por las larvas influye en el desarrollo, supervivencia y tasa de emergencia de las mismas. Ciertos estudios han demostrado que tanto la supervivencia como la cantidad de larvas que llegan a ser adultos aumenta cuando las larvas reciben un abundante suplemento alimenticio (Kivuyo *et al.*, 2014). Sin embargo, en condiciones de laboratorio no es recomendable agregar tanto alimento a los contenedores donde se encuentran las larvas. Esto puede generar una nata en la superficie del agua que impide el desarrollo de las larvas. Aún no se conoce con certeza por qué ocurre esto ya que en la naturaleza algunas larvas pueden crecer en aguas turbias (Asahina, 1964). Se ha demostrado que la capacidad vectorial de las larvas se incrementa cuando la comida ingerida es de buena calidad nutricional (Kivuyo *et al.*, 2014). La hambruna y sobrepoblación tienen efectos perjudiciales sobre el desarrollo de las larvas y la fecundidad de las hembras (Manorenjitha y Zairi, 2012). Para que las larvas lleguen a desarrollarse completamente su dieta debe incluir ácidos grasos, aminoácidos, azúcares, nucleótidos y esteroides (los últimos dos son importantes para el desarrollo y la eficiencia del vuelo). Los cambios en la dieta pueden impactar de diferente forma en el desarrollo de las larvas. Por ejemplo se ha observado que las dietas que contengan polen de maíz o comida de pescado con tetramina tienen un impacto positivo en el desarrollo de los mosquitos (Kivuyo *et al.*, 2014). Existe evidencia de que el tamaño de los adultos depende de las reservas energéticas obtenidas durante la etapa larvaria e influye en aspectos importantes de su estado físico y en su susceptibilidad a insecticidas (Manorenjitha y Zairi, 2012).

5. Diagnóstico y tratamiento. Al analizar las diversas opciones de diagnóstico para la malaria se debe tener en cuenta que los síntomas de la enfermedad no son para nada específicos. Por lo tanto, cualquier diagnóstico que se lleve a cabo únicamente tomando en cuenta los síntomas del paciente corre el riesgo de ser erróneo o no tan certero. Esto es un problema no solo porque se pone en riesgo la vida del paciente sino porque se gastan

recursos en un tratamiento que puede no ser el más efectivo. Esto afecta principalmente a las poblaciones vulnerables (niños, ancianos y mujeres embarazadas) ya que la malaria puede llegar a ser grave en poco tiempo. Por lo tanto se recomienda confirmar el diagnóstico de un caso de malaria sospechosa realizando un examen de parasitología (Organización Mundial de la Salud, 2010).

El diagnóstico parasitológico abarca tres estrategias: el uso de microscopía de luz, pruebas de diagnóstico rápido (RDT, por sus siglas en inglés) y métodos moleculares. Se inicia con una prueba de microscopía en la que se observan preparaciones de gota gruesa y gota delgada de sangre bajo el microscopio. Esto con el objetivo de visualizar si los eritrocitos están infectados con el parásito. Las RDT detectan enzimas o antígenos específicos del parásito y en algunos casos incluso podrían determinar de qué especie del parásito se trata (Organización Mundial de la Salud, 2010). Los resultados se observan como bandas de color que demuestran la interacción entre un anticuerpo y el antígeno del parásito que está siendo detectado (Organización Mundial de la Salud, 2010). Por último, entre los métodos moleculares se puede mencionar la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), la cual puede utilizarse para amplificar regiones del genoma específicas al parásito (Saiki *et al.*, 1985).

El tratamiento de malaria tiene diferente objetivo según la fase de la infección y la especie del parásito. En una etapa temprana el objetivo consiste en eliminar la infección lo antes posible mediante la eliminación del parásito que ya se encuentra en el organismo. Además, se busca reducir lo más que se pueda el parásito de manera que disminuya la transmisión. En los casos más avanzados de malaria (malaria severa) el objetivo del tratamiento es evitar la muerte de la persona. En cuanto a la especie del parásito se debe tener en cuenta que de las cinco especies que infectan al humano, únicamente *P. vivax* y *P. ovale* forman hipnozoitos en el hígado que se mantienen latentes y pueden generar recaídas en el paciente en los meses o años siguientes. Por lo tanto, el tratamiento contra *P. vivax* (la especie de interés en este caso) tiene como objetivo curar completamente al paciente eliminando el parásito de la sangre y del hígado (Organización Mundial de la Salud, 2010).

a. Fármacos antimaláricos. En Guatemala, los fármacos antimaláricos más utilizados son la primaquina en combinación con la cloroquina (0.25 mg/kg durante 14 días). Esta combinación se suministra a pacientes infectados tanto con *P. falciparum* como con *P. vivax* (Organización Mundial de la Salud, 2014). La malaria cae en la clasificación de enfermedades transmitidas por vectores que deben ser reportadas y notificadas semanalmente por los servicios de salud. Los casos sospechosos se basan únicamente en la descripción clínica de los síntomas. Por otro lado, en caso de que el centro de salud cuente con el equipo y personal necesarios, todos los casos deben ser confirmados con microscopía de gota gruesa teñida con Giemsa. De acuerdo a las guías nacionales, se le debe proveer el medicamento necesario incluso a los casos sospechosos que aún no se han confirmado (Centro Nacional de Epidemiología, 2007).

Es importante mencionar que existen infecciones sub-microscópicas de malaria en las que el parásito está en tan bajo número que no se detecta por microscopía. Además pueden existir infecciones asintomáticas en las que el parásito no cause síntomas aunque se mantenga circulando dentro de las personas. Si un mosquito pica a una persona con este tipo de infecciones, sí se infectará con el parásito y seguirá transmitiendo la enfermedad a otras personas. Esto es importante en Guatemala ya que la transmisión actual se debe principalmente a la presencia de infecciones de este tipo. Por lo tanto, es importante (aunque difícil) detectar estos casos lo antes posible para proporcionar a la persona el medicamento antimalárico y frenar la transmisión del parásito (Okell *et al.*, 2012).

6. Medidas y estrategias para el control del vector. Los principales intentos para controlar la malaria se han centrado en el control del vector (mosquito). Entre las estrategias iniciales de control del vector se encuentran: eliminación de las larvas, tratamiento de criaderos con larvicidas, eliminación de criaderos (agua estancada, pantanos, entre otros) y la colocación de aceite crudo sobre el agua (Despommier *et al.*, 2005).

En Guatemala, las estrategias de control del vector son dirigidas por el Centro Nacional de Epidemiología (CNE) y se clasifica como una enfermedad cuyos casos deben

ser reportados semanalmente al sistema de vigilancia. Uno de los métodos de control vectorial es el rociado residual intradomiciliario con insecticidas. Además se proporcionan mosquiteros impregnados con insecticidas de larga duración a los habitantes de áreas con alta transmisión de malaria (Centro Nacional de Epidemiología, 2007). En Guatemala se han implementado diversas estrategias de control del vector, pero aún no se ha logrado eliminar la enfermedad del territorio nacional. Por estar Guatemala en una fase de pre-eliminación es recomendable implementar ciertas medidas de control del vector que permitan alcanzar la eliminación (Organización Mundial de la Salud, 2009).

Actualmente se está realizando en Guatemala un estudio con el objetivo de “Determinar el perfil de susceptibilidad a insecticidas en los vectores de la malaria de Guatemala” (Lol, 2016). Resultados preliminares muestran que los mosquitos *An. albimanus* del departamento de Escuintla presentan mayor resistencia a deltametrina (36.4%) seguido por malatión (17.1%) y DDT (4.1%). Además estudios moleculares en los anofelinos han demostrado la presencia de genotipos asociados a resistencia a insecticidas Piretroides y DDT (Lol, 2016).

a. Método alternativo del control vectorial

1) Técnica del insecto estéril (SIT)

a) Concepto. La técnica SIT consiste en liberar insectos estériles a una población silvestre con el objetivo de reducir el tamaño de la población. Generalmente se liberan machos estériles que copulan con hembras silvestres pero no se produce progenie (Klassen y Curtis, 2006).

b) Factores que inciden en el éxito en la implementación de SIT. Se recomienda utilizar la técnica SIT para insectos con reproducción sexual que sean holometábolos, es decir que tengan un desarrollo en el que atraviesen por las fases de embrión, larva, pupa y adulto. El holometabolismo es conveniente ya que facilita aplicar la esterilización al insecto cuando se encuentra en la fase de pupa. Además, en esta fase es más fácil manejarlo, manipularlo y transportarlo (Knipling y Serv, 1955).

Para aplicar la técnica SIT se debe conocer la ecología de la población del insecto de interés, la cantidad estimada de adultos que la conforman y cómo ésta varía en

el tiempo. Al iniciar a trabajar con la técnica en 1950, Knipling formuló un modelo matemático para aplicar esta técnica a moscas de la especie *Cochliomyia hominivorax* que afectaban al ganado. Este modelo plantea que se necesitarían dos millones de machos estériles para erradicar una población de un millón de insectos silvestres (relación 2:1). Dicho modelo asumía que el ritmo de crecimiento de la población era estable y que los machos estériles tenían la misma capacidad que los silvestres para copular con las hembras. Sin embargo, se ha demostrado que en la realidad es difícil aplicar esta relación ya que en poblaciones de rápido crecimiento ni siquiera una relación de 100:1 (insecto estéril: insecto silvestre) ha funcionado. Con base a lo anterior se recomienda utilizar la técnica SIT para el control de poblaciones pequeñas de insectos que se encuentren ubicadas en hábitats delimitados y que tengan un ritmo de crecimiento estable (Knipling y Serv, 1955).

Generalmente la distribución de las poblaciones de insectos suele estar relacionada con la distribución de los recursos. Esto provoca que existan áreas de alta y baja densidad del insecto lo cual dificulta la efectividad de la técnica SIT (Shiga, 1986). En las áreas con alta densidad del insecto silvestre, se requerirá de la liberación de una mayor cantidad de insectos estériles para lograr la erradicación. Es decir que la liberación de insectos estériles debe ser acorde a la densidad de los insectos silvestres en un área. Por otro lado, se debe tener en cuenta la dispersión del insecto ya que el movimiento de gran cantidad de machos silvestres o de hembras ya apareadas a una región puede disminuir significativamente la eficiencia. Sin embargo, la moderada dispersión del insecto (a nivel local; en áreas pequeñas) puede contribuir al éxito de la técnica al homogeneizar la distribución del mismo en una región delimitada. Los insectos estériles deben ser capaces de movilizarse lo suficiente como para localizar los recursos donde seguramente se encontrará la población silvestre (Barclay, 1992). Por lo tanto, es importante evaluar que el método de esterilización no afecte la capacidad del insecto para volar ya que en múltiples experimentos ésta sí se ha visto afectada y no ha permitido que el insecto estéril sobreviva en el ambiente (Calkins y Parker, 2005).

El éxito de la técnica SIT depende en gran parte de que la población de insectos estériles viva tanto tiempo como la población de insectos silvestres. De tal forma que si la longevidad del insecto estéril es menor que la del silvestre se debe considerar liberar mayor

cantidad de insectos estériles para mantener la relación necesaria insectos estériles: insectos silvestres (Vreysen *et al.*, 2000). La disminución de la longevidad del insecto estéril puede deberse a múltiples factores: genética de cepas, métodos de manejo, esterilización o métodos de liberación (por ejemplo formas de liberación en las que el insecto estéril permanezca inmovilizado por algún tiempo) (Thomas y Loera-Gallardo, 1998). También han existido casos en los que la técnica de esterilización utilizada ha interferido con la capacidad del insecto de reaccionar a estímulos en su entorno. Esto puede afectar su sobrevivencia ya que al ser liberado al ambiente natural, el insecto estéril tiene más susceptibilidad que el silvestre de ser atacado por depredadores (Calkins y Parker, 2005).

El insecto estéril debe tener la habilidad de competir con el insecto silvestre para copular con las hembras silvestres. Por lo tanto, antes de liberar insectos estériles se debe comprobar la propensión y compatibilidad de apareamiento. La propensión hace referencia a la capacidad del insecto para localizar y copular con su pareja. En cambio, la compatibilidad hace referencia a qué tan compatible es el apareamiento del insecto estéril con el insecto silvestre (Calkins y Parker, 2005). Esto demuestra la importancia de evaluar que la técnica de esterilización no interfiera con los sistemas sensoriales que el insecto utiliza para localizar y comunicarse con su pareja con el objetivo de atraerla. Se ha demostrado que aplicar radiación ionizante puede provocar alteraciones genéticas en las células somáticas del insecto que interfieren con la capacidad de éste para copular con las hembras silvestres. Además, puede provocar alteraciones genéticas que disminuyan la capacidad de los espermatozoides para competir con otros espermatozoides. En conclusión, a medida que aumenta la complejidad del rol del macho durante el apareamiento, será más difícil aplicar la técnica SIT con éxito (Lance y McInnis, 2005).

La efectividad de la técnica SIT puede verse seriamente afectada si la hembra silvestre copula con un macho silvestre luego de haber copulado con el macho estéril. Esto podría provocar que los espermatozoides del macho silvestre fecundaran el óvulo de la hembra y dieran origen a prole viable. Con base a esto, Knippling propuso que la técnica sería exitosa siempre y cuando las hembras silvestres copularan una única vez en su vida (Knippling y Serv, 1955). Según lo reportado en la literatura, las hembras de *An. albimanus* copulan una única vez en su vida (Catteruccia *et al.*, 2009).

Se debe seleccionar un método adecuado de liberación tomando en cuenta características biológicas y ecológicas del insecto de interés. Existen diversos métodos de liberación (liberación estática, liberación en tierra, liberación aérea) (Dowell *et al.*, 2005).

c) Estudios exitosos. La técnica SIT fue utilizada por primera vez a gran escala en 1950 para erradicar el gusano barrenador *Cochliomya hominivorax* de Estados Unidos, México y Centroamérica. Durante los siguientes 43 años se siguió utilizando esta técnica para mantener controlado a dicho parásito del ganado (Klassen y Curtis, 2006). A partir de ese entonces se ha utilizado la técnica SIT en múltiples ocasiones:

- Desde 1967 se han liberado, en el Valle de San Joaquín en California, machos estériles de *Pectinophora gossypiella*, un conocido parásito del algodón (Klassen y Curtis, 2006).

- A partir de 1970 se creó el programa Moscamed por un acuerdo entre Guatemala, México y Estados Unidos. Dicho programa utiliza la técnica SIT para evitar el movimiento de la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* desde Centroamérica al sur de México y posteriormente a Estados Unidos. Moscamed ha logrado erradicar la mosca de la fruta de la región lo que ha ayudado a mantener las cosechas de fruta en buen estado (Enkerlin *et al.*, 2015). Sin embargo, actualmente todavía se siguen liberando machos estériles en diferentes localidades de Estados Unidos (Los Ángeles, Tampa y Miami) para evitar el establecimiento de la mosca que pudiera encontrarse en la fruta importada (Klassen y Curtis, 2006).

- En 1997 se logró erradicar la mosca tse tse (*Glossina austeni*) en Zanzibar, Tanzania mediante la liberación de machos estériles. La mosca tse tse es responsable de transmitir protozoos del género *Trypanosoma* que provocan la enfermedad del sueño en humanos y la enfermedad de nagana en animales. Esta última es considerada una de las más importantes causas de la pobreza que se vive en el área de África-Subsahariana ya que mata a los animales que podrían utilizarse como alimento o como animales de trabajo para mejorar las técnicas de agricultura (Vreysen *et al.*, 2000).

- En México se aplica la técnica para controlar a varias especies de moscas del género *Anastrepha* que afectan cosechas de fruta en el norte del país (Klassen y Curtis, 2006).

Un ejemplo actual consiste en la aplicación de la técnica SIT para controlar las enfermedades virales del dengue y el Zika (Benelli y Mehlhorn, 2016). La técnica SIT se ha implementado con *Aedes* utilizando radiación ionizante para esterilizar a los mosquitos. También se ha desarrollado una combinación de la técnica SIT con la auto-diseminación (consiste en liberar adultos contaminados para diseminar hormonas en los hábitats que impidan que el adulto se reproduzca o que causen un efecto tóxico sobre el parásito). A esta combinación se le conoce como SIT impulsado y ha resultado ser eficiente para el control de *Aedes*. Sin embargo, no puede ser implementada a gran escala debido a que no se tiene la capacidad de producir y liberar poblaciones estériles del tamaño necesario para lograr el efecto deseado en un territorio muy extenso (Benelli y Mehlhorn, 2016). Ejemplos de esto son los estudios que se llevan a cabo actualmente con *Aedes albopictus* en China y Estados Unidos, cuyo objetivo es esterilizar a los mosquitos utilizando la bacteria *Wolbachia pipientis*. Para lograrlo se microinyecta la bacteria a los mosquitos para que luego de copular con mosquitos silvestres (no poseen la misma cepa de *Wolbachia*) se produzcan huevos que nunca nacen. Esto ocurre debido a que cuando un mosquito macho infectado con una cepa de *Wolbachia* copula con una hembra que no posee una cepa de *Wolbachia* o que posee una cepa de *Wolbachia* diferente a la del macho, ocurre una interrupción en el proceso de mitosis y una incompatibilidad citoplasmática que provoca la muerte del huevo (Waltz, 2016).

Por otro lado, en enero del año 2016 se anunció en la ciudad de Piracicaba, Brazil, la aprobación para liberar los mosquitos modificados con *Wolbachia* (*Aedes aegypti* OX513A). Esto se está llevando a cabo como una medida de salud pública para controlar los brotes del Zika. En el pasado, esta ciudad ya se había aliado con Oxitec para liberar mosquitos de este tipo en una comunidad de aproximadamente 5,000 personas, en la que se observó una reducción del 82% en la población de larvas en comparación con las áreas que no fueron tratadas. Los nuevos proyectos de liberación de mosquitos tienen como meta cubrir poblaciones de 60,000 habitantes. En un futuro se desea construir instalaciones en dicha ciudad para producir mosquitos modificados que alcancen coberturas de hasta 300,000 personas (Waltz, 2016).

El estudio principal sobre el que se basa la presente investigación consistió en aplicar la técnica SIT a mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. En dicho caso la esterilización fue alcanzada mediante el silenciamiento de genes del testículo involucrados en la espermatogénesis. Todos los genes seleccionados para este propósito (*BOL*, *FZO*, *GAS8*, *NHT* y *ZPG*) se expresaban únicamente en los testículos y no en otros tejidos. Esto eliminó el riesgo de que el silenciamiento de los genes afectara el comportamiento reproductivo del macho u otros aspectos fisiológicos. El silenciamiento fue impulsado por la alimentación de las larvas de los mosquitos con ácido ribonucleico (ARN) doble hebra dirigido a los genes de interés. Además, también se alimentó a las larvas con ARNdh (también conocido como ARN de interferencia o ARNi, por sus siglas en inglés) dirigido contra un gen implicado en la determinación del sexo femenino del mosquito (gen *DOUBLESEX*), con el objetivo de producir únicamente machos y no hembras. El ARNdh fue producido por la bacteria *E. coli* HT115 (DE3), la cual fue transformada con el plásmido pL4440 al que se le habían introducido los genes de interés. No se recomienda liberar hembras estériles ya que estas aún pueden transmitir parásitos y dificultar que los machos estériles copulen con las hembras silvestres (Whyard *et al.*, 2015).

Los resultados del estudio demostraron que el silenciamiento de los genes *BOL*, *FZO*, *GAS8*, *NHT* y *ZPG* logró producir machos de *A. aegypti* con una fertilidad reducida. El gen silenciado que produjo mayor porcentaje de machos estériles de *A. aegypti* fue *GAS8* seguido de *FZO* y *BOL*. El silenciamiento del gen *ZPG* fue el que provocó menor porcentaje de esterilidad, pero fue el único que permitió que los machos estériles mantuvieran la capacidad de transferir a la hembra señales y hormonas necesarias para inducir los comportamientos post-copulatorios deseados (copular una única vez y ovipositar huevos, aunque sean no viables). El silenciamiento de los genes restantes impidió el paso de estas señales por lo que las hembras podían copular más de una vez. Se observó que al alimentar a las larvas con combinaciones de ARNdh de los diferentes genes se lograba aumentar el porcentaje de esterilidad en los machos. Por otro lado, se observó que el silenciamiento de la isoforma femenina del gen *DOUBLESEX* fue exitoso ya que la mayoría de la población de mosquitos estaba compuesta por machos. Esto puede verse

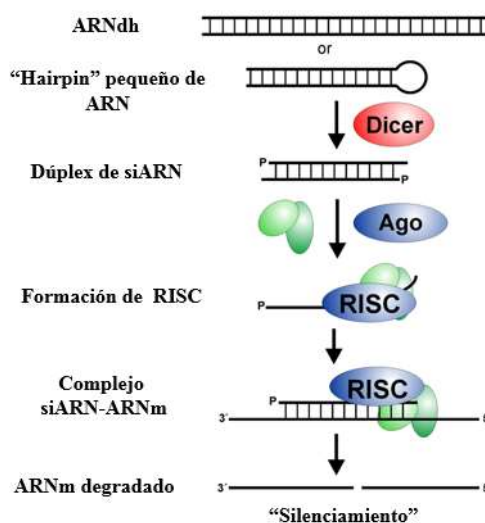
como una modificación beneficiosa a la técnica SIT ya que evita tener que realizar la separación de sexos y ahorra recursos (Whyard *et al.*, 2015).

El resultado del estudio sugiere que este mismo método de esterilización podría ser aplicado a otras especies de mosquitos, por ejemplo, *An. albimanus*. Un aspecto beneficioso de este método de esterilización es que no produce organismos genéticamente modificados lo cual podría ser un impedimento en ciertos países que no permiten la liberación de organismos de este tipo (Whyard *et al.*, 2015).

d) Interferencia de ARN. El ARN de interferencia (ARNi) recibe dicho nombre luego de que se descubrió que inyectar ARNd<sub>h</sub> al nematodo *Caenorhabditis elegans* provocaba el silenciamiento específico de genes con una secuencia altamente homóloga a la secuencia del ARNd<sub>h</sub> utilizado (Fire *et al.*, 1998). El ARNd<sub>h</sub> podía ser separado en fragmentos más pequeños que se unieran a fragmentos de ARN mensajero (ARNm) con secuencia homóloga. Estos fragmentos de ARNm eran degradados de forma que la información del gen que los codificó ya no era expresada. Desde un inicio se determinó que el ARNi estaba ampliamente ligado a los mecanismos de silenciamiento de genes transcripcional (TGS por sus siglas en inglés) y post-transcripcional (PTGS por sus siglas en inglés) en plantas. El mecanismo TGS se centra en la inhibición de la transcripción de un gen específico, mientras que el mecanismo PTGS se basa en la degradación de una secuencia específica de ARN. Al inicio dichos mecanismos fueron descritos solamente en plantas pero luego se confirmó su existencia en la gran mayoría de eucariotas, incluyendo el ser humano. En todos los organismos eucariotas se tienen mecanismos similares pero estos se han clasificado en tres tipos: PTGS en plantas, “quelling” en hongos y ARNi en animales (Agrawal *et al.*, 2003). Se considera que la función natural de estos sistemas de supresión es la de proveer protección al organismo contra material genético extraño que pueda interferir con el correcto funcionamiento de sus procesos de transcripción. Algunos ejemplos de material genético que podría provocar este daño son los virus y los transposones. Sin embargo, se ha demostrado en algunas ocasiones que los virus pueden protegerse ante estos sistemas de supresión (Elbashir *et al.*, 2001).

El mecanismo de silenciamiento de genes por ARN de interferencia (Figura 12) inicia con la separación del ARNd<sub>h</sub> en fragmentos más pequeños que por lo general poseen un tamaño de entre 21-25 pares de bases. Es posible generar dichos fragmentos por la acción enzimática de ARNasas, generalmente de la familia III, que pueden cortar el ARNd<sub>h</sub> en fragmentos de tamaño uniforme y que reciben el nombre de “dicer” (DCR). Dichos fragmentos se acuñaron con el nombre de siARN (Elbashir *et al.*, 2001). Se ha identificado que este tipo de nucleasas está conservado en la mayoría de los reinos y que es posible que funcione junto con otras proteínas como parte de un complejo proteico (Agrawal *et al.*, 2003). Además se ha identificado que la función del “dicer” se ve disminuida si el organismo no tiene ATP disponible para usar (Elbashir *et al.*, 2001). Los fragmentos de ARNd<sub>h</sub> luego se unen a un tipo de nucleasas que en muchos casos pertenecen a la familia de proteínas conocida como “Arganoute”. El ARNd<sub>h</sub> forma un complejo con dicha enzima la cual lo separa en dos hebras simples. Una de las hebras es degradada mientras que la otra funciona como la guía que dirigirá a la endonucleasa al ARNm blanco que tenga una secuencia homóloga. La hebra guía y la endonucleasa forman un complejo con otras proteínas que se conoce como el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC por sus siglas en inglés). El RISC se une al ARNm blanco y luego la endonucleasa rompe el ARNm en varios fragmentos. Los fragmentos de ARNm resultantes son degradados y ya no pueden ser traducidos (Agrawal *et al.*, 2003).

**Figura 12:** Funcionamiento del mecanismo del ARN de interferencia



(Modificado de Gene quantification, 2016)

En algunos organismos, por ejemplo, en *C. elegans* y en las plantas se ha identificado la existencia de proteínas transmembranales que funcionan como canales que permiten la distribución sistémica del ARNi en todos los tejidos de un organismo. El gen que se considera que codifica para una de estas proteínas transmembranales en *C. elegans* es SID1. Sin embargo, aún no se ha identificado este mecanismo en *D. melanogaster* por lo que el ARNi realiza una función local y no se distribuye en todos los tejidos del organismo (Agrawal *et al.*, 2003).

Es posible utilizar tres diferentes estrategias para lograr el silenciamiento de genes mediante el ARNi. A continuación, se muestra un cuadro de comparación de dichas estrategias.

**Cuadro 2:** Posibles estrategias para el uso del mecanismo de silenciamiento de genes mediante ARNi

siRNA	shRNA	ddRNAi
El siRNA es producido <i>in vitro</i> y luego es purificado e introducido a la célula por transfección (Farrell, 2005). También existe la posibilidad de que el siRNA sea producido dentro de la célula luego de transformarla con un vector de transcripción (Brummelkamp, Bernards, y Agami, 2002).	Se basa en la utilización de ARN de hebra simple en forma de “hairpin”. Dicho ARN puede ser procesado por “dicer” para producir los fragmentos siRNA (Farrell, 2005).	Se conoce como el ARN de interferencia dirigido por ADN. En esta técnica el ARNdH no es exógeno y tampoco es introducido a la célula. En cambio, el ARNdH es producido dentro de la célula por lo que la producción del siRNA también ocurre <i>in vivo</i> (Farrell, 2005).

Fuente: Elaboración propia.

El control de insectos utilizando ARNi se ha propuesto previamente con algunas variaciones a las planteadas en el presente estudio. Por ejemplo, administrando el ARNi de forma oral para controlar poblaciones de abejas de miel, lombrices de cuerno del tabaco,

termitas, entre otros. Además se han propuesto diferentes métodos para la administración oral del ARNdh, entre los que se encuentran: papeles impregnados con el ARNdh, plantas y bacterias modificadas para producir el ARNdh, plantas cubiertas con ARNdh, soluciones del ARNdh o partículas de quitosan con ARNdh en su interior (Taracena *et al.*, 2015).

e) Consecuencias ecológicas de aplicar la técnica SIT. La aplicación de la técnica SIT puede representar grandes beneficios para una población como el ahorro de recursos económicos por la reducción en : 1) uso de insecticidas y pesticidas y 2) medicinas y tratamiento a personas que sufren de una enfermedad transmitida por un vector (Nagel y Peveling, 2005). Sin embargo, también se debe tener en cuenta que aplicar la técnica SIT puede representar riesgos para el entorno, por ejemplo, puede reducir la diversidad genética de la especie blanco. Además, las consecuencias de eliminar una especie del ambiente que ocupa son impredecibles (Nagel y Peveling, 2005).

## **V. ANTECEDENTES – EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS**

Las técnicas moleculares son un conjunto de herramientas ampliamente utilizadas para investigación y diagnóstico de diversas enfermedades. Comprenden diversos métodos que permiten aislar, amplificar, secuenciar y purificar ADN, ARN, proteínas y otras biomoléculas. El uso de las técnicas moleculares ha renovado a la biología molecular, pues se caracterizan por ser precisas, sensibles y eficaces a la vez. Las herramientas desarrolladas han tenido diferentes aplicaciones como industria de alimento, procesadores de agua, laboratorios analíticos y salud. Los métodos moleculares pueden variar dependiendo su reproducibilidad, fácil manipulación, fácil interpretación de resultados entre otros (Babalola, 2003). Las técnicas moleculares se pueden utilizar para generar bacterias transgénicas con características deseadas. Las bacterias transgénicas son bacterias a las cuales se le ha modificado su material genético original mediante la introducción de fragmentos de material genético de otros organismo y son un tipo de organismos genéticamente modificados (OGMs) (Nielsen, 2003).

### **A. EXPRESIÓN DE PROTEÍNA**

Las proteínas son consideradas como pilares fundamentales de la vida. Estas son formadas por cadenas de aminoácidos. Las proteínas cumplen con diversas funciones en los organismos. Algunas de ellas son enzimas que ayudan a catalizar reacciones bioquímicas; otras funcionan como hormonas que participan en el crecimiento y homeostasis. Una de las funciones más importantes de las proteínas es formar parte de la estructura celular y el mantenimiento de la misma. Así como el transporte de nutrientes y proteínas al citoesqueleto. Muchas proteínas también se ven involucradas en funciones de movimiento; forman parte los cilios y flagelos que propician la motilidad. Otras están involucradas en el reconocimiento y transducción de señales en las células, así como en los receptores de anticuerpos. Sin embargo hay otras que forman parte de las defensas, estas

ayudan en la diferenciación de agentes extraños y además facilitan la eliminación de estos agentes (May y Goodsell, 2002).

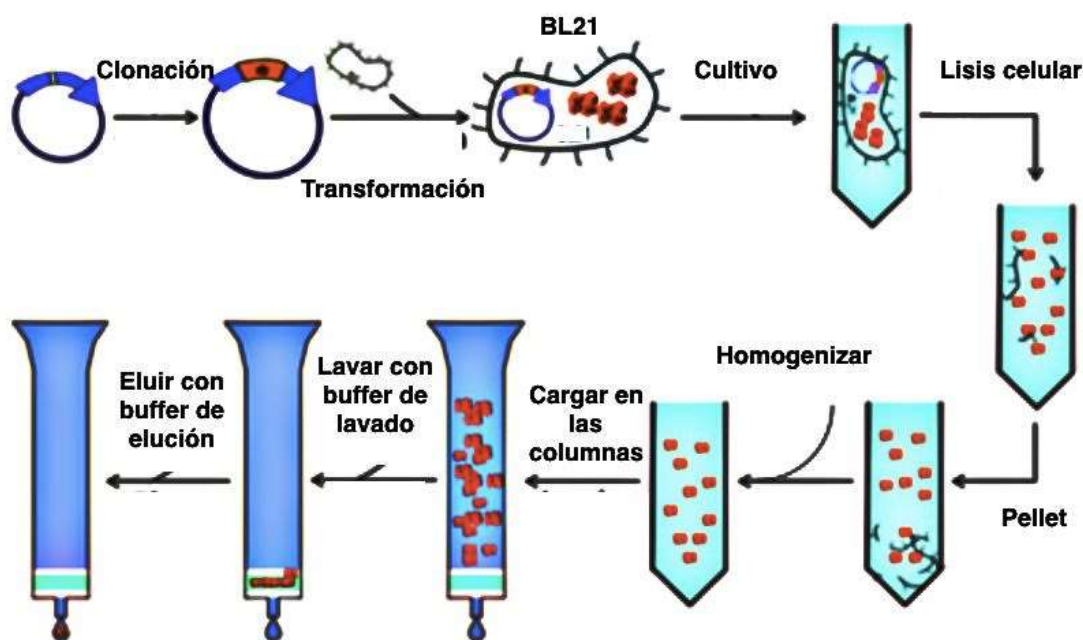
1. Proteínas recombinantes. Se define como aquella proteína que es sintetizada en un organismo diferente al organismo que la produce en la naturaleza (Guerrero *et al.*, 2004). La producción de proteínas recombinantes en sistemas microbianos ha revolucionado el mundo de la bioquímica y biotecnología. En escalas industriales la producción de proteínas recombinantes permite su caracterización bioquímica, uso en procesos industriales y el desarrollo de productos comerciales como lo son los kits de detección de enfermedades. De forma teórica la producción de proteínas recombinantes requiere de algunos pasos relativamente sencillos. Se requiere seleccionar un gen de interés, clonarlo en un vector de expresión para proteína, transformar a la bacteria hospedera, inducción de la expresión del gen, extraer y purificar la proteína para su posterior caracterización (Figura 13). Sin embargo de forma práctica decenas de factores pueden interferir en la producción de proteínas, por ejemplo la recepción del vector por parte de la cepa hospedera, formación de cuerpos de inclusión, inactivación de la proteína, pérdida o degradación, problemas con la purificación, y muchos más (Rosano y Ceccarelli, 2014).

Por lo que para la producción de proteína recombinante BipA (BipAr), se utiliza ampliamente. *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3). Dentro de las ventajas de utilizar esta cepa como hospedero podemos mencionar que tiene una mayor velocidad de crecimiento que las levaduras y células de mamíferos; es de fácil manipulación genética, y existen gran variedad de vectores de expresión estables (García *et al.*, 2013). En este caso el vector de expresión utilizado es una cepa de *E. coli*, en donde se sabe que la proteína recombinante puede acumularse de dos formas, biológicamente como proteínas solubles o como cuerpos de inclusión. (Bornhorst, 2010).

Es importante mencionar que las proteínas recombinantes pueden ser expresadas en el espacio intracelular, sin embargo, la expresión puede ser controlada para que la proteína se exprese en el espacio periplásmico. Cuando las proteínas se acumulan en el espacio intracelular pueden ser depositadas en forma de cuerpos de inclusión, que simulan ser una

forma insoluble de proteína, sin actividad biológica. Sin embargo el aislamiento de cuerpos de inclusión suele ser trabajoso y complejo (GE, 2011).

**Figura 13:** Diagrama procedimiento producción de proteína recombinante y purificación



(Adaptado de Abgenex, s. f.)

2. Bacterias. Utilizando las bacterias transgénicas, se pretende inducir la producción de la proteína BipA, proteína inmunogénica de *Borrelia*. Es importante realizar el estudio y la caracterización de posibles perros infectados con *B. turicatae* para determinar un tratamiento a seguir. Además, actualmente en Guatemala no hay estudios sobre las infecciones generadas por *B. turicatae*, por lo que es importante generar información sobre este tipo de enfermedades tropicales desatendidas.

a. Cepas bacterianas. *E. coli* es una de las bacterias ampliamente utilizada en la biotecnología. En el caso de la producción de proteína recombinante puede ser seleccionada como hospedero del vector de expresión. La cepa BL21 (DE3) ha sido modificada genéticamente para poder producir proteínas en ella. Esta cepa tiene una deficiencia de proteasas Lon, que ayuda a evitar la degradación de proteínas extrañas por parte del hospedero. Además, cuenta con una mutación que inhibe las proteasas OmpT, las

cuales son utilizadas para degradar proteínas extracelulares, gracias a esta mutación se evita que durante el proceso de lisis para extraer la proteína ésta se degrade. Su genotipo es B F- *ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS)* (Shiloach, *et. al.*, 1996). Además, esta cepa ha sido comercializada ampliamente por la tasa de eficiencia de transformación que presenta,  $1 \times 10^8$  ufc/ $\mu$ g, por lo que para comparar la eficiencia de las transformaciones realizadas experimentalmente puede utilizarse la ecuación 1 y con esto se debe calcular el rendimiento de transformación final por medio de ecuación 2.

**Ecuación 1:** Tasa de transformación

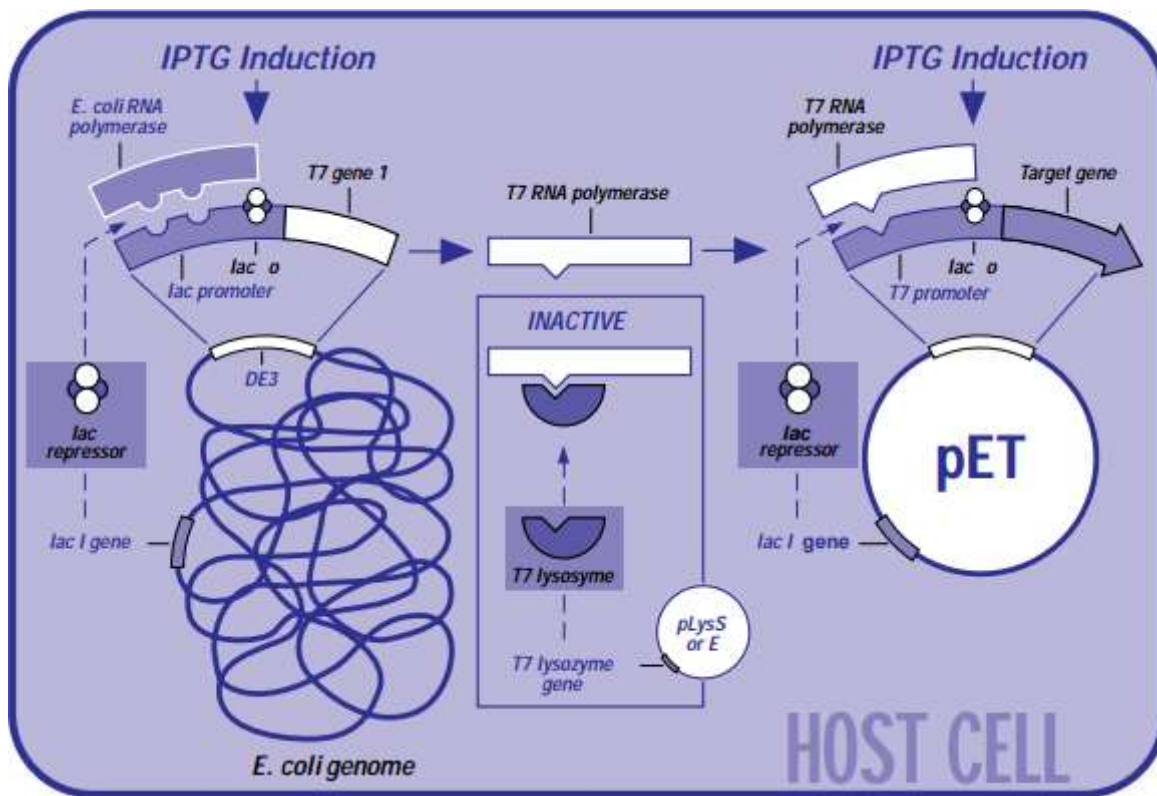
$$\frac{\# \text{ de colonias}}{10 \text{ pg ADN transformado}} \times \frac{10^6}{\mu\text{g}} \times \frac{300 \mu\text{L células transformadas}}{X \mu\text{L sembrados en placa}} = \frac{\# \text{ transformadas}}{\mu\text{g de ADN del plásmido}}$$

**Ecuación 2:** Porcentaje de rendimiento transformación

$$\frac{\text{Valor experimental}}{\text{Valor teórico}} * 100 = \text{porcentaje de rendimiento}$$

b. Inducción. Utilizando un inductor como IPTG, la ARN polimerasa T7 transcribe el ADN controlado por el promotor T7. Esta polimerasa es específica y activa. Si el ARN marcado contiene secuencia codificante con señales de translación, la síntesis de proteína será exitosa. Uno de los problemas de utilizar el sistema de expresión por T7 es que la polimerasa esta tan activa que pequeños niveles pueden inducir expresión sin presencia del inductor (Studier, 2005). Para reducir expresión basal se coloca el operon *lac* downstream de sitio de inicio de promotor T7, creando un promotor T7*lac*. El represor *Lac* se une al operador e interfiere con el establecimiento de elongación de complejo de la polimerasa, este recude el ARN mensajero producido (Studier, 1990).

**Figura 14:** Elementos de control de sistema pET



(Novagen, 1999).

c. Lisis celular. El proceso de lisis celular es un paso muy importante para la producción de proteína recombinante. En este se obtiene el producto de interés realizando un rompimiento de células bacterianas que contienen la proteína. Por medio de la lisis se rompe cualquier barrera como la membrana y pared celular. Es de suma importancia que esta proteína liberada mantenga actividad biológica para su posterior purificación y uso. La lisis celular se basa en el rompimiento de fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. El fundamento de este procedimiento es someter a estrés a una bacteria y desestabilizar las fuerzas mencionadas para que se dé un rompimiento adecuado de la célula y obtener proteína recombinante (GE, 2011).

1) Lisis mecánica. Uno de los distintos métodos de lisis es la lisis mecánica y esta permite liberar proteína recombinante producida. Es efectiva en romper la membrana

externa de la bacteria. Dentro de este método se encuentra la sonicación que se utiliza para purificaciones de escala pequeña. La formación de calor durante este proceso es su principal desventaja debido a que esta causa desnaturalización de proteína. Para esta también se utiliza prensa francesa, este lisa la célula aplicando el fundamento de presión en la célula, seguida de una descompresión, lo que causa la ruptura de la pared celular (Worrall, 1998).

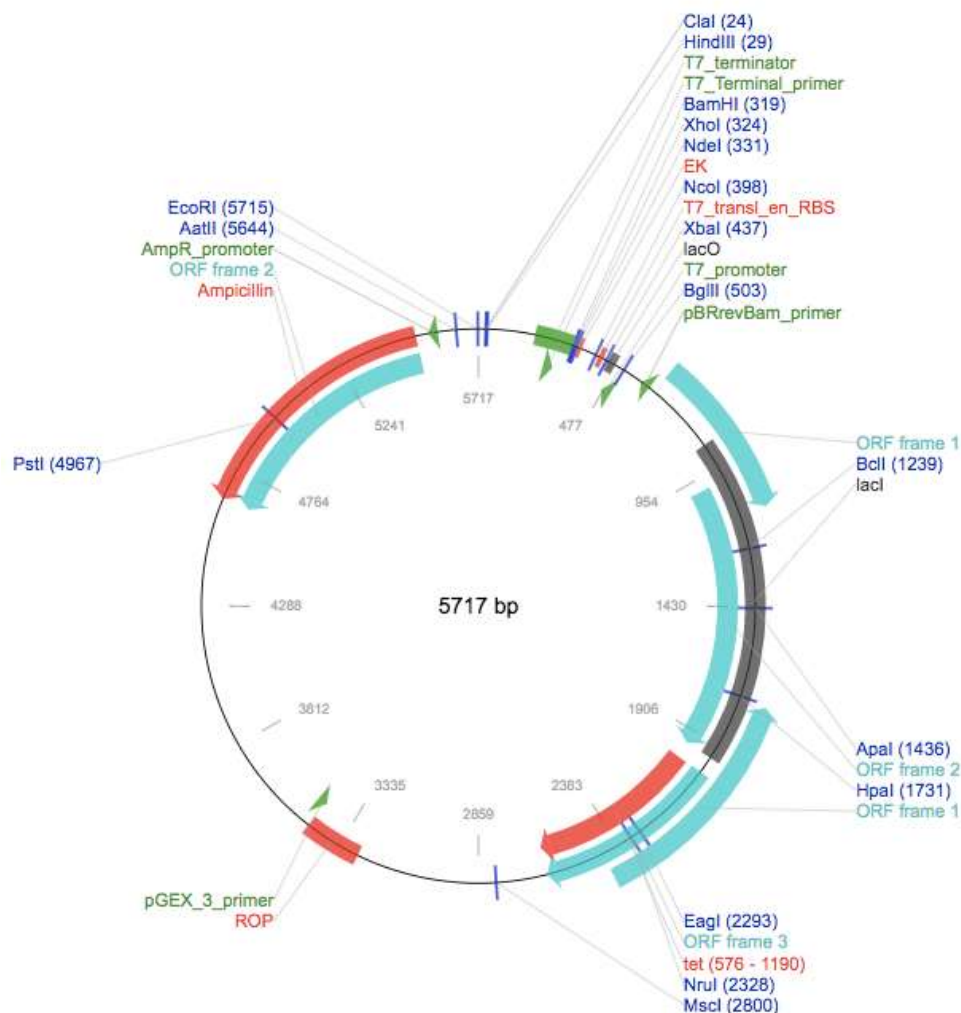
2) Lisis enzimática. Para esta metodología se utilizan enzimas líticas que tienen la capacidad de liberar proteína recombinante de bacteria. Se fundamenta en la estructura de la pared celular y la complejidad de esta. En bacterias Gram-negativa la pared es más propensa a enzimas líticas. La lisis enzimática utiliza la actividad de lisoenzima que se une a uniones glucosídicas de polisacáridos en la pared celular de bacterias (Salazar y Asenjo, 2007).

#### d. Métodos de transformación

1) Choque térmico. El procedimiento de transformación es una técnica en la cual una célula adquiere ADN libre presente en el medio. Este puede ser de manera natural o inducido en laboratorio. Para este procedimiento se necesitan condiciones específicas como lo son bacterias competentes en las que pared y membrana celular formen poros que permitan el ingreso del ADN de interés a la célula. Uno de estos métodos es el choque térmico, el cual se basa en desestabilizar la membrana por medio de cambios de temperatura, en los que se debe calentar las células y luego someterlas a temperatura baja. (Birge, 2013). Se utiliza un ambiente rico en calcio, con el fin de contrarrestar la repulsión electrostática entre el ADN del plásmido y la membrana celular bacteriana (Li *et al.*, 2007).

Las células deben ser tratadas con cloruro de calcio, ya que las membranas son permeables a los iones cloro, cuando estos entran en el citoplasma se induce que el agua ingrese y las células se hinchen. La temperatura provoca la formación de poros por los cuales ingresa el ADN libre a la célula (Fernandez, 2015).

3. Vectores de expresión. Para la expresión de proteínas se pueden utilizar plásmidos. Estos son elementos extracromosomales de tamaño finito que pueden presentarse de forma natural en las bacterias (Vivian *et al.*, 2001). Generalmente los plásmidos le confieren a las bacterias ventajas genéticas como la resistencia antibiótica. Como parte de la biotecnología, estos han sido utilizados como herramientas para clonar y transferir genes de un organismo a otro transformándolo. Cuando la bacteria hospedera del vector se divide el plásmido contenido dentro de la célula se copia generando células hijas con el plásmido integrado, por lo en ingeniería genética son un buen medio para copiar fragmentos de ADN en grandes cantidades (Nature, 2014). Dadas las diversas aplicaciones de los plásmidos existen varios tipos. Sin embargo, como el fin de esta investigación es producir proteínas recombinantes se puede utilizar el vector pET19b. Este plásmido cuenta con resistencia a ampicilina y contiene un promotor de lactosa que sirve para la inducción de genes, además cuenta con un marcaje de histidina, como se observa en la Figura 15, lo cual lo hace un buen vector de genes proteínicos. Se puede observar que el plásmido cuenta con un promotor T7 que es ampliamente utilizado para la la expresión de proteínas recombinantes. En este sistema, el gen de interés se clona detrás de un promotor reconocido por la ARN polimerasa del fago T7 este se encuentra bajo el control transcripcional de un promotor *lac* que puede ser inducido con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) que es un análogo no hidrolizable de la alolactosa para inducir la expresión génica.

**Figura 15:** Mapa del plásmido pET19b

(Abgenex, s.f.)

4. Sistemas de purificación. La purificación de la proteína es uno de los pasos más importantes, ya que es el paso que determina la pureza de la proteína obtenida. Además este proceso sirve para asegurar la eliminación de posibles contaminantes externos, que pudieran interferir con la caracterización y actividad proteica (Bornhorst, 2010). En los últimos años se ha optado por utilizar marcadores de fusión para la purificación de proteínas. Estos marcadores se unen a la proteína de interés y le confieren afinidad a superficies específicas, las cuales pueden estar cubiertas de metal o molécula de afinidad y de esta forma son reconocidas y purificadas (Young *et al.*, 2012). Cuando la proteína de

interés se encuentra marcada se pueden utilizar técnicas como la cromatografía de afinidad para purificar. En el caso de rGlpQ y rBipA, estas contienen un marcador de poli-histidina en el N terminal y se utiliza una columna cubierta con  $\text{Ni}^{2+}$ . El níquel de la columna inmoviliza la proteína mediante uniones selectivas al ion metálico con carga positiva. Las marcas mencionadas anteriormente son básicamente residuos de poli-histidina que pueden ser colocados en el extremo N-terminal o C-terminal de la proteína, éstos permiten utilizar cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado (IMAC, por sus siglas en inglés) (GE, 2011).

Cuando se realiza la técnica de IMAC para purificar proteínas con un marcaje de histidina generalmente se utiliza el ion  $\text{Ni}^{2+}$ , en el proceso la proteína atraviesa la columna y se forman interacciones iónicas entre el  $\text{Ni}^{2+}$  y la histidina, y gracias a esto la proteína queda retenida en la fase estacionaria mediante una solución tampón de unión. Luego se eluye la proteína con una solución tampón de elución, y se recolecta la proteína producida. Ambas soluciones tampón están hechas a base de imidazol, que es un intermediario de la síntesis de la histidina el cual se usa para evitar que se unan otras proteínas no marcadas con histidina a la columna. El imidazol a bajas concentraciones es utilizado principalmente en el tampón de unión con el fin de evitar la unión de proteínas del hospedero. Por lo tanto, la concentración de imidazol debe ser optimizada para asegurar el mejor equilibrio de alta pureza (baja unión a proteínas de la célula huésped), y alto rendimiento (fuerte unión de la proteína diana marcada con histidina) (GE Healthcare, 2014). El rendimiento de la purificación depende del volumen utilizado por lo que en el Cuadro 3 se muestra un aproximado (GE, 2011).

**Cuadro 3:** Rendimiento de la purificación de proteínas recombinantes

<b>Proteína</b>	12.5 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	1 mg	10 mg	50 mg
<b>Volumen del cultivo</b>	5ml	20ml	400ml	4 L	20 L
<b>Volumen del lisado</b>	0.5ml	1ml	20ml	200ml	1000ml

Adaptado de GE, 2011.

## 5. Sistemas de cuantificación.

a. Método DC. Para poder trabajar con muestras proteínicas es de suma importancia determinar la concentración de la proteína de interés, de tal forma que se obtiene un valor numérico capaz de indicar si la concentración de la proteína entra dentro de los valores aceptados. Esto permitirá trabajar únicamente con muestras de la proteína concentrada y así no se generarán malos resultados. El método DC es un ensayo colorimétrico que permite determinar la concentración de proteína por medio de solubilizarla en un detergente. Este ensayo alcanza 90% de su máximo cambio de coloración en 15 minutos. El ensayo se basa en la reacción de proteína con tartrato de cobre alcalino y reactivo de Folin. Se da la coloración por una reacción con aminoácidos tirosina y triptófano y en menor proporción cisteína e histidina. La proteína genera reducción del reactivo de Folin por pérdida de 1-3 átomos de oxígeno, esto hace que especies reducidas tengan coloración azul y con absorbancia en 750 nm y mínimo de absorbancia en 405 nm (Group, 2013).

b. Absorción ultravioleta. La cuantificación y determinación de proteínas tiene distintas funciones como evaluar actividad enzimática o determinar concentración de proteína desconocida. Los métodos conocidos para determinar esta concentración se basan en utilizar la absorbancia de algunos aminoácidos. Uno de estos métodos es absorción ultravioleta (UV) a 280 nm. A esta longitud de onda, distintos aminoácidos absorben como es el caso de aminoácidos con anillos aromáticos. El triptófano y tirosina son los que mayormente contribuyen a la absorbancia a esta longitud de onda, mientras que fenilalanina contribuye en menor proporción. Este método cumple con la ley de Beer-Lambert que indica que absorbancia es proporcional a la concentración y tamaño de celda (Pace *et al.*, 1995).

6. Sistemas de detección. Existen varios métodos para separar y analizar las proteínas, sin embargo hay algunos que sobresalen por su eficiencia y facilidad de empleo. Por lo que a continuación se presentan algunos de los métodos mayormente utilizados en la separación y detección de proteínas.

a. SDS PAGE. La electroforesis es un método comúnmente utilizado en la separación y visualización de las proteínas. Este procedimiento se fundamenta en el desplazamiento de proteínas cargadas en un campo eléctrico. Este método permite analizar mezclas de proteínas e identificar la proteína de interés dependiendo la masa molecular de la misma. Para realizarlo se utilizan geles formados por polímeros entrecruzados poli(acrilamida). El gel de poli(acrilamida) retrasa el desplazamiento de las proteínas en forma proporcional a su cociente carga/masa. Un método electroforético frecuentemente se utiliza para estimación de la pureza de la proteína, mientras que para la masa molecular se utiliza el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS). Este detergente tiene la peculiaridad de unirse a la mayoría de proteínas en una relación proporcional a la masa molecular de las mismas, dándoles carga negativa, lo que permite que su migración dependa de su masa. Además, al utilizar este detergente la conformación terciaria de una proteína cambia conformacionalmente, por lo que la proteína se despliega y logra migrar en el gel (Nybo, 2012).

Usos comunes del SDS PAGE (BioRad y Laboratories, 2012):

- Estimar el tamaño de una proteína
- Determinar el número de subunidades de la proteína
- Estimar la pureza de una proteína
- Cuantificar proteínas
- Monitorear la integridad de una proteína
- Analizar la calidad de un extracto proteico
- Electroforesis desnaturante SDS PAGE: este tipo incluye agentes reductores,

desnaturantes y caótopos. Cuando las proteínas se solubilizan con detergentes aniónicos se produce la ruptura de las interacciones hidrofóbicas y se desnaturiza la proteína. Al estar desnaturizada la proteína adquiere forma de bastoncillo con algunas moléculas de SDS cargadas de forma negativa en la cadena polipeptídica. Los complejos de SDS-proteína tienen una relación constante de carga/masa. Esto hace que cuando migren del cátodo al ánodo se separan acorde a su tamaño a una velocidad relacionada con la masa molecular. En este tipo de electroforesis se usan otros agentes reductores como el 2-mercaptoetanol, el cual reduce los puentes disulfuro de las proteínas, y caótopos, que rompen puentes de hidrógeno. De esta forma se puede garantizar la disociación de la

proteína y la pérdida de la conformación secundaria de la misma para así poder atravesar el gel y migrar respecto al peso de la proteína y el contenido de la misma (Maldonado-Alconada y Jorin-Novo, 2001).

- Electroforesis nativa: en este tipo de electroforesis las proteínas migran sin ser desnaturalizadas con lo cual la migración está relacionada a la carga, tamaño y forma de la proteína. Este tipo de electroforesis es comúnmente utilizada para encontrar la masa molecular de proteínas en su estado nativo, así como para investigaciones de proteómica (Fiñana, 2001). Los geles usados tienen un pH de 8.8, por lo que las proteínas con un punto isoeléctrico menor a 8.5 y cargadas negativamente van a migrar a través del gel de resolución (Nybo, 2012).

7. Verificación de la estabilidad de la proteína recombinante. En la mayoría de los casos la actividad biológica debe de ser retenida después del proceso de purificación. Mantener la actividad biológica de la molécula puede ser más factible cuando se realiza un buen procedimiento de purificación. Las proteínas por lo general contienen un alto grado de estructura terciaria por lo que se mantienen unidas mediante fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas e hidrófobas y enlaces de hidrógeno. Sin embargo, si las proteínas recombinantes son sometidas a condiciones de estrés se pueden desestabilizar estas uniones, lo cual puede causar la desnaturalización y / o precipitación. Algunas proteínas requieren coenzimas o cofactores para ser activos, además cuando se trata de proteínas de membrana pueden necesitar lípidos de su ambiente natural para mantener su estructura nativa. Los péptidos contienen un bajo grado de estructura terciaria, por lo que su estado nativo está compuesto en su mayoría de estructuras secundarias, estabilizadas principalmente por enlaces de hidrógeno. Por esta razón, los péptidos toleran una gama mucho más amplia de condiciones que las proteínas (GE, 2011).

Para obtener una proteína recombinante estable es necesario tomar precauciones en algunos de los pasos de la producción:

- Lisado de bacterias: es un paso crítico, pues hay que utilizar condiciones óptimas para maximizar la lisis celular y aumentar la fracción de la proteína recombinante extraída, a su vez hay que reducir al mínimo la oxidación de proteínas, la proteólisis no deseada y contaminación de la muestra con el ADN genómico (Graslund *et al.*, 2011).

- La lisis mecánica puede ser realizada por homogenización, ultrasonido o por procesos de congelación y descongelación con lisozima. Es importante que la solución tampón de lisis contenga una fuente fosfato de 50 a 100 mM o HEPES, así como una fuerza iónica alta que puede provenir de NaCl 300-500Mm para mejorar la solubilidad y estabilidad de la proteína (Graslund *et al.*, 2011).

- También es importante agregar inhibidores de proteasas como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, por sus siglas en inglés) o floruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Así como un agente que evite la oxidación de la proteína, por ejemplo Tris (2-carboxietil) fosfina clorhidrato (TCEP) (Graslund *et al.*, 2011).

## **B. EXPRESIÓN DE ARN**

1. ARN. El ácido ribonucleico (ARN) es un polímero de ribonucleótidos monofosfato unidos mediante enlaces fosfodiéster. Los monómeros del polímero de ARN pueden ser de cuatro tipos: adenina, uracilo, guanina y citosina. La presencia del ribonucleótido uracilo es una de las características que lo diferencian del ácido desoxirribonucleico (ADN). El ARN es un ácido nucleico de una sola hebra (presente en organismos eucariotas y procariotas) sintetizado por una ARN polimerasa a partir de una plantilla de ADN (doble hebra). Este proceso es conocido como transcripción. Posteriormente el ARN sintetizado (transcrito) sirve como plantilla para que se sintetizen proteínas mediante el proceso de traducción. Existen diferentes tipos de ARN que cumplen con diferentes funciones dentro de la célula. El tipo de ARN más prevalente es el ARN ribosomal (ARNr) que, en conjunto con otras 70 proteínas, forma la estructura de los ribosomas necesarios para la traducción. El ARN de transferencia (ARNt) transporta aminoácidos a los ribosomas durante el proceso de traducción, permite la elongación de la cadena de aminoácidos para sintetizar la proteína. El ARN mensajero (ARNm), menos abundante pero más diverso que los anteriores, dirige el proceso de traducción porque sirve de plantilla para el ribosoma durante la síntesis de proteínas, por lo cual se puede decir que el ARNm determina el perfil de expresión y fenotipo de la célula. Es de gran utilidad estudiar el ARN, ya que permite conocer los genes que se están expresando en una célula en un determinado momento, así como la localización de dichos genes y la presencia de

intrones (regiones del ADN que no codifican para ninguna proteína y que son eliminadas luego de la transcripción mediante el proceso de “splicing”). Cabe resaltar que el estudio del ARN permite llevar a cabo el proceso de traducción *in vitro* y la síntesis de ADN complementario (cDNA por sus siglas en inglés) (Farrell, 2005).

a. Extracción de ARN. Los métodos para extraer ARN requieren de muestra con material genético, ya sea en organismos vivos o conservados. Los métodos varían según el tipo de ARN y pureza del aislado que se desee. Sin embargo, a pesar de sus diferencias, todos los métodos se basan en una serie de pasos necesarios para lograr la extracción del ARN. El primer paso consiste en la lisis celular, para lograr esto se utilizan diversos reactivos que generan perturbación en la membrana celular. La lisis se puede llevar a cabo de dos maneras diferentes, según el tipo de “buffer” de lisis que se utilice. Un tipo de “buffers” de lisis conocidos como “buffers” caotrópicos, interrumpen completamente la membrana celular e inhiben a las ribonucleasas (ARNasas) que pueden degradar las moléculas de ARN. Algunos ejemplos de químicos de los “buffers” caotrópicos son: dodecil sulfato de sodio (SDS), urea, fenol y cloroformo (Farrell, 2005).

b. Validación de calidad del ARN extraído. Es necesario evaluar la integridad y pureza del ARN extraído de manera que se obtengan resultados exitosos en los procedimientos posteriores. Esto también es necesario teniendo en cuenta que la mayoría de las técnicas en las que se utiliza son caras y los reactivos no deberían desperdiciarse en un material que no es funcional (Farrell, 2005). Existen diversos métodos y técnicas utilizados para evaluar la calidad del ARN los cuales se presentarán a continuación. Sin embargo, se recomienda que al finalizar la extracción y purificación del ARN siempre se realice una electroforesis para evaluar su pureza e integridad. Si el ARN se encuentra almacenado, también se recomienda realizar una electroforesis para evaluar su calidad y determinar si no está degradado (Farrell, 2005).

1) Electroforesis. La técnica de electroforesis permite la separación de las moléculas según su tamaño al ser expuestas a un campo eléctrico (Lodish *et al.*, 2005). La separación de muestras de ARN eucariota revela dos bandas que son características, la del ARNr 28S y la del ARNr 18S (avanza más en el gel que el 28S por ser más pequeño). Las bandas se observan fácilmente porque el ARNr es la especie de ARN más abundante dentro

de la célula (80-85% del ARN total). También es posible observar la banda del ARNm de menor intensidad (3% del ARN total), esta banda avanza diferentes distancias según el tamaño de sus transcritos. El ARNt y otras especies menores de ARNr (5S y 5.8S) suelen movilizarse en el frente de la corrida y suelen viajar hasta las partes más inferiores del gel (Farrell, 2005).

La claridad de las bandas y su definición pueden aportar información. Si las bandas no están definidas es probable que el ARN haya estado expuesto a ribonucleasas que provocaron su degradación. El ARN degradado se visualiza como un barrido continuo en el gel (sin bandas definidas) y suele acumularse en la parte inferior del mismo. También es posible que el barrido continuo de ARN en el gel signifique que el ARN no se desnaturalizó adecuadamente cuando se calentó antes de iniciar la electroforesis. Además, el barrido podría significar que el ARN no se disolvió adecuadamente en el “buffer” o que se encuentra muy concentrado. Los geles comúnmente utilizados (de agarosa y poliacrilamida) no son desnaturalizantes. Sin embargo, es posible agregar agentes desnaturalizantes a la muestra de manera que se facilite la separación según el tamaño del ARN y su interpretación. La muestra de ARN no debe poseer ningún detergente o sales ya que estas sustancias pueden impedir que el ARN penetre el en gel o que se separe adecuadamente (se observa un barrido continuo) (Farrell, 2005).

Si la muestra de ARN no fue separada exitosamente del ADN, se podría observar en el gel las bandas de ADN por encima de las bandas del ARN. En este caso es importante eliminar el ADN antes de cuantificar la concentración de ARN antes y antes de hacer una PCR para amplificar a partir de ARN. Para asegurarse que la muestra no se contamine con ARNhs se recomienda incubar con ARNasas (enzimas que degradan el ARNsh) (Farrell, 2005).

Los dos materiales más utilizados para preparar los geles de electroforesis son la agarosa y la poliacrilamida, la decisión de cuál de estos utilizar dependerá del tamaño del ARN que se desea separar y la resolución con la que se desee hacerlo. Para separar ARN de tamaño pequeño (aprox. 500 pares de bases) se recomienda utilizar un gel de poliacrilamida (3-20 % p/v) que tiene un tamaño de poro menor que el del gel de agarosa, lo cual le da mayor capacidad de resolución. Para separar muestras de ARN de mayor

tamaño o una muestra con gran diversidad de tipos de ARN lo mejor es utilizar un gel de agarosa (1-1.2 % p/v). Los agentes desnaturalizantes más comunes para trabajar con geles de agarosa son el formaldehído y la mezcla de glioxal con dimetil sulfóxido (DMSO). En el caso de los geles de poliacrilamida, los agentes desnaturalizantes más utilizados son la formamida (50 % p/v) y la urea (2M) (Farrell, 2005).

Para poder visualizar las bandas del ARN se pueden utilizar compuestos como: bromuro de etidio, “SYBR Green”, “SYBR Gold”, “GelStar”, plata, naranja de acridina y azul de metileno. En esta ocasión, las bandas se visualizarán utilizando “SYBR Green”. El “SYBR Green” es un tinte fluorescente que pertenece a la familia de las cianinas y se adhiere fácilmente a los ácidos nucleicos, en especial y con más fuerza a los de doble hebra (mayor fluorescencia). Lo característico de este tinte es que presenta fluorescencia (a 300nm) únicamente cuando se encuentra unido al ácido nucleico de la muestra. Su fluorescencia óptima ocurre a un pH básico y en presencia de Tris (Farrell, 2005).

2) Espectrofotometría ultravioleta. La espectrofotometría con luz UV se puede utilizar para cuantificar la concentración y pureza de los ácidos nucleicos (Roca *et al.*, 2004). Es importante determinar la concentración de los ácidos nucleicos ya que muchos procesos posteriores se ven influenciados por este factor (Farrell, 2005). Los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta, su espectro de absorción (230-320 nm) tiene absorción máxima en 260 nm para ARN (Roca *et al.*, 2004). La concentración de los ácidos nucleicos se puede calcular a partir de la absorbancia registrada, utilizando las siguientes ecuaciones.

**Ecuación 3:** Concentración del ARN según la absorbancia de la muestra

$$[ARN] \frac{\mu g}{mL} = A_{260} \times dilución \times 40.0$$

Dónde:

$$A_{260} = \text{absorbancia a 260 nm}$$

$$dilución = \text{factor de dilución (generalmente 200 – 500)}$$

$$40.0 = \text{coeficiente promedio de extinción del ARN}$$

(Farrell, 2005)

**Ecuación 4:** Concentración del ADN según la absorbancia de la muestra

$$[ARN] \frac{\mu g}{mL} = A_{260} \times dilución \times 50.0$$

Dónde:

$$A_{260} = \text{absorbancia a 260 nm}$$

$$dilución = \text{factor de dilución (generalmente 200 – 500)}$$

$$50.0 = \text{coeficiente promedio de extinción del ARN}$$

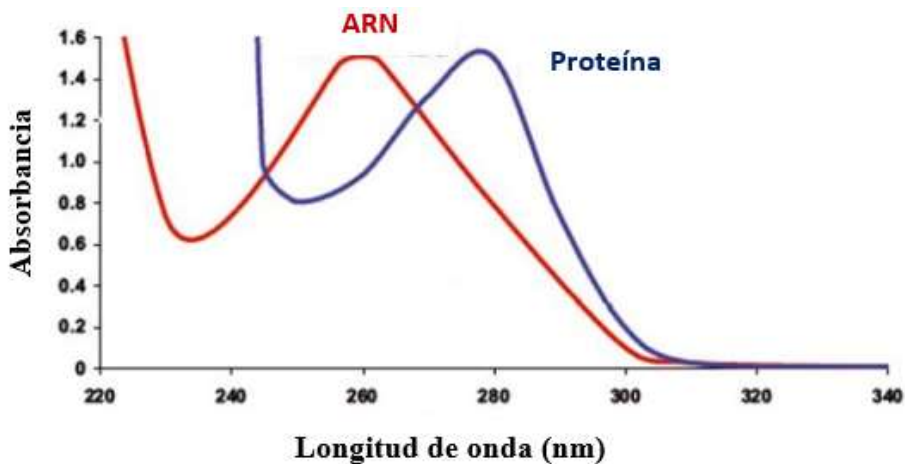
(Farrell, 2005)

Para determinar la pureza de la muestra se pueden establecer razones de comparación de absorbancias a longitudes de onda específicas. Existen dos razones que se deben medir:  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ . A 280 nm se mide la absorbancia de las proteínas en la muestra, lo recomendable es que la razón  $A_{260}/A_{280}$  para el ARN sea de  $2.0 \pm 0.1$  y para el ADN sea  $1.8 \pm 0.1$ . Si se obtiene una baja razón  $A_{260}/A_{280}$  por lo general indica que la muestra tiene contaminación de proteínas (Roca *et al.*, 2004). En ese caso hay que eliminar las proteínas contaminantes usando el siguiente proceso: 1) se disuelve la muestra de ARN o ADN en 100-200  $\mu$ L de agua estéril libre de nucleasas; 2) se extrae la muestra una vez con 100-200  $\mu$ L de una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1); 3) se extrae la muestra una vez con 100-200  $\mu$ L de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y 4) se vuelve a precipitar el ácido nucleico de interés para que esté más concentrado.

El ARN permanecerá en la fase acuosa, el ADN estará presente tanto en la fase orgánica como en la interfase y las proteínas se encontrarán específicamente en la interfase. Para evitarse este proceso, que aparte de ser trabajoso representa el riesgo de que la muestra se contamine con nucleasas, lo mejor sería realizar una extracción extra con fenol: cloroformo durante el proceso de aislamiento. Por otro lado, la medición de la absorbancia a 230 nm demuestra la presencia de otros contaminantes en la muestra. Por lo cual una razón  $A_{260}/A_{230}$  baja indica que la muestra está contaminada, probablemente con guanidinio proveniente del proceso de aislamiento u otra sustancia. El valor recomendable para la razón  $A_{260}/A_{230}$  es entre 2.0 y 2.4 (Farrell, 2005).

Al realizar la medición de absorbancia en el espectrofotómetro se deben tomar en cuenta varias recomendaciones para obtener las mejores mediciones posibles. En primer lugar, la muestra se debe diluir antes de realizar la medición; usualmente es adecuada una dilución 1:200 o 1:500 (Farrell, 2005). Segundo, procurar siempre realizar la medición de la absorbancia utilizando la misma celda de cuarzo o celda plástica que permita medir en el espectro ultravioleta (Roca *et al.*, 2004). Tercero, diluir la muestra en “buffer” de fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1-5 mM) o en “buffer” TE. Esto debido a que dichos “buffers” permiten que la muestra se encuentre en un rango de pH de 7.5 a 8.5. El pH puede influir en la medición de la absorbancia y puede afectar la exactitud de las mediciones realizadas a 260 y 280 nm. Se ha demostrado que dichas mediciones son más confiables cuando se realizan en el rango de pH mencionado y, por ende, no se recomienda diluir en agua ya que ésta suele tener un pH más ácido (alrededor de 6) (Wilfinger, Mackey y Chomczynski, 1997). Cuarto, evaluar la absorbancia de la muestra en un rango de longitudes de onda y no solo en las tres longitudes de onda mencionadas. La gráfica de la medición de absorbancias en el rango de 230 a 320 nm debe observarse como una campana con un nivel máximo de absorbancia a 260 nm (Figura 16). La absorbancia a 230 nm no es cero, pero sí lo es a 320 nm por lo que la curva no debe iniciar pero sí terminar en el cero (Farrell, 2005).

**Figura 16:** Espectro de absorción del ARN. La absorción máxima ocurre a 260 nm, antes de este punto la absorción va en aumento y después de dicho punto decrece hasta llegar a cero alrededor de 320 nm. La absorbancia máxima para las proteínas es en 280 nm



(Farrell, 2005)

c. PCR de tiempo real. La PCR se puede definir como la «amplificación enzimática de secuencias específicas de ADN genómico o de ADNc mediada por “primers”» (Saiki *et al.*, 1985). Permite obtener en pocas horas miles de copias de una secuencia de interés, por lo cual es útil en el estudio de: mutaciones genéticas, actividad transcripcional de células y tejidos, ciencia forense, enfermedades infecciosas, relaciones ontológicas entre familias de genes, relaciones genéticas entre organismos de diferentes especies, entre otros. Sin embargo, utilizar la PCR tiene desventajas como: 1) la secuencia objetivo debe estar bastante limpia y pura para que los “primers” utilizados puedan unirse a ella con eficiencia; 2) la reacción solamente funcionará si se utilizan los “primers” adecuados (requiere conocimiento previo sobre secuencia de interés); 3) todos los componentes de la reacción deben estar optimizados de manera que se amplifique únicamente la secuencia de interés y no otras regiones del ADN y 4) el producto de PCR suele ser mucho más pequeño que la plantilla original (Farrell, 2005).

Se requiere de varios componentes para llevar a cabo una PCR. En primer lugar, es necesario contar con dos “primers” que muestren cierto grado de complementariedad con la secuencia de interés. Cada uno de estos “primers” debe unirse a una de las hebras de ADN desnaturizado de forma que sus extremos 3’ estén uno frente al otro. El producto de PCR consistirá en toda la secuencia de ADN que se encuentra flanqueada por los extremos 5’ de ambos “primers” (Figura 17). Para promover la amplificación de ambas hebras de la secuencia blanco del ADN con la misma frecuencia, es importante asegurarse de añadir la misma concentración de ambos “primers” a la reacción de PCR (Farrell, 2005).

**Figura 17:** Secuencia de interés es flanqueada por los extremos 5’ de ambos “primers”



(Elaboración propia)

Generalmente se llevan a cabo entre 25-30 ciclos de la reacción de PCR para lograr amplificar la secuencia de interés en cantidades exponenciales. Cada uno de los ciclos de reacción consta de tres etapas que difieren principalmente por la temperatura utilizada (Farrell, 2005). Las tres etapas son:

- Desnaturalización: el ADN de la muestra es desnaturalizado (se separan las dos hebras). Además, se elimina cualquier estructura secundaria que pudiera haberse formado en los “primers”. Generalmente se lleva a cabo a una temperatura en un rango de 94-96°C (Farrell, 2005).
- Unión de “primers” a la secuencia de interés: los “primers” utilizados se unen a sitios complementarios en el ADN de la muestra (anillamiento). El éxito de esta etapa depende de que la temperatura de anillamiento no sobrepase la temperatura de fusión ( $T_m$  por sus siglas en inglés que hacen referencia a *melting temperature*) de los dos “primers”. De tal forma que se evite que los “primers” se degraden y ya no puedan unirse al ADN. Generalmente dicha temperatura se encuentra en un rango de 50-68 °C (Farrell, 2005).
- Extensión de la secuencia: se extiende la secuencia de interés mediante la unión de nucleótidos a partir de los “primers” que se unieron previamente al ADN de la muestra. Esta etapa generalmente se lleva a cabo a temperaturas entre 68-72°C (Farrell, 2005).

Un “primer” es una secuencia corta de ADN de hebra simple que ha sido diseñada de manera artificial según el interés del investigador (Farrell, 2005). Las características principales de un “primer” exitoso para la PCR son:

- Una sola hebra (Farrell, 2005).
- Secuencia corta de 20 a 25 pares de bases (pb) (no mayor a los 30 pb). El tamaño del “primer” depende directamente de la secuencia que se desea amplificar. Se puede utilizar la siguiente ecuación para conocer cuál sería el tamaño más adecuado para que el “primer” solamente reconozca la secuencia del interés y no cualquier otra parte del genoma del organismo (Farrell, 2005).

**Ecuación 5:** Tamaño adecuado de un “primer” según la especie

$$Y = 4^x$$

Dónde:

Y = el tamaño del genoma de organismo

X = el tamaño del “primer”

4 = el número de posibles nucleótidos que pueden formar el “primer”

(Farrell, 2005)

- Un grupo 3'-OH libre para que la ADN polimerasa pueda añadir nucleótidos en dicho extremo (Farrell, 2005).
- Complementario a la secuencia de interés que se desea amplificar (completamente o en cierto grado) (Farrell, 2005).
- La última base, y en algunos casos también la penúltima, del extremo 3' debe unirse con bastante afinidad a la plantilla de interés para asegurar que la ADN polimerasa pueda llevar a cabo la extensión sin ningún problema. Las bases terminales del extremo 5' no necesitan estar unidas a la secuencia de interés (Farrell, 2005).
- Tener un contenido GC entre 40-60 % (no mayor del 50 %) para evitar la formación de estructuras internas como “hairpins” (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Esto debido a que la unión entre la citosina y la guanina depende de la formación de tres enlaces de hidrógeno por lo que es más resistente que la unión entre adenina y timina que únicamente depende de dos (Farrell, 2005). Además es poco común encontrar en la naturaleza un organismo que posea un contenido GC mayor al 50% en su ADN. Además, a las polimerasas de ADN se les dificulta amplificar regiones con un alto contenido GC (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).
- No debe tener regiones internas complementarias para evitar la formación de “hairpins” que evitarían que los “primers” se unan a la plantilla de ADN (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).
- Evitar repeticiones en la secuencia del “primer” porque esto disminuye la especificidad del mismo (Farrell, 2005).
- Evitar que los dos “primers” que se estén utilizando posean regiones complementarias entre sí ya que esto podría provocar la formación de dímeros de

“primers”. En especial, evitar las regiones complementarias en el extremo 3’ de ambos “primers” ya que a partir de dicho extremo ocurre la adición de nucleótidos. Si los extremos 3’ de ambos “primers” son complementarios se amplificaría el dímero de “primers” y no la secuencia de interés (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Por eso se recomienda no incluir más de dos guaninas o citocinas en el extremo 3’ del “primer” (Farrell, 2005).

Se recomienda utilizar una pareja de “primers” cuya temperatura de anillamiento no difiera entre sí por más de  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  ya que esto podría resultar en la unión no específica de los “primers” al ADN y la amplificación de solamente una de las hebras de la secuencia de interés (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). La temperatura de anillamiento se refiere a la temperatura necesaria para promover la unión o hibridización específica de los “primers” al ADN de la muestra (Jiménez, 2003). Es la temperatura en la que el 50% de los “primers” de la reacción se encuentra unido al ADN (Farrell, 2005). Generalmente dicha temperatura se encuentra en el rango de  $55\text{-}80^{\circ}\text{C}$  (Vanden, 1997). Para calcular la temperatura de anillamiento de un “primer” se puede utilizar la siguiente ecuación:

**Ecuación 6:** Temperatura de anillamiento de un “primer”

$$Tm = 2^{\circ} (A + T) + 4^{\circ} (G + C)$$

Dónde:

Tm = temperatura de anillamiento

A = adenina

T = timina

G = guanina

C = citosina

(Farrell, 2005)

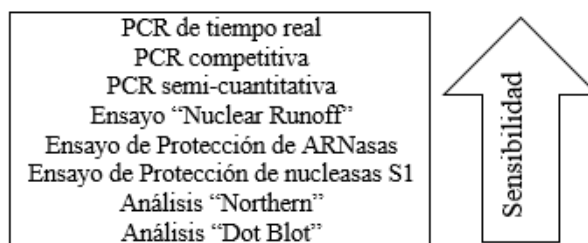
Se recomienda utilizar esta fórmula solamente para “primers” que tengan entre 11-28 pb. Si la temperatura de anillamiento utilizando la fórmula es mayor a  $68^{\circ}\text{C}$  no se debe considerar confiable el resultado (Farrell, 2005).

- Se pueden añadir otras secuencias al extremo 5’ del “primer” para que el producto de PCR posea un extremo “colgante” de interés que no interfiera con la síntesis de

la secuencia. Por ejemplo, puede ser la secuencia de un promotor de transcripción, un promotor de secuenciación, un sitio de restricción (para el uso de enzimas de restricción) entre otros (Farrell, 2005).

La PCR se utiliza para amplificar una secuencia de interés a partir de una plantilla, pero si se realiza una PCR tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés), además de amplificar una secuencia se puede cuantificar la cantidad de plantilla inicial que existía en la muestra, en este caso nos interesa una plantilla de ARN. Además de la qPCR, existen diversas técnicas de cuantificación del ARN que poseen sensibilidad variable, por lo tanto, al utilizar cada una de estas se pueden obtener diferentes resultados. Cada técnica se puede utilizar por separado, pero es recomendable utilizar más de una técnica para obtener resultados más confiables (Farrell, 2005). En la Figura 18 se observa el nivel de sensibilidad para las técnicas utilizadas en la cuantificación del ARN, en donde se puede observar que la técnica más sensible es la qPCR.

**Figura 18:** Sensibilidad relativa de diversas técnicas de cuantificación del ARN



(Farrell, 2005)

El científico Higuchi introdujo la PCR de tiempo real en el año 1992 basándose en la cuantificación de los productos a medida que éstos se van acumulando. Entre los materiales y el equipo necesario para realizar una qPCR a diferencia de una PCR convencional, se encuentran: 1) un termociclador equipado con un dispositivo que provoque excitación de fluorescencia y una cámara acoplada a un dispositivo de carga y 2) un reactivo fluorescente para marcar los productos amplificados. En una qPCR se cuantifican los productos según el incremento en la fluorescencia y los datos obtenidos son comparados con una curva de calibración (Farrell, 2005). Entre los beneficios que ofrece esta técnica sobre la técnica tradicional se pueden mencionar (Farrell, 2005):

- Se requiere de menos tiempo para obtener los resultados.
- Mejor rendimiento.
- La mayoría del proceso ocurre de forma automatizada.
- Se lleva a cabo en un sistema con tubos cerrados (evita contaminación y variaciones por transporte o manipulación de las muestras).
- Mayor rango de cuantificación (de seis a ocho órdenes de magnitud).
- El software puede llevar a cabo análisis complejos de manera instantánea conforme se lleva a cabo la reacción.
- Se puede determinar la masa del transcrito de ARN original (utilizado como plantilla) durante la fase de amplificación exponencial del ADNc.

Anteriormente se utilizaba el bromuro de etidio para marcar los productos y llevar a cabo la detección basada en un intercalador fluorescente (aumento de fluorescencia corresponde a aumento de productos de PCR). Sin embargo, la efectividad del bromuro de etidio como marcador fluorescente era limitada porque este compuesto fluoresce tanto en su forma unida como libre y es capaz de unirse a productos inespecíficos de la reacción. El problema de la especificidad se resolvió con el uso de una sonda marcada con dos fluorocromos que se une a la secuencia de interés delimitada por los “primers” sentido y contrasentido (Livak *et al.*, 1995). Luego surgió un compuesto más confiable conocido como “SYBR Green” que también se une a productos específicos y no específicos, pero solamente presenta fluorescencia al estar unido al ADN de doble hebra. Esto indica que a medida que se sintetizan más productos de PCR, aumenta el nivel de fluorescencia (Figura 19) (Farrell, 2005).

**Figura 19:** Acumulación de la fluorescencia al aumentar el número de ciclos de PCR



(Farrell, 2005)

El análisis de los resultados de una qPCR incluye el cálculo del ciclo límite ( $C_T$ , por “threshold cycle”). El  $C_T$  se refiere al punto en el que la emisión de fluorescencia de la muestra es 10 veces mayor (o el número de veces que el investigador establezca) que la fluorescencia de fondo. Este punto se alcanza cuando existe una relación lineal entre la masa de la plantilla utilizada y la acumulación del producto de PCR. Entre mayor sea la cantidad del ADN o ARN utilizado como plantilla, el  $C_T$  se alcanzará más rápido (Farrell, 2005).

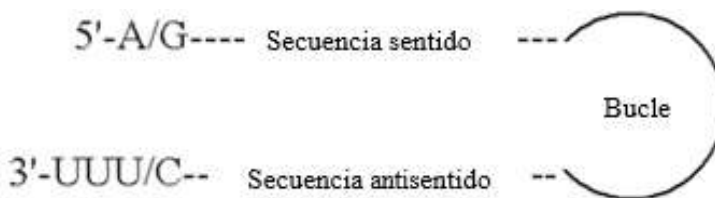
d. Clonación de secuencias de interés. La clonación es un proceso que se realiza con el fin de obtener una copia idéntica de un gen, una célula o incluso un organismo completo (Cohen, 2002). Uno de los métodos de clonación más utilizados es el sistema de clonación TA. Este sistema se aprovecha de que la Taq ADN polimerasa coloca una adenina extra en el extremo 3' de cada una de las hebras sintetizadas durante una PCR. Esto permite unir el producto de PCR (representa la secuencia a clonar), a un vector que posea una timina en cada uno de sus extremos 3', de tal forma que la timina se hibridice con la adenina. Esto induce la ligación del vector con el producto de PCR mediada por la ligasa T4 (Farrell, 2005).

e. Sistemas de Expresión de ARNi. El ARNi puede funcionar como ARN de interferencia (ARNi) para silenciar la expresión de genes específicos. Este mecanismo se basa en que el ARNi producido posee una secuencia homóloga a la secuencia del ARNm del gen que se desea silenciar en un organismo. De manera que cuando ocurra la unión de dichas secuencias homólogas se degrade el ARNm y no se pueda llevar a cabo la traducción de esa proteína. Para la expresión del ARN de interferencia (ARNi), primero se debe diseñarlo. Al diseñar un ARNi efectivo contra el blanco de interés, es necesario contar con la secuencia codificante del ARNm o del gen completo a silenciar. Hay que tener en cuenta que si se trabaja con la secuencia del gen completo, se debe conocer qué partes de la secuencia serán removidas por “splicing” y qué regiones pertenecen a las que no se traducen (UTRs, por sus siglas en inglés); ya que se recomienda no diseñar el ARNi en estas regiones (Correa *et al.*, 2008). Además, si el blanco a silenciar es una variante de expresión específica es vital saber si la variante se da por splicing alternativo o por un alelo específico.

Cuando ya se conoce la secuencia del gen a silenciar, se debe escoger una secuencia corta, preferiblemente de un tamaño aproximado de 400 pb. La secuencia que se escoja, debe ser específica para el gen a silenciar, ya que, si esta es conservada y parece en otras regiones, el ARNi junto con el complejo RISC, silenciarán a varios genes además del gen blanco y no se obtendrá el fenotipo esperado. Es importante considerar las bases de datos de siARN o miARN para encontrar ARNi que ya han sido evaluados de forma experimental. Estas secuencias se podrían adquirir comercialmente y evitar el proceso de diseño (Correa *et al.*, 2008).

Al utilizar vectores, se puede clonar en su interior una región que contenga la secuencia de ARNi seguida por una secuencia espaciadora, la secuencia de ARNi antisentido y un terminador rico en timinas (T- al transcribirse será una región rica en uracilos). La secuencia espaciadora permitirá formar una estructura de “hairpin” al transcribir la región, dando así como resultado la formación del ARN de doble hebra (Figura 20) (Bozzoni *et al.*, 2011). También es posible introducir en dos regiones de expresión (en un mismo plásmido o en plásmidos separados) la secuencia codificante de la hebra guía de ARNi y en otro la secuencia complementaria. Los ARNi generados de esta forma permanecen en la célula un mayor tiempo pero son menos efectivos que los miARN (Correa *et al.*, 2008). Una tercera opción consiste en introducir la secuencia codificante del ARNi flanqueada por dos promotores de la ARN polimerasa T7 (proveniente del bacteriófago T7); los promotores están situados en los extremos 3’ de cada hebra. En este caso se generan dos moléculas de ARN complementarias que se unen para formar ARNdH (Timmons y Fire, 1998).

**Figura 20:** Estructura de un “hairpin”



(Bozzoni *et al.*, 2011)

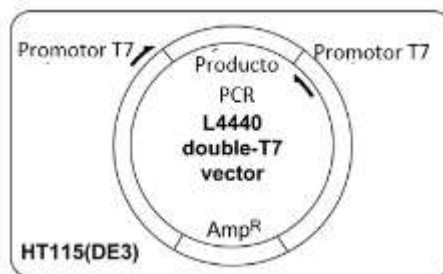
2. Bacterias transgénicas para la expresión de ARN de interferencia. Debido a la facilidad de mantenimiento, reproducción y crecimiento de las bacterias, éstas son

organismos ideales para utilizar como fuentes de producción de ciertas moléculas. Para lograr esto se debe introducir un fragmento de ADN que codifica para la producción del ARNi de interés, generalmente mediante transformación, de tal forma que se obtiene una bacteria transgénica productora de ARNi (Prats, 2005).

a. Cepas bacterianas. Una de las especies de bacterias más utilizadas para la transformación es *Escherichia coli* ya que las pueden transformar una gran variedad de plásmidos. Sin embargo, este tipo de bacterias presentan dos barreras de transformación: no son naturalmente competentes para la transformación y presentan la enzima exonucleasa V (degrada ADN de doble hebra lineal e impide la replicación del círculo rodante). Sin embargo, es posible que adquieran competencia en presencia de calcio, al activar una ruta metabólica que conduce a la síntesis de PHB (Poli-3-hidroxibutirato). O bien pueden suprimir la deficiencia de recombinación con el gen *sbcB*. Por otro lado, la exonucleasa V se puede inhibir con la presencia de genes *recB* y *recC*. Es por eso que la mayoría de cepas de *E. coli* utilizadas en transformación son *recB*, *recC* y *sbsB* (Birge, 2013).

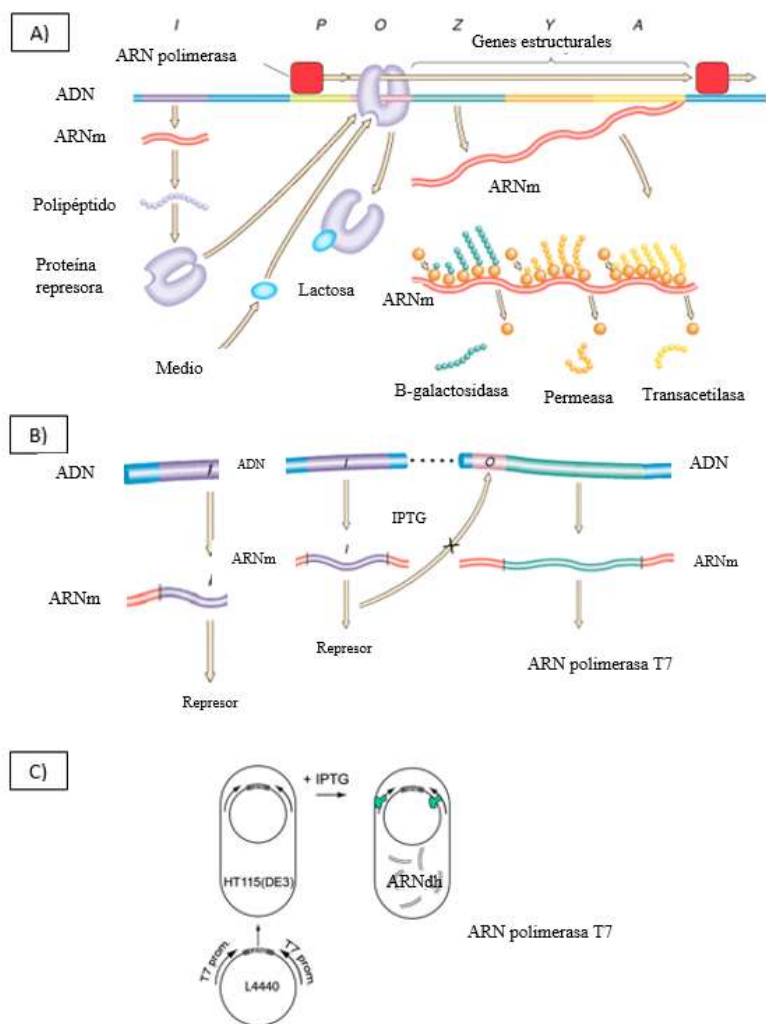
Se utilizará la cepa de *E. coli* HT115 (DE3) porque posee la capacidad de producir ARNi en grandes cantidades, es ideal para administración de ARNi a otros organismos y crece rápido en placas de agar LB y 2XYT. Además, su manipulación no es peligrosa (nivel de bioseguridad 1). Su genoma se puede describir de la siguiente manera: *F-*, *mcrA*, *mcrB*, *IN(rrnD-rrnE)1*, *rnc14::Tn10(DE3 lysogen: lavUV5 promoter -T7 polymerase)*. Entre las características más importantes de la cepa se encuentran: resistencia a tetraciclina (Tet<sup>r</sup>), no tiene la ARNasa III (no destruye fragmentos de ARNdh) y la expresión de la ARN polimerasa T7 está bajo control de un promotor lac modificado. Cuando la ARN polimerasa T7 viral se expresa en presencia de un plásmido con dos promotores T7, uno a cada extremo del inserto (Figura 21), permite la transcripción de este en ambas direcciones, generando una cadena de ARNm complementaria a la otra. La modificación del promotor lac le confiere la capacidad de producir ARNi en un momento específico; en presencia de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) se modifica al represor del promotor para que no se una al promotor y permita la transcripción del operón para producir la ARN polimerasa T7 (Figura 22). El IPTG asemeja a la alolactosa (metabolito de lactosa) responsable de la activación de la transcripción del operón lac (Source BioScience, 2012).

**Figura 21:** Plásmido con dos promotores de ARN polimerasa T7



(National Science Foundation, 2007)

**Figura 22:** A) Mecanismo de acción del operón lac, B) Mecanismo de acción del promotor lac para controlar expresión de ARN polimerasa T7 y C) Mecanismo de expresión de ARNi en cepa *E. coli* HT115 (DE3)



(National Science Foundation, 2007).

La cepa *E. coli* NOVA BLUE de NOVAGEN es una cepa ideal para la clonación previa a la utilización de *E. coli* HT115 (DE3) que no posee ningún sistema de confirmación de clonación exitosa. *E. coli* NOVA BLUE es una cepa de alta eficiencia de transformación que facilita la estabilidad del plásmido y realización de tamizaje por sistema de coloración azul-blanco. Su genoma se puede describir de la siguiente manera: *endA1* *hsdR17* ( $r_{K12}^- m_{K12}^+$ ) *supE44* *thi-1* *recA1* *gyrA96* *relA1* *lac F'*[*proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup>*lacI*<sup>q</sup>*ZΔM15::Tn10*] (Tet<sup>R</sup>). Entre las características importantes de esta cepa se pueden mencionar: tiene endonucleasas deficientes (*endA1*); son deficientes en la recombinación (*recA1*) lo cual mejora la estabilidad del ADN clonado; no pueden destruir el ADN clonado por la acción de la endonucleasa EcoK (*hsdR17*) y tiene el represor del operón de lactosa mutado de forma inducible (*lacI*<sup>q</sup> *ZΔM15*) lo cual permite el sistema de coloración azul-blanco (Merck Millipore, 2016).

Se pueden usar otras especies bacterianas para ser transformadas e inducir la producción de ARNi. Por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*. Sin embargo, solo *S. pneumoniae* tiene la misma eficiencia de transformación que *E. coli* (0.05 transformantes por cada célula viable) (Birge, 2013).

Es posible utilizar diversas cepas para evaluar el proceso de clonación de insertos; una de estas cepas es la *E. coli* JM109 de Promega. Esta cepa es una cepa ideal para la clonación previa a la utilización de *E. coli* HT115 (DE3) que no posee ningún sistema de confirmación de clonación exitosa. *E. coli* JM109 es una cepa de alta eficiencia de transformación con vectores pGEM y diversos métodos de transformación. Es altamente utilizada para la producción de ADNsh. Cuenta con el sistema de tamizaje de clonación por coloración azul-blanco por complementación. Su genoma se puede describir de la siguiente manera: *endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* ( $rk^-$ ,  $mk^+$ ), *relA1*, *supE44*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), [*F'* *traD36*, *proAB*, *lacI*<sup>q</sup>*ZΔM15*]. Entre las características importantes de esta cepa se pueden mencionar: tiene endonucleasas deficientes (*endA1*) que mejoran el rendimiento de la extracción de plásmido; son deficientes en la recombinación (*recA1*) lo cual mejora la estabilidad del ADN clonado; tiene resistencia a ácido nalidíxico y *ccdB* (*gyrA96*); no es capaz de producir su propia tiamina (*thi*); no pueden destruir el ADN clonado por la acción de la endonucleasa EcoK (*hsdR17*) y tiene el represor del operón de

lactosa mutado de forma inducible (*lacIq ZΔM15*) lo cual permite el sistema de coloración azul-blanco (Promega, 2016a).

f. Métodos de transformación. Para facilitar la transformación de bacterias en el laboratorio, existen diversos métodos que varían en cuanto a facilidad, eficiencia y costo. Entre los métodos más comunes para transformar bacterias se encuentra el choque térmico y la electroporación.

1) Choque térmico. La transformación es un proceso en el cual un determinado tipo de célula capta ADN libre presente en el medio. Este fenómeno puede suceder de manera natural o puede ser provocado en condiciones de laboratorio. Es necesario que las bacterias sean competentes, es decir, que la pared y membrana celular formen poros que permiten el ingreso del ADN en la célula. El método de choque térmico desestabiliza la membrana celular, mediante cambios abruptos de temperatura (Birge, 2013). Primero se calientan las células rápidamente y luego se enfrían. Para que el choque térmico sea efectivo, se requiere que las células se traten previamente con  $\text{CaCl}_2$ . Lo que sucede es que las membranas son permeables a los iones de cloro ( $\text{Cl}^-$ ), cuando estos entran al citoplasma, inducen que el agua entre también y las células se hinchan. Cuando se realiza el choque térmico a  $42^\circ\text{C}$ , la temperatura alta permite la formación de poros temporales que dan acceso al ADN hacia el interior de la célula (Pattinson y Pattinson, 2015). La transformación realizada mediante choque térmico necesita de un ambiente rico en calcio, esto con el fin de contrarrestar la repulsión electrostática entre el ADN plásmido y la membrana celular bacteriana (Li *et al.*, 2007).

2) Electroporación. Este método utiliza una corriente de alto voltaje para permitir la entrada del ADN a la célula. La electroporación es altamente efectiva en bacterias Gram negativas y menos efectiva en las Gram positivas (Dower *et al.*, 1988). Cuando el alto voltaje (hasta 2,500V) pasa a través de las células, se generan daños en las membranas. Algunas células mueren en este proceso, mientras otras sobreviven y se quedan con estos daños que generan poros en la membrana; lo cual facilita la entrada más rápida y de fragmentos más grandes de material genético. Sin embargo, estos daños en las membranas se arreglan rápidamente y los poros quedan sellados nuevamente. Es por eso que se requiere que el ADN esté en altas concentraciones alrededor de las células para aumentar la

probabilidad de que entre al momento de que se generen los poros (Birge, 2013). La efectividad de la electroporación depende de la fuerza del campo eléctrico y de la longitud del pulso (Dower *et al.*, 1988).

g. Genes de interés. A continuación, se describe el gen de interés a silenciar (*BOL*) mediante ARNi en *An. albimanus*. No se conoce con certeza el momento exacto de expresión de dicho gen durante el ciclo de vida de *An. albimanus*. Sin embargo, existe evidencia de que la expresión de la mayoría de genes involucrados en la espermatogénesis de *An. gambiae* se activa durante el cuarto estadio larvario (Krzywinska y Krzywinski, 2009). Además, se presenta información acerca de otro gen de espermatogénesis conocido como “Zero Population Growth” (*ZPG*), ya que el megaproyecto al cual pertenece este trabajo tiene como objetivo evaluar ambos genes. El presente trabajo, como ya se ha mencionado antes, se enfoca en el gen *BOL*; por lo cual los resultados se centran en dicho gen. Sin embargo, en algunas ocasiones se incluyen resultados de *ZPG* para facilitar el análisis. Todos los resultados paralelos para el gen *ZPG* se encuentran en el módulo complementario “Desarrollo de metodologías para el silenciamiento del gen “Zero Population Growth” (*ZPG*) de machos de *Anopheles albimanus* mediante el uso de ARN de interferencia” presentado por María Natalia Flores Ramos (Flores Ramos, 2016). La información presentada del gen *ZPG* en esta sección, fue extraída en su totalidad sin modificaciones (texto literal) del trabajo antes mencionado.

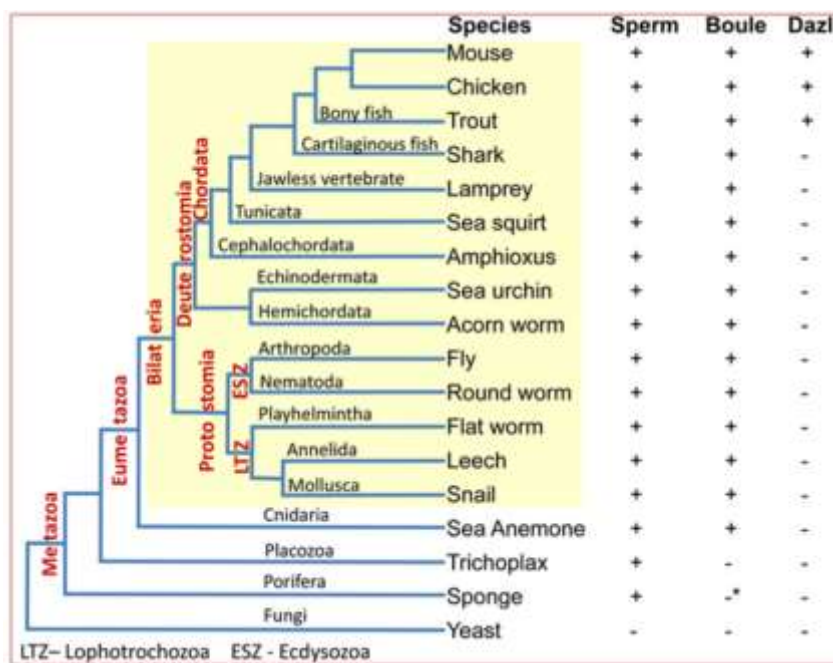
1) *BOL*. El gen *BOULE* también conocido como *BOL* codifica para una proteína específica de reproducción. *BOL* es el miembro más ancestral de la familia de genes conocidos como *DAZ*, familia que se ha utilizado ampliamente para estudiar la evolución de la separación del sexo y reproducción. Este gen tiene una expresión sesgada ya que se expresa mayoritariamente en los machos y específicamente en los testículos (Shah *et al.*, 2010).

Los mosquitos de *Anopheles* presentan este gen. En estudios anteriores con otras especies, se ha observado que la pérdida de la función del gen *BOL* genera la infertilidad de los machos debido a un arresto global del desarrollo de los espermatozoides. Lo cual sugiere el interesante descubrimiento que el gen *BOL* es vital para la gametogénesis de los

espermas en el macho (Shah *et al.*, 2010). Es importante mencionar que si bien *BOL* es esencial para la espermatogénesis, no parece ser esencial para la gametogénesis en la hembra (Ruggiu *et al.*, 1997).

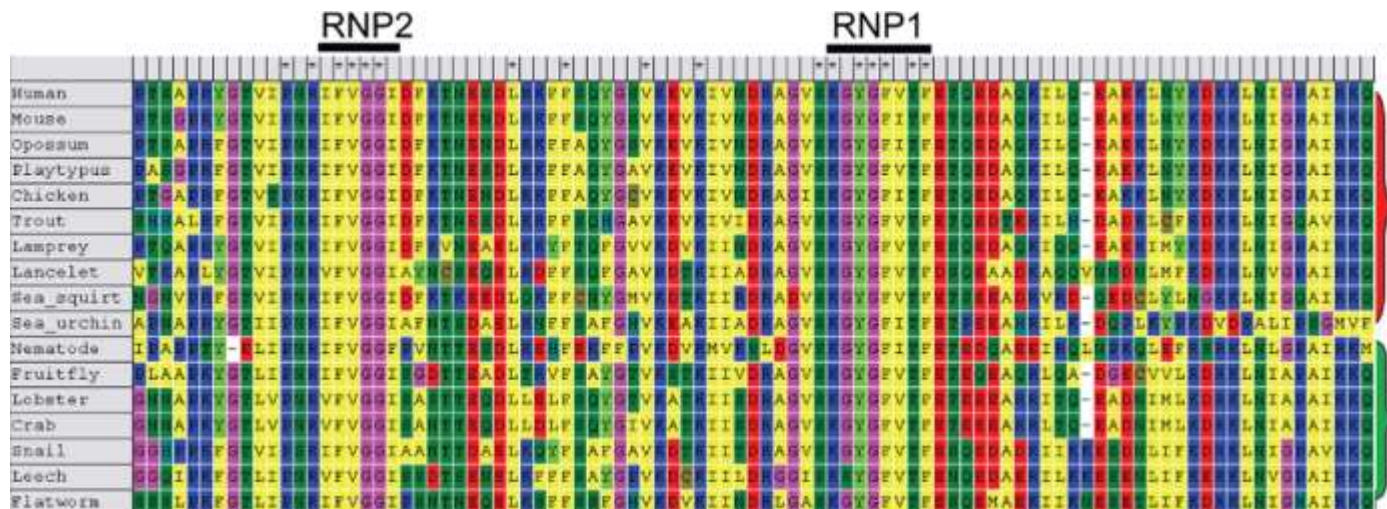
Este gen tiene homólogos en varias especies, incluso es conservado en mamíferos. Sin embargo, el gen *BOL* ha evolucionado de forma adaptativa a cada especie que lo presenta, tal y como se ha observado en otros genes reproductivos. Por consiguiente, es de esperar que la funcionalidad del gen haya divergido entre las diferentes especies de metazoos. En la Figura 23 se puede observar algunas de las especies representativas de los diferentes grupos taxonómicos de los metazoos y observar que en todas las especies analizadas sí está presente el gen *BOL*. A pesar de esto, el gen completo no está conservado, solo se conservan ciertas regiones como el dominio de unión a ARN y el extremo C-terminal (Figura 24) (Shah *et al.*, 2010).

**Figura 23:** Árbol filogenético de la distribución de espermas motiles y presencia de homólogos *BOL* y *Dazl* en los linajes más importantes de animales y hongos. El asterisco (\*) significa aminoácidos conservados en todas las especies, los colores de los aminoácidos



(Shah *et al.*, 2010)

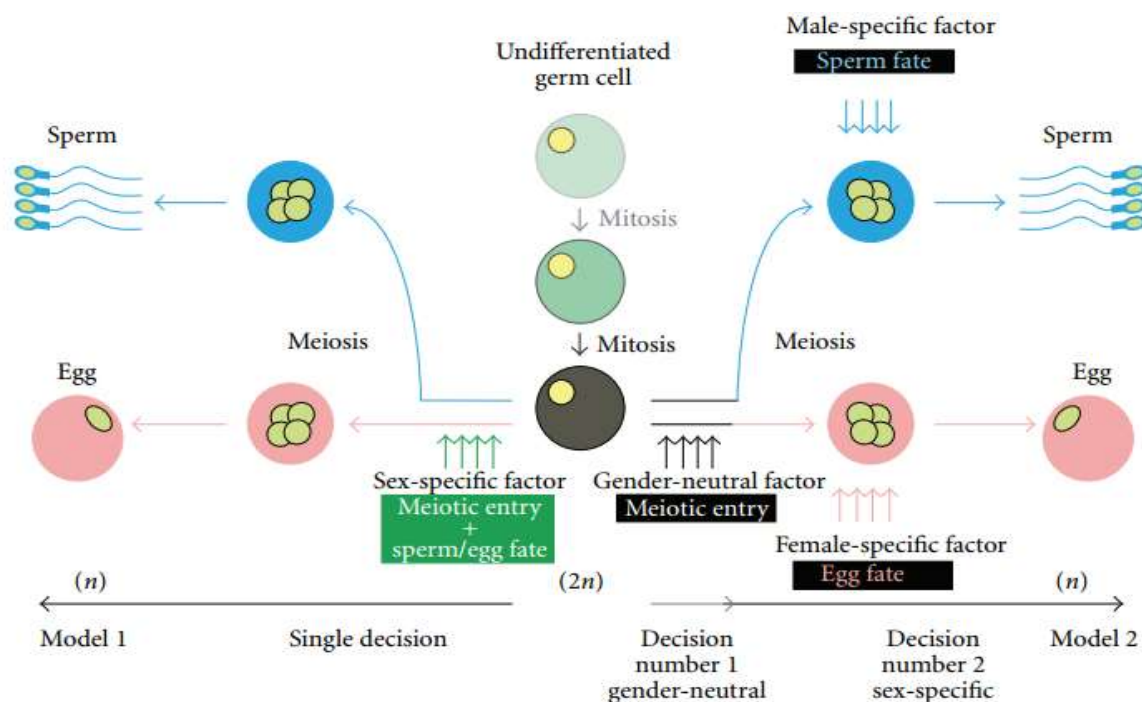
**Figura 24:** Alineamiento de comparación de la secuencia de aminoácidos que corresponde al gen *BOL* en varias especies de Animalia



(Shah *et al.*, 2010)

Para entender la función del gen *BOL* en el desarrollo de los gametocitos hay que considerar dos modelos de diferenciación celular de las células germinales (Figura 25). Ambos modelos toman en cuenta que las células germinales indiferenciadas ( $2n$ ) sufren mitosis hasta llegar a un paso de compromiso. El modelo 1 dice que la célula germinal, en este punto, tomará una única decisión de convertirse en esperma o en ovulo y que para hacerlo sufrirá división meiótica hasta llegar a ser haploide ( $n$ ). El modelo 2, toma en cuenta dos momentos de decisión cruciales; el primero en el cual la célula decide comprometerse a dividirse meióticamente (neutral para género) y el segundo en donde se reciben señales de factores específicos para la diferenciación en gametos de macho o gametos de hembra que al final terminan siendo haploides ( $n$ ). En cualquiera de los dos modelos, el gen *BOL* interferirá en la fase meiótica de los gametos masculinos (Eirín-López, Kulathinal y Marshall, 2011).

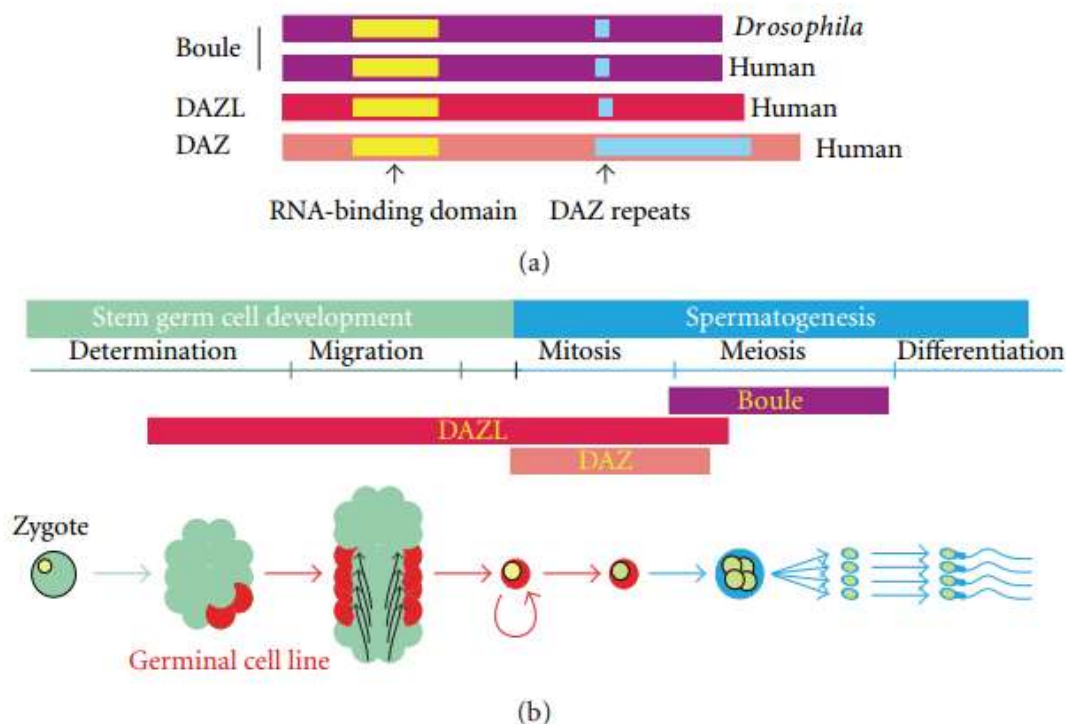
**Figura 25:** Esquema de los dos modelos de decisiones de las células germinales en la gametogénesis



(Eirín-López *et al.*, 2011)

El gen *BOL* comparte un dominio conservado de unión a ARN y un dominio conservado de repeticiones DAZ con otros genes de la familia DAZ en diversas especies (Figura 26 a). En especial la región de RNP-a y RNP-2 son casi iguales en la mayoría de las especies. Su expresión se ha registrado en la etapa meiótica de la espermatogénesis (Figura 26 b). Lo cual lo hace específico para la gametogénesis en machos. Además, al inhibir su función no se ha observado que ningún otro gen complemente su función. *BOL* parece ser un regulador meiótico único, por lo tanto vital, con dominios lo suficientemente conservados para poder realizar una función bastante parecida en muchas especies, pero con suficiente diferencia para haberse especializado en cada una de ellas (Eirín-López *et al.*, 2011). Esto lo hace un gen altamente deseado para el silenciamiento en los mosquitos de *An. albimanus*. Puesto que la secuencia del gen *BOL* en *An. albimanus* tendrá una secuencia completa única para esta especie, con lo cual se reduce el riesgo de diseñar un ARNi no específico, pero al mismo tiempo se aumenta mucho la probabilidad de que esté encargado del desarrollo gametogénico de los machos.

**Figura 26:** (a) Estructura molecular de genes de la familia DAZ y (b) patrón de expresión de estos genes durante la gametogénesis



(Eirín-López *et al.*, 2011).

2) *ZPG*. El gen “Zero Population Growth” (*ZPG*) codifica para una proteína “gap junction” específica de la línea germinal de las células (Tazuke *et al.*, 2002). Aún no se conoce con certeza el momento en el que la expresión del gen *ZPG* se activa en *An. albimanus*. Sin embargo, su nivel de expresión es mayor en los embriones que se encuentran en estado de gástrula (13-15 divisiones mitóticas). El ARNm que codifica para esta proteína se localiza en el extremo superior de dichos embriones (Figura 27). En el caso de *An. gambiae*, la expresión de la mayoría de genes involucrados en la espermatogénesis se activa durante el cuarto estadio larvario (Krzywinska y Krzywinski, 2009).

Se ha identificado que la proteína *ZPG* es una inxina 2 esencial para que ocurra correctamente la ovogénesis y espermatogénesis. Por lo tanto se puede decir que este gen es esencial para mantener la fertilidad en el mosquito macho (Hagen, 2007). En los machos, una mutación nula del gen *ZPG* genera adultos estériles que tienen gónadas pequeñas. Esta

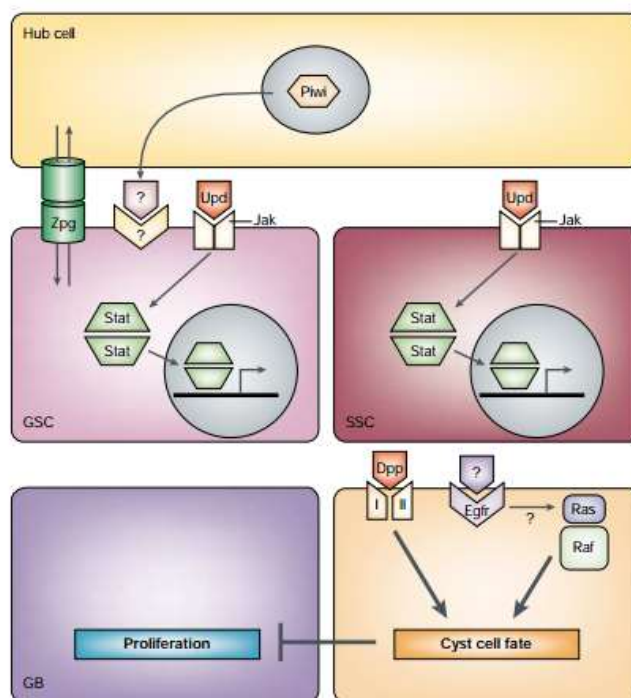
proteína se localiza en la superficie de la espermatogonia, principalmente en los lados adyacentes de las células somáticas (Figura 28). Posiblemente la proteína forme canales que se conectan con otros semicanales de inexitina en células somáticas adyacentes. La comunicación a través de estos canales puede mediar el paso de moléculas pequeñas cruciales o señales entre las células germinales y somáticas requeridas para la supervivencia y diferenciación de las células germinales (Tazuke *et al.*, 2002).

**Figura 27:** Localización del ARNm del gen *ZPG* en el polo posterior de un embrión de *Aedes aegypti*



(Hagen, 2007)

**Figura 28:** Localización de la proteína *ZPG* (inexitina 4) en la interfase entre células germinales de los testículos de *Drosophila melanogaster*



(Lin, 2002)

También se confirmó la importancia del gen *ZPG* para mantener la fertilidad de los mosquitos machos al tratar embriones de *A. gambiae* con ARNi que impedía que el ARNm del gen *ZPG* se tradujera a proteína. Los machos que se desarrollaron bajo este tratamiento no produjeron espermatozoides por lo que, luego de copular con las hembras, se obtuvieron huevos no fertilizados que no eran viables y que no eclosionaron (Thailayil *et al.*, 2011). Se logró el mismo resultado al alimentar larvas de *A. aegypti* con ARNdhs específicos para el gen *ZPG*. En dicho estudio el silenciamiento del gen *ZPG* no produjo porcentajes tan altos de esterilidad en los machos como los producidos por el silenciamiento de otros genes del testículo. Sin embargo, el silenciamiento del gen *ZPG* fue el único que no impidió que el macho transfiriera a la hembra fluidos provenientes de glándulas accesorias para inducir el comportamiento natural de la misma luego de copular. Esto implica que la hembra sí pueda ovipositar los huevos aunque estos no estén fertilizados y que la hembra copula una única vez. Esto último es vital para el éxito de la técnica SIT porque si no la hembra podría copular una segunda vez con un macho estéril y la población del mosquito seguiría aumentando. El silenciamiento del gen *ZPG* no implica que el macho pierda la habilidad para competir con los machos silvestres por copular con una hembra (Whyard *et al.*, 2015).

En *An. albimanus* este gen posee tres exones y una secuencia codificante de 1,170 pb. El ARNm de este gen codifica para una proteína de 389 aminoácidos y tiene una variante de “splicing”. El gen *ZPG* de *An. albimanus* cuenta con 48 ortólogos y seis parálogos (Vector Base, 2015).

## VI. METODOLOGÍA

### A. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DETECCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

1. Diseño, enfoque y tipo de investigación. Este proyecto no es investigación, ya que no pretende responder una pregunta de investigación, sino que su objetivo es la producción de una proteína recombinante que será utilizada para la estandarización de pruebas moleculares para la detección de *Borrelia turicatae* en suero de animal.

2. Variables. A continuación, se explica con detalle la conceptualización y operacionalización de las variables de interés para el presente estudio

**Cuadro 4:** Variables de interés en el presente estudio

Variable	Definición general	Naturaleza	Nivel de medición	Por su interrelación	Unidades de medición
Estabilidad de la proteína	Es el balance neto de las fuerzas, que determinan si una proteína está en su conformación nativa plegada o un estado desnaturalizado.	Cualitativa Cuantitativo	Nominal Intervalo	Dependiente Dependiente	Presencia de proteína Ausencia de proteína
Concentración de inhibidores de proteasas (PMSF)	Moléculas que inhiben la degradación de proteína	Cuantitativa	De intervalo	Razón	mM

Continuación Cuadro 4.

<b>Variable</b>	<b>Definición general</b>	<b>Naturaleza</b>	<b>Nivel de medición</b>	<b>Por su interrelación</b>	<b>Unidades de medición</b>
Temperatura para transformación	Temperatura en grados Celsius óptima para generar poros en la membrana	Cuantitativa	De intervalo	Independiente	Grados Celcius
Temperatura de incubación	Temperatura óptima para que la bacteria crezca.	Cuantitativa	De intervalo	Independiente	Grados Celcius
Concentración de plásmido	La concentración del plásmido es importante para saber eficiencia de transformación	Cuantitativa	De razón	Independiente	ng/ $\mu$ L
Tasa de transformación	Número de clones generados a partir del proceso de transformación.	Cuantitativa	De razón	Dependiente	ufc/ $\mu$ g

Continuación Cuadro 4.

<b>Variable</b>	<b>Definición general</b>	<b>Naturaleza</b>	<b>Nivel de medición</b>	<b>Por su interrelación</b>	<b>Unidades de medición</b>
Pureza de proteína recombinante	El grado en que la proteína es pura (sin contaminación de ADN u otras proteínas) para la cuantificación de la proteína. .	Cuantitativo	Intervalo	Dependiente	Nm
Estabilidad de proteína recombinante durante lisis celular	El grado en que la proteína es estable para la utilización como control.	Cualitativa	Intervalo	Dependiente	Intensidad de bandas.
Concentración del inductor	Concentración de IPTG necesaria para inducir la producción de proteína recombinante.	Cuantitativa	De intervalo	Dependiente	mM

Fuente: Elaboración propia.

### 3. Metodología

a. Transformación de *E. coli* BL21 (DE3) con pET19b GlpQ. La transformación de *E. coli* BL21 DE3 competentes (Novagen, Cat. No. 71335-3) se realizó con el plásmido GlpQ provisto por el Dr. Job López, de Baylor School of Medicine como parte de un trabajo colaborativo. Para esto se descongeló las células bacterianas en una superficie con hielo por 2 minutos. Se agregó 10 ng de ADN del plásmido a 5  $\mu$ L de células de *E. coli* BL21 DE3. Se mezcló de forma manual suavemente y se incubó en hielo por 30 minutos. Luego las células fueron sometidas a shock térmico por 30 segundos a 42°C sin agitar. Inmediatamente se transfirió el tubo a hielo y se agregó 250  $\mu$ L de medio SOC a temperatura ambiente. Se incubó a 37°C por 1 hora con agitación orbital, se vertió de 25 $\mu$ L de producto de transformación en una placa de medio Luria-Bertani (LB) +Amp (50 mg/ml) y se incubó por 24 horas a 37°C (Lopez *et al.*, 2013).

b. Transformación de *E. coli* BL21 (DE3) con pET19b – Bt BipA. La transformación de la cepa competente *E. coli* BL21 DE3 (Novagen, Cat. No. 71335-3) se realizó con plásmido pBipA (proteína de fusión BipA de 75 kDa marcada con tioeredoxina y polihistidinas, insertada en pET 102/Directional TOPO), donado por Job Lopez, de Baylor College of Medicine (Lopez *et al.*, 2013). Para esto se descongeló las células bacterianas en una superficie con hielo por 2 minutos. Se agregó 10 ng de ADN (plásmido BipA) a 5  $\mu$ L de células de *E. coli* BL21 DE3, según instrucciones del fabricante del kit Novagen, Cat. No. 71335-3. Se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 30 minutos. Se sometieron las células a un choque térmico por 30 segundos a 42°C sin agitar. Inmediatamente se transfirió el tubo a hielo. Se agregó 250  $\mu$ L de medio SOB a temperatura ambiente. Se incubó a 37°C por una hora con agitación orbital, se vertió de 100-200 $\mu$ L de producto de transformación en una placa de medio Luria-Bertani (LB) +Amp (50 mg/ml) y se incubó por 24 horas a 37°C.

c. Dilución celular. Se utilizó tubos cónicos Eppendorf, estériles, de 2 mL y se pesaron previamente. En estos tubos se colocó el producto de la expresión de cada plásmido y se centrifugó a 8,000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el botón celular resultante se colocó en hielo. Se pesó el tubo para determinar el peso del botón celular, el cual se diluyó agregando de 5 a 10 mL de tampón

de unión (c.f.) (30 mM imidazol, 0.5 M NaCl y 20 mM fosfato de sodio) por cada gramo de botón celular.

d. Inducción de expresión de proteína recombinante BipAr. Se preparó un cultivo de las células transformadas para cada plásmido. Para esto se preparó un volumen de 5 ml de medio LB +Amp (50 mg/ml) en el que se inoculó una colonia transformada. Se dejó en incubación por una noche con agitación a 220 rpm a 37°C. Posteriormente se midió la densidad óptica a 600 nm (OD600). Dependiendo el OD medido previamente se incubó un nuevo volumen de medio con antibiótico y un inóculo del crecimiento que se dejó por 2 horas para que llegara a un OD600 igual a 0.4. Posteriormente se indujo la expresión con isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactoíranósido (IPTG) (1 mM) según (Lopez *et al.*, 2013). Al cultivo se le agregó 5  $\mu$ L del inductor IPTG (c.f.) (1mM) por mL de medio y se incubó de 2 a 3 horas a 37°C y con agitación a 220 rpm.

e. Lisis enzimática de célula bacteriana. El producto de inducción se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos. Se procedió separar el sobrenadante y botón celular. Esto se almacenó a -70°C. El botón celular y sobrenadante se resuspendieron en 0.75 mL de buffer de lisis (c.f.) (50 mM Tris pH 8.0, Glicerol 10%, 0.1% Triton X-100, 100  $\mu$ g/mL lisoenzima, 1mM fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF, por sus siglas en inglés; stock a 10mM en etanol absoluto), y MgCl<sub>2</sub> 2mM.). Se incubó por 15 minutos a 30°C. Se utilizó baño ultrasónico (Branson, Cat. No. 1-291) y se trataron las muestras 3 veces por 20 segundos hasta que el contenido no tuviera apariencia viscosa. Se agregó ADNasa (Promega 610A) en c.f. 3U y posteriormente se centrifugó a 24,000 g por 20 minutos a 4°C. Se colectó en nuevos tubos de 1.5 mL el botón celular y sobrenadante. Estos se resuspendieron en 0.75 mL de buffer de lisado. Se tomaron 60  $\mu$ L de sobrenadante y botón celular, se agregaron 20  $\mu$ L de buffer de carga (c.f) (Agua desionizada, 0.5M Tris-HCl, pH 6.8, glicerol, SDS 10%(p/v), azul de bromofenol 0.5% (v/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol) (Lopez *et al.*, 2013).

f. Lisis mecánica de célula bacteriana. La lisis mecánica se realizó con los productos de inducción, estos se centrifugaron a 6,000 rpm por 10 minutos. Se separó pellet y sobrenadante y estos se diluyeron en 5 mL de buffer de carga por cada gramo de muestra.

Esto se procedió a congelar en hielo seco y descongelar a 37°C por lo menos 5 veces. Congelamiento eran períodos de 10 minutos, y descongelar por 3 minutos a en un baño maría a 37°C (GE, 2011).

g. Purificación de la proteína BipA. Para la purificación se utilizó una columna de afinidad de sefarosa para la purificación de proteínas recombinantes con cola de histidina HisTrap FF (GE, Cat. No. 17-5319-01). Ésta se llenó con agua destilada ultra pura. Se removió el tapón y se conectó la columna con jeringa para evitar introducir aire al sistema. Se removió la parte final de la columna y se lavó con 3 a 5 volúmenes de agua ultra pura. Posteriormente se equilibró con 5 volúmenes de tampón de unión (c.f.) (30 mM imidazol, 0.5 M NaCl y 20 mM fosfato de sodio) a un flujo de 1 ml/min. Se aplicó la muestra preparada previamente y se lavó con tampón de unión hasta que se obtuvo la fracción deseada. Por último, se lavó con 5 volúmenes de tampón de elución (c.f.) (500 mM imidazol, 0.5 M NaCl y 20 mM fosfato de sodio) y se recuperó la proteína purificada, en un volumen de 2.5ml a los cuales se les agregó PMSF 1Mm e inmediatamente se dividió en alícuotas de 100µl. El resto de la proteína purificada 0.5ml se almacenó en alícuotas de 100µl sin PMSF (GE, 2011).

h. Determinación de la estabilidad de la proteína. La determinación de la estabilidad de la proteína fue realizada mediante SDS-PAGE con un gel de poliacrilamida al 12% p/v. Las muestras fueron tratadas con tampón de Laemmli 3X en relación 1:2 (c.f.) (0.5M Tris-Hcl pH: 6.8, 20% SDS, 100% glicerol, 0.5% p/v azul de bromofenol, 5% p/v β-mercaptoetanol, diluido en agua ultrapura). Luego éstas fueron colocas durante 3 minutos a 95°C para completar la desnaturalización de la proteína. En cada pozo del gel se colocó 10 µL de la muestra tratada. Se usaron 10 µL de la escalera, marca Prestained SDS-PAGE standars Low Range (BioRad, Cat. No. 1610305). Se corrió el gel con tampón de corrida, Tris-Glicina-SDS (c.f) (0.025M Tris, 0.192M glicina, 0.1% p/v SDS, pH: 8.9), por 90 minutos a 100 V en una cámara Bio-Rad Mini-PROTEAN System, (Cat. 1658004) (Lopez *et al.*, 2013).

i. Preparación de solución de tinción (Coomassie R250). Se pesó 80 mg de azul de coomassie R250 marca Kodak y se disolvió en 1L de agua ultrapura por 4 horas con

agitación a temperatura ambiente. Luego se agregó en la campana de extracción HCl concentrado hasta llegar a un pH de 2 y se agitó por un minuto más. Luego se almacenó en oscuridad la solución (Lawrence y Besir, 2009).

j. Tinción con Coomassie R250. Se retiró el gel de carrete y se colocó en una caja plástica en donde se agregó 100ml de agua ultrapura y se calentó en un microondas por 30 segundos, sin dejar hervir. Luego se colocó la caja en un agitador por 3 minutos. Esto se repitió tres veces con agua fresca cada vez. Al finalizar se agregó 100ml de la solución de tinción y se calentó en microondas por 10 segundos sin dejar hervir, seguido de esto se colocó la caja en el agitador por 30 minutos hasta que se observaron las bandas proteínicas teñidas. Para desteñir el gel se utilizó tres lavados de agua ultrapura (Lawrence y Besir, 2009).

k. Cuantificación de proteína recombinante.

- Concentración proteína purificada por método absorción ultravioleta 280nm: por medio de determinar absorbancia de proteína de interés en una longitud de onda de 280nm y realizando el cálculo con la ecuación 7 mostrada a continuación. Donde  $\epsilon$  es el coeficiente de extensión de proteína. Para la corrección por contaminación de ADN se utiliza la ecuación 8.

**Ecuación 7:** Concentración proteína pura

$$[Proteína] \left( \frac{mg}{mL} \right) = \frac{A_{280nm}}{\epsilon * \text{tamaño de celda (cm)}}$$

**Ecuación 8:** Corrección concentración proteína

$$[Proteína] \left( \frac{mg}{mL} \right) = (1.55 * A_{280nm}) - (0.76 * A_{260nm})$$

- Concentración de proteína purificada (rBipA): por medio de espectrofotómetro se realizó una curva de calibración de estándares con concentraciones conocidas de BSA 0.005, 0.049, 0.493, 0.986, 1.479, 1.972 mg/ml. Las mediciones fueron realizadas con espectrofotometría UV a una longitud de onda de 280 nanómetros. En el eje X concentración en mg/mL y en el eje Y absorbancia (nm). Con esta gráfica se generó una ecuación de modelo lineal (ecuación 9).

**Ecuación 9:** Ecuación de modelo lineal

$$y = mx + b$$

En el que se muestra que el valor  $y$  será el valor que se mida con espectrofotómetro para las muestras de proteína purificada. La pendiente está representada como  $m$  y  $b$  es el valor del intercepto. Esta debe tener un  $r^2$  ajustado de mínimo 0.98 para que los resultados sean confiables. Con esta ecuación se determinó la concentración de la proteína purificada extrapolando la absorbancia de las mediciones.

## **B. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA EL SILENCIAMIENTO DE LOS GENES *BOL* Y *ZPG* DE MACHOS DE *Anopheles albimanus* MEDIANTE EL USO DE ARN DE INTERFERENCIA**

1. Sitio de estudio. El presente estudio se llevó a cabo en la ciudad de Guatemala, Guatemala. Los experimentos se llevaron a cabo haciendo uso de las siguientes instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG):

- Laboratorio de Enfermedades Parasitarias Transmitidas por Vectores.
- Laboratorio del Departamento de Bioquímica y Microbiología.
- Laboratorio de Análisis Instrumental Avanzado.
- Insectario.

2. Sujetos de estudio. Los sujetos de estudio fueron mosquitos macho de *An. albimanus* de la cepa Sanarate del insectario de la UVG. La cepa Sanarate (alimentada con sangre de carnero desfibrinada administrada a través del sistema Hemotek) lleva colonizada en el insectario desde la década de los 70's (alrededor de 40 años) y fue recolectada cerca de Sanarate, El Progreso.

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

4. Tipo y tamaño de muestra. En base a ejemplos de otras metodologías realizadas en estudios similares, se montó el protocolo de alimentación de larvas para poder realizar tres réplicas biológicas para cada tratamiento (*E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL*, *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG*, *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ANT*, *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG+BOL*, *E. coli* HT115 (DE3) y control de cereal). La réplica es un grupo de 20 larvas.

5. Variables. A continuación, se explica con detalle la conceptualización y operacionalización de las variables de interés para el presente estudio.

**Cuadro 5:** Variables de interés en el presente estudio

Nombre	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Interrelación	Unidades de medición
Presencia de inserto	Estado o hecho de encontrarse el inserto del gen de interés ligado al plásmido clonado en una cepa de <i>E. coli</i> .	Cualitativa	Nominal	Independiente	1.Presente Ausente

Continuación Cuadro 5.

Nombre	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Interrelación	Unidades de medición
Producción de huevos por hembra	Número de huevos ovipuestos por hembra	Cuantitativa	Razón	Dependiente	Número de huevos/hembra
Número de larvas eclosionadas por hembra	Número de huevos ovipuestos por hembra que logran eclosionar eficazmente a larvas L1.	Cuantitativa	Razón	Dependiente	Número de larvas eclosionadas/hembra.
Desarrollo de larva a adulto	Desarrollo de larva a adulto en presencia de alimento con <i>E. coli</i> .	Cuantitativa	Razón	Dependiente	Número de adultos

Fuente: Elaboración propia.

**Cuadro 6:** Variables intervinientes que serán controladas por el investigador.

Nombre	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Interrelación	Unidades de medición	Valor crítico
Cantidad de agua	Volumen de agua agregado por larva.	Cuantitativa	Razón	Interviniente (controlada)	mL/larva	4 mL/larva
Cantidad de alimento	Cantidad de mezcla de alimento (goma guar + levadura + comida de pez + bacteria transgénica) y cereal de bebé administrada a 20 larvas.	Cuantitativa	Razón	Interviniente (controlada)	g, $\mu$ L y “scoops” de 10 $\mu$ L	-Goma guar: 0.01 g -Comida de pez: 0.009 g Levadura: 0.004 g -Bacteria transgénica: 200 $\mu$ L -Cereal larvas L1 y L2: 1 “scoop” -Cereal larvas L3 y L4: 2 “scoops”

Continuación Cuadro 6.

Nombre	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Interrelación	Unidades de medición	Valor crítico
Tiempo de copulación	Tiempo en que están juntos los adultos machos y hembras para permitir que copulen. Empieza desde que se alcanza la mayor proporción de hembras emergidas.	Cuantitativa	Razón	Interviniente (controlada)	Días	5 días
Cantidad de hembras en tiempo de oviposición	Cantidad de hembras que permanecen en el vaso durante el tiempo de oviposición.	Cuantitativa	Razón	Interviniente (controlada)	Número de hembras	1 hembra

Continuación Cuadro 6.

Nombre	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Interrelación	Unidades de medición	Valor crítico
Tiempo de oviposición	Tiempo que transcurre desde que la hembra es alimentada con sangre hasta el último día que se toman en cuenta los huevos ovipuestos.	Cuantitativa	Razón	Interviniente (controlada)	Días	1 día
Tiempo de eclosión de huevos a larvas	Tiempo que transcurre desde que la hembra ovipone hasta el último día que se toman en cuenta las larvas eclosionadas a partir de dichos huevos.	Cuantitativa	Razón	Interviniente (controlada)	Días	2 días

Fuente: Elaboración propia.

**Cuadro7:** Variables intervinientes que no serán controladas por el investigador.

Nombre	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Interrelación
Cantidad de alimento ingerido	Cantidad ingerida por cada larva de la mezcla de alimento y cereal de bebé.	Cuantitativa	Razón	Interviniente
Proporción de machos y hembras	Proporción de machos y hembras en las jaulas durante el tiempo de copulación.	Cuantitativa	Razón	Interviniente

Fuente: Elaboración propia.

6. Hipótesis. Las hipótesis planteadas son las siguientes:

**Hipótesis nula 1:** La clonación de los genes *ZPG* y *BOL* de *An. albimanus* en *E. coli* no es estable.

**Hipótesis alternativa 1:** La clonación de los genes *ZPG* y *BOL* de *An. albimanus* en *E. coli* es estable.

**Hipótesis nula 2.1:** El método de alimentación para larvas de *An. albimanus* conteniendo *E. coli* expresando ARNd<sub>h</sub> de un gen control derivado de *Arabidopsis*

*thaliana*, permite el desarrollo larvario adecuado y no interfiere con el tiempo de eclosión de pupa a adulto en comparación con el método de alimentación a base de cereal de bebé.

**Hipótesis alternativa 2.1:** El método de alimentación para larvas de *An. albimanus* conteniendo *E. coli* expresando ARNdh de un gen control derivado de *Arabidopsis thaliana*, permite el desarrollo larvario adecuado, pero interfiere con el tiempo de eclosión de pupa a adulto en comparación con el método de alimentación a base de cereal de bebé.

**Hipótesis nula 2.2:** El método de alimentación para larvas de *An. albimanus* conteniendo *E. coli* expresando ARNdh de un gen control derivado de *Arabidopsis thaliana*, no afecta la ovipostura de las hembras en comparación con el método de alimentación a base de cereal de bebé.

**Hipótesis alternativa 2.2:** El método de alimentación para larvas de *An. albimanus* conteniendo *E. coli* expresando ARNdh de un gen control derivado de *Arabidopsis thaliana*, afecta la ovipostura de las hembras en comparación con el método de alimentación a base de cereal de bebé.

**Hipótesis nula 3.1:** No es posible diseñar “primers” para monitorear la expresión de los genes control o de espermatogénesis (*ZPG* y *BOL*) de *An. albimanus* a través de su amplificación y detección mediante electroforesis en gel de agarosa.

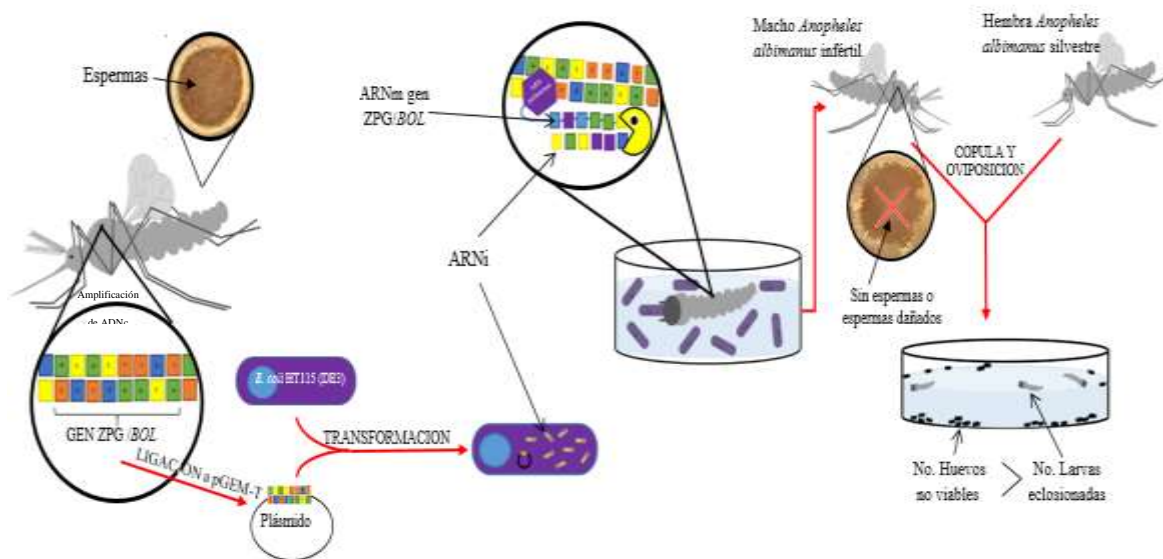
**Hipótesis alternativa 3.1:** Es posible diseñar “primers” para monitorear la expresión de los genes control o de espermatogénesis (*ZPG* y *BOL*) de *An. albimanus* a través de su amplificación y detección mediante electroforesis en gel de agarosa.

**Hipótesis nula 3.2:** No es posible diseñar “primers” para monitorear la expresión de los genes de control o de espermatogénesis (*ZPG* y *BOL*) de *An. albimanus* a través de su cuantificación y detección mediante PCR tiempo real.

**Hipótesis alternativa 3.2:** Es posible diseñar “primers” para monitorear la expresión de los genes de control o de espermatogénesis (*ZPG* y *BOL*) de *An. albimanus* a través de su cuantificación y detección mediante PCR tiempo real.

7. Metodología. A continuación, se presenta un diagrama de la metodología general llevada a cabo.

**Figura 29:** Diagrama general de metodología



(Elaboración propia)

Los métodos presentados a continuación son numerados como método 1, método 2 o método 3 acorde al objetivo que representan.

a. Método 1: Diseño de Primers. Para escoger los genes de interés se utilizó como referencia el gen de inexina de *An. gambiae* previamente silenciado por Magnusson *et al.* (2011) y los candidatos de *Aedes aegypti* listados por Whyard *et al.* (2015). Se realizó una búsqueda en la base de datos VectorBase (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2016) y se escogió dos de los genes (*BOL* y *ZPG*) que presentaban menor número de ortólogos y parálogos para la especie de *An. albimanus*. Para aislar las secuencias de los genes seleccionados para el silenciamiento, estas se amplificaron a partir del ADN genómico de larvas de *An. albimanus*. Para esta amplificación se inició con el diseño de los “primers”.

Se obtuvo las secuencias de los genes de interés (*BOL* y *ZPG*) en la base de datos VectorBase (anotados bajo el código de acceso AALB005972 y AALB006050, respectivamente) y se escogieron solo las regiones que codifican para predicción de exones dentro de la secuencia del gen (regiones que se van a transcribir). La secuencia codificante de los genes se introdujo en el programa Primer 3´ versión 0.4.0 (Untergasser *et al.*, 2012)

(Koressaar y Remm, 2007) y se buscaron los mejores primers de acuerdo a los siguientes parámetros: tamaño del primer de 18-20 pb, Tm del primer de 55-63 °C y GC % de 20-50%. Además, se buscaron parejas de primers que lograran amplificar la mayor parte posible de la secuencia. Para el gen *BOL* se tomó toda la secuencia codificante, mientras que para el gen *ZPG* solo se tomó en cuenta el último exón (exón 3); esto debido a que las otras regiones del gen *ZPG* presentaron una homología alta con diversas proteínas de la misma familia (de acuerdo a una prueba de alineación en VectorBase).

Se procedió a analizar cada primer individual y en pareja con la herramienta de Oligo Analyzer Tool versión 3.1 (Integrated DNA Technologies, 2015). Se buscaron los primers con la menor cantidad posible de “hairpins” (hibridización entre dos partes complementarias en la secuencia de una hebra del primer) posibles con  $\Delta G$  lo más positivo posible y que no formaran homodímeros/heterodímeros con uniones en sus extremos 3'. Con base en los resultados se realizó un Cuadro comparativo para facilitar la elección de los mejores primers. Al escoger la pareja de primers final se consideraron combinaciones de primers individuales de diferentes parejas siempre y cuando entre ellos formaran la menor cantidad de heterodímeros y no hibridizaran en los extremos 3'.

También se diseñaron primers para el control interno de la PCR tiempo real. Para esto se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, con dos modificaciones: (1) se diseñaron primers para amplificar regiones de aproximadamente 100 pb, y (2) los genes seleccionados debían ser genes altamente conservados en *An. albimanus*. Los genes candidatos para estos controles fueron seleccionados de la lista de Magnusson *et al* (2011) para la RT-PCR de identificación de transcritos específicos en testículos y ovarios de *Anopheles gambiae*. Los genes escogidos (*AaRpL19*, *AaRpS19*, *AaRpS7*, *AaCHS2*, *AaRIB43A* y *AaCHS1*) fueron los que mostraron una alta expresión en testículos y que estaban ausentes en ovarios.

b. Método 1: Amplificación (por PCR) de genes de interés a partir de cDNA de hembras de *An. albimanus*.

1) Obtención de la muestra. El Dr. Álvaro Molina del “National Institute of Health” (NIH) de Estados Unidos donó una muestra de ADNc producido a partir de hembras de *An. albimanus*.

## 2) PCR

a) Preparación de la mezcla de reacción (Master mix). Se agregó a un tubo cónico de PCR de pared transparente (NEPTUNE, No. 3426.8) con tapadera (LabSource, No. T53-927) los siguientes componentes (Promega, 2013):

**Cuadro 8:** Componentes de la mezcla de reacción de la PCR (para una reacción de amplificación)

Componente	Concentración de la solución madre	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
GoTaq <sup>®</sup> Hot Start Colorless Master Mix (Promega, REF. M5132)	2X	12.5
Primer F <i>ZPG/BOULE</i> Ext1T7_R	10 pmol/mL	2
Primer R <i>ZPG/BOULE</i> Ext1T7_L	10 pmol/mL	2
Agua libre de nucleasas	-----	3.5
ADN plantilla*	-----	5
Total		25

Fuente: Elaboración propia.

\*En el caso del control negativo, se añadió 5 $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas en vez de la plantilla de ADN (Promega, 2013).

b) PCR. Se utilizó el termociclador Mastercycler Personal modelo 5332 (Eppendorf) y se siguió el siguiente programa (Promega, 2013): desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, hibridación a 55 °C por 30 seg, extensión a 72 °C por 30 seg, y extensión final a 72 °C por 5 min.

c) Electroforesis en gel de agarosa. Se preparó un gel de agarosa al 2.5% (p/v) en “buffer” TBE 1X (c.f.). Se agregó la cantidad requerida de bromuro de etidio para alcanzar una concentración final de 0.005  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En el gel se cargó 4  $\mu\text{L}$  de escalera y 4  $\mu\text{L}$  de cada muestra con 1  $\mu\text{L}$  de “buffer” de carga. El gel se corrió a 16.67 V/cm por 30 min y se visualizó en un transiluminador UV Epichemi<sup>3</sup> Darkroom (UVP Bioimaging Systems).

c. Método 1: Ligación de inserto de interés al plásmido *pGEMT* easy. Para realizar la ligación de un inserto al plásmido *pGEMT* easy (Promega, No. A1360) se colocó en un tubo cónico de 0.6 mL lo siguiente: 1  $\mu\text{L}$  de plásmido linearizado *pGEMT* easy (50 ng/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  del inserto (aprox. 2 ng/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de “buffer” de ligasa de ADN T4 (10X), 0.17  $\mu\text{L}$  de ligasa de ADN T4 (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) y 6.83  $\mu\text{L}$  de agua tratada con dietilpirocarbonato (agua DEPC). La concentración del inserto se determinó según la intensidad que presentó la banda de éste en un gel de agarosa con bromuro de etidio. Se tomó como referencia las relaciones de 5 ng del amplicón/volumen cargado de muestra para las bandas con intensidad leve y 100 ng del amplicón/volumen cargado de muestra para las bandas más intensas. Adicional a la muestra con el inserto de interés, se preparó un control negativo utilizando las mismas cantidades, pero colocando 1  $\mu\text{L}$  de agua en vez del inserto. Se incubó a 4°C toda la noche (O/N). Por último, se calentó 20 minutos a 65°C para inactivar la ligasa T4. El producto de ligación se almacenó a -20 °C (Promega, 2015).

d. Método 1: Transformación de *E. coli* NOVA-BLUE mediante choque térmico. Se descongeló un tubo con la bacteria *E. coli* NOVABLUE GigaSingles<sup>TM</sup> Competent Cells (NOVAGEN®, No. 71227-1PKG) en hielo durante 2 min y se le agregó 1  $\mu\text{L}$  del plásmido *pGEMT* easy con inserto *ZPG/BOL*. Se dejó reposar cinco minutos en hielo. Luego se colocó el tubo en un baño de agua a 42°C durante 30 segundos y posteriormente se dejó reposar el tubo dos minutos en hielo. Se agregó 250  $\mu\text{L}$  de medio súper óptimo con represor catabólico (S.O.C. Medium, por sus siglas en inglés) (invitrogen, No. 15544-034) y se incubó durante una hora con agitación horizontal a 225 rpm en una incubadora Max<sup>Q</sup> 4000 (Barnstead Lab-Line). Se sembró 100  $\mu\text{L}$  del cultivo en placas de agar con medio Luria-Bertani (LB) + Tet [12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] + Amp [75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] + IPTG[0.1 mM] + X-gal[40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] y se incubaron O/N a 37°C (Merck Millipore, 2016).

Se descongeló un tubo con la bacteria *E. coli* NOVABLUE GigaSingles™ Competent Cells (NOVAGEN®, No. 71227-1PKG) en hielo durante 2 min y se le agregó 1 µL del plásmido *pGEMT* easy con inserto *ZPG/BOL*. Se dejó reposar cinco minutos en hielo. Luego se colocó el tubo en un baño de agua a 42°C durante 30 segundos y posteriormente se dejó reposar el tubo dos minutos en hielo. Se agregó 250 µL de medio súper óptimo con represor catabólico (S.O.C. Medium, por sus siglas en inglés) (invitrogen, No, 15544-034) y se incubó durante una hora con agitación horizontal a 225 rpm en una incubadora Max<sup>Q</sup> 4000 (Barnstead Lab-Line). Se sembró 100 µL del cultivo en placas de agar con medio Luria-Bertani (LB) + Tet [12.5 µg/mL] + Amp [75 µg/mL] + IPTG[0.1 mM] + X-gal[40 µg/mL] y se incubaron O/N a 37°C (Merck Millipore, 2016).

e. Método 1: Selección de clones transformados mediante PCR de colonias

1) Preparación de la mezcla de reacción (Master mix). Se agregó a un tubo cónico de PCR de pared transparente con tapadera los siguientes componentes (Promega, 2012):

**Cuadro 9:** Componentes de la mezcla de reacción de la PCR de colonias (para una reacción de amplificación)

Componente	Concentración de la solución madre	Volumen (µL)
GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix (Promega, REF. M5132)	2X	12.5
“Primer” M13 F	10 pmol/mL	2
“Primer” M13 R	10 pmol/mL	2
Agua libre de nucleasas	-----	8.5
Total		25

Fuente: Elaboración propia.

En la PCR de colonias, la plantilla de ADN a partir de la cual se amplificó se obtuvo directamente de la colonia bacteriana que se sospechaba que fue transformada exitosamente con el plásmido *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL*. En el caso de las *E. coli* NOVA BLUE, el crecimiento de colonias blancas indica que esa colonia se transformó con el plásmido ligado correctamente y no con el plásmido religado a sí mismo. Con una punta estéril se picó una colonia transformada individual y se disolvió en el master mix. En el caso del control negativo, se añadió 5 µL de agua libre de nucleasas en vez de añadir el ADN plantilla (Promega, 2012).

1) PCR de colonias. Se utilizó el termociclador Mastercycler Personal modelo 5332 (Eppendorf) y se siguió el siguiente programa (Promega, 2012): desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, hibridación a 55 °C por 30 seg, extensión a 72 °C por 30 seg, y extensión final a 72 °C por 5 min.

2) Electroforesis en gel de agarosa. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de la forma descrita anteriormente en la sección de metodología B. 7. b. 3) sin modificaciones.

f. Método 1: Extracción de plásmido *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL* a partir de colonias bacterianas.

1) Extracción de plásmido. Se utilizó el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, No. A1330) para la extracción de plásmido según el protocolo del proveedor, sin modificaciones. El plásmido se extrajo de 2.1 mL de cultivo líquido de *E. coli* NOVA-BLUE *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* y se resuspendió en 30 µL de buffer de elución.

2) Electroforesis en gel de agarosa. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de la forma descrita anteriormente en la sección de metodología B. 7. b. 3) pero para preparar un gel de agarosa al 0.8% (p/v).

g. Método 1: Transformación de *E. coli* HT115 (DE3) mediante electroporación.

1) Descongelamiento de *E. coli* HT115 (DE3). Se colocaron en hielo bacterias *E. coli* HT115 (DE3) criopreservadas. Se utilizó una punta estéril para tomar una porción del cultivo congelado y se esparció con un asa estéril sobre una placa de agar LB+Tet [12.5 µg/mL] (c.f.). Se incubó la placa O/N a 37°C en un horno de hibridización “Hibridization Incubator Combi-SV12DX” (Daigger Fineper Finemold Precision Ind.Co).

2) Preparación de células electrocompetentes. Se pre-enfriaron siete tubos estériles de 15 mL a -20°C y dos pipetas estériles de 1 mL a 0°C para 90 mL de cultivo bacteriano. Además, se pre-enfrió la centrifuga a 0°C y agua ultra pura estéril (135 mL de agua por cada 90 mL de cultivo bacteriano) en hielo. Para preparar el cultivo bacteriano se inoculó una colonia bacteriana de *E. coli* HT115 (DE3) en 5 mL de medio LB con los antibióticos necesarios. Este cultivo se incubó O/N y al día siguiente se tomó 1 mL para inocular en 9 mL de medio LB con antibióticos. Se incubó el cultivo O/N y al día siguiente se tomó 10 mL para inocular en 90 mL de medio LB con antibióticos. Se dejó incubando este cultivo hasta alcanzar una densidad óptica a 550nm (OD<sub>550</sub>) entre 0.5-0.6 (fase log media). Luego se transfirió los 90 mL del cultivo a tubos de 15 mL fríos y se mantuvieron en hielo por 30 minutos. Se centrifugó a 2,600 x g durante 15 minutos a 0°C. Se decantó el sobrenadante, se secó el pellet y se colocó en hielo (Invitrogen, s.f.).

Se añadió 0.75-1.5 mL de agua en cada tubo (manteniendo los tubos en hielo en todo momento). Se mezcló y se agitó para resuspender las células. Se repitió esto hasta que el volumen de agua agregada llegó a ser igual al volumen inicial. Luego se centrifugó a 2,600 x g por 15 minutos a 0°C. Se decantó el agua de los tubos y se colocaron en hielo. El pellet se resuspendió en 7.5 mL de agua estéril fría. Se centrifugó nuevamente a 2,600 x g por 5 minutos y 0°C. Se decantó el agua de los tubos y se colocaron en hielo. Luego se resuspendió los pellets en 0.6 mL de agua estéril fría con 10% (v/v) de glicerol. En ese momento se sacó un tubo de 15 mL del congelador y se colocó en hielo. Se utilizó una pipeta de 1 mL para transferir todas las células desde los tubos de centrifugación hasta el nuevo tubo de 15 mL. Se centrifugó una última vez a 7,146 x g por 15 minutos a 0°C. Se decantó el glicerol y se agitó rápidamente para remover la mayor parte de glicerol posible. Se colocó los tubos en hielo inmediatamente y se resuspendió el pellet en 180 µL de agua

estéril con 10% (v/v) de glicerol. Se agitó el contenido de los tubos con un agitador vortex y se preparó alícuotas de 25  $\mu$ L que se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Invitrogen, s.f.).

3) Electroporación. Se colocó la cubeta de electroporación de 0.1 cm (Gene Pulser® Cuvette BioRad, No. 165-2089) y su soporte en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se descongeló en hielo una alícuota de células de *E. coli* HT 115 (DE3) electrocompetentes. Al mismo tiempo se descongeló en hielo el plásmido *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL*. Se configuró el electroporador Gene Pulser® II Electroporation System (BioRad, modelo 165-2110) con las siguientes condiciones: voltaje: 1.5 kV, resistencia: 200  $\Omega$  y capacitancia: 25  $\mu$ F (BioRad Laboratories, s.f.).

Se colocó 1 mL de medio S.O.C. Medium (Invitrogen, No, 15544-034) en un tubo Falcon® y se sacó la cubeta y el soporte del congelador. Se colocó 1 $\mu$ L del plásmido en la parte inferior de la abertura de la cubeta de electroporación. Encima de la gota del plásmido se colocó 20 $\mu$ L de células de *E. coli* XL1-BLUE electrocompetentes. Se cerró la cubeta y se golpeó suavemente sobre una superficie plana para asegurarse de que no hubiese burbujas. Se colocó la cubeta en el soporte y se introdujo en el compartimiento del electroporador. Se presionó simultáneamente los dos botones de pulso del electroporador hasta escuchar un sonido. En el caso de observar una pequeña explosión o chispa en la cubeta, se asumía que las bacterias habían muerto y que no funcionó la electroporación. En ese caso se repetía nuevamente todo el procedimiento. Al no observar ninguna chispa, se sacó rápidamente la cubeta del equipo, se le agregó el medio SOC previamente colocado en el tubo Falcon® y se mezcló con las bacterias electroporadas para transferirlas de regreso al tubo Falcon® (BioRad Laboratories, s.f.).

Se incubó el cultivo durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se sembró 100 $\mu$ L del cultivo en una placa de agar LB +ampicilina [50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] (c.f.) +Tet [12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] (c.f.). Se incubó la placa O/N a  $37^{\circ}\text{C}$ . El medio SOC con *E. coli* HT 115 (DE3) electroporada se guardó a  $4^{\circ}\text{C}$  para inocular al día siguiente y aislar más colonias individuales (BioRad Laboratories, s.f.).

h. Método 1: Evaluación de la estabilidad de los insertos de ZPG y BOL en cepas de *E. coli*.

1) PCR de colonias para confirmar presencia de los insertos de *ZPG* y *BOL*. Se llevó a cabo tres PCR de colonias de la cepa *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL* según la metodología descrita en la sección 7. e. En la primera reacción se utilizó los “primers” *ZPGExt1* y *BouleExt1*. En las otras dos reacciones se utilizó los “primers” universales *M13* con la diferencia de que en una de las reacciones el control positivo fue el plásmido *pGEMT* sin inserto y en la otra fue la cepa *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ANT*.

2) Extracción y digestión de los plásmidos de las cepas *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL*. El plásmido se extrajo de 5 mL de cultivo líquido de *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL* y se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Para la extracción se utilizó el kit *Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, No. A1330) según el protocolo del proveedor, con las siguientes modificaciones dado que la cepa utilizada no posee la endonucleasa A mutada: se duplicó el volumen utilizado de la solución de neutralización y se pre-lavó la columna con 750  $\mu$ L de una solución de isopropanol 40 % (v/v) y HCl guanidinio 4.2 M (c.f.). Dichas modificaciones fueron consultadas en el protocolo del kit *Wizard<sup>®</sup> Plus SV Maxipreps DNA Purification System* (Promega).

La digestión de cada uno de los plásmidos se llevó a cabo mezclando los siguientes reactivos: 30  $\mu$ L del plásmido extraído, 1  $\mu$ L de la enzima *EcoRI* (New England Biolabs, No. R0101S), 5  $\mu$ L de *NEBuffer 3.1* (New England Biolabs, No. B7203S) y 14  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Posteriormente se incubó a 37 °C por una hora. Al finalizar se llevó a cabo una electroforesis utilizando la metodología descrita en la sección de metodología B. 7. b. 3) pero con un gel de agarosa al 0.8% (p/v).

3) Transformación de *E. coli* JM109 con los plásmidos *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL*. Para esta transformación se utilizaron los plásmidos *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL* previamente extraído de *E. coli* NOVA BLUE *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL*. La cepa *E. coli* JM109 fue donada por el “Centers of Disease Control and Prevention” de Atlanta, Estados Unidos. Las transformaciones se llevaron a cabo por el método de choque térmico descrito

anteriormente en la sección de metodología B. 7. d. Se seleccionó las colonias que crecieron en presencia de ampicilina y se re-sembraron en dos placas: una placa de agar LB + Amp [50 µg/mL] (c.f.) + X-gal [35.2 µg/mL] (c.f.) y otra placa de agar LB + Amp [50 µg/mL] (c.f.) + X-gal [35.2 µg/mL] (c.f.) + IPTG [0.1 mM] (c.f.).

i. Método 2: Estandarización de un método de alimentación de larvas de *An. albimanus* con *E. coli* HT115 (DE3) pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL inactivada. Se realizaron diversos experimentos para estandarizar y optimizar el método ideal de alimentación de larvas de *An. albimanus* con *E. coli* inactivada. El proceso de optimización se llevó a cabo por iteración y experimentos de prueba y error, tomando en cuenta los siguientes factores: humedad, temperatura, cantidad de agua, cantidad de alimento, cantidad de larvas por recipiente, tipo de recipiente para desarrollo de larvas, tiempo de copulación, tipo de recipiente para oviposición, tiempo de oviposición y tiempo de eclosión de huevos a larvas. Se analizó el desarrollo de las larvas utilizando curvas de Kaplan Meier.

Para comprobar que las larvas consumen el alimento con *E. coli* se disectaron los intestinos de larvas de todos los estadios que estuvieron expuestas al alimento durante cuatro horas. Para esto se colocó las larvas en la refrigeradora a 4°C durante 24 horas. Posteriormente se procedió a colocar a las larvas sobre un portaobjetos para montarlo en un estereoscopio con la luz superior encendida. La larva se colocó con la menor cantidad de agua posible. Con ayuda de un estilete se cortó el tejido que une la cabeza de la larva con los segmentos abdominales. Luego se sostuvo firme el último segmento abdominal de la larva con un estilete y al mismo tiempo (con otro estilete) se jaló suavemente la cabeza de la larva para separarla, junto con el intestino, del resto del cuerpo. Se colocó una gota de solución salina sobre el intestino para evitar su desecación y se prosiguió a contar los segmentos llenos de alimento rojo (coloración predominante del alimento con *E. coli*) utilizando la luz superior encendida seguidamente de la visualización con la luz inferior encendida.

También se llevó a cabo tres réplicas biológicas de desarrollo a adulto con el método estandarizado de alimentación; utilizando alimento a base de cereal de bebé (CEREAL) o cereal más alimento bacteriano compuesto (ABC, ver composición en el Cuadro 9 de la sección VII. B. 1.) con la cepa *E. coli* HT115 (DE3) pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ANT

(ANT). Se analizó el tiempo de eclosión a adulto utilizando curvas de Kaplan Meier y la prueba de Mantel-Cox para comparar los resultados entre CEREAL y ANT.

Se realizó tres experimentos para determinar la condición de oviposición más adecuada entre: jaula, separación de parejas de hembras por vaso y separación de hembras individuales por vaso. Posteriormente se realizó un experimento con la condición de oviposición de hembras separadas individualmente en vasos y se analizó los resultados de huevos por hembra y larvas por hembra utilizando diagramas de caja y bigote y las siguientes pruebas estadísticas para comparar los resultados entre los tratamientos ANT y CEREAL: “Shapiro-Wilk”, “Bartlett”, “T de Student” y “Mann-Whitney-Wilcoxon”.

j. Método 3: PCR y PCR en tiempo real de “primers” control y de espermatogénesis

1) Método 3.1: PCR de “primers” control y de espermatogénesis para PCR tiempo real

a) Obtención de la muestra. El Dr. Álvaro Molina del “National Institute of Health” (NIH) de Estados Unidos donó una muestra de ADNc producido a partir de larvas y pupas de *An. albimanus*.

b) Preparación de la mezcla de reacción (Master mix). Se agregó a un tubo cónico de PCR de pared transparente (NEPTUNE, No. 3426.8) con tapaderas (LabSource, No. T53-927) los siguientes componentes (Promega, 2013):

**Cuadro 10:** Componentes de la mezcla de reacción de la PCR (para una reacción)

Componente	Concentración de la solución madre	Volumen (µL)
GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix (Promega, REF. M5132)	2X	12.5
“Primer” sentido <i>ZPG/BOULE</i> Ext1T7_R	10 pmol/mL	2
“Primer” contrasentido <i>ZPG/BOULE</i> Ext1T7_L	10 pmol/mL	2

Continuación Cuadro 10.

Componente	Concentración de la solución madre	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua libre de nucleasas	-----	3.5
ADN plantilla*	-----	5
Total		25

Fuente: Elaboración propia.

\*En el caso del control negativo, se añadió 5 $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas en vez de la plantilla de ADN (Promega, 2013).

c) PCR. Se utilizó el termociclador Mastercycler Personal modelo 5332 (Eppendorf) y se siguió el siguiente programa (Promega, 2013): desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, hibridación a 55 °C por 30 seg, extensión a 72 °C por 30 seg, y extensión final a 72 °C por 5 min.

d) Electroforesis en gel de agarosa. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de la forma descrita anteriormente en la sección de metodología B. 7. b. 3) sin modificaciones.

## 2) Método 3.2: PCR en tiempo real de “primers” control y de espermatogénesis

a) Obtención de la muestra. El Dr. Álvaro Molina del “National Institute of Health” (NIH) de Estados Unidos donó una muestra de ADNc producido a partir de una mezcla de hembras y machos (adultos) y otra producida a partir de una mezcla de larvas y pupas de *An. albimanus*.

b) Preparación del Master mix (1 reacción de PCR). Agregar a un tubo óptico de PCR el volumen de los siguientes componentes y mezclar por pipeteo:

**Cuadro 11:** Componentes de una reacción de PCR

Componente	Concentración de la solución madre	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
PerfeCTA SYBR Green SuperMix (Quanta Biosciences, No.95054-02K)	2X	12.5
“Primer” forward	10 pmol/ $\mu\text{L}$	1
“Primer” reverse	10 pmol/ $\mu\text{L}$	1
Agua libre de nucleasas	-----	5.5
ADNc plantilla*	10 ng/ $\mu\text{L}$	5
	15 ng/ $\mu\text{L}$	
	20 ng/ $\mu\text{L}$	
Total		25

Fuente: Elaboración propia.

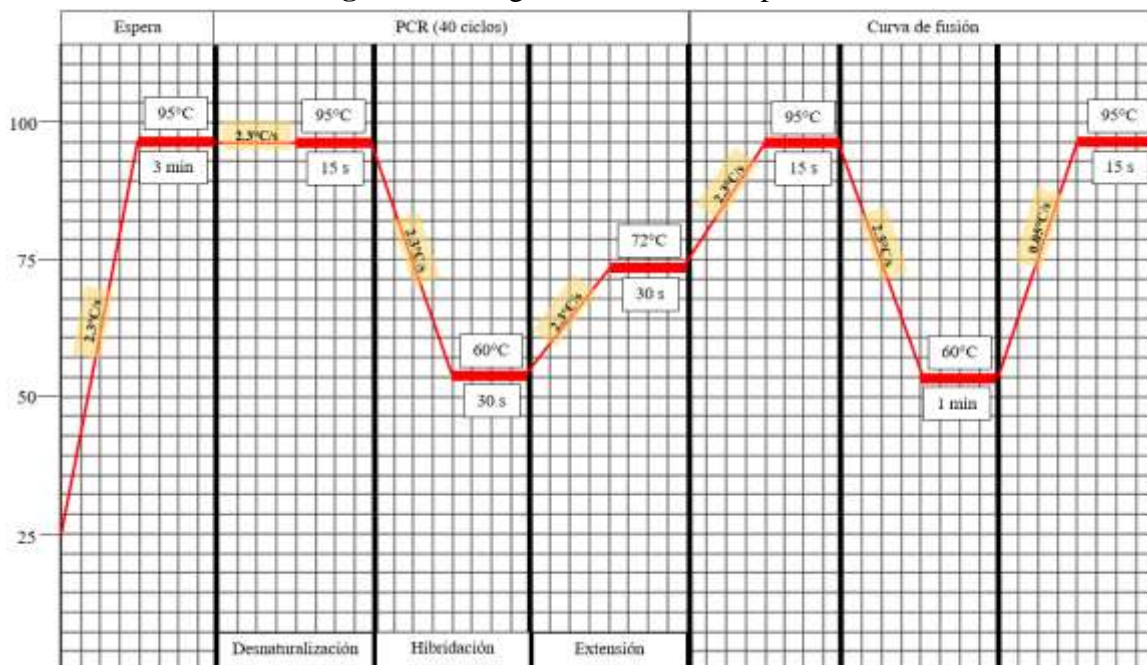
\*Para cada una de las 9 parejas de primers, se trabajó con ADNc plantilla proveniente de adultos de *An. albimanus* y ADNc proveniente de larvas/pupas de *An. albimanus*; cada uno en las tres concentraciones especificadas. Además, cada combinación se trabajó en triplicado. En el caso del control negativo para cada pareja de “primers”, se añadió 5  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas en vez de añadir la plantilla de ADNc. El control también se trabajó en triplicado.

Las 9 parejas de “primers” trabajados fueron: AaRpL19, AaRpS19, AaRpS7, AaRIB43A1, AaRIB43A2, AaCHS1, AaCHS2, ZPGqP y BOLqP.

c) PCR en tiempo real. Se preparó el Sistema de PCR Tiempo Real (Applied Biosystems 7300) escogiendo el tipo de experimento de comparación de CT, el canal para SYBR Green (aprox. 530 nm), placa de 96 pozos y propiedad Fast. Se definió el nombre de cada una de las muestras a analizar y se les asignó un pozo en el mapa de la placa de 96

pozos. Se utilizó el programa indicado en la Figura 30 para llevar a cabo 40 ciclos de PCR y una curva de fusión.

**Figura 30:** Programa de PCR tiempo real



(Fuente: Elaboración propia)

La temperatura de hibridación mostrada en la Figura 30 se utilizó para todas las parejas de “primers” a excepción de la pareja de “primers” BOLqP cuya temperatura de hibridación fue de 68°C.

d) Análisis de resultados de PCR tiempo real. Para la interpretación de los resultados obtenidos de PCR tiempo real, se realizaron tres análisis según los dos diferentes tipos de ADNc utilizados. El primer análisis consistió en evaluar las curvas de temperatura de fusión de cada “primer”. El segundo análisis consistió en evaluar la intensidad de fluorescencia del SYBR Green con respecto al ciclo de PCR tiempo real. Por último, el tercer análisis consistió en la comparación de los porcentajes de éxito de determinación de un CT válido (CT cuyo valor esté entre 10 y 40). El porcentaje de éxito de determinación de un CT válido (%ECT) se definió en este trabajo de la siguiente manera:

**Ecuación 10:** Porcentaje de éxito de determinación de un CT válido

$$\%ECT = 100\% * \left( \frac{\text{Número de réplicas con CT válido}}{\text{Número total de réplicas}} \right)$$

## **VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **A. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DETECCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE**

Durante el proceso de la obtención de la proteína recombinante se tuvo que realizar diversos métodos y protocolos. Sin embargo para lograr optimizar las técnicas utilizadas se pasó por una serie de experimentos en donde se tenía deficiencias que fueron siendo mejoradas mediante la lectura de distintas publicaciones. Por lo que a continuación se presenta un Cuadro en donde se pueden analizar los problemas más relevantes enfrentados y la solución que se dio a cada uno de ellos. La categoría más importante fue vida útil de los reactivos utilizados. Cada reactivo tiene un tiempo de vida en el cual cumplen su función y el rendimiento es lo que menciona el proveedor. Sin embargo, muchas veces estos no se almacenen en condiciones adecuadas para que la viabilidad se preserve.

La técnica utilizada de separación fue SDS-PAGE con el fin de observar la migración de proteínas de interés. En el Cuadro 12 se mencionan los problemas que se tuvieron en la optimización de esta técnica. Es importante conocer que el pH es una condición importante para esta herramienta ya que con un pH óptimo las proteínas pueden migrar adecuadamente según su relación carga/masa (Nybo, 2012). Otro aspecto importante en esta técnica es evaluar los límites de detección, al trabajar con una muestra muy concentrada se observó una coagulación. Esto se da debido a una concentración muy alta de proteína, al tratar la muestra con calor esta se desnatura por lo que toma una apariencia viscosa y no permite cargar en gel de poliacrilamida. Otra categoría importante fue la tinción para la cual fue de suma importancia manejar distintos métodos de tinción, para poder comparar y elegir el mejor de acuerdo a los resultados de optimización.

**Cuadro 12:** Problemas y soluciones enfrentados durante la fase experimental

Problema	Descripción	Solución del problema
Concentración de iones hidronios (pH)	pH del agua: al realizar las soluciones a utilizar no funcionaban de manera correcta, pues corría el gel ya que el agua utilizada tenía un pH muy ácido.	Medir siempre el pH del agua previamente, además procurar utilizar agua ultrapura grado (HPLC) fresca.
	pH de solución amortiguadora: al realizar soluciones con un pH distinto al de los geles la muestra no migra de forma consistente. No hay una migración correcta de la muestra ni escalera.	Mientras se disuelve la solución (70% del volumen final) medir el pH y ajustar hasta que éste sea óptimo. Luego aforar la solución al volumen final deseado.
Polimerización	Poca polimerización del gel; no se formaba el polímero en el tiempo indicado (<15min/ >1hora).	Utilizar siempre APS fresco, y soluciones amortiguadoras frescas y a su pH óptimo.
	Formación de burbujas. No se vertía de forma homogénea la solución de poliacrilamida, por lo que el gel al final tenía agujeros que impedían la migración de la muestra.	Utilizar una micropipeta p1000 para verter la solución de forma homogénea y así evitar la formación de burbujas en la solución y en los geles.

Continuación Cuadro 12.

Problema	Descripción	Solución del problema
Adhesión del gel a las placas	El gel se quedaba adherido a la placa y al tratar de despegarlo se rompía, ver Figura 71 de la sección de anexos.	Tratar las placas con repelente de silano para una fácil manipulación del gel.
Tinción	<p>Se comenzaron a teñir todos los carriles del gel de inicio a fin, como si hubiese proteína fijada en el gel, como se observa en la Figura 72 de la sección de anexos.</p> <p>Precipitación del azul de coomassie R-250. Se observaba un precipitado en los pozos de carga y en resto del gel. Así como en el recipiente que contenía la solución colorante.</p> <p>Las bandas de la proteína no se fijaban en el gel. Se podían observar las bandas solo por unas horas (8 horas) y luego se degradaban y se perdía la tinción.</p>	<p>Lavar las placas con suficiente jabón y agua y luego dejar secar completamente. Utilizar una solución limpiadora de 1% de SDS y 1% de ácido oxálico, dejar reposar en la solución por toda la noche las placas y los peines.</p> <p>Inicialmente se procedió a disolver completamente el azul de coomassie en metanol y agua, para luego filtrarlo y eliminar el remanente del reactivo. Sin embargo esta medida no funcionó por lo que se cambió al método de tinción basado en tinción de coomassie R250 con HCl (Lawrence y Besir, 2009).</p>

Continuación Cuadro 12.

Problema	Descripción	Solución del problema
Vida útil de reactivos y soluciones	El SDS 10% se comenzó a precipitar a las cuatro semanas de haber sido preparado, además ya no se disolvía de forma completa.	Preparar SDS 10% fresco y homogenizar en vortex para que la solución no se precipite después.
	El APS dejó de funcionar durante el proceso de polimerización de los geles a las tres semanas de haber sido preparado.	Preparar APS fresco (el día de preparación de geles) y disolver de forma correcta. Cuando se almacena debe ser guardado a 4 °C por no más de tres semanas.
	Tampón de corrida dejó de funcionar a la quinta vez que se utilizó. La migración de las muestras no se llevaba a cabo de forma óptima; como se observa en la Figura 70 se la sección de anexos.	Preparar nuevo tampón de corrida y utilizarlo en frío para una mejor corrida del gel.
	Durante la preparación Tampón de Laemmli el azul de bromofenol no se disolvió de forma completa, por lo que la solución tenía un color anaranjado en vez de azul.	Verificar el orden en que se disuelven los reactivos. Preparar un stock a una concentración mayor de azul de bromofenol. Verificar el pH de la solución, pues ésta puede tener un color amarillento si

Continuación Cuadro 12.

Problema	Descripción	Solución del problema
		está en un pH ácido y ajustar con NaOH hasta que se vire a azul.
Vida útil de reactivos y soluciones	La escalera utilizada tenía más de un año de estar guardada por lo que las bandas ya no se veían con la intensidad debida.	El proveedor Biorad indica que el tiempo de vida de la escalera es de 1 año a una temperatura de -20°C.
	El reactivo de azul de Coomassie era del año 1988 por lo ya no era funcional, por lo que dejó de teñir las proteínas.	Utilizar reactivos que no tuviesen más de ocho años de estar en uso, marcar y separar los que no sirvan. Además, siempre verificar la caducidad y vida útil de los reactivos.
Concentración de muestras	Para estandarizar el SDS-PAGE se utilizó BSA, pero la concentración era mucho mayor a 2mg/ml, por lo que las muestras se coagulaban al ser preparadas y no se podían cargar en los pozos.	Medir siempre la concentración de la muestra. Realizar diluciones si es necesario para que esté dentro del rango óptimo para el SDS-PAGE (1-2mg/ml).
Condiciones de corrida del SDS- PAGE	El voltaje de la corrida no llegaba a los 100V por lo que no se llevaba a cabo la migración de las proteínas.	Medir siempre el voltaje de los tomacorrientes con voltímetro y así asegurar que la corrida será exitosa.

Continuación Cuadro 12.

Problema	Descripción	Solución del problema
Transformación de bacterias	La cantidad de bacterias transformadas fue muy baja en comparación a lo esperado por el proveedor. Sin embargo, las células de BL21(DE3) que se utilizaron ya eran antiguas.	Optimizar los tiempos y temperaturas de la transformación mediante choque térmico ya que de esta forma se puede mejorar la tasa de transformación.
Purificación de proteína	Para la purificación se necesita realizar varios lavados de tampón de unión y elución, respectivamente. Por lo que al tener reactivos limitados se realizó menos lavados, lo que disminuyó la eficiencia de la purificación.	No comprometer la eficiencia de la purificación por la disminución de los lavados. Realizar los cinco lavados indicados por el proveedor.
Estabilidad de la proteína	La proteína purificada comenzó a degradarse a las dos semanas de haberla extraído.	Agregar inhibidores de proteasas a la proteína purificada para evitar que ésta se degrade.
Contaminación con ADN	La proteína purificada se cuantificó con método absorción UV 280nm, sin embargo, se mostraba una lectura en 260nm, lo que indica contaminación con ADN.	Agregar ADNasa durante el proceso de lisis enzimática. Así como hacer la corrección de la muestra con la ecuación 3 del marco teórico y así calcular la concentración real de la proteína.

Fuente: Elaboración propia.

Se realizó transformación de células BL21 DE3 con plásmido pET19b que contenía GlpQ de *Borrelia turicatae*. En la Figura 31 se puede observar dentro del círculo rojo el crecimiento de clones en los cuales se expresa la proteína de interés (GlpQr). En el Cuadro 13 se muestra la tasa de transformación obtenida.

**Figura 31:** Transformación de células BL21 DE3 + GlpQ en placas con LB y ampicilina (50mg/mL)



(Fuente: Foto propia)

**Cuadro 13:** Tasa de células transformadas con pET19b- GlpQ

	UFC/ $\mu$ g	Rendimiento de la transformación
<i>E. coli</i> BL21(DE3) transformadas	$6 \times 10^6$	6%

Fuente: Elaboración propia.

Para la transformación de *E. coli* BL21(DE3), una cepa que se caracteriza por ser capaz de expresar genes heterólogos no tóxicos, ausencia del gen de proteasas de membrana externa *ompT* y además tener deficiencia de proteasas Lon, lo cual hace que sea un buen modelo para expresar proteínas y no degradarlas (García *et al.*, 2013). La técnica de shock térmico fue utilizada para poder introducir al vector, pET19b que contenga a GlpQ; con esta técnica se desestabiliza la membrana por los cambios de temperatura y se forman

poros que permiten el ingreso del vector al hospedero (Li *et al.*, 2007). El fenotipo de las células transformadas fue verificado en placas de medio LB, el cual tiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos. Ha este medio se le agregó ampicilina 50mg/ml como factor de selección; ya que el plásmido pET19b cuenta con el gen de resistencia para este antibiótico dentro de su genoma. Como prueba de esto se puede observar en la Figura 31 que dentro del círculo rojo hay células transformadas, pues lograron crecer en el medio que contenía ampicilina. Además, se calculó la tasa de células transformadas  $6 \times 10^6$  ufc/ $\mu$ g, con un rendimiento del 6%, lo cual es bajo pero esto puede ser debido a la longevidad del Kit utilizado. Sin embargo, se obtuvo colonias viables para poder hacer nuevos cultivos a partir de las células transformadas y criopreservarlas. El motivo por el cual se realizó esta transformación es que la proteína GlpQ ha sido utilizada como un método de tamizaje de posibles muestras infectadas y distinción de la especie de *Borrelia* causante de enfermedad de Lyme o fiebre recurrente (Wilder *et al.*, 2015). Por lo que para desarrollar un método de detección es necesaria, ya que las muestras que son positivas para esta proteína pueden ser posteriormente analizadas con BipAr para analizar cuál es exactamente la que esta causando la borreliosis.

El fenotipo de las células transformadas fue verificado en placas de medio LB + amp (50mg/mL); debido a que las células transformadas tendrían la secuencia del vector. Como se observa en la Figura 32 en círculo rojo presencia del fenotipo de transformación donde *E. coli* BL21(DE3) expresó resistencia a antibiótico como producto de transformación. La cepa utilizada se caracterizaba por tener una tasa de transformación de  $1 \times 10^8$  UFC/ $\mu$ g según el proveedor. Esta debía ser corroborada para evaluar la tasa de transformación y por ende el rendimiento del proceso (Novagen, 1999). La tasa de células transformadas igual a  $1 \times 10^7$  UFC/ $\mu$ g y este se comparó con el teórico de  $1 \times 10^8$  UFC/ $\mu$ g. El resultado de esto fue un 10% de rendimiento en transformación y esto se atribuye según el Cuadro 13 a la antigüedad de kit utilizado. Se asocia por el tiempo almacenado este kit y sus células perdieron viabilidad establecida por proveedor. Al perder su viabilidad estas células no iban a ser transformadas en su totalidad, es por esto que el número de células presentes en Figura 32 son pocas, además que el volumen de siembra también fue un factor

limitante de transformación. La bacteria transformada es importante para continuar con proceso de producción de proteína recombinante BipAr.

**Figura 32:** Transformación de células BL21 DE3 + Bt BipA en placas con LB y ampicilina (50mg/mL). Se realizó transformación de células BL21 DE3 con plásmido pET-19B que contenía Bt BipA. Se puede observar dentro del círculo rojo el crecimiento de clones en los cuales se expresa la proteína de interés (BipAr)



(Fuente: Foto propia)

La inducción es un paso importante en la producción de proteína recombinante, ya que permite activación de expresión de operon *Lac*. El genoma de las células transformadas contiene la polimerasa de T7 bajo el control de la secuencia del operon *lac*, que es un sistema útil para controlar inducción (Studier, 2005). Utilizando BL21 (DE3) e IPTG se indujo la expresión de proteína BipAr por medio del sistema T7 ya que el vector pET contiene el gen de BipA bajo el control del promotor del fago T7. Al inducir la expresión de la polimerasa T7, esta puede activar la expresión en grandes cantidades de la proteína BipAr. Es importante mencionar que para que la inducción fuera eficiente se debía tener cultivo celular con un  $OD_{600}$  igual a 0.4, ya que en este punto las bacterias se encuentran en fase exponencial en su curva de crecimiento (Novagen, 1999). En la Figura 33, se observa en que las muestras que fueron inducidas tienen una mayor cantidad de proteína,

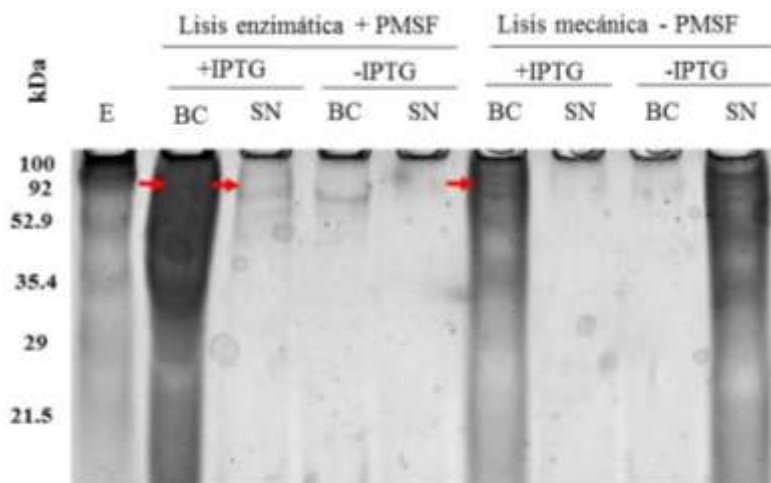
en comparación a no inducidas, esto se puede ver según la intensidad y tamaño de las bandas presentes en el gel. En el segundo y sexto carril se observa muestras inducidas para lisis enzimática y mecánica respectivamente con presencia de bandas con mayor intensidad en comparación del cuarto y octavo carril que son muestras no inducidas para lisis enzimática y mecánica respectivamente. En este resultado se aseguró que el inductor IPTG cumplió su función al unirse a promotor *T7lac* por lo que el gen que codifica para proteína recombinante sí se expresó de una manera adecuada. Al estar presente el inductor, el complejo IPTG-represor permite que ARN polimerasa transcriba la polimerasa de T7.

La lisis celular es un paso crítico y determinante en la producción de proteína recombinante, ya que con este procedimiento se libera la proteína de interés producida por el hospedero que en este caso fue BL21 (DE3). En este paso se da un rompimiento de células específicamente de barreras como la membrana y la pared celular. El rompimiento también se da a niveles de fuerzas de van de Waals, interacciones iónicas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno (GE, 2011). Para obtener BipAr fue importante determinar el mejor método de lisis celular. En el proceso de lisis mecánica sin inducción, se observa que la mayoría de proteínas se encuentran en el sobrenadante y no en el pellet. Al inducir y lisar mecánicamente en la Figura 33, se observa que la mayoría de proteína se encuentra en el botón celular. Esto sugiere que la inducción produce la acumulación de proteína recombinante en el botón celular. En la Figura 33 se puede observar del segundo al quinto carril productos de lisis enzimática y del sexto al noveno carril de lisis mecánica, en esto se muestra la diferencia en base a la integridad de la banda. La presencia de mayor cantidad de proteína en el botón celular como se observa en el segundo carril comparado con el sexto carril asegura que el proceso de lisis enzimática es más adecuado para continuar el proceso de producción. Esto se debe a que BL21 (DE3) es propensa a enzimas líticas. La utilización de lisoenzima se fundamenta en rompimiento uniones glucosídicas de polisacáridos en pared celular de BL21 (DE3) por lo que proteína de interés es liberada para su posterior purificación (Salazar y Asenjo, 2007).

Para evaluar estabilidad de proteína inducida luego del proceso de lisis se realizó un SDS-PAGE con el fin de observar integridad de una banda. La estabilidad es importante para comprender estructura y función de la proteína de interés. La proteína inducida debe

mantener su estabilidad para asegurar que su actividad biológica no se pierda (Stigter, *et al.*, 1991). BipAr producida fue expuesta a lisis enzimática, quiere decir que se trató la muestra con un reactivo como PMSF que es un inhibidor de proteasa, que tiene la capacidad de unirse al sitio activo de proteasas y bloquear su función. En la Figura 33 se muestra la diferencia que hay entre el proceso de lisis enzimática que incluye PMSF y mecánica que no lleva PMSF, las flechas indican presencia de banda de proteína de interés. Al inducir expresión, se observa la degradación en los carriles de lisis mecánica, comparado con lisis enzimática, indicando que en la lisis mecánica se pierde estructura terciaria de la proteína y además que hay presencia de proteasas que degradan la proteína que se produjo en el proceso de inducción.

**Figura 33:** Gel de poliacrilamida desnaturalizante SDS-PAGE 12% de la proteína BipA inducida con IPTG en *E. coli* BL21 (DE3). Se realizó la inducción con IPTG 1mM, en el primer carril se observa escalera (Bio-Rad, *Prestained SDS-PAGE standards low range*, Cat No. 1610305), del segundo al quinto carril muestras inducidas y no inducidas respectivamente de Lisis enzimática (LE). Por último, del sexto al noveno carril se observan muestras inducidas y no inducidas correspondientes a lisis mecánica (LM). Las flechas indican presencia de banda de proteína de interés. Se observa la diferencia de intensidad comparando métodos de lisis. La muestra fue preparada con Buffer Laemmli en relación 2:1 con la muestra. IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido), E (escalera), BC (botón celular) y SN (sobrenadante)



(Fuente: Foto propia)

Para realizar la cuantificación de la concentración de la proteína recombinante BipA se utilizó espectrofotometría UV a una longitud de onda de 280nm. Esto debido a que algunos aminoácidos aromáticos como el triptofano y tirosina pueden absorber a esta longitud, mientras que la fenilalanina contribuye en menor forma. Además, este método fue seleccionado debido a cumple con la ley de Beer-Lambert que indica que la absorbancia es proporcional a la concentración y tamaño de celda. Se utilizó BSA para la preparación de estándares (Cuadro 14) debido a que esta proteína en su secuencia contiene tres triptófanos, veintiuna tirosinas y treinta fenilalaninas, dadas estas características la absorción a 280 nm suele ser muy eficiente. En comparación con rBipA ésta tiene cuatro triptófanos, siete tirosinas y veintidos fenilalaninas, lo que hacen que pueda absorber ha esta longitud de onda. En la Figura 34 se puede observar la curva de calibración con la siguiente ecuación  $y = 0.5799x - 0.013$  con un  $R^2 = 0.9970$ ; esta ecuación fue utilizada para interpolar los valores y determinar la concentración de la proteína purificada. Sin embargo, la Figura 34 muestra el análisis estadístico del modelo de regresión lineal. En éste se puede observar que el  $R^2$  ajustado es de 0.996, lo cual toma en cuenta los grados de libertad, además mientras mas cercano a 1 es el valor de este indicador se sabe que mejor ajuste al modelo tiene la curva. Si se observa también que la significancia es 0.000 quiere decir que la pendiente no es igual a cero, lo cual se comprueba con la ecuación.

La concentración de la proteína BipAr fue evaluada mediante espectrofotometría a 280nm. Para realizar el cálculo de la concentración de la proteína purificada se utilizó la curva de calibración de la Figura 34 con su respectiva ecuación. Además, la absorbancia obtenida se encontraba dentro del rango con el que se había realizado la curva de calibración por lo que se podía utilizar el modelo para determinar la concentración de la proteína purificada. Con una  $Abs_{280}$  de 0.095, se estimó una concentración de 0.1107 mg/ml a partir de un cultivo de 1 mL de bacterias (Cuadro 15).

Para asegurarse que la cuantificación de la proteína fuera exacta se realizó una corrección a 260 nm (ecuación 8), que es la longitud de onda donde absorbe el ADN. Esto fue realizado para asegurarse de no tener este tipo de contaminante. Sin embargo, durante el proceso de lisis se agregó ADNasa que ayudó a eliminar estos contaminantes; dado esto la absorbancia medida a 260nm fue cero. Medir la concentración de la proteína purificada

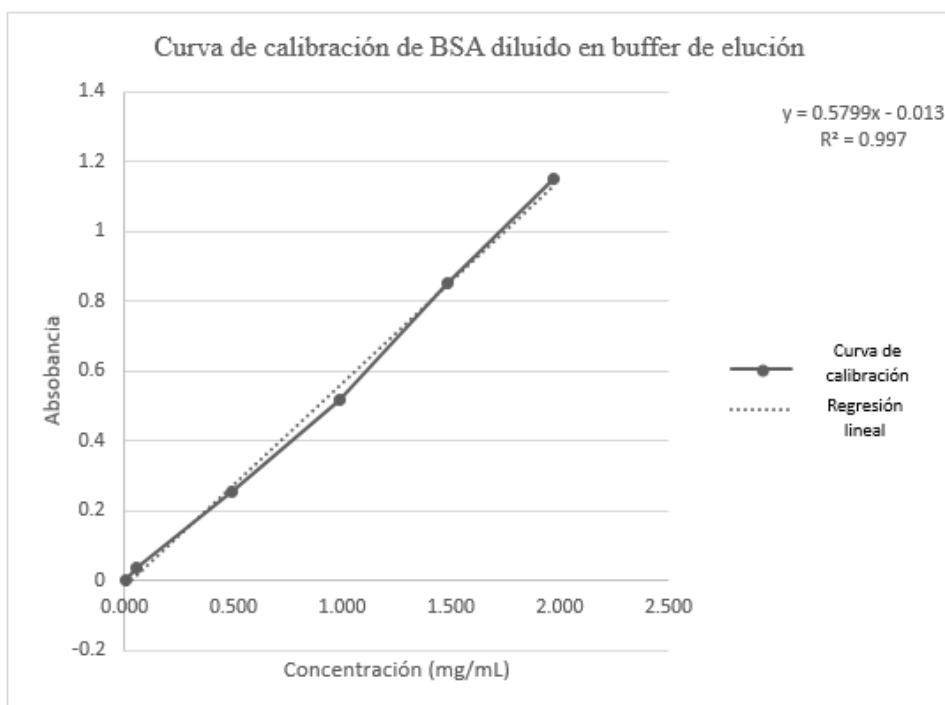
fue importante ya que es un indicador de la eficiencia del método de purificación. Además, era necesario conocer la concentración para poder analizar la proteína posteriormente en el gel de SDS-PAGE.

**Cuadro 14:** Concentración de cada estándar de BSA con tampón de elución y la absorbancia respectiva

Concentración (mg/ml)	Absorbancia 280nm
0.005	0.0035
0.049	0.035
0.493	0.256
0.986	0.5159
1.479	0.8511
1.972	1.151

Fuente: Elaboración propia.

**Figura 34:** Curva de calibración y modelo de regresión lineal para la estimación de concentración de rBipA



Fuente: Elaboración propia utilizando Excel.

**Cuadro 15:** Concentración de proteína purificada

Absorbancia (280nm)	Concentración mg/ml
0.095	0.1107

Fuente: Elaboración propia.

La proteína BipAr tenía insertada una cola de seis histidinas con el fin de que pudieran adherirse a la resina de columna revestida con Niquel. La resina de la columna esta formada por agarosa derivatizada con ácido nitrilotriacético que actúa como quelante de los iones de níquel divalentes ( $\text{Ni}^{2+}$ ) lo cual permite que dichos iones permanezcan unidos por cuatro enlaces a la columna y que a través de dos enlaces restantes que se una la proteína que esta marcada con la histidina. Durante el proceso de purificación fue necesario realizar varios lavados con tampón de unión y elución. Ambos tampones contenían imidazole, este reactivo compite con la proteína por la unión a los medios de comunicación de iones metálicos cargados que están en el revestimiento de la columna. Además, es importante hacer mencionar que el imidazol es intermediario de la síntesis de histidina, teniendo una estructura que compite con otras proteínas del lisado bacteriano en la unión al níquel. Por lo tanto, la concentración de imidazol en cada paso debe de ser optimizada para garantizar el rendimiento de la purificación. Una concentración de imidazol 500 mM en el tampón de elución asegura la elución completa de la proteína marcado con histidina (GE-Healthcare, 2011). Sin embargo, es importante mencionar que el rendimiento de la purificación también depende de la cantidad de producto lisado que se quiera purificar, ya que a mientras más producto lisado se purifique mayor será el rendimiento. En el caso de esta purificación se utilizó 0.5 mL de lisado por lo que la cantidad de proteína que debía de haberse purificado era de 12.5  $\mu\text{g}$  y finalmente se obtuvo 442.8  $\mu\text{g}$  lo cual indica un rendimiento de mas del 90 % en la purificación (Cuadro 16).

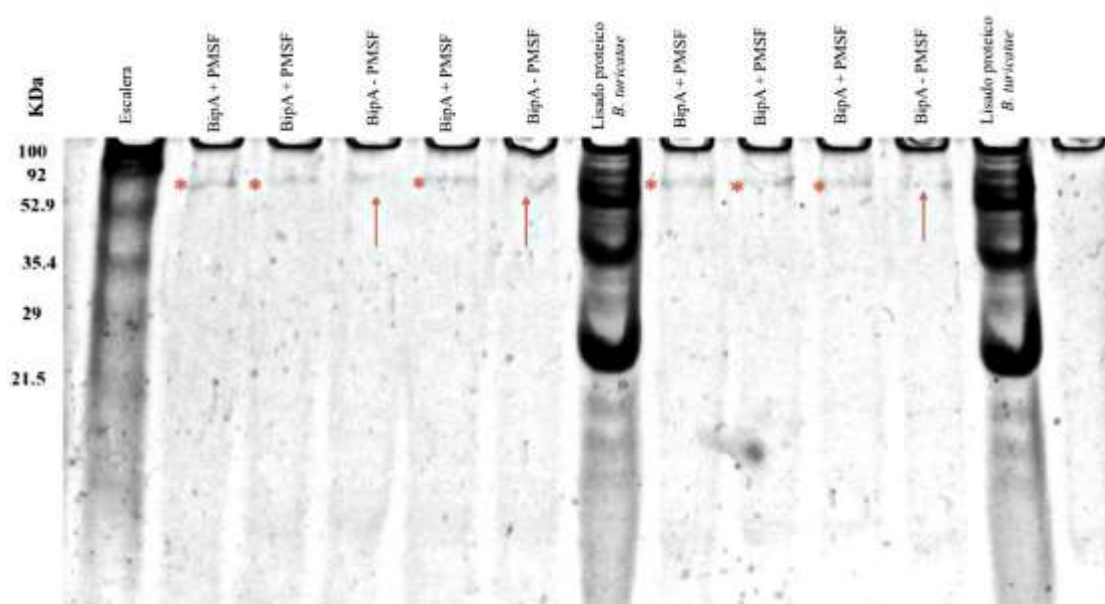
**Cuadro 16:** Rendimiento de la purificación de BipAr

	Mínimo esperado $\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$ obtenidos	Rendimiento
<b>rBipA</b>	12.5	442.8	>90%

Fuente: Elaboración propia.

El SDS PAGE fue utilizado para caracterizar y evaluar la estabilidad de la proteína BipAr. Ésta técnica permite separar proteínas en base a su peso molecular, por lo que si se observa la escalera se puede notar una banda para cada peso. La banda que corresponde al tamaño de BipAr es de 70 kDa (Wilder *et al.*, 2015) por lo que se puede decir que sí hay correspondencia entre las bandas encontradas y el peso de la proteína purificada. Para analizar la estabilidad de la proteína fue necesario agregar un inhibidor de proteasas, en este caso se utilizó PMSF (c.f.) (1 Mm). Se sabe que el PMSF tiene la capacidad de unirse de forma covalente al sitio activo de las proteasas para evitar la actividad proteolítica. Si se observa la Figura 11 se pueden visualizar tres carriles que contiene una flecha, esta flecha indica que la proteína purificada no fue tratada con PSMF por lo que se observan bandas más degradadas que en el resto de carriles en donde con un rectángulo se encuentra marcada la proteína con su inhibidores. A pesar de que las bandas no son tan intensas coinciden con la concentración encontrada de 0.1107 mg/mL que es equivalente a 1107 ng de BipAr cargados en el gel. Se sabe que en un SDS PAGE teñido con Commassie se puede llegar a visualizar proteínas con una concentración de 100 ng, sin embargo la resolución no es completamente buena (Kang *et al.*, 2002).

**Figura 35:** Gel de poliacrilamida desnaturalizante SDS-PAGE 12% de la proteína BipAr purificada con la columna HisTrap FF marca General Electric. En el primer carril se cargó 10  $\mu$ L de la escalera Prestained SDS-PAGE Standards, low range Cat. 1610305 BioRad. Luego el segundo, tercer, quinto, octavo, noveno y décimo carril se cargó 10  $\mu$ L de BipAr purificada con PMSF 1 Mm (bandas marcadas con asteriscos rojos). En el cuarto, sexto y onceavo carril se cargó 10  $\mu$ L de BipAr purificada sin PMSF (carriles con flecha). Por último, en el séptimo y doceavo carril se cargó 10  $\mu$ L de lisado de *B. turicatae*, donado por Dr. Job López.



(Fuente: Foto propia)

## B. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA EL SILENCIAMIENTO DE LOS GENES *BOL* Y *ZPG* DE MACHOS DE *Anopheles albimanus* MEDIANTE EL USO DE ARN DE INTERFERENCIA

Los resultados presentados a continuación son numerados como resultado 1, resultado 2 o resultado 3 acorde al objetivo que representan.

1. Resultado 1: Diseño de “primers” de los genes de interés (*BOL* y *ZPG*) y determinación de la estabilidad de los insertos de dichos genes en cepas de *E. coli*

a. Señalización de productos amplificados con “primers” diseñados para los genes *ZPG* y *BOL*. A continuación, se presentan las secuencias de los genes *ZPG* y *BOL* señalizando los fragmentos amplificados por las diferentes parejas de “primers” diseñados.

**Figura 36:** Señalización de parejas de "primers" en la secuencia del gen *ZPG*. Los exones están representados por diferentes colores. La secuencia en la que se une cada uno de los “primers” está señalizada con una flecha. En negrita se encuentra la secuencia amplificada

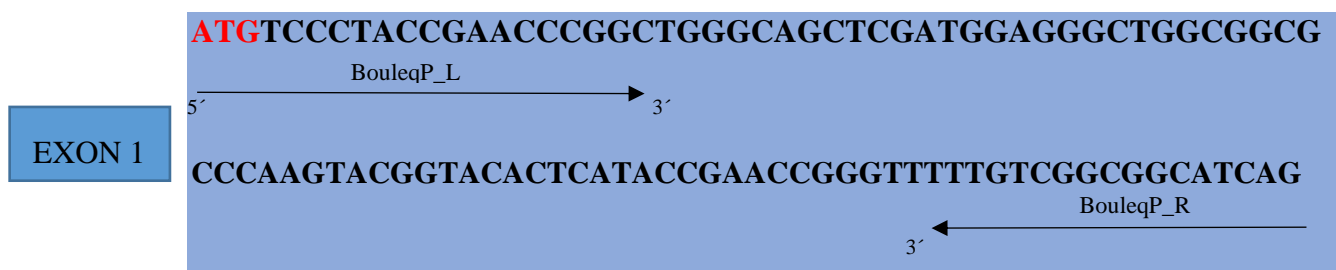


Continuación figura 36

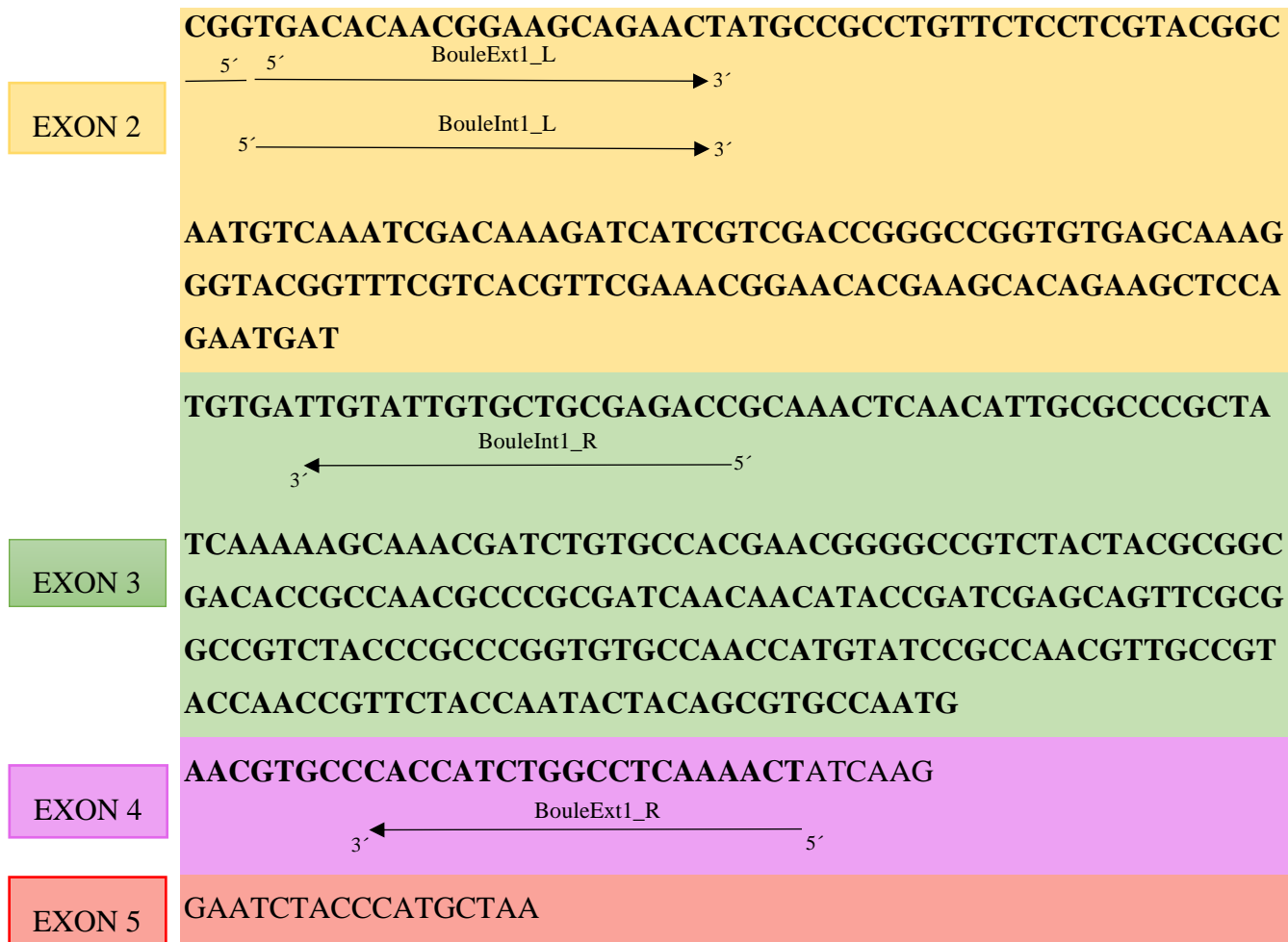


(Fuente: Elaboración propia)

**Figura 37:** Señalización de parejas de "primers" en la secuencia del gen *BOL*. Los exones están representados por diferentes colores. La secuencia en la que se une cada uno de los "primers" está señalizada con una flecha. En negrita se encuentra la secuencia amplificada.



Continuación figura 37



(Fuente: Elaboración propia)

b. Cuadro con nombre y secuencias de “primers” diseñados para los genes *BOL* y *ZPG*. En los Cuadros 17 y 19 se presentan las secuencias y nombres otorgados a los “primers” diseñados para la amplificación de los genes *BOL* y *ZPG*, respectivamente. También se presentan características especiales de cada “primer” en los Cuadros 18 y 20.

En el Cuadro 17 se observa que todos los “primers” diseñados sin promotor T7 cumplen con la recomendación de tamaño adecuado entre 20-25 pb. Esto asegura el buen funcionamiento de la PCR (Farrell, 2005). El promotor T7 fue añadido en los demás “primers” en el extremo 5’ para permitir la síntesis del amplicón por adición de nucleótidos en el extremo 3’ (Farrell, 2005). Se procuró que la secuencia de los últimos cinco nucleótidos cercanos al extremo 3’ contuvieran como máximo dos guaninas o citocinas.

Sin embargo, esto no fue posible en dos “primers”, los cuales podrían propiciar la formación de dímeros que impidan amplificar el gen (Farrell, 2005). Se observan dos parejas de “primers” exteriores para el diseño de los cuales se tomó en cuenta la secuencia completa de exones del gen *BOL*. Por otro lado, las parejas de “primers” interiores (BouleInt1 y BouleInt1T7) se diseñaron tomando en cuenta únicamente la secuencia amplificada por los “primers” exteriores (BouleExt1 y BouleExt1T7). Esto con el fin de realizar una PCR anidada y confirmar la especificidad del gen amplificado.

**Cuadro 17:** Nombre y secuencia de los “primers” diseñados para amplificar el gen *BOL*

Nombre	Especificaciones	Secuencia “primers” exteriores gen <i>BOULE</i> (1)
BouleExt1_L	“Primer” F	5'-TGACACAACGGAAGCAGAAC-3'
BouleExt1_R	“Primer” R	5'-AGTTTTGAGGCCAGATGGTG-3'
BouleExt1T7_L	“Primer” F con promotor T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGTGACACAACGGAAGCAGAAC-3'
BouleExt1T7_R	“Primer” R con promotor T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGAGTTTTGAGGCCAGATGGTG-3'
Nombre	Especificaciones	Secuencia “primers” exteriores gen <i>BOULE</i> (2)
BouleExt2L	“Primer” F	5'-CGCCCAAGTACGGTACTC-3'
BouleExt2_R	“Primer” R	5'-GGTCTCGCAGCACAATACAA-3'
BouleExt2T7_L	“Primer” F con promotor T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGCGCCCAAGTACGGTACTC-3'
Nombre	Especificaciones	Secuencia “primers” interiores gen <i>BOULE</i>
BouleExt2T7_R	“Primer” R con promotor T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGGTCTCGCAGCACAATACAA-3'
BouleInt1_L	“Primer” F	5'-TCGTACGGCAATGTCAAATC-3'
BouleInt1_R	“Primer” R	5'-TTGGCAGCTGTAGTATTGG-3'
BouleInt1T7_L	“Primer” F con promotor T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGTTCGTACGGCAATGTCAAATC-3'
BouleInt1T7_R	“Primer” R con promotor T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGTTGGCAGCTGTAGTATTGG-3'

Fuente: Elaboración propia

Las características de los “primers” observadas en el Cuadro 18 reflejan el cumplimiento de las recomendaciones reportadas en la literatura. En primer lugar, no existe

una diferencia mayor a cinco grados centígrados entre la  $T_m$  de todas las parejas de los “primers” (Farrell, 2005), lo cual facilita la utilización de las parejas en un mismo programa de PCR. En segundo lugar, el porcentaje de GC de todos los “primers” se encuentra en el rango ideal de 40-60%. Por lo tanto no se propicia la formación de enlaces fuertes entre secuencias complementarias que pertenezcan al mismo “primer” (“hairpin” u homodímero) o a este y su pareja (heterodímeros) (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Se observa que las estructuras anteriormente mencionadas tienen poca probabilidad de suceder de forma espontánea debido a que el cambio en la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) de estos procesos tiende a ser positivo y el máximo valor negativo es de -16.03 (Melo y Cuamatzi, 2007).

**Cuadro18:** Características de los “primers” diseñados para amplificar el gen *BOL*.

Nombre	$T_m$ (°C)	% GC	No. de “hairpins” (rango $\Delta G$ kcal/mol)	No. de homodímeros (rango $\Delta G$ kcal/mol)	No. de heterodímeros (rango $\Delta G$ kcal/mol)
BouleExt1_L	60	50	6 (1.9 a 2.47)	5 (-3.61 a -1.95)	19 (-3.9 a -1.34)
BouleExt1_R	60	50	2 (-0.65 a 0.11)	5 (-9.28 a -1.47)	
BouleExt1T7_L	73	45	1 (-2.05)	30 (-6.59 a -0.96)	48 (-6.59 a -0.96)
BouleExt1T7_R	74	45	3 (-1.66 a -0.72)	32 (-9.28 a -0.96)	
BouleExt2L	61	60	4 (-0.37 a 0.49)	11 (-3.65 a -1.34)	12 (-3.61 a -1.34)
BouleExt2_R	60	50	7 (0.76 a 1.72)	8 (-3.61 a -0.96)	
BouleExt2T7_L	74	50	2 (-0.81 a -1.64)	36 (-16.03 a -0.96)	39 (-6.75 a -0.96)
BouleExt2T7_R	74	45	4 (-0.34 a 0.64)	29 (-5.19 a -0.96)	
BouleInt1_L	60	45	1 (-1.03)	10 (-10.87 a -1.34)	12 (-5.37 a -1.94)
BouleInt1_R	60	50	13 (0.75 a 1.74)	14 (-3.61 a -0.96)	
BouleInt1T7_L	73	45	3 (-4.12 a -2.56)	35 (-10.87 a -0.96)	44 (-8.83 a -0.96)
BouleInt1T7_R	73	45	2 (-1.16 a -0.7)	41 (-6.59 a -0.96)	

Fuente: Elaboración propia

En el Cuadro 19 se puede observar que las secuencias de todos los “primers” diseñados sin promotor T7 poseen un tamaño adecuado para que funcione la PCR ya que no superan los 25 pb recomendados (Farrell, 2005). En los demás “primers” dicho promotor fue añadido en el extremo 5’ para evitar interferir con la adición de nucleótidos (Farrell, 2005). No fue posible evitar la presencia de más de dos guaninas o citocinas cercanas al extremo 3’ en todos los “primers”. Esto podría intervenir en el adecuado funcionamiento de los “primers” porque facilitaría la formación de dímeros en dicho extremo e impediría la adición de nucleótidos para amplificar el gen (Farrell, 2005). Se diseñó “primers” exteriores (ZPGExt1 y ZPGExt1T7) para amplificar una secuencia grande del exón 3 del gen *ZPG*. Además, se diseñó “primers” interiores (ZPGInt1 y ZPGInt1T7) para amplificar una secuencia interna del amplicón generado por los “primers” exteriores; esto facilita confirmar la amplificación del gen de interés mediante una PCR anidada.

**Cuadro 19:** Nombre y secuencia de los "primers" diseñados para amplificar el gen *ZPG* de *An. albimanus*

Nombre	Especificaciones	“Primers” exteriores gen <i>ZPG</i>
ZPGExt1_L	“Primer” sentido	5'-ATTTGCATTCCTGTGGCTGT-3'
ZPGExt1_R	“Primer” antisentido	5'-AAACATTAACCTCGCCTATCTCT-3'
ZPGExt1T7_L	“Primer” sentido con promotor T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGATTTGCATTCCTGTGGCTGT-3'
ZPGExt1T7_R	“Primer” antisentido con promotor T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGAAACATTAACCTCGCCTATCTCT-3'
Nombre	Especificaciones	“Primers” interiores gen <i>ZPG</i>
ZPGInt1_L	“Primer” sentido	5'-TTCGGTGGTTGTCAACAATG-3'
ZPGInt1_R	“Primer” antisentido	5'-AGATCGCCATCTTGGTCCT-3'
ZPGInt1T7_L	“Primer” sentido con promotor T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGTTTCGGTGGTTGTCAACAATG-3'
ZPGInt1T7_R	“Primer” antisentido con promotor T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGAGATCGCCATCTTGGTCCT-3'

Fuente: Elaboración propia.

En el Cuadro 20 se observa que todas las parejas de los “primers” diseñados cumplen con que su  $T_m$  no difiera en más de cinco grados centígrados (Farrell, 2005). Esto permitirá que cada pareja de “primers” funcione adecuadamente al utilizar un mismo programa de PCR. Se espera que todos los “primers” sean efectivos debido a que su porcentaje de GC no supera el 60%, lo cual reduce la posibilidad de que se formen enlaces fuertes en los “hairpins” y dímeros (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Esto se comprueba debido a que los rangos del cambio de la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) son levemente negativos (máximo -8.19) lo que implica que existe menor probabilidad de que las reacciones de formación de “hairpins” y dímeros ocurran de manera espontánea (Melo y Cuamatzi, 2007).

**Cuadro 20:** Características de los "primers" diseñados para amplificar el gen *ZPG* de *An. albimanus*

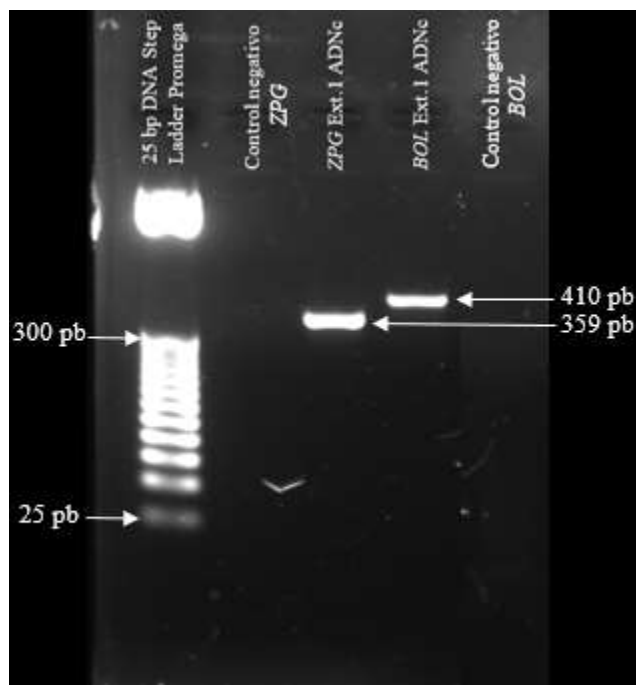
Nombre	$T_m$ (°C)	% GC	No. de “hairpins” (rango de $\Delta G$ kcal/mol)	No. de homodímeros (rango de $\Delta G$ kcal/mol)	No. de heterodímeros (rango de $\Delta G$ kcal/mol)
ZPGExt1_L	61	45	3 (-0.2 a 0.7)	10 (-7.05 a -1.47)	16 (-6.21 a -1.34)
ZPGExt1_R	58	39	3 (1.92 a 2.83)	10 (-4.85 a -0.96)	
ZPGExt1T7_L	74	43	1 (-1.57)	36 (-7.05 a -0.96)	45 (-8.19 a -0.96)
ZPGExt1T7_R	71	40	2 (-1.39 a -0.67)	37 (-7.1 a -0.96)	
ZPGInt1_L	60	45	4 (-0.55 a 0.23)	11 (-5.24 a -1.34)	11 (-5.02 a -1.34)
ZPGInt1_R	60	53	4 (-0.84 a 0.04)	7 (-5.02 a -1.57)	
ZPGInt1T7_L	73	43	6 (-1.38 a -0.4)	38 (-6.59 a -0.96)	43 (-6.59 a -0.96)
ZPGInt1T7_R	73	46	3 (-1.93 a -1.02)	32 (-6.59 a -0.96)	

Fuente: Elaboración propia

c. Geles de electroforesis de productos de PCR amplificados con los “primers” diseñados. En la Figura 38 se observa que los “primers” ZPGExt1 y los “primers” BouleExt1 sí lograron amplificar la secuencia esperada (tercer y cuarto pozo, respectivamente). Se esperaba que la secuencia amplificada del gen *ZPG* fuera de 359 pb y la secuencia amplificada del gen *BOL* fuera de 410 pb. Esto concuerda con la posición de las bandas en el gel, ya que la banda de *ZPG* está entre la banda de 300 pb de la escalera y la banda de *BOL* que está ubicada en una posición superior. Las secuencias amplificadas presentan alta integridad ya que se observan como bandas definidas. Además, ambas bandas son bastante intensas lo que significa que los productos de PCR se encuentran en alta concentración (Magdeldin, 2012).

Cabe resaltar que en la literatura se reporta que el gen *BOL* es únicamente importante en la espermatogénesis, pero no es esencial para la gametogénesis de las hembras (Ruggiu *et al.*, 1997). Aun así, se logró amplificar el gen *BOL* a partir de ADNc de hembras, lo cual indica que se expresa en hembras, pero posiblemente se encuentre desempeñando otra función no conocida. Además, se reporta que el gen *ZPG* está involucrado en la diferenciación y supervivencia de las células germinales, tanto en machos como en hembras (Magnusson *et al.*, 2011). Es por esto que fue posible amplificarlo a partir de ADNc de hembras de *An. albimanus* ya que estas también lo expresan. El control negativo de ambos genes no presentó ninguna banda (segundo y cuarto pozo) por lo que los resultados son confiables. La elección de la escalera no fue la más adecuada ya que no permite determinar la diferencia de tamaño en bandas superiores a las 300 pb. Se recomienda utilizar la escalera “Perfect DNA ladder 50 bp” de NOVAGEN.

**Figura 38:** Productos de PCR de genes *BOL* y *ZPG* amplificados a partir de cDNA de hembras de *An. albimanus* utilizando los "primers" BouleExt1 y ZPGExt1, respectivamente. Condiciones de corrida: gel de agarosa al 1 % (p/v) en "buffer" de corrida TBE 1X (c.f.) y 16.67 V/cm. Visualización con bromuro de etidio a 300 nm



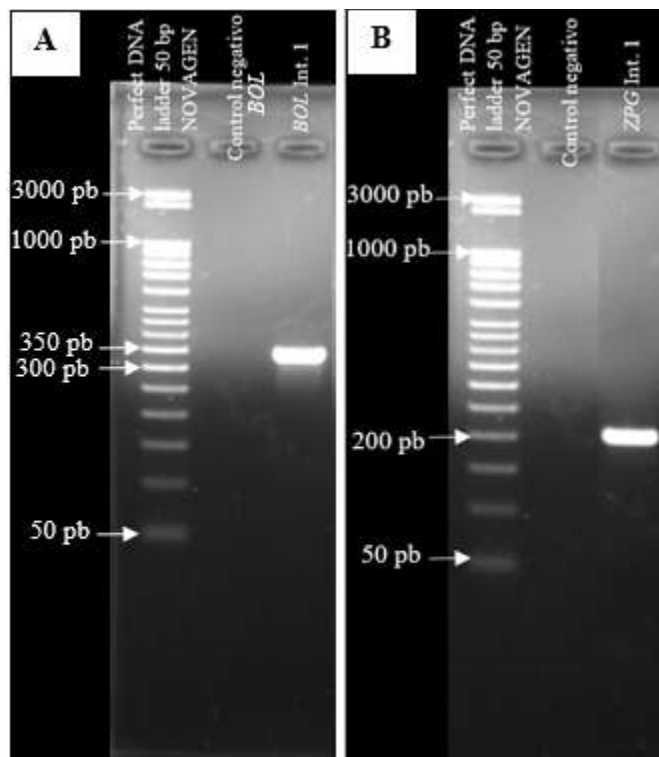
(Fuente: Foto propia)

En el tercer pozo de la Figura 39 A se observa la banda correspondiente a la secuencia amplificada por los "primers" BouleInt1 a partir del producto de PCR obtenido con "primers" BouleExt1. La banda se encuentra localizada entre las bandas de 300 pb y 350 pb de la escalera, lo cual confirma el funcionamiento exitoso de dichos "primers" debido a que el tamaño del amplicón esperado era de 343 pb. Por otro lado, en el tercer pozo de la Figura 39 B se observa la banda correspondiente a la secuencia amplificada por los "primers" ZPGInt1 del gen *ZPG* a partir del producto de PCR obtenido con "primers" ZPGExt1. El tamaño esperado de esta secuencia era de 204 pb. Por lo que su ubicación, levemente por encima de la banda de 200 pb de la escalera, demuestra que la banda representa el producto esperado. Ambas bandas se observan intensas y definidas lo que demuestra la alta concentración e integridad de los productos de PCR. La ausencia de

bandas en el segundo y cuarto pozo de los controles negativos demuestra la correcta ejecución de la PCR y la ausencia de contaminación.

**Figura 39:** Productos de PCR anidada de los genes A) *BOL* y B) *ZPG* de *An. albimanus* utilizando los "primers" BouleInt1 y ZPGInt1, respectivamente. Condiciones de corrida: gel de agarosa al 1 % (p/v) en "buffer" de corrida TBE 1X (c.f.) y 16.67 V/cm.

Visualización con bromuro de etidio a 300 nm

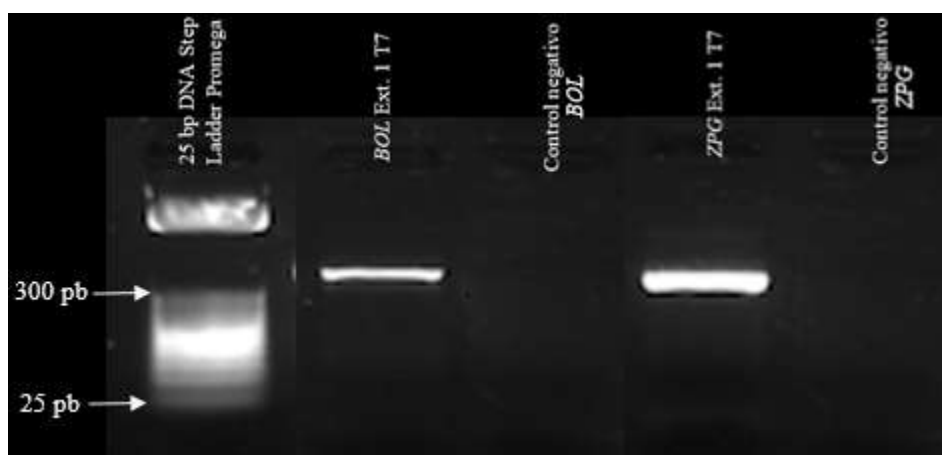


(Fuente: Foto propia)

En el segundo pozo de la Figura 40 se observa la amplificación del producto esperado (450 pb) para el gen *BOL*, cuya banda se ubica por encima de la banda de 300 pb de la escalera utilizada (pozo 1). La banda del producto amplificado representa la secuencia seleccionada del gen *BOL* de 410 pb por en cuyos extremos 5' se ha añadido un promotor T7 (20 pb cada uno) para formar un producto final de 450 pb. En el cuarto pozo se observa el producto del gen *ZPG*, el cual tiene un tamaño esperado de 399 pb. Este se compone del segmento del gen *ZPG* de 359 pb y dos promotores T7 de 20 pb cada uno (añadidos en cada extremo 5' del producto). Los resultados concuerdan con lo esperado ya que la banda

del producto del gen *BOL* corrió una menor distancia que la banda del producto del gen *ZPG*, lo que significa que el primero tiene un mayor tamaño (Magdeldin, 2012). Ambos productos tienen alta concentración ya que las bandas se ven claras e intensas. Además las bandas se observan bastante definidas, lo que demuestra la alta integridad de los productos. Los controles negativos no poseen ninguna banda (tercer y quinto pozo) evidenciando la buena ejecución de la PCR y la ausencia de contaminación. Se observa que la escalera utilizada no se separó de forma adecuada y seguramente necesitaría más tiempo de corrida para permitir la separación definida de las bandas. En este caso nuevamente se recomendaría utilizar la escalera “Perfect DNA ladder 50 bp” de NOVAGEN para analizar bandas con tamaños superiores a los 300 pb.

**Figura 40:** Producto de PCR de los genes *BOL* y *ZPG* de *An. albimanus* utilizando "primers" BouleExt1T7 y ZPGExt1T7, respectivamente. Condiciones de corrida: gel de agarosa al 1 % (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X (c.f.) y 16.67 V/cm. Visualización con bromuro de etidio a 300 nm



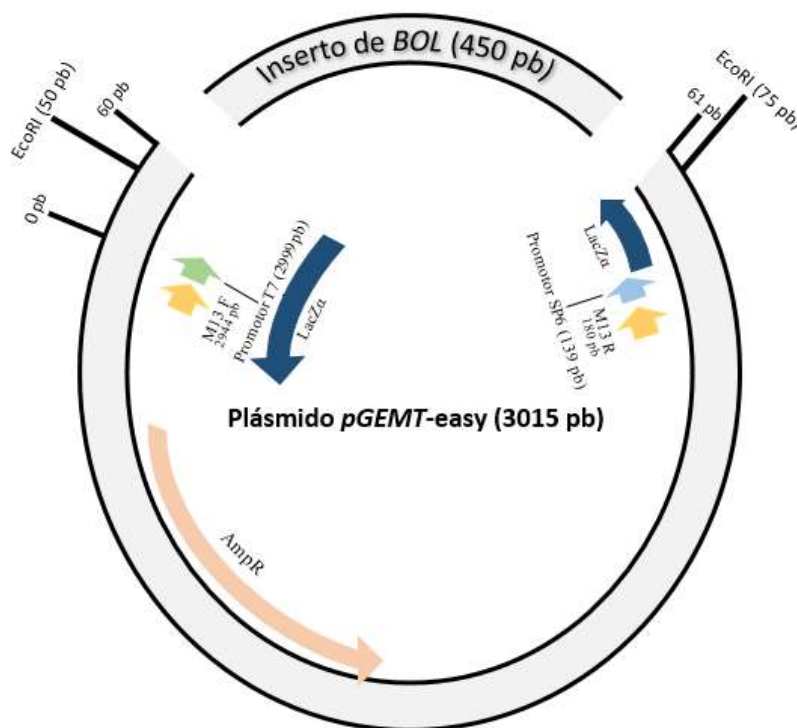
(Fuente: Foto propia)

Es necesario mencionar que en el diseño de ambas parejas de “primers” no se consideró que el plásmido *pGEMT* ya posee un promotor T7 cercano al sitio de clonación (Promega, 2015). Esto implicaría que el inserto amplificado con estos “primers” sea antecedido por dos promotores T7 en uno de sus extremos cuando sea ligado al plásmido; uno de los promotores pertenecientes al plásmido y el otro añadido al inserto por los “primers”. Como resultado los “primers” exteriores 1 T7 podrían presentar dificultad para

amplificar el inserto dentro del plásmido. También implica que el inserto pueda ser expresado a niveles superiores de lo deseado. Otro aspecto que podría mencionarse como una desventaja del uso de este plásmido es que posee un promotor lac inducible por IPTG y también es capaz de inducir la expresión del inserto, por lo que la expresión del ARNi del gen *BOL* no es totalmente controlada por la ARN polimerasa T7.

d. Determinación de la estabilidad del inserto de los genes *BOL* y *ZPG* en cepas de *E. coli*. Para facilitar la comprensión de los resultados presentados en esta sección, se preparó un diagrama del plásmido *pGEMT easy* presentado a continuación.

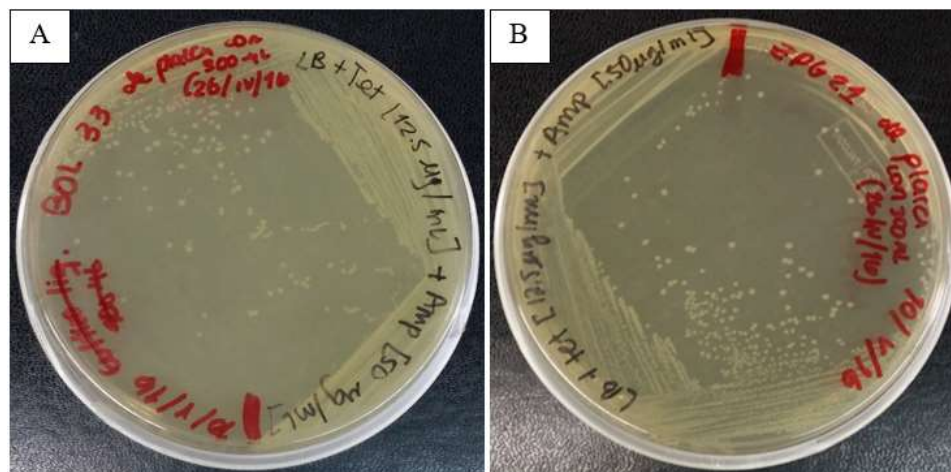
**Figura 41:** Diagrama del plásmido *pGEMT easy*. Los números indicados representan sitios clave en la secuencia del plásmido. Las flechas indican la dirección de los promotores, “primers” o genes.



(Fuente: Elaboración propia utilizando como referencia información proporcionada por Promega, 2015)

1) Placa de agar LB+Tet [12.5 µg/mL] (c.f.) + Amp [50 µg/mL] (c.f.) con crecimiento de *E. coli* NOVA BLUE *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL/ZPG*. La transformación de *E. coli* NOVA BLUE con el plásmido *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL/ZPG* fue exitosa debido a que las cepas transformadas adquirieron la resistencia a ampicilina (codificada en el plásmido mencionado) permitiendo su crecimiento en la placa con tetraciclina y ampicilina (Figura 42). Si no hubiera sido transformada, la cepa sería resistente únicamente a tetraciclina. Los insertos de *BOL* y *ZPG* en el plásmido interrumpen la secuencia del gen que codifica para la β-galactosidasa (inducida en presencia de IPTG) que hidroliza el X-gal y le confiere una coloración azul a las colonias. Por lo tanto, las colonias transformadas con el plásmido que contiene cualquiera de estos dos insertos permanecen blancas (Padmanabhan, *et al.*, 2011). Las colonias observadas en las placas A y B son blancas. Sin embargo, no se está utilizando el sistema de tamizaje blanco-azul porque no se agregó X-gal e IPTG a dichas placas. Esto debido a que el crecimiento inicial de las cepas transformadas en presencia de estos compuestos resultó ser muy lento, lo que podría indicar que cuando el inserto se expresa es tóxico (New England BioLabs Inc., 2016b). Para evitar mayor expresión del inserto se creció esta cepa a 30 °C (ThermoFisher Scientific, 2016b). La presencia de los insertos *BOL/ZPG* en el plásmido *pGEMT* se comprueba con el resultado de PCR presentado a continuación.

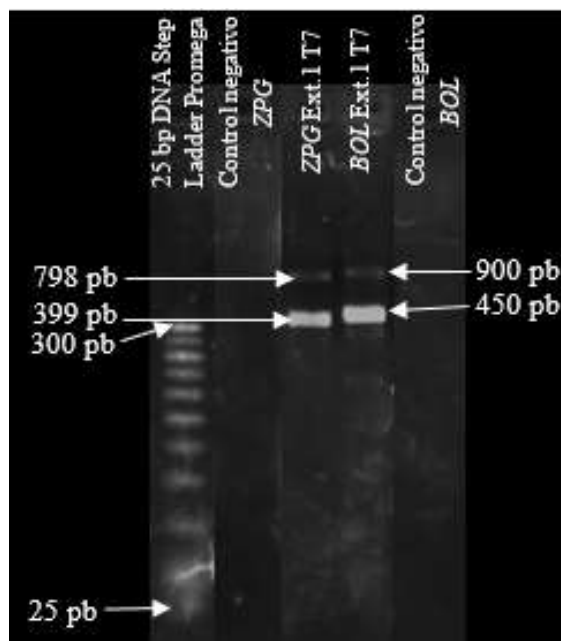
**Figura 42:** Crecimiento de (A) *E. coli* NOVA BLUE *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL* y (B) *E. coli* NOVA BLUE *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG*, resistentes a ampicilina [50 µg/mL] (c.f.) y tetraciclina [12.5 µg/mL] (c.f.). Siembra: estriado de una colonia aislada.



(Fuente: Foto propia)

2) Gel de electroforesis que demuestre la presencia del inserto de los genes *BOL* y *ZPG* en *E. coli* NOVA BLUE pGEMT-*Amp*<sup>R</sup>-*BOL/ZPG*. Los productos de PCR observados en la Figura 43 se obtuvieron a partir de una PCR exitosa. Esto se evidencia por la ausencia de bandas en el segundo y quinto pozo que contienen los controles negativos para ambos genes. En el tercer pozo se observan dos bandas; una banda intensa inferior que se cree corresponde al amplicón del gen *ZPG* con promotores T7 (399 pb) y una banda superior de aproximadamente 800 pb. En el cuarto pozo, también se observan dos bandas; una inferior intensa que se cree corresponde al producto del gen *BOL* con promotores T7 (450 pb) y otra superior de menor intensidad. Se cree que la banda intensa del cuarto pozo, que se localiza levemente por encima de la banda de 399 pb de *ZPG*, corresponde al producto del gen *BOL* con promotores T7 (450 pb). Los resultados concuerdan con lo esperado ya que la banda del producto del gen *BOL* corrió una menor distancia que la banda del producto del gen *ZPG*, lo que significa que el primero tiene un mayor tamaño (Magdeldin, 2012). En ambos pozos (tercero y cuarto) se observa que las bandas inferiores son intensas y definidas lo que demuestra la alta concentración e integridad de los productos mencionados. Por otro lado, en dichos pozos también se observa una banda superior de menor intensidad que se cree corresponde al mismo producto de cada gen pero en duplicado (*BOL*: 900 pb; *ZPG*: 798 pb). Por lo tanto, la menor intensidad de dichas bandas puede explicarse porque en un ciclo de PCR, se podría sintetizar el doble de los productos individuales que del producto duplicado. La escalera utilizada no presenta bandas superiores a las 300 pb. Por lo tanto, se recomienda utilizar la escalera “Perfect DNA ladder 50 bp” de NOVAGEN.

**Figura 43:** Producto de PCR de colonias de *E. coli* NOVA BLUE *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL* y *E. coli* NOVA BLUE *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* utilizando los “primers” BouleExt1T7 y ZPGExt1T7. Condiciones de corrida: gel de agarosa al 1 % (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X (c.f.) y 16.67 V/cm. Visualización con bromuro de etidio a 300 nm

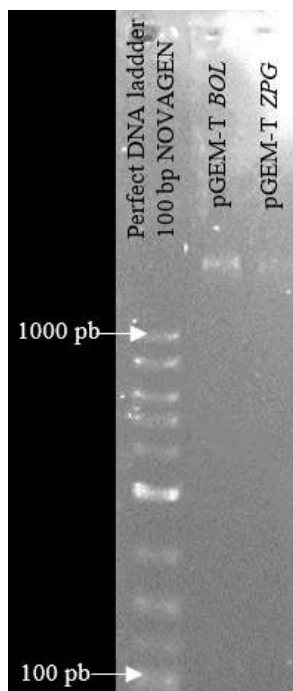


(Fuente: Foto propia)

3) Gel de electroforesis de la extracción de los plásmidos *pGEMT-AmpR-BOL/ZPG* a partir de *E. coli* NOVA BLUE *pGEMT-AmpR-BOL/ZPG*. En el segundo y tercer pozo de la Figura 44 se observan bandas de intensidad leve por encima de la banda de 1000 pb de la escalera (primer pozo). Se cree que dichas bandas representan el plásmido *pGEMT-AmpR-BOL* de 3450 pb (segundo pozo) y el plásmido *pGEMT-AmpR-ZPG* de 3399 pb (tercer pozo). La ubicación de la banda del plásmido *pGEMT-AmpR-BOL* concuerda con lo esperado, ya que el inserto de *ZPG* (399 pb) tiene un menor tamaño que el inserto de *BOL* (450 pb). Ambas bandas son íntegras, pero tienen poca intensidad, especialmente la banda del plásmido *pGEMT-AmpR-ZPG*, por lo que se podría decir que el rendimiento de la extracción fue bastante bajo. Esto se confirmó mediante la cuantificación de los plásmidos extraídos utilizando un equipo Nanodrop 2000c (ThermoFisher Scientific), cuyo resultado fue de 38.3 ng/μL para *pGEMT-AmpR-ZPG* y 31.7 ng/μL para *pGEMT-AmpR-BOL*. Según la información proporcionada por el

fabricante del kit de extracción (Promega, No. A1330), para un cultivo de 2.1 mL de *E. coli* DH5 $\alpha$  se espera extraer 163 – 233 ng/ $\mu$ L de plásmido *pGEMT*. Tomando en cuenta el límite inferior de dicho rango como el 100 %, se demuestra que el porcentaje de rendimiento de la extracción fue de 23.5 % para el plásmido *pGEMT-AmpR-ZPG* y de 19.4 % para el plásmido *pGEMT-AmpR-BOL*. El bajo rendimiento podría explicarse por la utilización de un kit de extracción que ya se encontraba vencido desde hace ya varios años. Es importante mencionar que los resultados de la cuantificación no concuerdan con la intensidad de las bandas observadas en el gel. Sin embargo, el resultado de la cuantificación es más confiable y por ende se hace caso omiso de dicha diferencia.

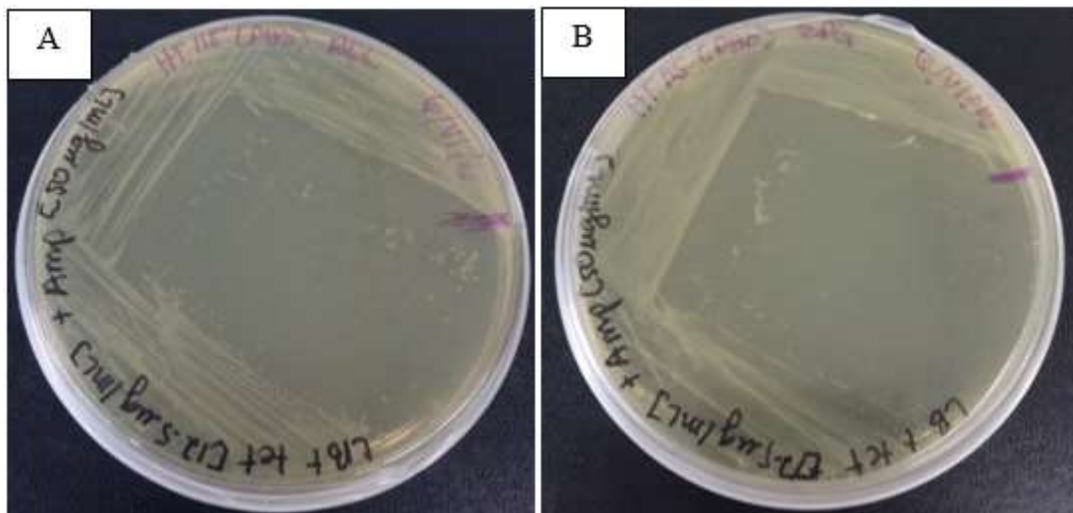
**Figura 44:** Extracción de plásmidos *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL* a partir de *E. coli* NOVA BLUE *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL*. Condiciones de corrida: gel de agarosa al 0.8 % (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X (c.f.) y 16.67 V/cm. Visualización con bromuro de etidio a 300 nm



(Fuente: Foto propia)

3) Placa de agar LB+Tet [12.5 µg/mL] (c.f.) + Amp [50 µg/mL] (c.f.) con crecimiento de *E. coli* HT115 (DE3) pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL/ZPG. La transformación de *E. coli* HT115 (DE3) con los plásmidos pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL y pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG fue exitosa debido a que las cepas transformadas adquirieron la resistencia a ampicilina (codificada en el plásmido mencionado) permitiendo su crecimiento en las placas con tetraciclina y ampicilina. Si no hubiera sido transformada, la cepa sería resistente únicamente a tetraciclina. Se considera que las colonias blancas de ambas placas de la Figura 45 sí presentan el inserto de ZPG/BOL porque la transformación se llevó a cabo utilizando un plásmido extraído de una colonia de *E. coli* NOVA BLUE pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL, cuya transformación con cada uno de los insertos había sido previamente confirmada. Las cepas *E. coli* HT115 (DE3) pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG y *E. coli* HT115 (DE3) pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL también fueron crecidas a 30°C.

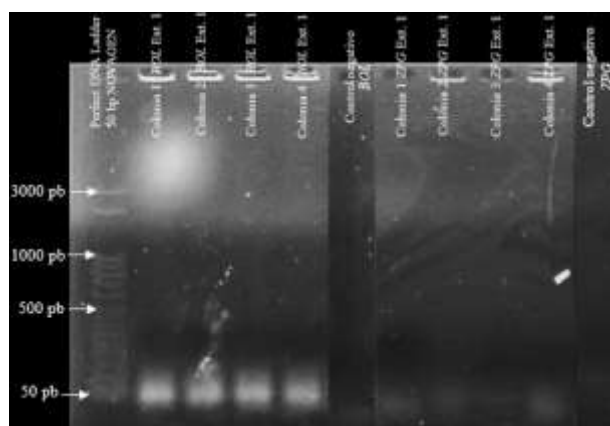
**Figura 45:** Crecimiento de (A) *E. coli* HT115 (DE3) pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL y (B) *E. coli* HT115 (DE3) pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG, resistentes a ampicilina [50 µg/mL] (c.f.) y tetraciclina [12.5 µg/mL] (c.f.). Siembra: estriado de una colonia aislada



(Fuente: Fotos propias)

4) Geles de electroforesis que demuestren la pérdida del inserto de los genes *ZPG* y *BOL* de *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL*. Los resultados del PCR presentados en la Figura 46 demuestran que la reacción fue llevada a cabo adecuadamente y no se contaminó ya que no se observan bandas en el sexto ni en el onceavo pozo de los controles negativos de ambos genes. Del segundo al quinto pozo se corrió los productos de PCR de cuatro colonias de *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL* del crecimiento en la placa (A) de la Figura 45. Del séptimo al décimo pozo se corrió los productos de PCR de cuatro colonias de *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* del crecimiento en la placa (B) de la Figura 45. Los “primers” utilizados fueron BouleExt1 y ZPGExt1 por lo que se esperaba un amplicón de tamaño de 410 pb para el gen *BOL* y 359 pb para el gen *ZPG*. La ausencia de bandas de estos tamaños en los ocho pozos mencionados sugiere que los insertos fueron retirados del plásmido posiblemente por la acción de la recombinasa A no mutada de la cepa (Darmon y Leach, 2014). Esto pudo suceder por el efecto tóxico que cada uno de los insertos ejerce sobre la cepa al ser expresado. Lo único visible en los pozos mencionados es un barrido inferior (aprox. 50 pb) correspondiente a la formación de dímeros de los “primers” (Brownie *et al.*, 1997).

**Figura 46:** Productos de PCR de colonias de *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL* y *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* utilizando los “primers” BouleExt1 y ZPGExt1, respectivamente. Condiciones de corrida: gel de agarosa al 1 % (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X (c.f.) y 16.67 V/cm. Visualización con bromuro de etidio a 300 nm



(Fuente: Foto propia)

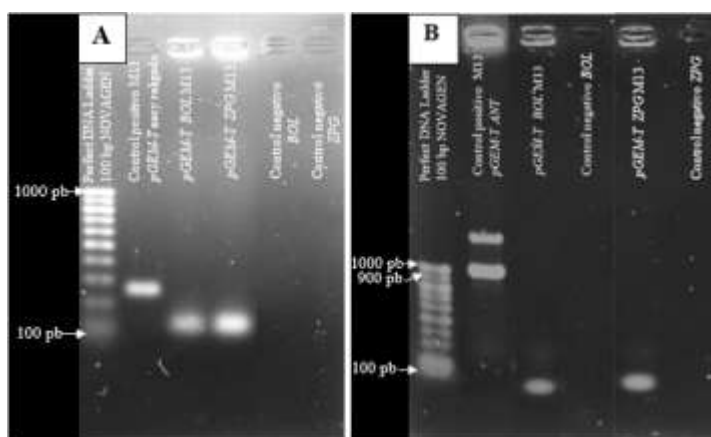
En la Figura 47 se muestran los resultados de dos reacciones de PCR de colonias de *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* y *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL* utilizando "primers" M13. Se demuestra que ambas reacciones de PCR fueron ejecutadas adecuadamente y sin contaminación debido a la ausencia de bandas en los controles negativos localizados en el quinto y sexto pozo del gel A y en el cuarto y sexto pozo del gel B. Los controles positivos utilizados se observan en el segundo pozo de ambos geles. En el gel A, dicho control presenta una banda de 252 pb (primer pozo del gel A). Esto era lo esperado ya que se utilizó como plantilla el plásmido *pGEMT* re-ligado a sí mismo. En el gel B, el control positivo presenta dos bandas intensas resultantes de la amplificación de la cepa *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ANT* utilizando "primers" M13. Se considera que la banda inferior corresponde al producto de *ANT*, el cual cuenta con un tamaño esperado de 824 pb. Se puede observar que la banda de este amplicón se localiza entre las bandas de 900 pb y 1000 pb de la escalera (primer pozo del gel B), y no entre las bandas de 800 pb y 900 pb como era lo esperado. En teoría, este amplicón se compone de los fragmentos adyacentes al sitio de clonación amplificados por los "primers" M13 (252 pb) y el inserto *ANT* (572 pb), lo que daría el total de 824 pb. Sin embargo, se cree que la bacteria pudo producir reordenamientos en la secuencia del inserto que provocaran un aumento en su tamaño. La banda superior observada en el segundo pozo del gel B probablemente corresponda a la duplicación del inserto de *ANT* en el plásmido *pGEMT*. Dicha duplicación pudo haber ocurrido por la acción de la recombinasa A no mutada de la cepa (Proteopedia, 2016). Esto confirma que los "primers" M13 sí funcionan adecuadamente y son capaces de amplificar el plásmido original y el plásmido con inserto flanqueado por promotores T7.

En el tercer pozo de ambos geles de la Figura 47 se observa que no fue amplificado el producto del gen *BOL* esperado de aprox. 700 pb (450 pb del producto del gen *BOL* con promotores T7 y 252 pb del segmento del plásmido amplificado por los "primers" M13). Además, en el cuarto pozo del gel A y el quinto pozo del gel B se observa que no fue posible amplificar el producto del gen *ZPG*. Este producto tiene un tamaño aproximado de 650 pb ya que se compone de los fragmentos adyacentes al sitio de clonación amplificados por los "primers" M13 (252 pb) y el producto de *ZPG* amplificado por los "primers" *ZPGEt1T7* (399 pb). En el tercer y cuarto pozo del gel A y el tercer y quinto pozo del gel

B únicamente fue posible observar bandas difusas que se cree corresponden a dímeros de los “primers” por tener un tamaño menor a las 100 pb. Esto plantea la posibilidad de que la toxicidad de los insertos haya inducido un reordenamiento en el plásmido a través de la acción de la recombinasa A, la cual no se encuentra mutada en las cepas *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL*. Esto debido a que pudo haber ocurrido una reocmninacion homóloga con la  $\beta$ -galactosidasa en el cromosoma, la cual flanquea el insecto (Proteopedia, 2016). Como resultado los “primers” M13 no se pueden unir a sus secuencias complementarias en el plásmido debido a que estas han sido modificadas o parcialmente eliminadas.

**Figura 47:** Productos de PCR de colonias de *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL* y *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* utilizando los "primers" M13. Condiciones de corrida: gel de agarosa al 1 % (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X (c.f.) y 16.67 V/cm.

Visualización con bromuro de etidio a 300 nm

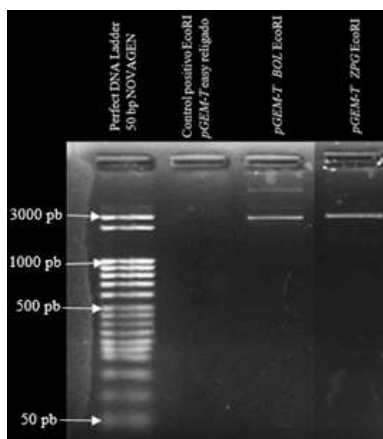


(Fuente: Foto propia)

En el segundo pozo de la Figura 48 se encuentra el control positivo de digestión realizado con el plásmido *pGEMT* religado a sí mismo. En dicho pozo no es posible observar ninguna banda ya que se cree que el plásmido estaba muy poco concentrado y no se pudo visualizar. En el tercer pozo se observan dos bandas resultantes de la digestión del plásmido *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL* previamente extraído. La banda superior de intensidad leve representa el plásmido sin digerir (Magdeldin, 2012). Fue posible visualizar esta banda debido a que la cantidad de plásmido agregado en la reacción de digestión era demasiada

para la cantidad de enzima que fue utilizada (New England BioLabs Inc., 2016a). Por lo cual se recomienda realizar una digestión con refrescamiento en donde se agregue más enzima y “buffer” de digestión y se deje incubar la reacción durante 4 horas más. La banda inferior más intensa corresponde al plásmido digerido lineal (2,990 pb) y se encuentra ubicada ligeramente por debajo de la banda de 3000 pb de la escalera (primer pozo). En el cuarto pozo se observa una única banda resultante de la completa digestión del plásmido *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* previamente extraído. Esta banda representa al plásmido lineal de 2,990 pb. En ambos pozos (tercero y cuarto) se esperaba observar bandas de menor tamaño correspondientes a cada uno de los insertos (*BOL*: aprox. 475 pb; *ZPG*: aprox. 424 pb). Esto debido a que los sitios de restricción de la enzima EcoRI se localizan a 10 pb (en el extremo del promotor T7) y a 15 pb (en el extremo del promotor SP6) del sitio de inserción (Promega, 2015). Por lo que cuando la enzima realice el corte, quedará como resultado el plásmido lineal y el inserto por aparte. Previamente se comprobó, mediante un análisis en el programa CLC Sequence Viewer 7, que no existen sitios de restricción para esta enzima dentro de la secuencia de ambos insertos (anexo B. 1.) (CLC Bio Qiagen, 2015). Por lo tanto, la ausencia de dichas bandas en los pozos mencionados confirma que el plásmido ya no posee ninguno de los insertos.

**Figura 48:** Productos de la digestión de plásmidos extraídos de *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-AMP<sup>R</sup>-BOL* y *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* utilizando la enzima ECORI. Condiciones de corrida: gel de agarosa al 0.8% (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X (c.f.) y 16.67 V/cm. Visualización con bromuro de etidio a 300 nm



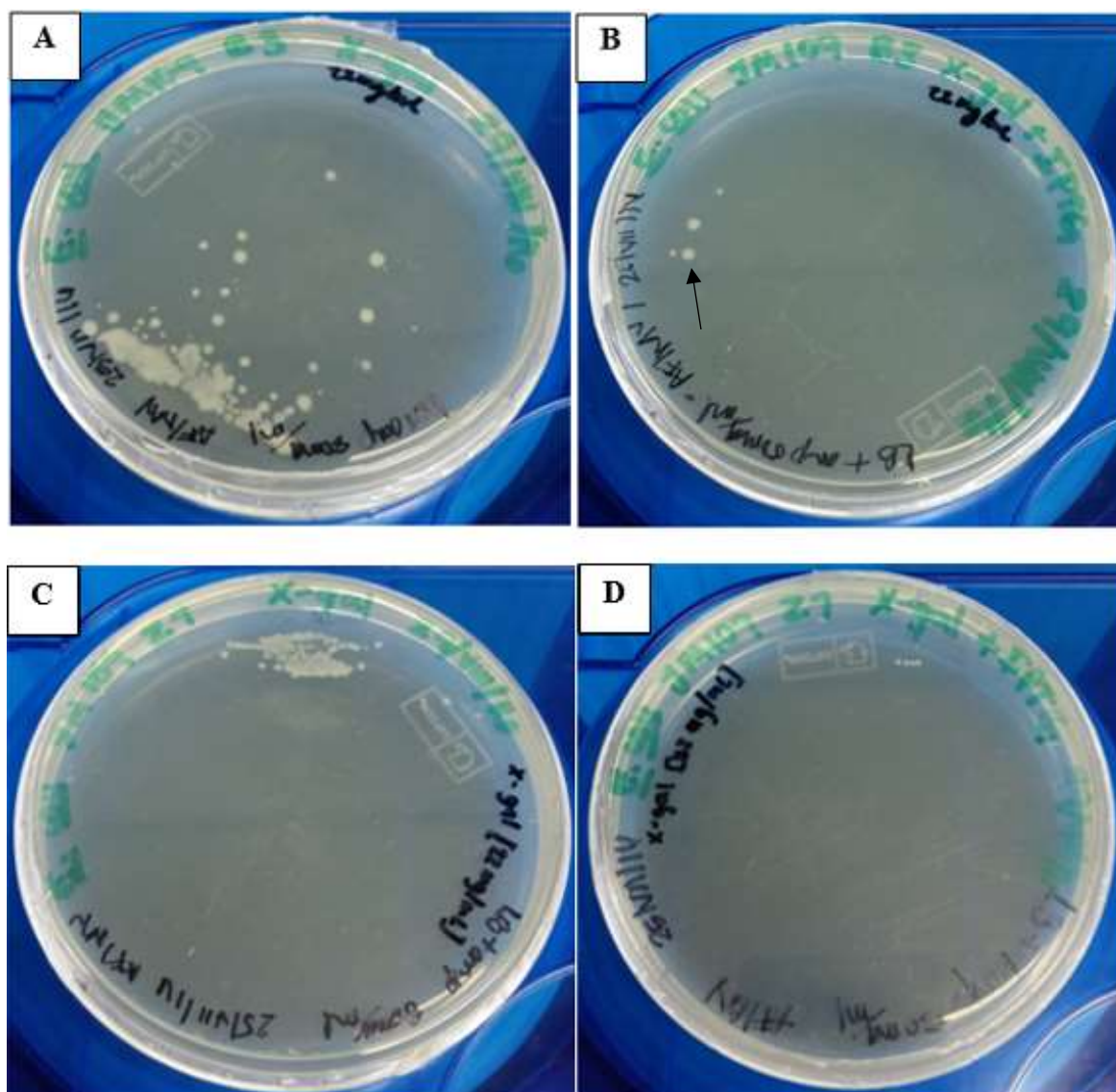
(Fuente: Foto propia)

Es importante mencionar que previo a la digestión, los plásmidos *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL* fueron cuantificados utilizando en fluorómetro Quantus (Promega, No. E6150). El resultado de la cuantificación fue de 0.037 ng/μL para el plásmido *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* y de 0.04 ng/μL para el plásmido *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL*. Según la información proporcionada por el fabricante del kit de extracción (Promega, No. A1330), para un cultivo de 5 mL de *E. coli* DH5α se espera extraer 388 – 555 ng/μL de plásmido *pGEMT*. Tomando en cuenta el límite inferior de dicho rango como el 100 %, se demuestra que el porcentaje de rendimiento de la extracción fue de 0.009 % para el plásmido *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* y de 0.01 % para el plásmido *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL*. El bajo rendimiento podría explicarse por la utilización de un kit de extracción que ya se encontraba vencido desde hace ya varios años. Además, el porcentaje de rendimiento se pudo haber reducido aún más dado que la cepa *E. coli* HT115 (DE3) no posee la endonucleasa A mutada y por ende puede degradar parte de los plásmidos extraídos (Darmon y Leach, 2014).

5) Placas de crecimiento de *E. coli* JM 109 *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL* y *E. coli* JM 109 *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* que demuestren la toxicidad de la inducción de expresión del gen *BOL*. La Figura 49 se observan cuatro placas del resultado de la transformación de *E. coli* JM 109 con los plásmidos *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL* o *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* extraídos de *E. coli* NOVA BLUE *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL*. Las placas A y C contiene únicamente ampicilina [50 μg/mL] (c.f.) y X-gal [35.2 μg/mL] (c.f.) y presentan una conglomeración de colonias blancas, pequeñas y circulares. El crecimiento obtenido en dichas placas fue menor que el observado en la cepa original de *E. coli* JM 109. Esto podría indicar dos cosas: 1) que la presencia de los insertos es tóxica para las bacterias y 2) que la expresión de los insertos se lleva a cabo incluso en ausencia de IPTG que active la expresión del operón lac (operón que regula la expresión la polimerasa T7) (National Science Foundation, 2007). La toxicidad de ambos insertos es confirmada por la disminución dramática del crecimiento de la cepa en las placas B y D que contienen ampicilina [50 μg/mL] (c.f.), X-gal [35.2 μg/mL] (c.f.) e IPTG [0.1 mM] (c.f.). Debido a que cuando su expresión es inducida por el IPTG, existe menor cantidad de bacterias que sobreviven. Además, la toxicidad del inserto se confirmó por completo dado que las cepas de *E. coli* NOVA BLUE *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL* y *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG/BOL*

criopreservadas (almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en 1 mL de medio LB con 20% de glicerol) no crecieron al ser sembradas en placas de medio LB luego de varios meses de almacenamiento en el congelador.

**Figura 49:** Crecimiento de *E. coli* JM 109 *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL* en presencia de (A) X-gal [35.2  $\mu\text{g/mL}$ ] (c.f.) y (B) X-gal [35.2  $\mu\text{g/mL}$ ] (c.f.) e IPTG [0.1 mM] (c.f.) y crecimiento de *E. coli* JM 109 *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* en presencia de (C) X-gal [35.2  $\mu\text{g/mL}$ ] (c.f.) y (D) X-gal [35.2  $\mu\text{g/mL}$ ] (c.f.) e IPTG [0.1 mM] (c.f.). Siembra: aspersion de 100  $\mu\text{L}$  de cultivo.



(Fuente: Fotos propias)

Todos los resultados presentados anteriormente demuestran que sí fue posible clonar el inserto del gen *BOL* y *ZPG* en las cepas *E. coli* NOVA BLUE *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL/ZPG* y *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL/ZPG*. Sin embargo, luego no fue posible demostrar la persistencia de cada inserto en las cepas lo que evidencia que posiblemente el plásmido *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL/ZPG* sufrió reordenamientos o deleciones que eliminaron o modificaron el inserto y otras regiones del mismo. Esto probablemente ocurrió debido a que el inserto es tóxico al ser expresado, lo cual se demostró por el reducido crecimiento de las cepas *E. coli* JM 109 *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL/ZPG* en presencia de IPTG. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula 1 y se puede decir que la clonación de los genes ortólogos *BOL* y *ZPG* de *An. albimanus* en *E. coli* no es estable.

2. Resultado 2: Estandarización de un método de alimentación para administrar las bacterias *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL* y *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* a larvas de *An. albimanus*.

a. Breve explicación de los experimentos realizados para lograr la estandarización del método de alimentación en forma de cuadro (problema y solución). En el Cuadro 21 se presenta una breve explicación de los experimentos realizados para la estandarización del método de alimentación que permite el desarrollo y evaluación de oviposición de *An. albimanus*.

**Cuadro 21:** Optimización de condiciones experimentales para el desarrollo de larvas de *An. albimanus*.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→ <u>Número de larvas totales:</u> 15</p> <p>→ <u>Tipo de placa:</u> Petri (marca Falcon, 100 x15 mm)</p> <p>→ <u>Número de larvas por recipiente:</u> 15</p> <p>→ <u>Volumen/Tipo de agua:</u> 1.3 mL de agua destilada por larva.</p> <p>→ <u>Alimento:</u> bacteria <i>E. coli</i> XL1-BLUE</p> <p>→ <u>Condición de la bacteria:</u> viva</p> <p>→ <u>Forma de administración del alimento:</u> bacteria en la punta de un palillo estéril colocado sobre el agua.</p>	<p>1. El área de superficie de la bacteria expuesta a las larvas es muy pequeña, no permite la eficiente alimentación simultánea.</p>	<p>1. Buscar una superficie de administración más grande.</p> <p>Se decidió usar más larvas y el mismo tipo de agua utilizada en el insectario para asemejar las condiciones a las que habitualmente se expone a esta colonia.</p>	<p>Las larvas de <i>An. albimanus</i> si se ven atraídas a alimentarse de la bacteria viva azul.</p>
<p>→ <u>Número de larvas totales:</u> 20</p> <p>→ <u>Tipo de placa:</u> Petri (marca Falcon, 100 x15 mm)</p>	<p>1. Hubo canibalismo, se considera que podría ser por falta de espacio o alimento.</p>	<p>1. Colocar a las larvas en compartimientos individuales.</p>	

Continuación Cuadro 21.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→ <u>Número de larvas por recipiente</u>: 10</p> <p>→ <u>Volumen/Tipo de agua</u>: 1 mL de agua desclorinada por larva.</p> <p>→ <u>Alimento</u>: bacteria <i>E. coli</i> XL1-BLUE</p> <p>→ <u>Condición de la bacteria</u>: viva</p> <p>→ <u>Forma de administración del alimento</u>: bacteria esparcida en la superficie inferior de un círculo de papel encerado (aprox. 7mm de diámetro).</p>	<p>2. El desarrollo de las larvas es muy lento (aprox. 20 días en llegar a adulto).</p> <p>3. Se está trabajando en condiciones diferentes a las del mantenimiento de la colonia del insectario.</p>	<p>2. Se realizó cálculos a partir de la cantidad de alimento que se les proporciona en el insectario. Se determinó que estaban recibiendo muy poco alimento y se decidió agregar cereal de bebé, además de alimentar con la bacteria.</p> <p>3. Trabajar en el insectario para asemejar condiciones ambientales. Será necesario inactivar a la bacteria porque la bacteria viva podría crear</p>	

Continuación Cuadro 21.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
		consecuencias indeseadas en la colonia.	
<p>→<u>Número de larvas totales</u>: 24</p> <p>→<u>Tipo de placa</u>: ELISA de 24 pozos</p> <p>→<u>Número de larvas por recipiente</u>: 1 en cada pozo</p> <p>→<u>Volumen/Tipo de agua</u>: 2 mL de agua desclorinada por larva.</p> <p>→<u>Alimento</u>: bacteria <i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math> pUC19 y cereal de bebé+levadura. 12 larvas alimentadas solo con la bacteria y 12 larvas con la combinación de bacteria y alimento a base de cereal de bebé (1 “scoop” de 1<math>\mu</math>L para L1 y L2 y 2 “scoops” de 1<math>\mu</math>L para L3 y L4).</p>	<p>1. El papel encerado se desintegra con facilidad en el agua y las larvas se lo comen. 2. Al final del experimento muchos papeles estaban hundidos y las larvas no podían alcanzar la bacteria en el fondo.</p> <p>3. El círculo de papel encerado cubre la mayor parte de la superficie del agua lo cual impedía la oxigenación adecuada de las larvas.</p>	<p>1. Utilizar papel filtro que no se desintegra con tanta facilidad en el agua.</p> <p>2. y 3. Atravesar el papel filtro con una punta de un estilete estéril que permita una disposición inclinada del papel para mejor oxigenación.</p> <p>4. Agregar más alimento a base de cereal de bebé y cambiar a un recipiente más grande.</p>	

Continuación Cuadro 21.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→<u>Condición de la bacteria:</u> inactivada en el papel encerado colocado dentro de microtubos de 1.5mL en un bloque de calor a 70°C durante una hora.</p> <p>→<u>Forma de administración del alimento:</u> bacteria esparcida en la superficie inferior de un círculo de papel encerado (aprox. 7mm de diámetro).</p>	<p>4. Alto índice de mortalidad que se cree que podría deberse a un espacio reducido o a una mala nutrición ya que las larvas presentan un tamaño muy pequeño.</p>		
<p>→<u>Número de larvas totales:</u> 60</p> <p>→<u>Tipo de placa:</u> Petri (marca Falcon, 100 x15 mm)</p> <p>→<u>Número de larvas por recipiente:</u> 10</p> <p>→<u>Volumen/Tipo de agua:</u> 2 mL de agua desclorinada por larva.</p>	<p>1. El lugar en dónde se atravesó el papel filtro con el estilete se oxidó y disminuyó la atracción de las larvas hacia la bacteria.</p>	<p>1. Utilizar un papel filtro del tamaño de la placa con crecimiento confluyente de la bacteria y colocar en el fondo de esta.</p> <p>2. Separar las larvas en recipientes individuales al llegar a tercer estadio (L3).</p>	<p>En el análisis microbiológico de las muestras de agua se encontró que las bacterias presentes en el agua de las bandejas del insectario son diferentes a las bacterias presentes en el agua desclorinada que se ha</p>

Continuación Cuadro 21.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→<u>Alimento</u>: bacteria <i>E. coli</i> XL1-BLUE y cereal de bebé+levadura. 30 larvas alimentadas solo con la bacteria y 30 larvas con la combinación de bacteria y alimento a base de cereal de bebé (1 “scoop” de 10µL para L1-L4).</p> <p>→<u>Condición de la bacteria</u>: inactivada en el papel encerado colocado dentro de microtubos de 1.5mL en un bloque de calor a 70°C durante una hora.</p> <p>→<u>Forma de administración del alimento</u>: bacteria sobre un círculo de papel filtro atravesado con la punta de un estilete estéril que permita una disposición inclinada.</p>	<p>2. Se observó canibalismo, especialmente en los estadios L3 y L4.</p> <p>3. El exceso de cereal creó una nata que afectó la oxigenación de las larvas.</p> <p>4. Se percibió olor a cloro en el agua utilizada, se cree que esto puede provocar mortalidad en larvas o matar a las bacterias del agua que son necesarias para el</p>	<p>3. Realizar un experimento en el que solo se prueben diferentes combinaciones de cantidades de alimento a base de cereal de bebé (sin bacteria).</p> <p>4. Realizar un análisis microbiológico de las muestras de agua (agua desclorinada de los galones del insectario, agua desclorinada utilizada en los experimentos, agua de las bandejas del insectario).</p>	<p>utilizado para los experimentos. A partir de esto se realizó una búsqueda en la literatura y se encontró que las heces de las hembras contienen bacterias importantes para el desarrollo de los huevos, eclosión y desarrollo de las larvas. Dichas bacterias se transfieren con los huevos en el momento de la oviposición (Coon, Vogel, Brown, y Strand, 2014). Por lo tanto, se decidió comparar las bacterias presentes en el agua de las bandejas y el agua de</p>

Continuación Cuadro 21.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
	desarrollo de las larvas.		oviposición, se encontró que en los dos casos la mayoría de las bacterias presentes en el agua eran Gram negativas (anexo B. 2.). Se decidió utilizar el agua de oviposición o de la bandeja (ha tenido contacto con el agua de oviposición).
<p>→ <u>Número de larvas totales:</u> 120</p> <p>→ <u>Tipo de placa:</u> Petri (marca Falcon, 100 x15 mm)</p> <p>→ <u>Número de larvas por recipiente:</u> 5. Al llegar L3 se separaron en recipientes individuales.</p> <p>→ <u>Volumen/Tipo de agua:</u> 4 mL de agua de bandeja por larva.</p>	No hubo	No es necesaria.	La combinación 3 es la mejor ya que permite la mayor sobrevivencia. La combinación 4 permite desarrollo más rápido.

Continuación Cuadro 21.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante															
<p>→ <u>Alimento</u>: cereal de bebé+levadura. Se probó cuatro diferentes combinaciones de cantidad de “scoops” de 1 µL por larva (30 larvas por combinación):</p> <table border="1" data-bbox="396 690 646 852"> <thead> <tr> <th>No.</th> <th>Larvas L1 y L2</th> <th>Larvas L3 y L4</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>½</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>¼</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>1</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>1</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>	No.	Larvas L1 y L2	Larvas L3 y L4	1	½	1	2	¼	2	3	1	1	4	1	2			<p>Se escogió la combinación 3 para alimentar a las larvas, hasta indicar modificación.</p>
No.	Larvas L1 y L2	Larvas L3 y L4																
1	½	1																
2	¼	2																
3	1	1																
4	1	2																
<p>→ <u>Número de larvas totales</u>: 20</p> <p>→ <u>Tipo de placa</u>: Petri (marca Falcon, 150 x 25 mm)</p> <p>→ <u>Número de larvas por recipiente</u>: 20</p> <p>→ <u>Volumen/Tipo de agua</u>: 4 mL de agua de bandeja por larva.</p>	<p>1. El colorante se disolvió en el agua y la comida perdió la coloración ideal.</p>	<p>1. Utilizar comida de pescado en bolitas de color rojo y verde (Kijaro) para evaluar atracción hacia el alimento y proporcionar mayor cantidad de proteína a las larvas. Agregar levadura al alimento porque esta</p>	<p>Las larvas se ven atraídas hacia el alimento con color verde, tanto en presentación de agarosa como en goma guar. La goma guar es más barata por lo cual se escogió esta presentación.</p>															

Continuación Cuadro 21.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→ <u>Alimento</u>: solución de cereal de bebé mezclado con goma guar o agarosa, tanto con o sin colorante comestible verde.</p> <p>→ <u>Forma de administración del alimento</u>: un Cuadro formado con la pasta de goma guar o de agarosa.</p>		<p>combinación pretende suplantar el alimento a base de cereal de bebé.</p>	
<p>→ <u>Número de larvas totales</u>: 60</p> <p>→ <u>Tipo de placa</u>: Petri (marca Falcon, 150 x 25 mm)</p> <p>→ <u>Número de larvas por recipiente</u>: 20</p> <p>→ <u>Volumen/Tipo de agua</u>: 4 mL de agua de bandeja por larva.</p> <p>→ <u>Alimento</u>: <i>E. coli</i> XL1-BLUE pUC19 y mezcla de goma guar con alimento de pez verde o rojo.</p>	<p>1. La consistencia de la mezcla con goma guar flota solo por un tiempo y luego se hunde por estar muy líquida. Ya hundida no les atrae a las larvas tanto como cuando aún flota.</p>	<p>1. Hacer pruebas para determinar la cantidad de goma guar a agregar al alimento para que tenga una consistencia más densa y pueda flotar o mantener su forma.</p> <p>2. Cuantificar la cantidad de proteína que las larvas ingieren con alimento a base</p>	<p>Las larvas L2 en adelante son capaces de bajar hacia el fondo de la placa para alimentarse de la bacteria (anexo B. 3.). Además, esto se confirmó al triturar las larvas y observar crecimiento de bacterias azules resistentes a ampicilina y tetraciclina. Previamente se determinó que la microbiota habitual de las</p>

Continuación Cuadro 21.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→<u>Forma de administración del alimento</u>: pastas obtenidas de mezclar 0.025g de goma guar con 1mL de PBS, 0.012g de levadura y 20 bolitas de comida de pez roja o verde. La bacteria en crecimiento confluyente sobre papel filtro del tamaño de la placa.</p>	<p>2. Sobra mucho alimento al día sin consumir por las larvas.</p>	<p>de cereal de bebé en comparación con la mezcla de alimento con goma guar, para saber la cantidad que ingieren y optimizar la dosis. Realizar la cuantificación con el método DC (BioRad) utilizando estándares de albúmina sérica bovina (0.005 – 5 mg/mL) y 20 larvas por estadio divididas en grupos de 5 larvas.</p>	<p>larvas no contenía bacterias de este tipo (anexo B. 4.).</p> <p>Las larvas sí se alimentan de la mezcla con goma guar y alimento con la bacteria (anexo B. 5.).</p> <p>Se determinó que la cantidad adecuada de goma guar para mezclar con 1mL de cultivo bacteriano es de 0.05g.</p> <p>Se determinó que las larvas de todos los estadios consumen aproximadamente la misma</p>

Continuación Cuadro 21.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
			<p>cantidad de alimento (0.22 mg de comida de pez al día). Por lo cual se ha decidido que por 20 larvas se debe agregar al día 100 µL de la mezcla de alimento. Sin embargo, se les colocará el doble para que nunca se les acabe. La mezcla de alimento final (la cual será nombrada como Alimento Bacteriano Compuesto – ABC) queda como 200 µL de cultivo bacteriano +0.01 g de goma guar + 0.009 g de comida de pez + 0.004 g de levadura (alimento diario para 20 larvas).</p>

Continuación Cuadro 21.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→ <u>Número de larvas totales:</u> 60</p> <p>→ <u>Tipo de placa:</u> Petri (marca Falcon, 150 x 25 mm)</p> <p>→ <u>Número de larvas por recipiente:</u> 20</p> <p>→ <u>Volumen/Tipo de agua:</u> 4 mL de agua de bandeja por larva.</p> <p>→ <u>Alimento:</u> <i>E. coli</i> XL1-BLUE pUC19 en el ABC (una placa con cambio diario de alimento y otra con acumulación de este). Control de cereal de bebé + levadura.</p> <p>→ <u>Forma de administración del alimento:</u> pasta.</p>	<p>1. Hay sobrevivencia reducida, las larvas llegan a pupa pero no eclosionan a adulto. Esto probablemente se debe a que la bacteria utilizada fue preparada con muchos días de anticipación (aprox. 3 meses).</p> <p>2. La placa a la que no se le cambió el alimento diariamente tenía muy sucia el agua y presentó mayor mortalidad.</p>	<p>1. Preparar cultivo bacteriano fresco cada dos semanas.</p> <p>2. Cambiar diariamente el alimento de las larvas. Succionar el alimento restante del día anterior para evitar acumulación de desechos.</p>	

Continuación Cuadro 21.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→<u>Número de larvas totales:</u> 60</p> <p>→<u>Tipo de placa:</u> Petri (marca Falcon, 150 x 25 mm)</p> <p>→<u>Número de larvas por recipiente:</u> 20</p> <p>→<u>Volumen/Tipo de agua:</u> 4 mL de agua de bandeja por larva.</p> <p>→<u>Alimento:</u> <i>E. coli</i> XL1-BLUE pUC19 en el ABC. Control de cereal de bebé + levadura.</p> <p>→<u>Forma de administración del alimento:</u> pasta.</p>	<p>1. Al cabo de una semana, la levadura creció en el agua. Todas las larvas murieron. Se piensa que la levadura las privó de oxígeno.</p> <p>2. Se percibe el olor de <i>E. coli</i> en el agua.</p>	<p>1. Utilizar una levadura que no sea instantánea, de manera que su crecimiento no sea tan acelerado.</p> <p>2. Incrementar tiempo y temperatura de inactivación.</p> <p>Realizar un control de inactivación sembrando el cultivo en placas correspondientes.</p>	<p>La levadura seca activa marca Red Star funciona adecuadamente.</p> <p>La inactivación de la bacteria es efectiva a 105 °C durante una hora en un horno de calentamiento.</p>

Fuente: Elaboración propia

**Cuadro22:** Optimización de condiciones experimentales para la obtención de adultos de *An. albimanus* y la evaluación de ovipostura

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→ <u>Número de larvas totales:</u> 60</p> <p>→ <u>Tipo de placa:</u> Petri (marca Falcon, 150 x 25 mm)</p> <p>→ <u>Número de larvas por recipiente:</u> 20</p> <p>→ <u>Volumen/Tipo de agua:</u> 4 mL de agua de bandeja por larva.</p> <p>→ <u>Alimento:</u> ABC con bacteria DE3 o ANT. Control de cereal de bebé + levadura.</p> <p>→ <u>Forma de administración del alimento:</u> pasta o polvo.</p> <p>→ <u>Lugar:</u> cámara biológica desde larvas L1 hasta pupa. Insectario de pupa a adulto.</p>	<p>1. La cámara no tiene una buena regulación de la temperatura. Puede aumentar de manera desmedida en cualquier momento. Esto provocó que gran cantidad de larvas L4 y pupas murieran quemadas a 33 °C.</p> <p>2. Las pupas separadas antes del aumento de temperatura, no lograron llegar a adulto. Posiblemente por el cambio de condiciones cuando fueron trasladadas al insectario.</p>	<p>1. y 2. Trabajar todo el desarrollo, desde L1 hasta adulto, en el insectario.</p>	
<p>→ <u>Número de larvas totales:</u> 180</p> <p>→ <u>Tipo de placa:</u> Petri (marca Falcon, 150 x 25 mm)</p>	<p>1. Únicamente se obtuvo adultos en la jaula colocada en el estante superior.</p>	<p>1. Medir la temperatura para determinar posibles</p>	<p>El estante inferior se encontraba a 26 °C y el superior a 29 °C. Por lo tanto se</p>

Continuación Cuadro 22.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→ <u>Número de larvas por recipiente</u>: 20</p> <p>→ <u>Volumen/Tipo de agua</u>: 4 mL de agua de bandeja por larva.</p> <p>→ <u>Alimento</u>: ABC con bacteria DE3 o ANT. Control de cereal de bebé + levadura.</p> <p>→ <u>Número de réplicas</u>: 3</p> <p>→ <u>Forma de administración del alimento</u>: pasta o polvo.</p> <p>→ <u>Lugar</u>: insectario desde larvas L1 hasta adulto. De L1 a pupa en un cuarto con las siguientes condiciones: temperatura entre 25 – 29 °C y humedad de 54 – 70 % (cuarto 1). Las pupas son trasladadas a jaulas de 14.5 x 14.5 x 17.5 cm hacia un cuarto con las siguientes condiciones: temperatura entre 23 – 30 °C y humedad de 40 – 92 % (cuarto 2). Las jaulas</p>	<p>2. Todos los adultos eclosionados tienen dificultad para volar, permanecen en el agua y se ahogan. Además, las pupas que no eclosionaron, se veían estiradas o únicamente había logrado salir la mitad del cuerpo del adulto. Se cree que esto se debe a que las pupas se colocan en agua de oviposición, la cual contiene gran cantidad de bacterias. La restructuración de los tejidos durante el cambio de larva a pupa expone los tejidos al agua y podría propiciar una sepsis (Chapman, 1974).</p>	<p>diferencias entre los estantes.</p> <p>2. Utilizar agua de oviposición desde L1 a L3. Al llegar a L3, cambiar el agua y limpiar los recipientes.</p> <p>Aprovechar para lavar un poco las larvas mientras se trasladan. Luego utilizar agua desclorinada para continuar el desarrollo de L3, L4 y pupa.</p>	<p>colocaran todas las jaulas en el estante superior.</p>

Continuación Cuadro 22.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>fueron colocadas en una estantería (dos jaulas en el estante inferior y una en el estante superior).</p> <p>→<u>Separación de hembras para oviposición</u>: hembras separadas individualmente en vasos de oviposición.</p>	<p>3. La mayoría de hembras evaluadas no ovipositó posiblemente porque no hay competencia con otras hembras o a que no están bien alimentadas.</p>	<p>3. Colocar a todas las hembras del tratamiento juntas en la jaula para inducir oviposición.</p>	
<p>→<u>Número de larvas totales</u>: 180</p> <p>→<u>Tipo de placa</u>: Petri (marca Falcon, 150 x 25 mm)</p> <p>→<u>Número de larvas por recipiente</u>: 20</p> <p>→<u>Volumen/Tipo de agua</u>: 4 mL de agua de bandeja por larva.</p> <p>→<u>Alimento</u>: ABC con bacteria DE3 o ANT. Control de cereal de bebé + levadura.</p> <p>→<u>Número de réplicas</u>: 3</p>	<p>1. En todos los tratamientos, excepto el control, las pupas tienen problemas para llegar a ser adultos y no vuelan. Esto se observó tanto en las pupas que se quedaron en el cuarto 1 como las que se trasladaron al cuarto 2.</p> <p>2. Se cree que las pupas se encuentran desnutridas y que esto impide su eclosión a adulto o que no tengan fuerza para</p>	<p>1. Realizar un experimento con diferentes tipos de alimento para resolver dudas de la nutrición de las larvas. Además, reducir el tiempo de exposición de las larvas al alimento ABC con bacteria.</p>	<p>El cereal Nestum de Nestlé® que se utiliza como alimento, posee rastros de leche y la bacteria <i>Bifidobacterium lactis</i> (Nestlé, 2016). Se sospecha que esta bacteria forma parte de la microbiota de los mosquitos de la colonia y que utiliza la leche para obtener lactosa y crecer (Gopal, Sullivan, y Smart, 2001). Es posible que</p>

Continuación Cuadro 22.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→<u>Forma de administración del alimento</u>: pasta o polvo.</p> <p>→<u>Lugar</u>: insectario desde larvas L1 hasta adulto. De L1 a pupa en cuarto 1 y de pupa en adelante en cuarto 2. Cambio de agua al llegar a L3. Las pupas son trasladadas a jaulas de 14.5 x 14.5 x 17.5 cm. Las jaulas fueron colocadas en la estantería superior. Para descartar efectos de cambios de condiciones, una réplica se dejó crecer hasta adulto en el cuarto 1.</p> <p>→<u>Separación de hembras para oviposición</u>: hembras juntas en la jaula.</p>	<p>volar. A pesar de que el agua en el que se colocan las pupas es agua desclorinada, sigue habiendo mucha mortalidad que se cree podría provenir de la sobreexposición a la bacteria del alimento.</p> <p>2. No se logra determinar cuántas hembras oviponen en cada tratamiento y cuántas no lo hacen.</p>	<p>2. Separar dos hembras por vaso de oviposición para determinar el número de huevos y larvas eclosionadas por pareja de hembras.</p>	<p>las larvas se alimentan más de esta bacteria que de los demás componentes del alimento proporcionado. Al estar en contacto con el IPTG proveniente del alimento ABC con bacteria (tratamientos ANT y DE3), <i>B. lactis</i> sobreexpresa los genes del operón lac en ausencia de lactosa; la bacteria no crece y por ende las larvas están desnutridas.</p>
<p>→<u>Número de larvas totales</u>: 100</p> <p>→<u>Tipo de placa</u>: Petri (marca Falcon, 150 x 25 mm)</p>	<p>1. Las larvas expuestas a IPTG tienen una menor tasa de eclosión a adultos.</p>	<p>1. Lavar siempre la bacteria inducida con PBS para eliminar el IPTG</p>	<p>La exposición a la bacteria <i>E. coli</i> HT115 (DE3) no afecta el desarrollo de las larvas.</p>

Continuación Cuadro 22.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→ <u>Número de larvas por recipiente</u>: 20</p> <p>→ <u>Volumen/Tipo de agua</u>: 4 mL de agua de bandeja por larva.</p> <p>→ <u>Alimento</u>: 1) Alimento ACB con bacteria <i>E. coli</i> HT115 (DE3) inducida con IPTG, 2) Alimento ABC con bacteria <i>E. coli</i> HT115 (DE3) inducida con IPTG y lavado, 3) Alimento ABC con bacteria <i>E. coli</i> HT115 (DE3) no inducida, 4) Alimento ABC sin bacteria y 5) control de alimento a base de cereal de bebé.</p> <p>→ <u>Número de réplicas</u>: 2 (segunda replica con exposición de 4 horas al alimento ABC con bacteria y posterior adición de alimento a base de cereal de bebé (1 “scoop” de 1 <math>\mu</math>L por larva de L1 a L4).</p>	<p>2. Existe menor cantidad de adultos en los tratamientos expuestos solo al alimento ABC con bacteria que en el control con alimento a base de cereal de bebé. Además, dichas larvas van más atrasadas y se ven más pequeñas y menos robustas que las que se alimentan con cereal de bebé.</p> <p>3. La adición de 1 “scoop” por larva durante el estadio L1 ocasiona una alta tasa de mortalidad.</p>	<p>utilizado para inducir la producción de ARNi.</p> <p>2. Combinar la mezcla final de alimento con bacteria con el alimento a base de cereal de bebé para alimentar a las larvas.</p> <p>3. Reducir a medio “scoop” por larva la cantidad de alimento a base de cereal de bebé</p>	<p>La exposición únicamente al alimento ABC reduce la cantidad de adultos obtenidos en comparación con la exposición al alimento ABC adicionado con el alimento a base de cereal de bebé.</p> <p>La exposición de las larvas durante 4 horas al alimento ABC con bacteria es suficiente para permitir alimentación (ver inciso 3 de esta sección de resultados) y evitar el riesgo de sepsis en pupas.</p>

Continuación Cuadro 22.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→<u>Lugar</u>: insectario desde larvas L1 hasta adulto. De L1 a pupa en cuarto 1 y de pupa en adelante en cuarto 2. Cambio de agua al llegar a L3. Las pupas son trasladadas a jaulas de 14.5 x 14.5 x 17.5 cm. Las jaulas fueron colocadas en la estantería superior.</p> <p>→<u>Forma de administración del alimento</u>: pasta o polvo.</p>		<p>agregada en los estadios L1 y L2.</p>	<p>Se obtienen más adultos en tratamientos con el alimento de bacteria con IPTG lavado.</p>
<p>→<u>Número de larvas totales</u>: 180</p> <p>→<u>Tipo de placa</u>: Petri (marca Falcon, 150 x 25 mm)</p> <p>→<u>Número de larvas por recipiente</u>: 20</p> <p>→<u>Volumen/Tipo de agua</u>: 4 mL de agua de bandeja por larva.</p>	<p>1. La producción de huevos por hembra se disparó y su conteo es muy difícil y tardado. En este se determinó que los resultados que realmente interesan corresponden al número de huevos y larvas eclosionadas</p>	<p>1. Separar a las hembras nuevamente en vasos individuales para facilitar el conteo de huevos y larvas y obtener</p>	<p>Cuando las hembras son colocadas en parejas, la oviposición incrementa dramáticamente.</p>

Continuación Cuadro 22.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→ <u>Alimento</u>: ABC con bacteria DE3 o ANT. Control de cereal de bebé + levadura.</p> <p>→ <u>Número de réplicas</u>: 3</p> <p>→ <u>Forma de administración del alimento</u>: pasta o polvo.</p> <p>→ <u>Lugar</u>: insectario desde larvas L1 hasta adulto. De L1 a pupa en cuarto 1 y de pupa en adelante en cuarto 2. Cambio de agua al llegar a L3. Las pupas son trasladadas a jaulas de 14.5 x 14.5 x 17.5 cm. Las jaulas fueron colocadas en la estantería superior.</p> <p>→ <u>Separación de hembras para oviposición</u>: dos hembras por vaso de oviposición.</p>	<p>por hembra. En estas condiciones de oviposición aún no se puede conocer con certeza si las dos hembras ovipositaron o solamente una de ellas.</p>	<p>con certeza el resultado esperado.</p>	
<p>→ <u>Número de larvas totales</u>: 180</p>	<p>No hay.</p>	<p>No aplica.</p>	<p>Esta combinación de condiciones y metodologías es ideal para lograr el desarrollo</p>

Continuación Cuadro 22.

Descripción del experimento	Problema	Solución	Descubrimiento importante
<p>→ <u>Tipo de placa</u>: Petri (marca Falcon, 150 x 25 mm)</p> <p>→ <u>Número de larvas por recipiente</u>: 20</p> <p>→ <u>Volumen/Tipo de agua</u>: 4 mL de agua de bandeja por larva.</p> <p>→ <u>Alimento</u>: ABC con bacteria DE3 o ANT. Control de cereal de bebé + levadura.</p> <p>→ <u>Número de réplicas</u>: 3</p> <p>→ <u>Forma de administración del alimento</u>: pasta o polvo.</p> <p>→ <u>Lugar</u>: insectario desde larvas L1 hasta adulto. De L1 a pupa en cuarto 1 y de pupa en adelante en cuarto 2. Cambio de agua al llegar a L3. Las pupas son trasladadas a jaulas de 14.5 x 14.5 x 17.5 cm. Las jaulas fueron colocadas en la estantería superior.</p> <p>→ <u>Separación de hembras para oviposición</u>: hembras separadas individualmente en vasos de oviposición.</p>			<p>adecuado desde larvas L1 hasta adultos. Así como las condiciones de oviposición que facilita el conteo de ésta.</p>

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados de los experimentos mostrados anteriormente permitieron la estandarización del método de alimentación adecuado para administrar la bacteria transgénica productora de ARNdh y obtener adultos de *An. albimanus* en buenas condiciones. La metodología optimizada y estandarizada se muestra a continuación con imágenes demostrativas del proceso.

b. Esquema detallado con imágenes y explicación de cada paso del método de alimentación estandarizado (anexo B. 6.).

c. Fotografías de intestinos disectados de larvas de *An. albimanus* que confirman la ingestión del alimento con bacteria.

En la Figura 50 se observa una larva de *An. albimanus* de cuarto estadio disectada luego de ser expuesta al alimento a base de cereal de bebé. Se puede observar que el intestino de la larva está lleno del alimento color café. Esto comprueba que la larva sí ingiere este tipo de alimento. No es posible cuantificar el número de segmentos intestinales rellenos del alimento ya que no se observa con claridad la separación entre estos.

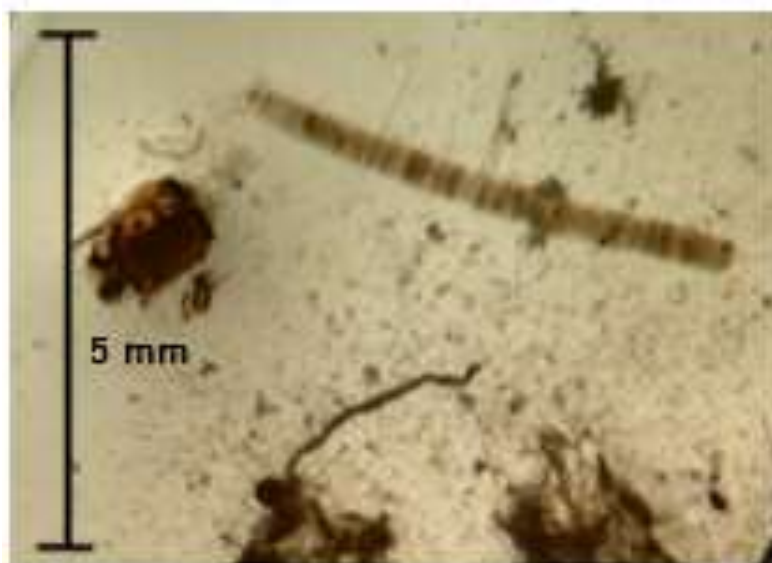
**Figura 50:** Disección de intestinos de larvas de *An. albimanus* alimentadas con alimento a base de cereal de bebé. Observación en estereoscopio con luz inferior y aumento 10X



(Fuente: Foto propia)

En la Figura 51 se observa una larva de *An. albimanus* de cuarto estadio disectada luego de ser expuesta a ABC combinado con la cepa *E. coli* HT115 (DE3). Se puede observar que algunos segmentos del intestino de la larva están llenos de alimento color rojo. Dicha coloración concuerda con el color de ABC. Lo anterior comprueba que la larva sí ingiere el ABC combinado con una bacteria. No es posible cuantificar el número de segmentos intestinales rellenos del alimento ya que no se observa con claridad la separación entre estos.

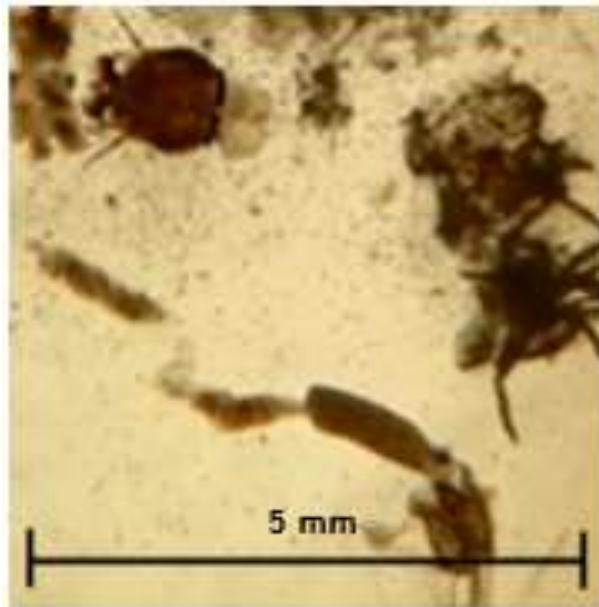
**Figura 51:** Disección de intestinos de larvas de *An. albimanus* alimentadas con alimento a base de cereal de bebé. Observación en estereoscopio con luz inferior y aumento 10X



(Fuente: Foto propia)

En la Figura 52 se observa una larva de *An. albimanus* de cuarto estadio disectada luego de ser expuesta a el ABC combinado con la cepa *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ANT*. Se puede observar que algunos segmentos del intestino de la larva están llenos de alimento color rojo. Dicha coloración concuerda con el color del ABC. Lo anterior comprueba que la larva sí ingiere el ABC combinado con una bacteria que contiene un plásmido que posee un inserto con promotores T7. No es posible cuantificar el número de segmentos intestinales rellenos del alimento ya que no se observa con claridad la separación entre estos.

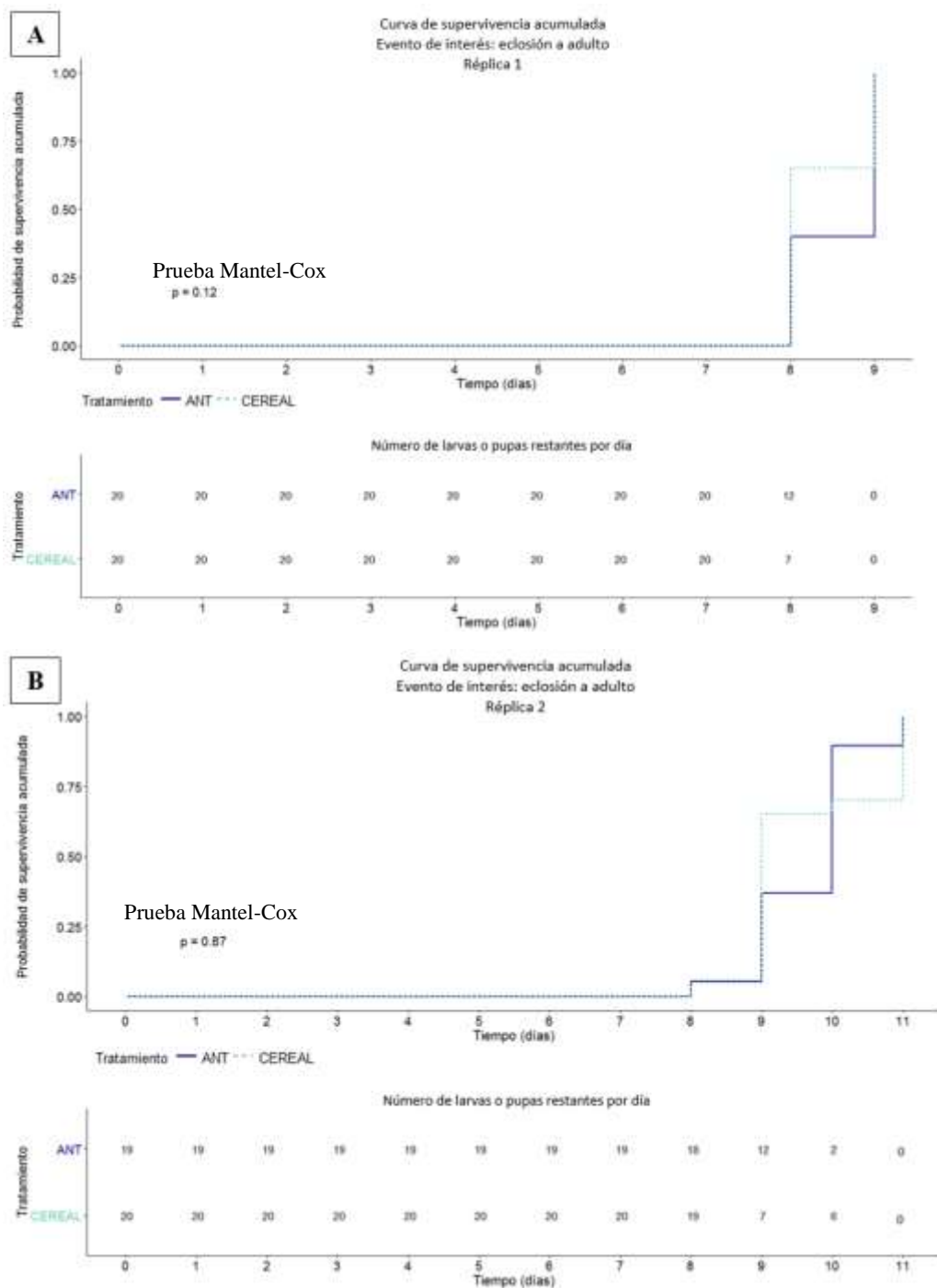
**Figura 52:** Disección de intestinos de larvas de *An. albimanus* alimentadas con el ABC combinada con cultivo de la cepa *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ANT*. Observación en estereoscopio con luz inferior y aumento 10X



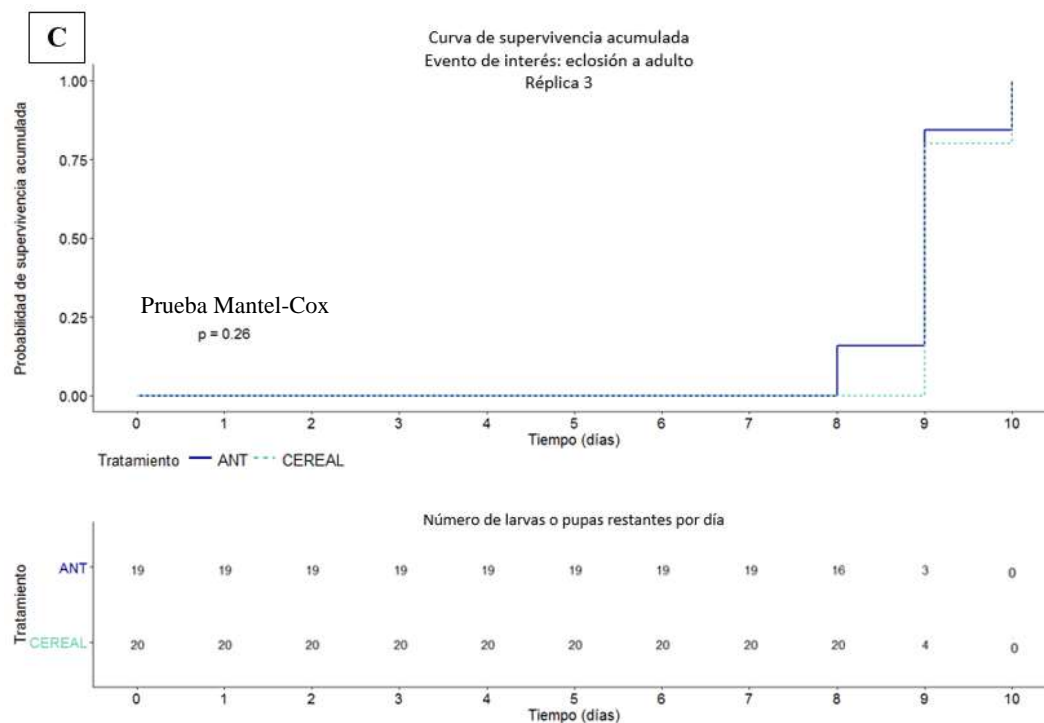
(Fuente: Foto propia)

d. Gráficas de Kaplan-Meier para comparar el tiempo de eclosión a adulto en mosquitos expuestos a diferentes tratamientos. En la Figura 53 se observan tres curvas de supervivencia acumulada que comparan los resultados de la eclosión a adulto entre tres réplicas del tratamiento con alimento a base de cereal de bebé (CEREAL) y con el ABC que contiene la cepa *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ANT* (ANT). En las tres curvas se observa que la eclosión de pupas a adultos en ambos tratamientos inicia a partir del día ocho y termina como máximo en el día once. No es posible identificar un patrón o tendencia que indique que las pupas de alguno de los dos tratamientos eclosionen antes o después que las del otro tratamiento. Esto concuerda con el resultado obtenido para la prueba de Mantel-Cox (conocida en inglés como “Log Rank Test”), ya que con un 95% de confianza se puede decir que no existe diferencia significativa entre las curvas de supervivencia de las dos poblaciones sometidas a los tratamientos (valor  $p > 0.05$ ). Esto significa que la probabilidad de que ocurra el evento de eclosión a adulto es la misma para las dos poblaciones en cualquier momento (Bewick *et al.*, 2004).

**Figura 53:** Curvas de supervivencia acumulada (evento de interés: eclosión a adulto). Tres réplicas biológicas de desarrollo a adulto (A, B y C) con alimento a base de cereal de bebé (CEREAL) o cereal más ABC con la cepa *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ANT* (ANT)



Continuación Figura 53.



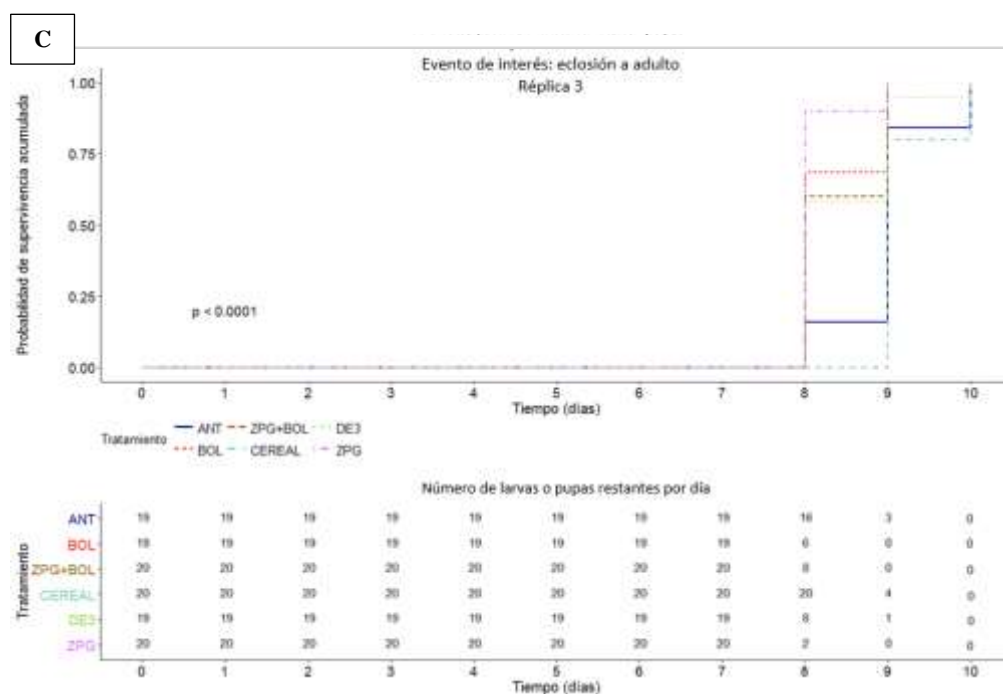
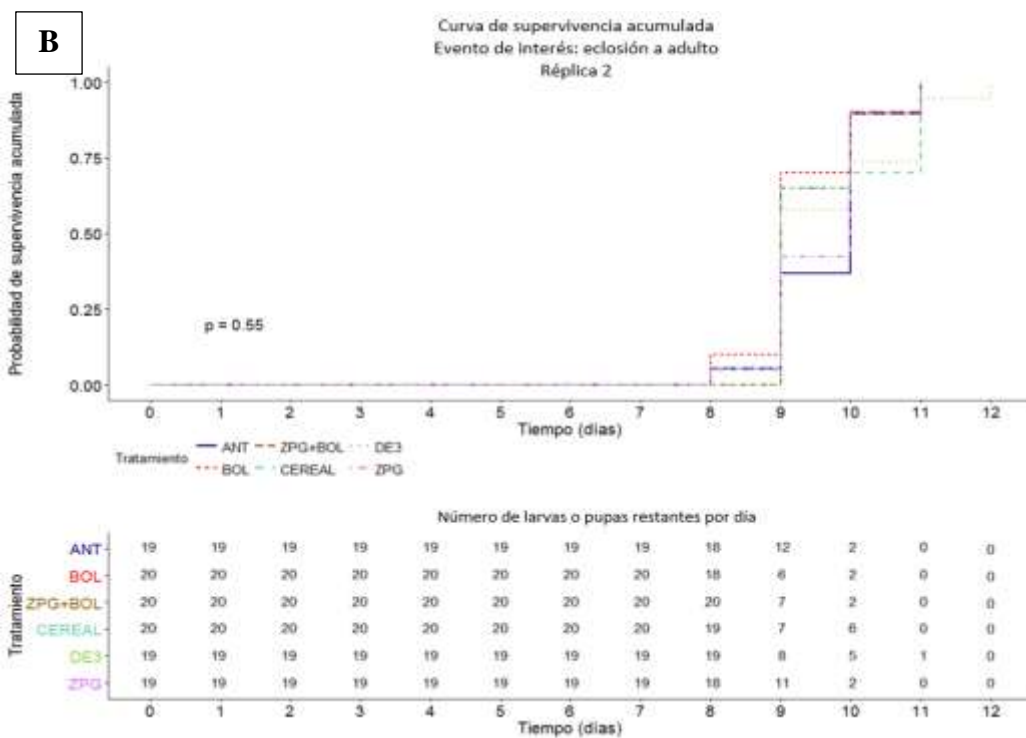
(Fuente: Elaboración propia utilizando el paquete “Survminer” en R (Kassambara y Kosinski, 2016))

En la Figura 54 se observan tres curvas de supervivencia acumulada que comparan los resultados de la eclosión a adulto entre tres réplicas de seis diferentes tratamientos: alimento a base de cereal de bebé (etiquetada como CEREAL) y ABC con las cepas *E. coli* HT115 (DE3) (etiquetada como DE3), *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ANT* (etiquetada como ANT), *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG* (etiquetada como ZPG), *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL* (etiquetada como BOL) y una combinación de las dos últimas cepas mencionadas (etiquetada como ZPG+BOL). En las tres curvas se observa que la eclosión de pupas a adultos en todos los tratamientos ocurre principalmente entre los días del ocho al once con la posibilidad de que exista un día de atraso o adelanto en el inicio o final del período de eclosión.

No es posible identificar una tendencia que indique que las pupas de alguno de los tratamientos sigan un patrón de eclosión en las tres réplicas realizadas. Sin embargo, la comparación de las curvas de vida, a través de la prueba de Mantel-Cox, evidencia con un 95% de confianza que al menos una de las poblaciones comparada tiene una curva de



Continuación Figura 54.



(Fuente: Elaboración propia utilizando el paquete “Survminer” en R (Kassambara y Kosinski, 2016))

Los resultados presentados demuestran que se acepta la hipótesis nula 2.1 lo que comprueba que el método de alimentación para larvas de *An. albimanus* conteniendo *E. coli* expresando ARNdh de un gen control derivado de *Arabidopsis thaliana*, permite el desarrollo larvario adecuado y no interfiere con el tiempo de eclosión de pupa a adulto en comparación con el método de alimentación a base de cereal de bebé.

e. Comparación de la ovipostura de mosquitos expuestos al alimento con *E. coli* en contraste con el alimento en base a cereal de bebé. A continuación se analiza la ovipostura de hembras de *An. albimanus* en diferentes condiciones.

En el Cuadro 23 se observa la comparación de la ovipostura de hembras de *An. albimanus* cuando estas son colocadas en diferentes condiciones al momento de oviponer. Las hembras individuales se encontraban separadas cada una en un vaso como el descrito en el método estandarizado de alimentación (anexo B. 6.). Las hembras en parejas se encontraban distribuidas en el mismo tipo de recipiente en grupos de dos. Por último, para las hembras en jaula se agrupó a todas las hembras de cada tratamiento en una jaula diferente como la descrita en el método estandarizado de alimentación (anexo B. 6.). En los resultados presentados en el cuadro se observa que las condiciones sí afectan la ovipostura de las hembras de *An. albimanus*. Esto debido a que tanto el promedio de número de huevos por hembra como el de número de larvas eclosionadas por hembra varía según cada condición. Tomando como referencia a las hembras individuales, dichos valores aumentaron al colocar a las hembras por parejas y disminuyeron al colocarlas en jaulas. Por lo tanto, no es posible observar una tendencia que relacione la densidad de hembras con el número de huevos y larvas eclosionadas por hembra.

**Cuadro 23:** Comparación de oviposición, en diferentes condiciones, de hembras de *An. albimanus* expuestas al alimento a base de cereal

Condición de oviposición	Proporción de machos:hembras en jaula	No. de hembras evaluadas	Promedio de huevos/hembra	Promedio de larvas /hembra	Porcentaje de eclosión
Hembras individuales	11:9	6	65	36	55%
Hembras en jaula por tratamiento	8:12	10	31	30	97%
Hembras en parejas	30:30	27	559	454	81%

Fuente: Elaboración propia.

Sin embargo, no es posible concluir esto acerca de los datos dado que no se trabajó con la misma proporción de hembras y machos en todos los experimentos. Además los resultados no son comparables porque no se evaluó el mismo número de individuos bajo cada condición de oviposición. Los únicos resultados que podrían compararse son los referentes a las condiciones de oviposición individual y en jaula (enmarcados en negro en el Cuadro 23) ya que para dichos casos el número de individuos evaluado fue el mismo (20 individuos) y la proporción entre machos y hembras no fue muy diferente. Al comparar dichos resultados es notable que el porcentaje de eclosión difiere bastante. Sin embargo, esta variación no se debe al número de larvas eclosionadas por hembra sino más bien al número de huevos por hembra. Esto refleja una diferencia en la fecundidad de las hembras, la cual se ve afectada principalmente por la alimentación (Ramsey *et al.*, 1988). No obstante, las hembras de ambas condiciones fueron alimentadas de la misma manera por lo que estos resultados preliminares podrían dar un indicio de que la presencia de muchas hembras en un mismo espacio puede afectar la fecundidad. Posiblemente cuando la densidad de hembras aumenta, la fecundidad disminuye para evitar más competencia por recursos entre las larvas eclosionadas. En la literatura se ha reportado que al disminuir el espacio de la jaula donde se encuentren las hembras, la fecundidad aumenta. Esto también podría haber ocurrido en este caso ya que el vaso de oviposición es de menor tamaño que la jaula (Ramsey *et al.*, 1988). Sería recomendable continuar realizando experimentos para

determinar si esto es lo que realmente ocurrió o si los resultados obtenidos para la fecundidad se deben a una variación en la alimentación. Los resultados que más interesa comparar son los referentes al número de larvas por hembra ya que estos reflejan la fertilidad tanto del macho como de la hembra (Ramsey *et al.*, 1988). Tal como se esperaba estos resultados no presentan mucha variación para las condiciones de oviposición individual y en jaula. Por último, al analizar la condición de oviposición en parejas, se observa una gran diferencia en cuanto al número de huevos y larvas por hembra. Esto se debe a que en dicho experimento se trabajó con diez individuos más. Para los próximos experimentos se recomienda trabajar siempre con 30 individuos y utilizar la misma proporción de machos y hembras.

Se considera importante continuar realizando experimentos para determinar cómo la densidad de las hembras afecta la oviposición en *Anopheles albimanus* ya que en la literatura existente solamente se ha analizado el comportamiento de oviposición en cuanto a la densidad de larvas presentes en el agua de oviposición. Se reporta que la presencia de larvas en el agua induce la ovipostura debido a que las hembras pueden percibir feromonas o químicos liberados por las larvas al momento de seleccionar el sitio de ovipostura (Sumba, Ogbunugafor, Deng, y Hassanali, 2008). Además se reporta que el número de huevos puestos por hembra y que eclosionan exitosamente aumenta a menores densidades de larvas presentes en el agua. Esto debido a que una menor densidad de larvas presentes reduce la competencia (Munga *et al.*, 2006) (Gotifrid *et al.*, 2014). Por lo tanto, es importante tener en cuenta que la oviposición es inhibida cuando la densidad de larvas es muy grande y estas se encuentran hacinadas. Por otro lado se ha reportado que en la especie *Hypera postica* a menor densidad de hembras el número de huevos puestos por cada hembra aumenta. Además se ha reportado que en la especie *Haematobia irritans* una mayor densidad de hembras implica un mayor porcentaje de eclosión de los huevos puestos debido a que poblaciones más densas generan condiciones más calientes y húmedas que inducen la eclosión (Peters y Barbosa, 1977) . Es necesario realizar más investigación para confirmar que las hembras de *An. albimanus* se comporten de la misma manera.

Debido a que los resultados son muy variables según las condiciones y a pesar de que en las hembras agrupadas en jaulas se obtiene menor cantidad de huevos (mayor

facilidad de conteo y manejo) se seleccionó la condición de hembras individuales como parte del método estandarizado. Esto debido a que únicamente en esta condición se puede saber con certeza cuántas hembras oviponen y el número huevos y larvas eclosionadas por hembra. Por lo tanto los análisis posteriores se realizaron únicamente con esta condición de ovipostura.

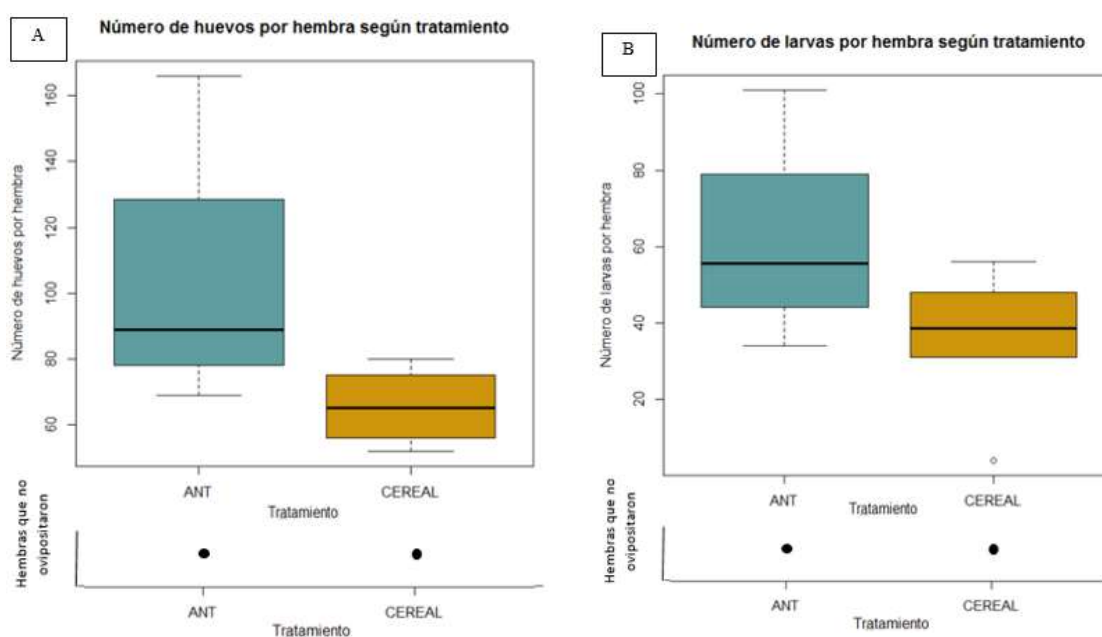
En la Figura 55 se observan dos diagramas de caja y bigote. En el diagrama A es posible observar que el tratamiento CEREAL presenta menor dispersión que el tratamiento ANT debido a que su rango intercuartílico (diferencia entre tercer y primer cuartil) es más corto (Serrano, 2003). No es posible determinar si la varianza es constante (homogénea) a simple vista. Es por eso que se realizó el test de Bartlett, que confirma la homogeneidad de las varianzas, indicando que las varianzas son homogéneas ( $p\text{-value} > 0.05$ ) (Serrano, 2003) (Anexo C). Se realizó el mismo análisis para los resultados presentados en el diagrama B y se confirmó que también en ese caso las varianzas son homogéneas (anexo B. 8.).

Además, es posible distinguir que el tratamiento CEREAL tiene una mediana de huevos por hembra menor que el tratamiento ANT. Sin embargo, a simple vista no se puede conocer si esa diferencia es significativa por lo que fue necesario realizar una “prueba T de Student”. A partir de este análisis se puede concluir con un 95% de confianza que la media del número de huevos por hembra de los tratamientos ANT y CEREAL no es significativamente diferente (valor  $p > 0.05$ ) (Serrano, 2003) (anexo B. 8.). Por lo tanto se puede decir que las medias del número de huevos por hembra de los tratamientos ANT y CEREAL son iguales. Es importante mencionar que previo a realizar la prueba “T de Student” se llevó a cabo la prueba de “Shapiro-Wilk” para evaluar normalidad; el resultado demuestra que no se puede rechazar la hipótesis nula que menciona que los datos provienen de poblaciones con una distribución normal. Sin embargo, con la prueba de “Shapiro-Wilk” no se puede confirmar que los datos sí provengan de una población con distribución normal. Teniendo en cuenta que las poblaciones de los tratamientos podrían no estar distribuidas de manera normal, se decidió llevar a cabo una prueba no paramétrica análoga a la prueba “T de Student” para comprobar si con ambas pruebas se llega a la misma conclusión. La prueba no paramétrica utilizada fue “Mann-Whitney-Wilcoxon”. A partir

de dicha prueba se determinó, con un 95% de confianza, que la media del número de huevos por hembra de los tratamientos ANT y CEREAL no es significativamente diferente (valor  $p > 0.05$ ) (Serrano, 2003) (anexo B. 8.). Este análisis confirma el resultado obtenido a partir de la prueba “T de Student”.

En la Figura 55 (B) es posible observar que el tratamiento CEREAL nuevamente presenta menor dispersión que el tratamiento ANT. Además, es posible distinguir que el tratamiento CEREAL tiene una mediana de larvas por hembra menor que el tratamiento ANT. Sin embargo, a simple vista no se puede conocer si esa diferencia es significativa por lo que nuevamente fue necesario realizar una prueba “T de Student”. A partir de este análisis se puede concluir con un 95% de confianza que la media del número de larvas por hembra de los tratamientos ANT y CEREAL no es significativamente diferente entre sí (valor  $p > 0.05$ ) (Serrano, 2003) (anexo B. 8.). Por lo tanto se puede decir que las medias de número de larvas por hembra de los tratamientos ANT y CEREAL son iguales. Previo a realizar la prueba “T de Student”, nuevamente se llevó a cabo la prueba de “Shapiro-Wilk” para evaluar normalidad; el resultado demostró que no se puede rechazar la hipótesis nula que menciona que los datos provienen de poblaciones con una distribución normal. Sin embargo, teniendo en cuenta que las poblaciones de los tratamientos podrían no estar distribuidas de manera normal, se decidió llevar a cabo nuevamente la prueba de “Mann-Whitney-Wilcoxon”. A partir de dicha prueba se determinó, con un 95% de confianza, que la media del número de larvas por hembra de los tratamientos ANT y CEREAL no es significativamente diferente (valor  $p > 0.05$ ) (Serrano, 2003) (anexo B. 8.). Este análisis confirma el resultado obtenido a partir de la prueba "T de Student".

**Figura 55:** Gráfico de caja y bigotes de (A) número de huevos por hembra y (B) número de larvas por hembra según la comparación de los tratamientos ANT y CEREAL. La línea horizontal dentro de cada caja representa la mediana de los datos (segundo cuartil), mientras que las líneas horizontales que limitan la caja representan el primer cuartil (inferior) y tercer cuartil (superior). Las líneas horizontales que limitan los bigotes representan los valores mínimos o máximos no atípicos. Los círculos no rellenos representan valores atípicos. En la parte inferior referente a las hembras que no ovipositaron, cada punto negro representa una de estas hembras



(Fuente: Elaboración propia utilizando R (R Development Core Team, 2014))

En la Figura 56 se observan dos diagramas de caja y bigote. En el diagrama A es posible observar que el tratamiento CEREAL presenta menor dispersión que los demás debido a que su rango intercuartílico es más corto (Serrano, 2003). Por el contrario, el tratamiento ANT presenta mayor dispersión que los demás. Sin embargo, no es posible determinar si la varianza es constante (homogénea) a simple vista. Es por eso que se realizó el test de Bartlett, que confirma la homogeneidad de las varianzas, indicando que las varianzas son homogéneas ( $p\text{-value} > 0.05$ ) (Serrano, 2003) (anexo B. 8.). Se realizó el

mismo análisis para los resultados presentados en el diagrama B y se confirmó que también en ese caso las varianzas son homogéneas (anexo B. 8.).

Además, es posible distinguir que el tratamiento ZPG+BOL tiene una mediana de huevos por hembra menor que los demás tratamientos y además es el tratamiento que presenta el mayor número de hembras que no ovipositaron (cada hembra representada por un círculo negro en la parte inferior de la gráfica). Esto podría indicar que la combinación del silenciamiento de ambos genes sí tiene un efecto sobre la ovipostura ya que disminuye la progenie. Se considera que esto pudo haber ocurrido debido a que a pesar de los rearreglos que sufrió el plásmido, este aún conserva ciertas regiones del gen introducido que pueden inducir silenciamiento. Sin embargo, este efecto no se observa cuando se utilizan las cepas ZPG y BOL de manera individual posiblemente porque el silenciamiento sea muy leve como para provocar un efecto visible en la ovipostura. No obstante, no es posible concluir esto con certeza debido a que no se monitoreó la expresión de los genes ni se secuenció el plásmido. Además, las hembras utilizadas para los experimentos, las cuales fueron expuestas a la mezcla final de alimento con bacteria *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-ZPG*, pudieron verse afectadas por el silenciamiento del gen *ZPG*. El gen *ZPG* también puede intervenir en la oogénesis por lo cual su silenciamiento podría afectar la ovipostura. A partir de esto se recomienda realizar los próximos experimentos con hembras silvestres de *An. albimanus*.

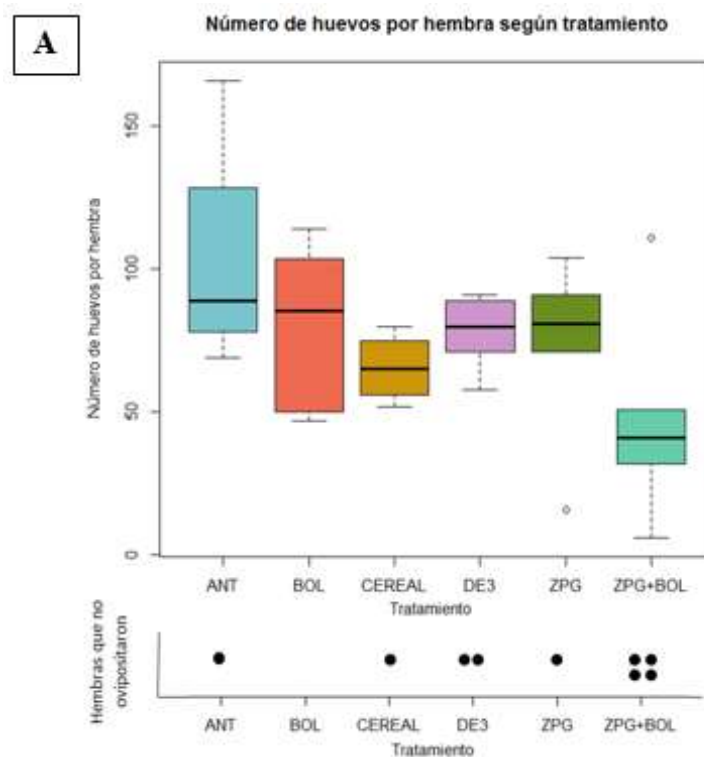
El tratamiento ANT presenta la mediana de huevos por hembra más grande. Además se observa que los tratamientos ANT, ZPG, BOL y ZPG+BOL tienen una mediana distinta al tratamiento CEREAL. Sin embargo, a simple vista no se puede conocer si esa diferencia es significativa por lo que fue necesario realizar un análisis de ANOVA de un factor. A partir de este análisis se puede concluir con un 95% de confianza que la media del número de huevos por hembra de todos los tratamientos no es significativamente diferente (valor  $p > 0.05$ ) (Serrano, 2003) (anexo B. 8.). Por lo tanto se puede decir que las medias del número de huevos por hembra de todos los tratamientos son iguales. Este resultado fue confirmado por la prueba post-hoc “TukeyHSD” (valor  $p > 0.05$ ) (Serrano, 2003) (anexo B. 8.). Es importante mencionar que previo a realizar el ANOVA se llevó a cabo la prueba de “Shapiro-Wilk” para evaluar normalidad; el resultado demuestra que no

se puede rechazar la hipótesis nula que menciona que los datos provienen de poblaciones con una distribución normal. Sin embargo, con la prueba de “Shapiro-Wilk” no se puede confirmar que los datos sí provengan de una población con distribución normal. Teniendo en cuenta que las poblaciones de los tratamientos podrían no estar distribuidas de manera normal, se decidió llevar a cabo una prueba no paramétrica análoga al ANOVA para comprobar si con ambas pruebas se llega a la misma conclusión. La prueba no paramétrica utilizada fue Kruskal-Wallis. A partir de dicha prueba se determinó, con un 95% de confianza, que la media del número de larvas por hembra de todos los tratamientos no es significativamente diferente (valor  $p > 0.05$ ) (Serrano, 2003) (anexo B. 8.). Este análisis confirma el resultado obtenido a partir del ANOVA.

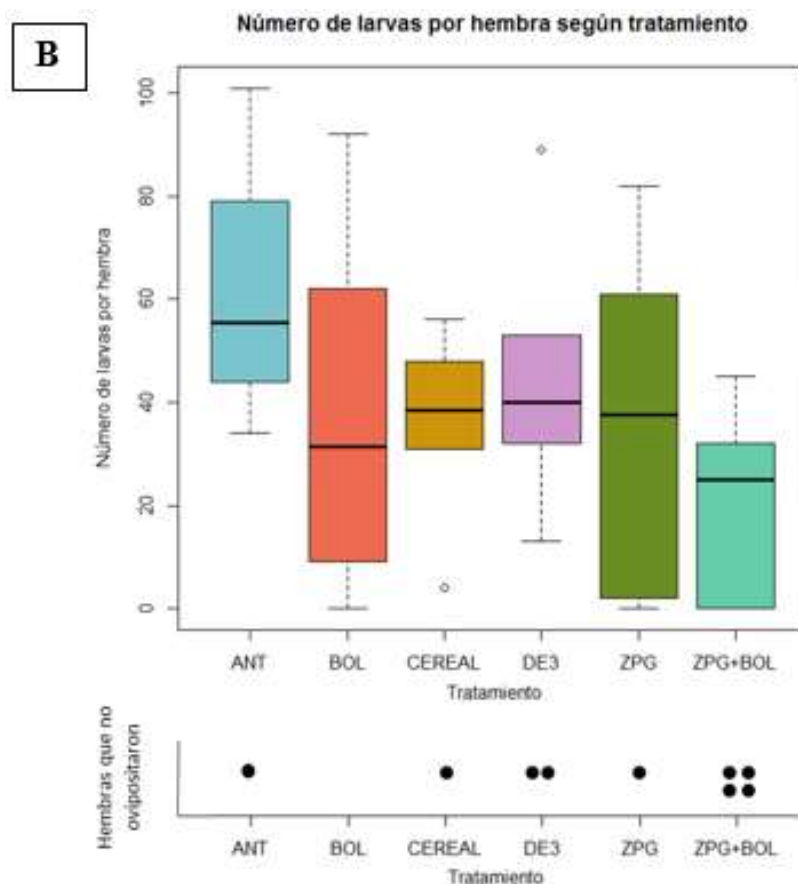
En la Figura 56 (B) es posible observar que el tratamiento CEREAL nuevamente presenta menor dispersión que los demás. Por el contrario, el tratamiento BOL presenta mayor dispersión que los demás. Además, es posible distinguir que el tratamiento ZPG+BOL tiene una mediana de larvas por hembra menor que los demás tratamientos y además es el tratamiento que presenta el mayor número de hembras que no ovipositaron. Esto posiblemente se deba al efecto discutido anteriormente para el diagrama A. Por el contrario, el tratamiento ANT presenta la mediana de larvas por hembra más grande. Además se observa que los tratamientos ANT, BOL y ZPG+BOL tienen una mediana distinta al tratamiento CEREAL, a excepción del tratamiento ZPG cuya mediana es muy parecida. Sin embargo, a simple vista no se puede conocer si esa diferencia es significativa por lo que nuevamente fue necesario realizar un análisis de ANOVA de un factor. A partir de este análisis se puede concluir con un 95% de confianza que la media del número de larvas por hembra de todos los tratamientos no es significativamente diferente (valor  $p > 0.05$ ) (Serrano, 2003) (anexo B. 8.). Por lo tanto se puede decir que las medias de número de larvas por hembra de todos los tratamientos son iguales. Este resultado fue confirmado por la prueba post-hoc “TukeyHSD” (valor  $p > 0.05$ ) (Serrano, 2003) (anexo B. 8.). Previo a realizar el ANOVA nuevamente se llevó a cabo la prueba de “Shapiro-Wilk” para evaluar normalidad; el resultado demostró que no se puede rechazar la hipótesis nula que menciona que los datos provienen de poblaciones con una distribución normal. Sin embargo, teniendo en cuenta que las poblaciones de los tratamientos podrían no estar distribuidas de manera normal, se decidió llevar a cabo nuevamente la prueba de “Kruskal-Wallis”. A partir de

dicha prueba se determinó, con un 95% de confianza, que la media del número de larvas por hembra de todos los tratamientos no es significativamente diferente (valor  $p > 0.05$ ) (Serrano, 2003) (anexo B. 8.). Este análisis confirma el resultado obtenido a partir del ANOVA.

**Figura 56:** Gráfico de caja y bigotes de (A) número de huevos por hembra y (B) número de larvas por hebra según la comparación de múltiples tratamientos. La línea horizontal dentro de cada caja representa la mediana de los datos (segundo cuartil), mientras que las líneas horizontales que limitan la caja representan el primer (inferior) y tercer cuartil (superior). Las líneas horizontales que limitan los bigotes representan los valores mínimos o máximos no atípicos. Los círculos no rellenos representan valores atípicos. En la parte inferior referente a las hembras que no ovipositaron, cada punto negro representa una de estas hembras.



Continuación Figura 56



(Fuente: Elaboración propia utilizando R (R Development Core Team, 2014))

Los resultados presentados demuestran que el método de alimentación para larvas de *An. albimanus* conteniendo *E. coli* expresando ARNd<sub>h</sub> de un gen control derivado de *Arabidopsis thaliana*, no afecta la oviposición de las hembras en comparación con el método de alimentación a base de cereal de bebé. Por lo tanto se acepta la hipótesis nula 2.2, lo cual permite utilizar este método para alimentar a las larvas con la bacteria transgénica en el futuro.

3. Resultado 3: Diseño y evaluación de “primers” para genes de control y de espermatogénesis en *An. albimanus*

a. Señalización de productos amplificados con “primers” control y de espermatogénesis. A continuación se presentan partes de las secuencias de los genes de

control señalizando los fragmentos amplificados por las diferentes parejas de “primers” diseñados (Figuras 57 a 62). Los productos amplificados por las parejas de “primers” ZPGqp y Bouleqp diseñados para utilizar en PCR tiempo real, se encuentran señalizados en las Figuras 36 y 37, respectivamente.

**Figura 57:** Señalización de parejas de "primers" en la secuencia del gen *AaRpL19*. Los exones están representados por diferentes colores. La secuencia en la que se une cada uno de los “primers” está señalizada con una flecha. En negrita se encuentra la secuencia amplificada



(Fuente: Elaboración propia)

**Figura 58:** Señalización de parejas de "primers" en la secuencia del gen *AaRpS19*. Los exones están representados por diferentes colores. La secuencia en la que se une cada uno de los "primers" está señalizada con una flecha. En negrita se encuentra la secuencia amplificada



(Fuente: Elaboración propia)

**Figura 59:** Señalización de parejas de "primers" en la secuencia del gen *AaCHS1*. Los exones están representados por diferentes colores. La secuencia en la que se une cada uno de los "primers" está señalizada con una flecha. En negrita se encuentra la secuencia amplificada

EXON 5

GAAAAGGTTTGATGGATGACAACGTGATGCGCAAGTATACGACACGATCGGA  
 TGAGGCCCGGCACTACGTGCAGTACGATCAGGGTGAGGATCGTTGGTTGTGT  
 ACGCTGCTGCTGCAACGGGGCTACCGGGTCGAGTACTCGGCCGCCTCGGACG  
 CCTACACGCACTGTCCCGAGGGTTTCAACGAGTTCTACAACCAGCGCCGCCG  
 CTGGGTACCGTCCACCATCGCCAACATCATGGACCTGCTGATGGACTACCGG  
 CGCACGATCAAGATCAACGACAACATCTCGCTGCTGTACATCTTCTACCAGA  
 TGATGCTGATGGGCGGTACGATTCTCGGCCCGGCACGATCTTCCTCATGTTG  
 GTCGGTGC GTTCGTGGCCGCGTTCAAGATTGACAACTGGACCTCCTTCTACTA  
 CAACATCATAACCGATCATGCTGTTCATGCTGGTGTGCTTCACGTGCAAATCCA  
 ACATCCAGCTGCTGGTCGCCAGATACTGTCCACCGTCTACGCGCTCATCATG  
 ATGGCGGTGATCGTCGGTACGGCGCTGCAGCTCGGCGAGGACGGCATCGGGT  
 CACCGTCGGCCATTTTCCTGTAGCGATGACGGGCTCGTTCTTTATAGCGGC

AaCHS1qP\_L  
 5' → 3'

CTGCCTGCATCCGCAGGAGTTCTGGTGCATTGCGTCCGGTATCATCTAT  
 CTGCTGTCGATTCCGTCCATGTACCTGCTGTTGATCCTGTACTCGATCATC  
 AACCTGAACG

AaCHS1qP\_R  
 3' ← 5'

TCGTCTCCTGGGGTACCCGCGAGGTCGTGGCCAAGAAGACGAAGAAGGAGCT  
 GGAACAGGAGAAGAAGGAAGCGGAGGAGGCGGCCAAACGGGCGAAGCAGA  
 AGAGCCTGCTCGGGTTCCTGCAGGGCGGCGTCGGCAATGGCTCGGACGAGGA  
 AGGCTCGATCGACATTTTCGATCGCGGGCCTGTTCCGGTGTCTCCTCTGTACGC  
 ACGGCAAGACGACGGACGAGAAGGCGCAGCTCATCCACATCAGCGATGCGC  
 TCGATTCGATTACGAAGAAGATCGAAAACCTGGAGAAGCACATCGATCCGCA  
 CGGCCACCATAACGCGCAAACGGACGGCTTCGGCCGGGTCGAAGGACCACCAT

Continuación Figura 59.

CTCGGTTTCGGTTCGCCGAGGACACGGAGGATGACGATGAAGACGAGGAGTCG  
GAGACCTCGACGCTGCAGCGCGAC.....

(Fuente: Elaboración propia)

**Figura 60:** Señalización de parejas de "primers" en la secuencia del gen *AaCHS2*. Los exones están representados por diferentes colores. La secuencia en la que se une cada uno de los "primers" está señalizada con una flecha. En negrita se encuentra la secuencia amplificada.

.....CCCTGATGGAGAACTCGGTGATGAAGAAGTACACGACCAAGTC  
GGACCAGGCGCGCCACTACGTGCAGTACGATCAGGGTGAGGATCGATGGTTG  
TGTACGCTGCTGCTGAAGCAAAGTTCCGCGTCGAGTATTCGGCCGCTTCCGA  
TGCCTACACGCACGCACCGGAGGGATTTAACGAGTTCTACAATCAACGCCGC  
CGCTGGGTACCGTCCACTATTGCGAATATCTTCGATCTGCTGGCCGATGCGAA  
GCGTGTGGTCAAGACGAACAACAGCATCTCGATGCCGTACATCATCTATCAG  
TGTATGTTGATGTTTCGGCACGATTCTCGGACCGGGCACCATCTTCCTGATGAT  
GGTCGGTGCCTGGTGGCCGTGTTCCGTATTGACATGTGGACCTCCTTCCTCT  
GGAACGGGATACCGTTGGCCGGTTTTATGGCGATTTGCTACTGGATGGAGCA  
AAAGTACCAGCTGGTGGCGGCCTTCTTCATCTCCGCCATCTACTCGCTCGTCA  
TGATGGCCGTTCTCGTCGGTATCGTCGTACAGGTGATGGAGGACGGCATCCT  
AGCGCCCTCCTCCATGTTCTTCATCGCCGTCGCGCTACAGATCGTTATCACCG  
GGGTGCTGCATCCGCAGGAGATGGAAGCCCTACCGGCCGGGCTCGTCTACTA  
CATCACCATTCCCTCCATGTACATGCTGCTCGTGATCTACTCCGTCTTCAACA  
TGAACGACGTTTCGTGGGGAACGCGCGAGAATCCGGTGGATGCGGCCAAGA  
AGGCCCCAGCACCTGCCGCCCGCAGGGCAAATGCAGAACTCTTCGGC  
5'  $\xrightarrow{\text{AaCHS2qP\_L}}$  3'  
**TATCTGCGCTCGCCGACAAAGAAGACGACGGATCGATCGACATTTCGA**  
**TCAACGGGCTGTTCCGTTGTATGCTCTGCACGCACCCCAAACCGAGTGCC**  
3'  $\xleftarrow{\text{AaCHS2qP\_R}}$  5'  
GATAAGGAACAGATCGCACAAATTGCTGCCTCCCTCGCGGACATCAGCACCA  
AGATGAAGGGTCTCGAAAT

EXON 8

(Fuente: Elaboración propia)

**Figura 61:** Señalización de parejas de "primers" en la secuencia de los genes *AaRIB43A1* y *AaRIB43A2*. Los exones están representados por diferentes colores. La secuencia en la que se une cada uno de los "primers" está señalizada con una flecha. En negrita se encuentra la secuencia amplificada



(Fuente: Elaboración propia)

**Figura 62:** Señalización de parejas de "primers" en la secuencia de los genes *AaRpS7*. Los exones están representados por diferentes colores. La secuencia en la que se une cada uno de los "primers" está señalizada con una flecha. En negrita se encuentra la secuencia amplificada



(Fuente: Elaboración propia)

b. Cuadro con nombre y secuencias de “primers” diseñados. En el Cuadro 24 se presentan las secuencias y nombres otorgados a los “primers” diseñados para la amplificación y cuantificación de genes control y de espermatogénesis (*BOL* y *ZPG*). También se presentan características especiales de cada “primer” en el Cuadro 21.

En el Cuadro 24 se puede observar que las secuencias de todos los “primers” diseñados poseen un tamaño adecuado para que funcione la PCR ya que no superan los 25 pb recomendados (Farrell, 2005). No fue posible evitar la presencia de más de dos guaninas o citocinas cercanas al extremo 3’ en todos los “primers” (específicamente en los últimos cinco nucleótidos de este extremo). Esto podría intervenir en el adecuado funcionamiento de los “primers” porque facilitaría la formación de dímeros en dicho extremo e impediría la adición de nucleótidos para amplificar el gen (Farrell, 2005). Se diseñó siete parejas de “primers” para genes ribosomales que son altamente conservados y continuamente expresados en *An. albimanus* y que por ende pueden ser utilizados como control. Además se diseñó “primers” para amplificar dos genes involucrados en la espermatogénesis de *An. albimanus*, siendo estos *ZPG* y *BOL*. Dichos “primers” amplifican una secuencia de menor tamaño (aprox. 100 pb) que los “primers” *ZPGExt1T7* o *BouleExt1T7*. Cabe resaltar que la región amplificada por estos “primers” no es compartida con la región amplificada por los “primers” *ZPGExt1T7* o *BouleExt1T7*. Esto para permitir cuantificar el silenciamiento de dichos genes en las larvas de *An. albimanus* sin tomar en cuenta interferencias por el ARNdh proveniente del alimento.

**Cuadro 24:** Nombre y secuencia de los "primers" diseñados para amplificar genes de control y de espermatogénesis de *An. albimanus*

Nombre	Especificaciones	Secuencia “primers” de genes control
AaRpL19qP_L	“Primer” F	5’- AAGAAGATCGATCGCCACCT -3’
AaRpL19qP_R	“Primer” R	5’- CGCTTTCCTCTTGTGGATGT -3’
AaRpS19 qP_L	“Primer” F	5’- ACTTGTGTTGCCCTTCCTTG -3’
AaRpS19 qP_R	“Primer” R	5’- TGTGTTTCGATTGCTTTTGGA -3’

Continuación Cuadro 24.

Nombre	Especificaciones	Secuencia “primers” de genes control
AaCHS1qP_L	“Primer” F	5'- GATGACGGGCTCGTTCTTTA -3'
AaCHS1qP_R	“Primer” R	5'-AGCAGGTACATGGACGGAAT-3'
AaCHS2qP_L	“Primer” F	5'- CAGGGCAAATGCAGAAACT -3'
AaCHS2qP_R	“Primer” R	5'- GCAGAGCATACAACGGAACA -3'
AaRIB43A1qP_L	“Primer” F	5'- GGTGCAAGAAAAGCAAGAGG -3'
AaRIB43A1qP_R	“Primer” R	5'- GCGTTGCTTCAGTAACAGGA -3'
AaRIB43A2qP_L	“Primer” F	5'- TCTCGAGGAAACCCTCATGT -3'
AaRIB43A2qP_R	“Primer” R	5'- AACTCGTTTACGGCTTCCTG -3'
AaRpS7qP_L	“Primer” F	5'- ACCCCAACAAGCAGAAGAGA-3'
AaRpS7qP_R	“Primer” R	5'- ATACGCTTGCCGACCACTT-3'
Nombre	Especificaciones	Secuencia “primers” de genes de espermatogénesis <i>BOL</i> y <i>ZPG</i>
ZPGqP_L	“Primer” F	5'-AGCTGGCCAAATGCGACT-3'
ZPGqP_R	“Primer” R	5'-TATCTTCTCGTTCACCACGTTC-3'
BouleqP_L	“Primer” F	5'-ATGTCCCTACCGAACCCGGC-3'
BouleqP_R	“Primer” R	5'-CCGCTGATGCCGCCGACAAA-3'

Fuente: Elaboración propia

En el Cuadro 25 se observa que la mayoría de las parejas de los “primers” diseñados cumplen con que su Tm no difiera en más de cinco grados centígrados (Farrell, 2005). La única pareja que no cumple con este requerimiento es BouleqP, por lo que dichos “primers” podrían presentar dificultad para funcionar adecuadamente al utilizar un mismo programa de PCR. Se espera que todos los “primers”, excepto BouleqP\_L y BouleqP\_R, sean efectivos debido a que su porcentaje de GC no supera el 60%, lo cual reduce la posibilidad

de que se formen enlaces fuertes en los “hairpins” y dímeros (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Esto se comprueba debido a que los rangos de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) son levemente negativos (máximo -13.19) lo que implica que existe menor probabilidad de que las reacciones de formación de “hairpins” y dímeros ocurran de manera espontánea (Melo y Cuamatzi, 2007) A pesar de que la pareja de “primers” BouleqP no cumpla con todas las características de un buen “primer”, fue seleccionada debido a que era la mejor opción para el diseño de “primers” en la corta región disponible no amplificada por los “primers” exteriores 1 con promotores T7.

**Cuadro 25:** Características de los "primers" diseñados para amplificar genes de control y de espermatogénesis de *An. albimanus*

Nombre	Tm (°C)	% GC	No. de “hairpins” (rango $\Delta G$ kcal/mol)	No. de homodímeros (rango $\Delta G$ kcal/mol)	No. de heterodímeros (rango $\Delta G$ kcal/mol)
AaRpL19qP_L	61	50	3 (0.65 a 1.56)	9 (-12.86 a -1.57)	17 (-6.37 a -1.34)
AaRpL19qP_R	60	50	2 (-0.32 a -0.08)	5 (-4.64 a -1.47)	
AaRpS19 qP_L	60	50	3 (0.95 a 1.29)	3 (-3.14 a -1.34)	7 (-4.64 a -1.34)
AaRpS19 qP_R	60	40	1 (0.55)	4 (-6.76 a -1.47)	
AaCHS1qP_L	60	50	1 (-1.44)	8 (-4.95 a -0.96)	14 (-4.95 a -0.96)
AaCHS1qP_R	59	50	2 (0.63 a 1.37)	6 (-5.38 a -1.47)	
AaCHS2qP_L	60	45	2 (-1.6 a -1.48)	7 (-7.05 a -1.47)	7 (-6.57 a -1.6)
AaCHS2qP_R	60	50	1 (0.31)	6 (-3.61 a -0.96)	
AaRIB43A1qP_L	60	50	2 (-0.6 a -0.4)	3 (-7.05 a -3.14)	11 (-10.58 a -1.57)
AaRIB43A1qP_R	59	50	1 (-0.99)	12 (-3.61 a -0.96)	

Continuación Cuadro 25.

Nombre	T <sub>m</sub> (°C)	% GC	No. de “hairpins” (rango ΔG kcal/mol)	No. de homodímeros (rango ΔG kcal/mol)	No. de heterodímeros (rango ΔG kcal/mol)
AaRIB43A2qP_L	60	50	1 (-2.13)	9 (-9.96 a -1.34)	12 (-8.19 a -1.34)
AaRIB43A2qP_R	59	50	1 (-0.95)	8 (-4.95 a -0.96)	
AaRpS7qP_L	60	50	0	1 (-3.14)	10 (-8.64 a -1.6)
AaRpS7qP_R	61	53	1 (-1.47)	9 (-3.61 a -0.96)	
ZPGqP_L	62	56	2 (-0.32 a 0.32)	10 (-13.19 a - 1.47)	19 (-5.19 a -1.34)
ZPGqP_R	59	46	1 (-1.61)	7 (-6.3 a -0.96)	
BouleqP_L	67	65	1 (-2.45)	11 (-9.75 a - 1.34)	8 (-9.82 a -1.47)
BouleqP_R	74	65	2 (-0.46 a -0.02)	13 (-3.61 a - 1.47)	

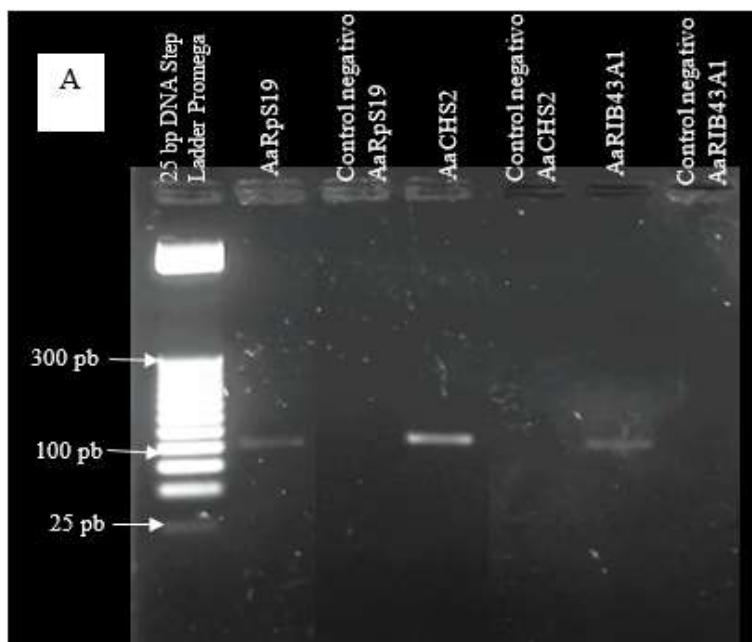
Fuente: Elaboración propia

c. Geles de electroforesis de productos de PCR amplificados con “primers” de control y de espermatogénesis. En la Figura 63 se observa que los “primers” control utilizados para esta reacción de PCR lograron amplificar las secuencias de los genes ribosomales esperadas (aprox. 100 pb) a partir de ADNc de hembras de *An. albimanus*. Las bandas de los amplicones se observan en el segundo, cuarto y sexto pozo del gel A para los genes *AaRpS19*, *AaCHS2* y *AaRIB43A1*, respectivamente, y en el tercer, quinto, séptimo y noveno pozo del gel B para los genes *AaRpL19*, *AaCHS1*, *AaRpS7* y *AaRIB43A2*, respectivamente. Se considera que dichas bandas representan los productos esperados debido a que todas las bandas amplificadas se encuentran ubicadas exactamente aproximadamente al mismo nivel que la banda de 100 pb de la escalera (primer pozo en

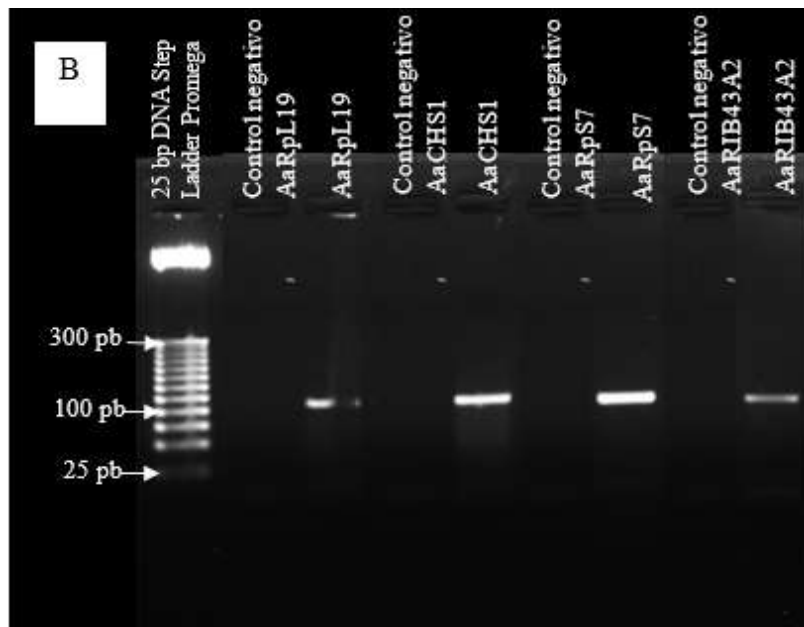
ambos geles). Además todas las bandas se ven definidas lo que demuestra que la secuencia amplificada posee alta integridad. Sin embargo, la intensidad de las bandas fue variable lo cual implica que las parejas de “primers” amplificaron con diferente efectividad las secuencias de interés. La banda más intensa corresponde al amplicón de la pareja de “primers” AaRpS7 lo que significa que el producto amplificado por los mismos está más concentrado. Por lo tanto, se recomienda utilizar esta pareja como el control para una reacción de PCR en tiempo real. Siguiendo este parámetro, las parejas de “primers” menos recomendables son AaRpS19 y AaRIB43A1. La ausencia de bandas en los pozos de control negativo demuestra que la reacción de PCR se llevó a cabo sin contaminación y confirman la confiabilidad de los resultados.

**Figura 63:** Productos de PCR amplificados utilizando los "primers" control AaRpS19, AaCHS2, AaRIB43A1, AaRIB43A2, AaCHS1, AaRpL19 y AaRpS7. Condiciones de corrida: gel de agarosa al 1 % (p/v) en “buffer” de corrida TBE 1X (c.f.) y 16.67 V/cm.

Visualización con bromuro de etidio a 300 nm



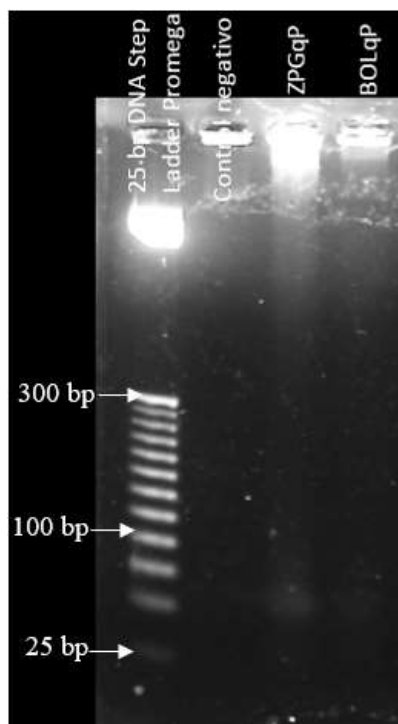
Continuación Figura 63.



(Fuente: Fotos propias)

En la Figura 64 se demuestra que la reacción de PCR fue llevada a cabo exitosamente y sin contaminación debido a que no se observa ninguna banda en el control negativo (segundo pozo). No fue posible amplificar ningún producto utilizando estos “primers” ya que no se observa ninguna banda cercana a 100 pb en el tercer y cuarto pozo. Cabe resaltar que el método de visualización de un gel bajo luz UV tiene una baja sensibilidad (utilizando bromuro de etidio se puede detectar hasta 5 ng) (ThermoFisher Scientific, 2016a). Por lo tanto, se recomendaría utilizar otro método de detección que tenga mayor sensibilidad, por ejemplo PCR tiempo real (utilizando SYBR Green se puede detectar hasta 100 pg) (Sigma-Aldrich, 2016). Es importante recalcar que los “primers” de control (Figura 63) fueron probados utilizando el mismo ADNc y sus amplicones sí se pudieron observar en un gel de agarosa. Esto demuestra que los “primers” de espermatogénesis diseñados son menos efectivos para lograr su propósito.

**Figura 64:** Productos de PCR amplificados utilizando los "primers" ZPGqP y BouleqP. Condiciones de corrida: gel de agarosa al 1 % (p/v) en "buffer" de corrida TBE 1X (c.f.) y 16.67 V/cm. Visualización con bromuro de etidio a 300 nm

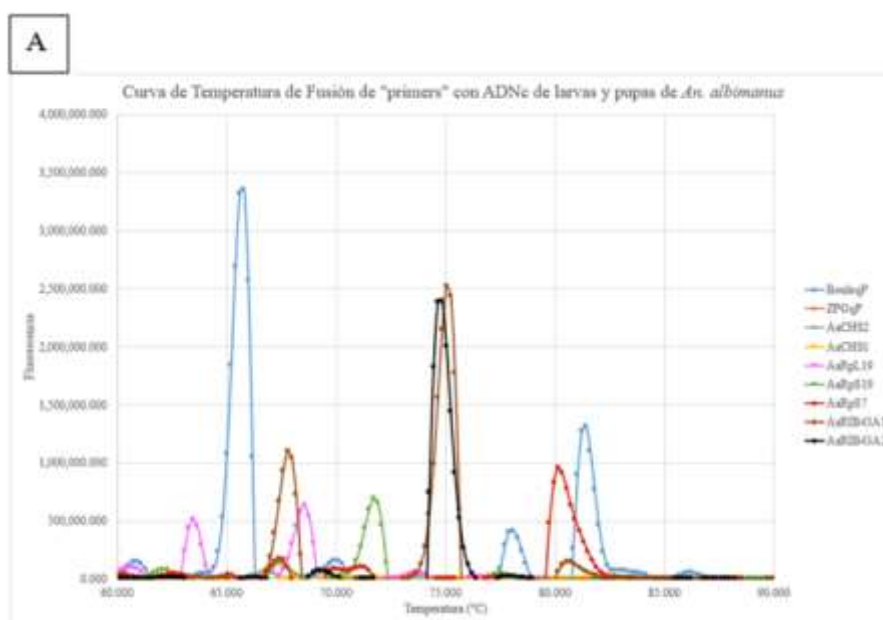


(Fuente: Foto propia)

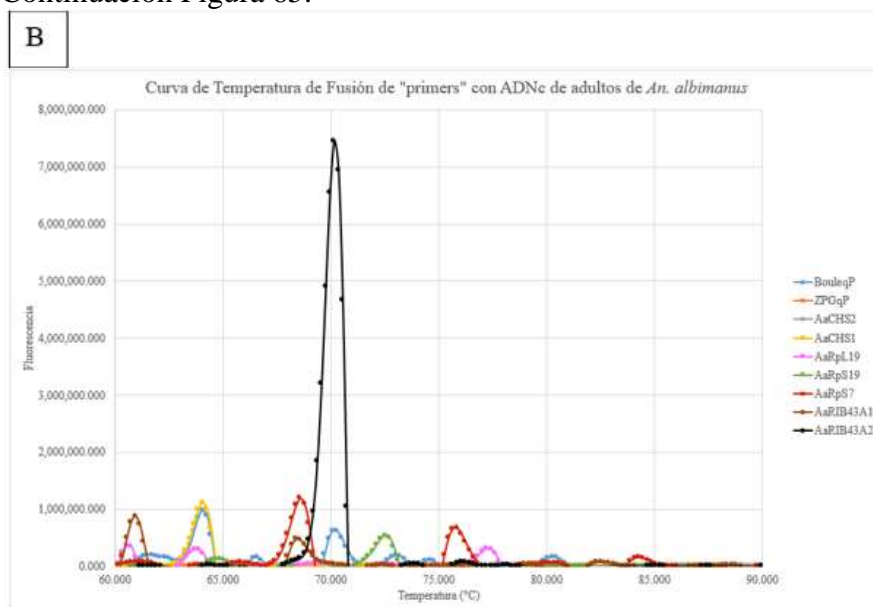
Los resultados anteriores demuestran que todos los "primers" de control funcionaron para amplificar el producto esperado. Sin embargo, ciertas parejas de "primers", por ejemplo AaRpS7, funcionaron mejor que otras. Por otro lado, los productos de los genes de espermatogénesis no se lograron amplificar y detectar exitosamente mediante electroforesis en gel de agarosa. Por lo tanto, no se recomienda utilizarlos para monitorear la expresión de los genes *ZPG* y *BOL* utilizando esta técnica de detección. En conclusión se puede decir que se rechaza la hipótesis nula 3.1 ya que sí es posible diseñar "primers" para monitorear la expresión de los genes control o de espermatogénesis (*ZPG* y *BOL*) de *An. albimanus* a través de su amplificación y detección mediante electroforesis en gel de agarosa.

d. Análisis de curvas de temperatura de fusión para cada “primer” según diferentes tipos de ADNc de *An. albimanus*. En la Figura 65 se demuestra que la reacción de PCR fue llevada a cabo exitosamente y sin contaminación debido a que no se observa ninguna banda en el control negativo (segundo pozo). No fue posible amplificar ningún producto utilizando estos “primers” ya que no se observa ninguna banda cercana a 100 pb en el tercer y cuarto pozo. Cabe resaltar que el método de visualización de un gel bajo luz UV tiene una baja sensibilidad (utilizando bromuro de etidio se puede detectar hasta 5 ng) (ThermoFisher Scientific, 2016a). Por lo tanto, se recomendaría utilizar otro método de detección que tenga mayor sensibilidad, por ejemplo PCR tiempo real (utilizando SYBR Green se puede detectar hasta 100 pg) (Sigma-Aldrich, 2016). Es importante recalcar que los “primers” de control (Figura 39) fueron probados utilizando el mismo ADNc y sus amplicones sí se pudieron observar en un gel de agarosa. Esto demuestra que los “primers” de espermatogénesis diseñados son menos efectivos para lograr su propósito.

**Figura 65:** Gráfica de fluorescencia de SYBR Green con respecto a la temperatura de fusión para cada "primer" utilizando A) ADNc de larvas y pupas y B) ADNc de adultos de *An. albimanus*. Cada “primer” está representado con un color diferente (la codificación de colores se presenta en la parte inferior de cada gráfica) y cada pico observado en la curva representa un producto de amplificación según el “primer” indicado



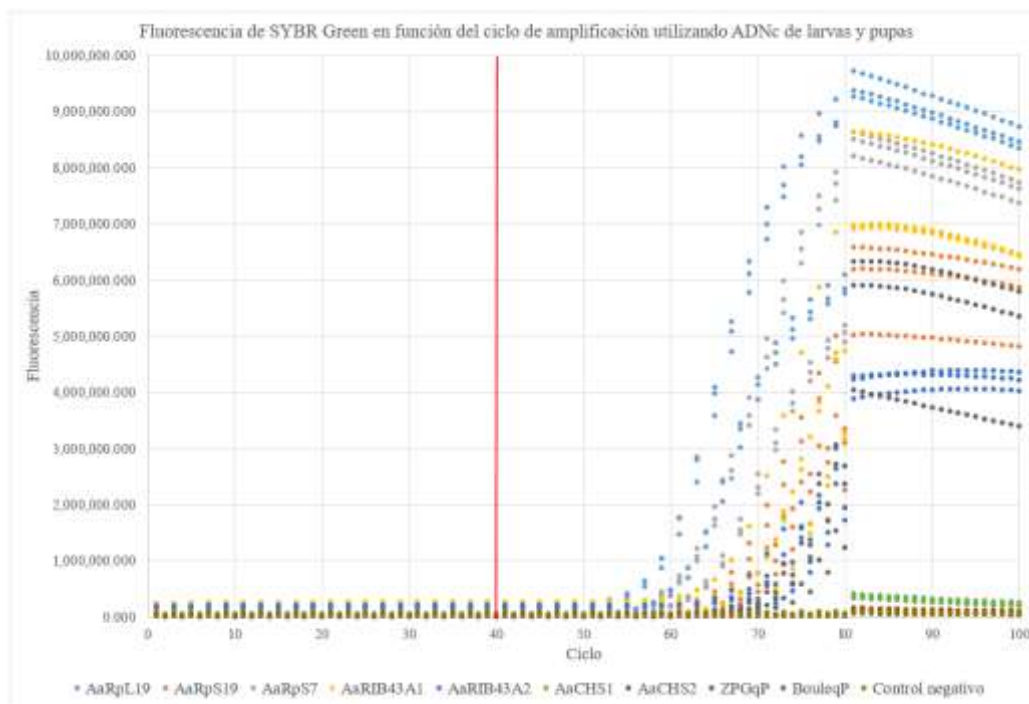
Continuación Figura 65.



(Fuente: Elaboración propia utilizando Excel)

e. Análisis de la intensidad de fluorescencia con respecto al ciclo para diferentes tipos de ADNc de *An. albimanus*. En la Figura 66 se demuestra que la reacción de PCR fue llevada a cabo exitosamente y sin contaminación debido a que no se observa ninguna banda en el control negativo (segundo pozo). No fue posible amplificar ningún producto utilizando estos “primers” ya que no se observa ninguna banda cercana a 100 pb en el tercer y cuarto pozo. Cabe resaltar que el método de visualización de un gel bajo luz UV tiene una baja sensibilidad (utilizando bromuro de etidio se puede detectar hasta 5 ng) (ThermoFisher Scientific, 2016a). Por lo tanto, se recomendaría utilizar otro método de detección que tenga mayor sensibilidad, por ejemplo PCR tiempo real (utilizando SYBR Green se puede detectar hasta 100 pg) (Sigma-Aldrich, 2016). Es importante recalcar que los “primers” de control (Figura 39) fueron probados utilizando el mismo ADNc y sus amplicones sí se pudieron observar en un gel de agarosa. Esto demuestra que los “primers” de espermatogénesis diseñados son menos efectivos para lograr su propósito.

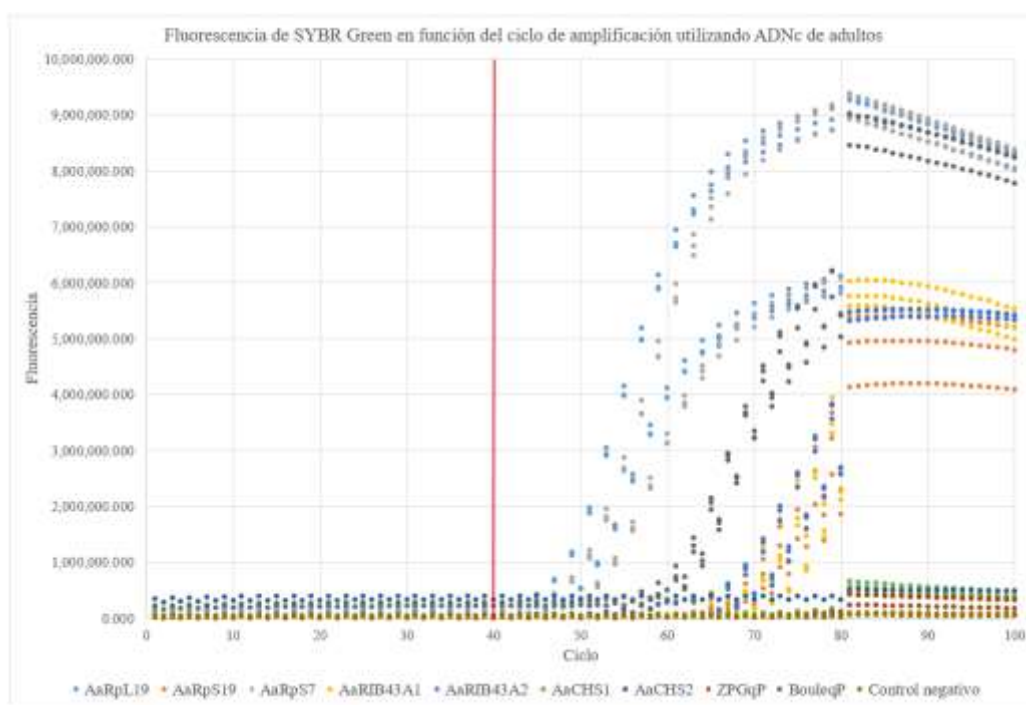
**Figura 66:** Amplificación de ADNc de larva-pupa con los "primers" de control y espermatogénesis. Cada "primer" está representado con un color diferente (la codificación de colores se presenta en la parte inferior de la gráfica). La línea vertical roja representa el límite de ciclos que teóricamente son tomados en cuenta como resultados válidos



(Fuente: Elaboración propia utilizando Excel)

En la Figura 67 se encuentran graficados los datos de tres réplicas de PCR tiempo real para cada uno de los "primers" en presencia de ADNc de adultos de *An. albimanus*. Se observa que uno de los "primers" con mayor amplificación fue AaRIB43A2, el cual se encuentra entre los que se recomendó para este tipo de ADNc (Figura 42). Al igual que en la Figura anterior se observa que en ningún caso la fluorescencia del SYBR Green es significativa en los primeros 40 ciclos (límite delimitado por la línea roja en la gráfica). Sin embargo el aumento exponencial de la fluorescencia del SYBR Green, observado posterior a los cuarenta ciclos, pertenece al aumento de amplicones porque la curva del control se mantuvo en todo momento por debajo de las lecturas de todos los "primers".

**Figura 67:** Amplificación de ADNc de adulto con los "primers" de control y espermatogénesis. Cada "primer" está representado con un color diferente (la codificación de colores se presenta en la parte inferior de la gráfica). La línea vertical roja representa el límite de ciclos que teóricamente son tomados en cuenta como resultados válidos



(Fuente: Elaboración propia utilizando Excel)

f. Análisis de capacidad de amplificación de los "primers" de control y espermatogénesis utilizando diferentes tipos de ADNc de *An. albimanus*. En los Cuadros 26 y 27 se observa el CT obtenido para cada uno de los "primers" utilizados en la PCR tiempo real con tres diferentes concentraciones de ADNc de larvas y pupas y ADNc de adultos, respectivamente. El valor de CT para al menos una de las réplicas realizadas con cada "primer" no pudo ser determinado (ND). Esto significa que en los primeros cuarenta ciclos de amplificación no se llegó a detectar una fluorescencia que superara el valor crítico. Tanto los resultados ND como los CT menores o cercanos a 5 (evidencia contaminación con ácidos nucleicos) no fueron tomados en cuenta para el análisis (Sigma-Aldrich, 2016).

Se esperaba que el valor de CT disminuya conforme aumenta la concentración del ADNc. Esta tendencia no fue posible observarla con claridad, debido a la falta de datos. También se considera que para observar este tipo de diferencias se debió haber usado diluciones con diferencias en al menos un orden de magnitud (por ejemplo 1:10, 1:100 y 1:1000). Ya que las diluciones utilizadas están en un mismo orden de magnitud y no se observa diferencial alguna entre ellas. Además, se observa que los resultados del CT varían en más de una unidad entre réplicas, lo cual representan variaciones en orden de magnitud para la concentración de ADNc. Esto evidencia que en la corrida posiblemente hubo error de pipeteo o las diluciones de ADNc no estaban completamente homogeneizadas. Este error es muy grande, ya que para el análisis cuantitativo con PCR tiempo real la precisión es muy importante (ThermoFisher Scientific, 2016).

**Cuadro 26:** Valores de CT obtenidos para los “primers” de control y espermatogénesis utilizando ADNc de larva-pupa

Réplica	Concentración final de ADNc en reacción (ng/μL)	CT según pareja de "primers"								
		AaRpL19	AaRpS19	AaRpS7	AaRIB43A1	AaRIB43A2	AaCHS1	AaCHS2	ZPGqP	BOLqP
1	50	ND	ND	10.712	32.973	ND	19.435	ND	ND	ND
2	50	ND	ND	5.434	34.683	ND	ND	ND	ND	ND
3	50	ND	ND	31.342	30.997	20.472	ND	ND	14.401	ND
1	75	ND	ND	ND	30.921	ND	9.378	11.785	30.886	ND
2	75	ND	21.476	20.388	32.387	14.65	ND	ND	ND	ND
3	75	ND	25.442	ND	34.704	ND	5.772	34.455	ND	ND
1	100	17.849	ND	ND	ND	ND	11.367	ND	ND	ND
2	100	8.344	10.823	35.456	34.458	ND	7.547	ND	ND	ND
3	100	ND	ND	29.448	33.566	26.7	ND	24.61	ND	ND

Fuente: Elaboración propia

\*ND: No determinado.

**Cuadro 27:** Valores de CT obtenidos para los “primers” de control y espermatogénesis utilizando ADNc de adulto

Réplica	Concentración final de ADNc en reacción (ng/μL)	CT según pareja de "primers"								
		AaRpL19	AaRpS19	AaRpS7	AaRIB43A1	AaRIB43A2	AaCHS1	AaCHS2	ZPGqP	BOLqP
1	50	ND*	31.597	20.336	37.667	22.192	12.805	ND	37.545	26.31
2	50	ND	ND	13.939	ND	ND	ND	ND	6.207	28.992
3	50	ND	ND	37.601	ND	10.246	ND	ND	ND	33.677
1	75	ND	ND	23.754	12.788	ND	ND	ND	ND	ND
2	75	24.405	ND	ND	31.577	ND	ND	ND	ND	34.925
3	75	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	30.913
1	100	ND	3.688	ND	ND	ND	ND	ND	ND	29.256
2	100	ND	10.238	6.812	32.492	ND	18.974	ND	ND	13.661
3	100	ND	ND	ND	ND	33.321	ND	ND	ND	ND

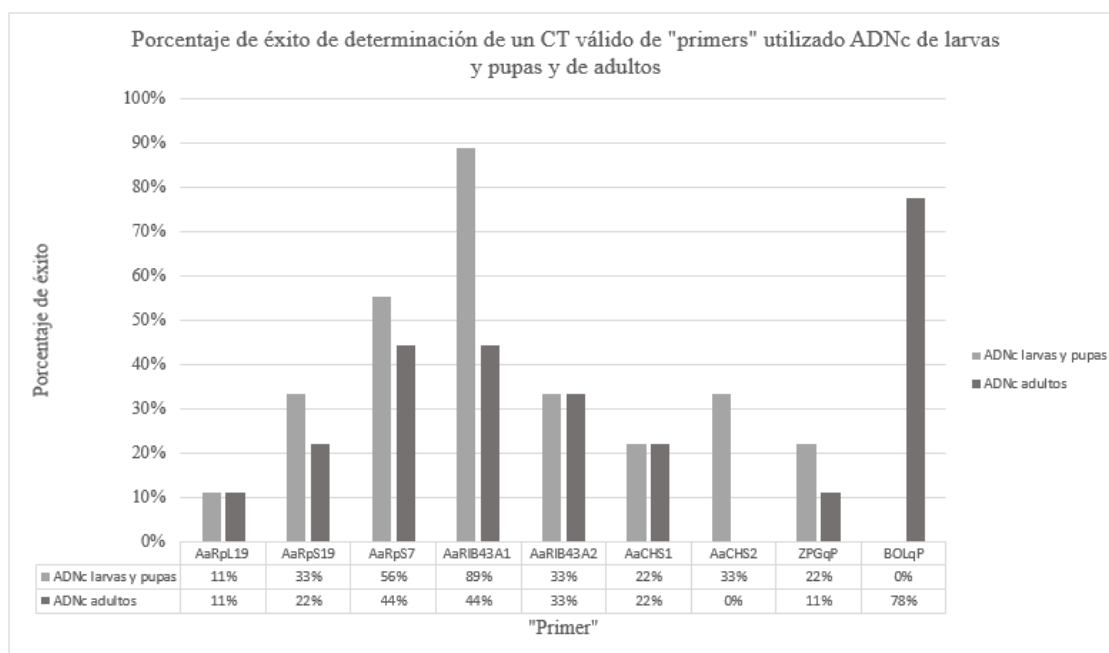
Fuente: Elaboración propia.

\*ND: No determinado.

En la Figura 68 se observa que los “primers” de control presentaron diferente porcentaje de éxito de determinación de un CT válido (valores entre 10 y 40). El 100% representa las nueve réplicas realizadas para cada primer (tres con cada concentración de ADNc). Teniendo en cuenta los “primers” previamente recomendados para ADNc de larvas y pupas de *An. albimanus* (AaRpS19, AaRpS7 y AaRIB43A2); se observa que el que tiene mejor porcentaje de éxito de determinación de un CT válido es AaRpS7. Mientras que para los “primers” previamente recomendados para ADNc de adultos de *An. albimanus* (AaCHS1, AaRpS19, AaRIB43A1 y AaRIB43A2) los mejores son AaRIB43A1y AaRIB43A2. Para los “primers” de genes de espermatogénesis se obtuvo un porcentaje de éxito elevado con ADNc de adultos usando el “primer” BouleqP, pero nulo con ADNc de larvas y pupas. Mientras que para el “primer” ZPGqP se obtuvo un porcentaje parecido con ambos ADNc, pero este es muy bajo. El porcentaje de éxito de determinación de un CT

válido se consideró importante porque un porcentaje alto podría asegurar la capacidad del “primer” de cuantificar la expresión de los genes en individuos de *An. albimanus* y que los resultados puedan ser comparables entre sí.

**Figura 68:** Porcentaje de éxito de determinación de un CT válido para las parejas de “primers” control y de espermatogénesis con ADNc de larva-pupa y adulto. El porcentaje de éxito de determinación de un CT válido se definió como: 100% multiplicado por número de réplicas en las cuales se determinó un valor de CT entre 10 y 40 dividido el número total de réplicas realizadas para cada “primer”



(Fuente: Elaboración propia utilizando Excel)

Con base en todos los resultados presentados, se puede decir que todos los “primers”, excepto ZPGqP, fueron capaces de amplificar en PCR tiempo real a partir de ADNc de larvas y pupas o de ADNc de adultos. Se rechaza la hipótesis nula 3.2, ya que sí es posible diseñar “primers” para monitorear la expresión de genes control o de espermatogénesis (*ZPG* y *BOL*) a través de su cuantificación y detección mediante PCR tiempo real. Para utilizar como control al monitorear la expresión de dichos genes en larvas y pupas de *An. albimanus* se recomienda continuar con la estandarización de los “primers” específicos AaRpS19, AaRpS7 y AaRIB43A1 (siendo el mejor de estos el AaRpS7);

mientras que para monitorear en adultos se recomienda continuar con la estandarización de los “primers” específicos AaCHS1, AaRpS19, AaRIB43A1 y AaRIB43A2 (siendo el mejor de estos el AaRIB43A2). Es importante recalcar que antes de utilizar dichos “primers” su funcionamiento se debe volver a evaluar y seguir estandarizando las condiciones de PCR tiempo real que conduzcan a su desempeño ideal.

## VIII. CONCLUSIONES

- Se transformó *E. coli* BL21 (DE3) con pET-19B para la expresión de BipA de *Borrelia turicatae*. El procedimiento de inducción de bacteria fue realizado correctamente debido a que se pudo observar en el resultado de SDS-PAGE presencia de bandas con mayor intensidad en muestras tratadas con el inductor IPTG.

- Se optimizó la metodología de lisis y se determinó que la lisis enzimática es más adecuada para el proceso de producción de proteína recombinante ya que se obtiene mayor rendimiento de proteína recombinante y al agregar PMSF se asegura la estabilidad de la proteína.

- El proceso de lisis mecánica mostraba degradación en la muestra ya que en este procedimiento no se utilizó inhibidor de proteasa PMSF por lo que la estabilidad no era la óptima.

- La transformación de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET19b GlpQ fue evidenciada gracias al crecimiento de clones en las placas de medio LB + ampicilina 50mg/ml.

- El rendimiento de la transformación de *E. coli* BL21 (DE3) con pET19b GlpQ fue del 6%, sin embargo esta baja tasa está relacionada con la longevidad del kit utilizado, por lo que las bacterias perdieron su competencia.

- La proteína BipA recombinante fue purificada exitosamente ya que obtuvo una banda en el SDS-PAGE cerca de los 70kDa, la cual corresponde al peso molecular de dicha proteína.

- Existe correspondencia entre la concentración 0.1107mg/ml, que equivalente a 1107ng de la proteína BipA recombinante y las bandas poco intensas del SDS-PAGE ya que el límite de detección de esta técnica es 100ng.

- Sí fue posible clonar el inserto de los genes *BOL* y *ZPG* en la cepa *E. coli* NOVA BLUE *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL/ZPG*, pero ambos insertos no son estables en *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL/ZPG* ya que se pierden. Los insertos son tóxicos ya que al ser expresados a partir del operón de lactosa, hay menor crecimiento de *E. coli* JM109

transformada con los plásmidos. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula 1 y se puede decir que la clonación de los genes *BOL* y *ZPG* de *An. albimanus* en *E. coli* no es estable.

- Las curvas de supervivencia de eclosión de pupa a adulto de los tratamientos ANT y CEREAL no muestran una diferencia significativa entre sí por lo que se acepta la hipótesis nula 2.1. Esto comprueba que el método de alimentación para larvas de *An. albimanus* conteniendo *E. coli* expresando ARNdh de un gen control derivado de *Arabidopsis thaliana*, permite el desarrollo larvario adecuado y no interfiere con el tiempo de eclosión de pupa a adulto en comparación con el método de alimentación a base de cereal de bebé. Esto a su vez permite utilizar este método para alimentar a las larvas con la bacteria transgénica en el futuro.

- Los valores del número de huevos y larvas eclosionadas por hembra en los tratamientos ANT y CEREAL en condiciones de oviposición individual no son significativamente diferentes. Se acepta la hipótesis nula 2.2 y se puede decir que el método de alimentación para larvas de *An. albimanus* conteniendo *E. coli* expresando ARNdh de un gen control derivado de *Arabidopsis thaliana*, no afecta la oviposición de las hembras en comparación con el método de alimentación a base de cereal de bebé. Esto permite utilizar este método para alimentar a las larvas con la bacteria transgénica en el futuro.

- Los resultados demuestran que se logró amplificar los productos esperados al utilizar los “primers” de control, pero no al utilizar los “primers” de espermatogénesis. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula 3.1 y se puede decir que sí es posible diseñar “primers” para monitorear la expresión de los genes control o de espermatogénesis (*ZPG* y *BOL*) de *An. albimanus* a través de su amplificación y detección mediante electroforesis en gel de agarosa. La pareja de “primers” de control recomendada para este propósito es AaRpS7 debido a que la banda del producto amplificado por dicha pareja fue la más intensa, lo cual significa que fue el amplicón con mayor concentración.

- Se rechaza la hipótesis nula 3.2, ya que sí es posible diseñar “primers” para monitorear la expresión de genes control o de espermatogénesis (*ZPG* y *BOL*) a través de su cuantificación y detección mediante PCR tiempo real. Para utilizar como control al monitorear la expresión de dichos genes en larvas y pupas de *An. albimanus* los mejores

candidatos para continuar con la estandarización son los “primers” específicos AaRpS19, AaRpS7 y AaRIB43A1 (siendo el mejor de estos el AaRpS7); mientras que para monitorear en adultos los mejores candidatos para continuar con la estandarización son los “primers” específicos AaCHS1, AaRpS19, AaRIB43A1 y AaRIB43A2 (siendo el mejor de estos el AaRIB43A2)

## IX. RECOMENDACIONES

- Siempre asegurarse se utilizar soluciones de tampón de corrida, APS, tampón de unión y purificación, frescas preparadas el mismo día del procedimiento ya que la actividad de los componentes de las soluciones puede verse afectada después de tenerla guardada por mucho tiempo.
- Asegurarse de que los reactivos que se utilicen no tengan demasiado (más de 8 años) de estar abiertos, pues la vida útil de éstos se ve disminuida con el tiempo.
- Para tener un mayor rendimiento en la purificación de la proteína es necesario aumentar el volumen de producción y así poder conectar el sistema a un equipo de HPLC para poder recolectar únicamente la proteína recombinante de interés.
- Extraer y secuenciar los plásmidos *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL/ZPG* de las cepas *E. coli* NOVA BLUE *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL/ZPG*, *E. coli* HT115 (DE3) *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL/ZPG* y *E. coli* JM109 *pGEMT-Amp<sup>R</sup>-BOL/ZPG* para determinar qué rearrreglos o recombinaciones ocurrieron.
- Realizar pruebas con otros genes de espermatogénesis para evaluar si su silenciamiento mejora la efectividad de la esterilización de los machos de *An. albimanus*.
- Utilizar distintos “sets” de parejas de “primers” para amplificar regiones más pequeñas de los genes *BOL* y *ZPG* de manera que se reduzca la potencial toxicidad de los insertos. Recordar colocar únicamente un promotor T7 en el inserto para facilitar la amplificación cuando este se encuentre dentro del plásmido *pGEMT*. Otra estrategia podría consistir en diseñar “hairpins” de regiones de los genes *BOL* y *ZPG* cuya expresión sea regulada por el operón de lactosa o arabinosa para mayor control en caso de toxicidad. Para el diseño de los “hairpins” se recomienda utilizar el programa “BLOCK-iT™ RNAi Designer” de Thermo Fisher Scientific.
- Probar el funcionamiento de los “primers” BouleInt1T7 y ZPGInt1T7 con ADNc de *An. albimanus* de preparación fresca.
- Sintetizar nuevo ADNc para continuar con los experimentos. Almacenar alícuotas del ADNc en agua DEPC a -80°C en todo momento para evitar su degradación y descongelamiento consecutivo.

- Realizar pruebas de clonación en una cepa de *E. coli* que posea mutadas la ARNasa III, recombinasa A y la endonucleasa A de manera que produzca ARNdh en grandes cantidades y que no ocurran reordenamientos en el plásmido. Además, realizar pruebas de producción de horquillas largas con una cepa de *E. coli* que no posea la ARNasa III mutada, ya que existe evidencia de que esta enzima puede cumplir la función de la proteína “dicer” y facilitar la producción de fragmentos de ARNdh de 21 pb (Lee *et al.*, 2013).

- Evaluar si la levadura presente en el ABC atrae a las larvas de *An. Albimanus*. De no ser así ésta podría eliminarse de la mezcla, puesto que ya está presente en el alimento a base de cereal de bebé.

- Probar incluir un mayor número de larvas por placa para realizar los nuevos experimentos de manera que se pueda optimizar el método para la producción a gran escala de machos de *An. albimanus* estériles.

- En los próximos experimentos, cuando las larvas lleguen a pupa, sexarlas y trasladar a la jaula únicamente los machos (descartar a las hembras). Introducir en la jaula el mismo número de hembras silvestres que de machos. Esto para mantener la misma proporción de machos y hembras que facilite el análisis de resultados y para evaluar únicamente el efecto que el silenciamiento causa en los machos.

- Diseñar nuevos “primers” ZPGqP que amplifiquen otra región de aproximadamente 100 pb del gen ZPG. Probar si estos podrían ser utilizados para monitorear la expresión de dicho gen a través de su cuantificación y detección mediante electroforesis en gel de agarosa y PCR tiempo real.

- Repetir el análisis de PCR tiempo real con los mejores “primers” seleccionados; utilizando ADNc según cada estadio de desarrollo de *An. albimanus* y tomando en cuenta el tejido en donde es más expresado el gen analizado. Recordar repasar la técnica de pipeteo antes de hacer PCR tiempo real y realizar diluciones del ADNc que difieran en orden de magnitud.

## X. REFERENCIAS

- Abgenex. s. f.. *Recombinant Protein Production/Expression/Purification Service in India*.  
<http://www.abgenex.com/custom-services/recombinant-protein-production> [19 mayo 2016]
- Achinko, D., *et al.* 2016. «Swarming and mating activity of *Anopheles gambiae* mosquitoes in semi-field enclosures». *Medical and Veterinary Entomology*. 30 (1): 14–20.
- Afrane, Ya; A. Githeko y G. Yan. 2012. «The ecology of Anopheles mosquitoes under climate change: case studies from the effects of environmental changes in East Africa Highlands». *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1249 (1): 204–210.
- Agrawal, Neema, *et al.* 2003. «RNA Interference: Biology , Mechanism , and Applications». *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67 (4): 657–685.
- American Society for Microbiology. *Apicomplexans*.  
<http://www.asm.org/index.php/component/finder/search?q=apicomplexa>
- Asahina, S. 1964. «Food Material and Feeding Procedures for Mosquito Larvae». *Bulletin of the World Health Organization*. 31 (4): 465–466.
- Barclay, Hugh J. 1992. «Modelling the effects of population aggregation on the efficiency of insect pest control». *Researches on Population Ecology*. 34 (1): 131–141.
- Baton, Luke A. y L.Ranford-cartwright. 2012. «Ookinete destruction within the mosquito midgut lumen explains *Anopheles albimanus* refractoriness to *Plasmodium falciparum* ( 3D7A ) oocyst infection». *International Journal for Parasitology*. 42 (3): 249–258.
- Benelli, Giovanni y H. Mehlhorn. 2016. «Declining malaria, rising of dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control». *Parasitology Research*. 115 (5): 1747-1754.
- Berger, S. 2016. *Infectious Diseases of Guatemala: 2016 Edition*. California: Gideon Informatics.
- Bewick, Viv; L. Cheek y J. Ball. 2004. «Statistics review 12: survival analysis». *Critical Care*. 8 (5): 389–94.
- BioRad Laboratories. s.f. *Electroporation System Instruction Manual Catalog Numbers*. California. Laboratorios Bio-Rad. 29 págs.

- BioRad, y Laboratories. 2012. *A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection*. United States Patent. 20 págs.
- Birge, Edward A. 2013. *Bacterial and Bacteriophage genetics*. Nueva York: Springer Science and Business Media. 559 págs.
- Boissiere, Anne, *et al.* 2012. «Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum* Infection». *Public Library of Science*. 8 (5): 1–12.
- Bornhorst, J. 2010. «Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags». *Methods Enzymol*, 326, 245-254.
- Bousema, Teun y C. Drakeley. 2011. «Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination». *Clinical Microbiology Reviews*. 24 (2): 377–410
- Boyle, W. K., Wilder, H. K., Lawrence, A. M., y Lopez, J. E. 2014. «Transmission dynamics of *Borrelia turicatae* from the arthropod vector». *PLoS neglected tropical diseases*, 8(4).
- Bozzoni, Irene; M. Denti y A. Rosa. 2011. *SiRNA Expression System*. United States Patent. 22 págs.
- Brownie, Jannine, *et al.* 1997. «The elimination of primer-dimer accumulation in PCR». *Oxford University Press*. 25 (16): 3235–3241.
- Brummelkamp, Thijn R.; R. Bernards y R. Agami. 2002. «A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells». *Science*. 296 (5567): 550–553.
- Cadavid, D., Pennington, P. M., Kerentseva, T. A., y Barbour, A. G. 1997. «Immunologic and Genetic Analyses of VmpA of a Neurotropic Strain of *Borrelia turicatae* ». *Infection and Immunity*, 65(8), 3352-3360.
- Calkins, C. y A. Parker. 2005. «Sterile Insect Quality». En *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*, de Springer Netherlands. Nueva York: Springer Science and Business Media. págs. 270-289.
- Carmell, Michelle, *et al.* 2002. «The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis». *Genes and Development*. 16 (516): 2733–2742.
- Catteruccia, Flaminia; A. Crisanti y E. Wimmer. 2009. «Transgenic technologies to induce sterility». *Malaria Journal*. 8 Suppl 2: S7.

- Centers for Disease Control and Prevention. 2014 *Malaria: Biology*. <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/> [5 octubre 2016]
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2009. *Ticks*. [http://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/english/DPDx5/HTML/Frames/S-Z/Ticks/body\\_Ticks\\_argasid\\_cycle.htm](http://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/english/DPDx5/HTML/Frames/S-Z/Ticks/body_Ticks_argasid_cycle.htm) [12 marzo 2016]
- Centro Nacional de Epidemiología. 2007. *Normas y procedimientos del sistema nacional de vigilancia epidemiológica de Guatemala*. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Guatemala. 42 págs.
- Chapman, Harold C. 1974. «Biological Control of mosquito larvae». *Annual Review of Entomology*. (172): 33–59.
- Charon, N. W., y Goldstein, S. F. 2002. «Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria : the spirochetes». *Annual Reviews of Genetics*, 40 (36), 47-73.
- Chomczynski, Piotr y N. Sacchi. 1987. «Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate». *Analytical Biochemistry*. 162 (1): 156–159.
- CLC Bio Qiagen. *CLC Sequence Viewer 7*. Software de computadora. Vers 7.6.
- Cohen, Daniel. 2002. *Cloning*. Brookfield: Twenty-First Century Books. 144 págs.
- Cold Spring Harbor Protocols. *Phosphate-buffered saline (PBS)*. <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8247> [5 octubre 2016]
- Coon, Kerri, *et al.* 2014. «Mosquitoes rely on their gut microbiota for development». *Molecular Ecology*. 23 (11): 2727–2739.
- Cossio, M., Giesen, L., Araya, G., Pérez-Cotapos, M., Manca, M., Héritier, F. 2012. *The Pathogenic Spirochetes: Strategies for Evasion of Host Immunity and Persistence: Borrelia turicatae*. New York: Springer. 24 págs.
- Correa, María Fernanda; H. Adjounian y 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): 22–26.
- Cruz, N. S., y Mayoral, P. V. (2012). «Borreliosis, fiebre recurrente causada por espiroquetas. Informe de un caso. Boletín médico del Hospital Infantil de México». 69(2), 121-125.
- Darmon, Elise y D. Leach. 2014. «Bacterial genome instability». *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 78 (1): 1–39.

- De Felice, Clelia y A. Restivo. 2005. *Developments in Language Theory*. Palermo: Springer Science and Business Media. 408 págs.
- Despommier, Dickson, *et al.* 2005. *Parasitic Diseases*. 5ª ed. Nueva York: Apple Trees Productions. 363 págs.
- Donaldson, T. G., Adalberto, A. P., León, D., Li, A. I., Castro-arellano, I., Teel, D., y Lopez, J. E. 2016. «Assessment of the Geographic Distribution of *Ornithodoros turicata* ( Argasidae Climate Variation and Host Diversity». *PLoS neglected tropical diseases*, 10 (2) 1-19.
- Dowell, R.; J. Worley y P. Gomes. 2005. «Sterile Insect Supply, Emergence and Release». En *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*, de Springer Netherlands. Nueva York: Springer Science and Business Media. págs 298-319.
- Dower, William; J. Miller y C. Ragsdale. 1988. «High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation». *Nucleic Acids Research*. 16 (13): 6127–6146.
- Dragan, A., *et al.* 2012. «SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA». *Journal of Fluorescence*. 22 (4): 1189–1199.
- Eirín-López, José; R. Kulathinal y J. Marshall. 2011. «The evolution of sex-related traits and genes». *International Journal of Evolutionary Biology*. 2011:1-2.
- Elbashir, Sayda; W. Lendeckel y T. Tuschl. 2001. «RNA interference is mediated 1- and 22-nucleotide RNAs». *Genes and Development*. 15: 188–200.
- Eglin Air Force Base. 2016. Medical Group first to find bacteria unseen in humans. <http://www.eglin.af.mil/news/story.asp?id=123466617> [3 marzo 2016]
- Embers, Monica. 2012. *The pathogenic Spirochetes: strategies for evasion of host immunity and persistence*. New York: Springer. 268 págs.
- Enkerlin, Walter, *et al.* 2015. «Area Freedom in Mexico from Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae): A Review of Over 30 Years of a Successful Containment Program Using an Integrated Area-Wide SIT Approach». *Florida Entomologist*. 98 (2): 665–681.
- Escalante, Ananias. A., *et al.* 2005. «A monkey’s tale: The origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite». *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102 (6): 1980–1985.
- Escudero-Nieto, R., y Guerrero-Espejo, A. 2005. «Enfermedades producidas por *Borrelia*». *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(4), 232-240.

- Farrell, Robert. 2005. *RNA Methodologies*. 3<sup>a</sup> ed. San Diego: Elsevier. 688 págs.
- Fire, Andrew, *et al.* 1998. «Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*». *Nature*. 391 (Febrero): 806–811.
- Fiñana, I. T. 2001. Proteínas Séricas. *Departamento de biología molecular, facultad de Medicina, universidad de Cordoba, Cordoba*, 1-7.
- Furst, B., *et al.* 2006. «The impact of immunosuppression on erythema migrans. A retrospective study of clinical presentation, response to treatment and production of *Borrelia* antibodies in 33 patients». *Clinical and Experimental Dermatology*, 31 (4): 509–514.
- García, Fabiola. 2007. «Comparación de una prueba rápida con el método convencional gota gruesa para el diagnóstico de malaria en un área endémica». Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala. 135 págs.
- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., y Cruz, O. 2013. «Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*». *VacciMonitor*, 22(2), 30-39.
- Garros, C., *et al.* 2008. «Gut content identification of larvae of the *Anopheles gambiae* complex in western Kenya using a barcoding approach». *Molecular Ecology Resources*. 8 (3): 512–518.
- GE-Healthcare. 2011. *Recombinant Protein Purification Handbook*. General Electric Healthcare.
- GE Healthcare. 2014. HisTrap™ FF. General Electric Healthcare.
- Gene quantification. *RNA interference (RNAi) basics and essential publication*. <http://www.gene-quantification.de/rnai.html> [5 octubre 2016]
- Giglio, N. F., *et al.* 2015. «Laboratory colonization of *anopheles* (*Nyssorhynchus*) *marajoara* (Diptera: Culicidae) by induced copulation». *Journal of Medical Entomology*. 52 (1): 3–8.
- Gopal, Pramod K.; P. Sullivan y J. Smart. 2001. «Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20». *International Dairy Journal*. 11 (11): 19–25.
- Gotifrid, Gilbert M., *et al.* 2014. «Reduced hatchability of *Anopheles gambiae* s.s eggs in presence of third instar larvae». *BMC Research Notes*. 7: 231.

- Graslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Harlberg, M., Bray, J., Gileadi, O., y Knapp, S. 2011. «Protein production and purification». *Nature Methods*, 5(2), 135-146.
- Guerrero-olazarán, M., Cab-barrera, E. L., Galán-wong, L. J., y Viader-salvadó, J. M. 2004. «Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura». *Memorias del VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 20 (2) 418-440.
- Hagen, Darren. 2007. *Identification and Characterization of Germline-Specific Promoters for Remobilization of Transgenes in the Mosquitoes, Aedes Aegypti and Anopheles Gambiae*. Texas AyM University. 157 págs.
- Hiwat, Helene y G. Bretas. 2011. «Ecology of Anopheles darlingi Root with respect to vector importance: a review». *Parasites y Vectors*. 4 (177): 1–13.
- Howell, Paul I. y B. Knols. 2009. «Male mating biology». *Malaria Journal*. 8 Suppl 2: S8.
- Integrated DNA Technologies. *OligoAnalyzer 3.1*. <https://www.idtdna.com/calc/analyzer> [5 octubre 2016]
- Invitrogen. s.f. *The Electroporator II*. 51 págs.
- Juárez, Jaime. 2012. «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.
- Jiménez, Adriano. 2003. *Manual de Neurogenética*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos. 295 págs.
- Kang, D., Gho, Y. S., Suh, M., y Kang, C. 2002. «Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis». *Korean Chemical Society*, 23(11), 1511-1512.
- Kassambara, A. y M. Kosinski. 2016. *Survminer*. Software de computadora, Programa de R.
- Khan, Inamullah,; A. Farid y A. Zeb. 2013. «Development of inexpensive and globally available larval diet for rearing Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae) mosquitoes». *Parasites y Vectors*. 6 (1): 90.
- Kiszewski, Anthony, *et al.* 2004. «A global index representing the stability of malaria transmission». *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 70 (5): 486–498.
- Kivuyo, Happiness S., *et al.* 2014. «Performance of five food regimes on *Anopheles gambiae* senso stricto larval rearing to adult emergence in insectary». *PLOS*. 9 (10).

- Klassen, W. y C. Curtis. 2006. «History of the Sterile Insect Technique». En *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*, de Springer Netherlands. Nueva York: Springer Science and Business Media. págs 4-28.
- Knipling, E. 1955. «Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males 1». *Journal of Economic Entomology*. 48 (4): 459–462.
- Koressaar, Triinu y M. Remm. 2007. «Enhancements and modifications of primer design program Primer3». *Bioinformatics*. 23 (10): 1289–1291.
- Krzywinska, Elzbieta y J. Krzywinski. 2009. «Analysis of expression in the *Anopheles gambiae* developing testes reveals rapidly evolving lineage-specific genes in mosquitoes». *BMC Genomics*. 10: 300–313.
- Lance, D. y D. McInnis. 2005. «Biological Basis of the Sterile Insect Technique». En *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*, de Springer Netherlands. Nueva York: Springer Science and Business Media. págs 70-85.
- Lawrence, A., y Besir, H. 2009. «Staining of Proteins in Gels with Coomassie G-250 without Organic Solvent and Acetic Acid». 30(14) *Journal of Visualized Experiments*, 2-4.
- Lee, Jae Man, *et al.* 2013. «Coexpression of *Escherichia coli* RNase III in silkworm cells improves the efficiency of RNA interference induced by long hairpin dsRNAs». *Insect Science*. 20 (1): 69-77.
- Li, Sha, *et al.* 2007. «DNA transformation via local heat shock». *Applied Physics Letters*. 91: 90–92.
- Lin, H. 2002. «The stem-cell niche theory: lessons from flies». *Nature Reviews – Genetics*. 3 (12): 931-940.
- Liu, Weimin, *et al.* 2010. «Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas». *Nature*. 467 (7314): 420-425.
- Livak, Kenneth, *et al.* 1995. «Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization». *PCR Methods and Applications*. 4 (6): 357–62.
- Lodish, Harvey, *et al.* 2005. *Biología Celular y Molecular*. 5ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 973 págs.

- Lol, Juan Carlos. 2016. «Resistencia a Insecticidas: No aprendemos del pasado». Datos no publicados. Comunicación directa clol@ces.uvg.edu.gt
- Lopez, J. E., Schrumph, M. E., Nagarajan, V., Raffel, S. J., McCoy, B. N., y Schwan, T. G. 2010. «A novel surface antigen of relapsing fever spirochetes can discriminate between relapsing fever and Lyme borreliosis». *Clin. Vaccine Immunol.*, 17(4), 564-571.
- Magdeldin, Sameh. 2012. *Gel electrophoresis – principles and basics*. Croatia: INTECH Open Science. 376 págs.
- Magnusson, Kalle, *et al.* 2011. «Transcription Regulation of Sex-Biased Genes during Ontogeny in the Malaria Vector *Anopheles gambiae*». *PLOS ONE*. 6 (6): e21572.
- Maldonado-Alconada, A. M., y Jorrin-Novio, J. V. 2001. *Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de Arabidopsis thaliana*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universitario de Rabanales, 16 págs.
- Manorenjitha, Sivanathan y J. Zairi. 2012. «Nutrition and overcrowding effects on larval development and fecundity of females *Aedes albopictus* (Skise)». *International Journal of life Science and Medical Research*. 2 (4): 63-67.
- Marcisin, R. A., Campeau, S. A., Lopez, J. E., y Barbour, A. G. 2012. «Alp, an Arthropod-Associated Outer Membrane Protein of Borrelia species that cause relapsing fever». *American Society for Microbiology*, 80(5), 1881-1890.
- Marti, N., Postic, D., Ave, P., Huerre, M., y Baranton, G. 2000. «Antigenic variation of Borrelia turicatae Vsp surface lipoproteins occurs in vitro and generates novel serotypes». *Research in Microbiology, Elsevier*, 151(151), 5-12.
- May, J., y Goodsell, D. S. 2002. Protein–Protein Interactions: Protein interactions contribute to protein function. *TRENDS in genetics*. 18(8), 432.
- Melo, Virginia y O. Cuamatzi. 2007. *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Barcelona: Reverté. 406 págs.
- Merck Millipore. 70181 | NovaBlue Singles™ Competent Cells - Novagen. [http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/NovaBlue-Singles?-Competent-Cells---Novagen,EMD\\_BIO-70181?RedirectedFrom=http://www.emdmillipore.com/products/EMD\\_BIO-70181ybd=1](http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/NovaBlue-Singles?-Competent-Cells---Novagen,EMD_BIO-70181?RedirectedFrom=http://www.emdmillipore.com/products/EMD_BIO-70181ybd=1) [6 octubre 2016]
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 2015. *Casos reportados de Malaria en Guatemala 2015*. Ciudad de Guatemala. Datos no reportados.

- Munga, S., *et al.* 2006. «Effects of larval competitors and predators on oviposition site selection of *Anopheles gambiae sensu stricto*». *Journal of Medical Entomology*. 43 (2): 221-224.
- Nagel, P. y R. Peveling. 2005. «Environment and the Sterile Insect Technique». En *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*, de Springer Netherlands. Nueva York: Springer Science and Business Media. págs 499-524.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *VectorBase*. <https://www.vectorbase.org> [6 octubre 2016]
- National Science Foundation. 2007. ARN feeding strains. <https://www.nsf.gov/>
- Nature. 2014. Plasmid / plasmids. <http://www.nature.com/scitable/definition/plasmid-plasmids-28> [20 julio 2016]
- Nestlé. *Cereal Nestum® 5 Cereales*. <https://www.comienzosano.cl/cereal-nestumr-5-cereales#> [6 octubre 2016]
- New England BioLabs Inc. 2016a. *EcoRI*. <https://www.neb.com/products/r0101-ecori> [5 octubre 2016]
- \_\_\_\_\_. 2016b. *Troubleshooting Guide for Cloning*. <https://www.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/troubleshooting-guide-for-cloning> [5 octubre 2016]
- Nielsen, K. M. (2003). «Transgenic organisms--time for conceptual diversification ». *Nature Biotechnology*. 21 (3): 227–8.
- Novagen. 1999. *pET System Manual*. 8<sup>va</sup> edición. United States. Novagen. 183 págs.
- Nybo, K. 2012. «Native PAGE». *BioTechniques*, 52(1), 20-21
- O'Donoghue, Peter. 2010. *Protozoan Parasites*.
- Okell, Lucy, *et al.* 2012. «Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control». *Nature Communications*. 3: 1237.
- Organización Mundial de la Salud. 2009. *Guía para la reorientación de los programas de control de la malaria con miras a la eliminación*. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud.

- Organización Mundial de la Salud. 2010. *Guidelines for the treatment of malaria*. Ginebra. 317 págs.
- Organización Mundial de la Salud. 2014. *World Malaria Report*. Ginebra. Organización Mundial de la Salud. 242 págs.
- Organización Mundial de la Salud. 2015. *World Malaria Report 2015*. Ginebra. 280 págs.
- Organización Mundial de la Salud. *Enfermedades tropicales*. <https://snt146.mail.live.com/?page=Compose> [5 octubre 2016]
- Organización Mundial de la Salud. 2012. ¿Por qué se les dice «desatendidas» a algunas enfermedades tropicales? <http://www.who.int/features/qa/58/es/> [2 febrero 2016]
- Organización Mundial de la Salud. 2016. *Enfermedades tropicales*. <http://www.who.int/features/qa/58/es/> [4 febrero 2016]
- Organización Panamericana de la Salud. B) *Análisis de Situación: Malaria*. [http://www.paho.org/gut/index.php?option=com\\_contentyview=articleid=523](http://www.paho.org/gut/index.php?option=com_contentyview=articleid=523) [2 agosto 2015]
- Padmanabhan, Sriram; S. Banerjee y N. Mandi. 2011. «Screening of Bacterial Recombinants : Strategies and Preventing False Positives». En *Molecular Cloning- Selected Applications in Medicine and Biology*. Croatia: INTECH Open Science. págs. 3-20.
- Parola, P., y Raoult, D. 2001. «Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans : An Emerging Infectious Threat». *Clinical Infectious Diseases*. 32 (6) 897-928.
- Pattinson, T. y S. Pattinson. 2015. *Biochemistry Laboratory Manual For Undergraduates: An Inquiry-Based Approach*. Berlin: Gruyter Open. 186 págs.
- Pennington, P., Cadavid, D., Bunikis, J., Norris, S., y Barbour, A. 1999. «Extensive interplasmidic duplications change the virulence phenotype of the relapsing fever agent *Borrelia turicatae*». *Molecular Microbiology*, 34(5), 1120-32.
- Pennington, P. M., Allred, C. D., West, C. S., Alvarez, R., Barbour, A. G., y Mmun, I. N. I. 1997. «Arthritis Severity and Spirochete Burden Are Determined by Serotype in the *Borrelia turicatae* -Mouse Model of Lyme Disease». *Infection and Immunity*, 65(1), 285-292.
- Peters, T. M. y P. Barbosa. 1977. «Influence of Population Density on Size, Fecundity, and Developmental Rate of Insects in Culture». *Annual Review of Entomology*. 22: 431-450.

- PNUD. *Combatir el VIH/SIDA, el paludismo y otras enfermedades*. <http://www.gt.undp.org/content/guatemala/es/home/mdgoverview/overview/mdg6.html> [20 julio 2015]
- Porcella, S. F., Raffel, S. J., Schrupf, M. E., Montgomery, B., Smith, T., y Schwan, T. G. 2006. *Borrelia turicatae* 91E135 (spirochetes). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP000049.1> [2 febrero 2016]
- Prajapati, S. y Om. Singh. 2013. «Insights into the invasion biology of *Plasmodium vivax*». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3: 8.
- Prats, Guillen. 2005. *Microbiología Clínica*. Buenos Aires: Médica Panamericana. 366 págs.
- Promega. 2012. «Cloning». En *Protocols y Applications Guide*. pág. 23.
- Promega. 2013. *PCR Master Mix Product Information 9PIM750*. 2 págs.
- Promega. 2015. *pGEM(R)-T and pGEM(R)-T Easy Vector Systems Technical Manual TM042*. 29 págs.
- Promega. 2016a. *JM109 and HB101 Competent Cells*. [https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/cloning-tools-and-competent-cells/bacterial-strains-and-competent-cells/pro-5\\_alpha\\_-jm109-and-hb101-competent-cells/](https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/cloning-tools-and-competent-cells/bacterial-strains-and-competent-cells/pro-5_alpha_-jm109-and-hb101-competent-cells/) [6 octubre 2016]
- \_\_\_\_\_. 2016b. *PCR Amplification*. <https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/pcr-amplification/> [6 octubre 2016]
- Proteopedia. *Recombinase A*. [http://proteopedia.org/wiki/index.php/Recombinase\\_A#Binding\\_Sites\\_on\\_RecA](http://proteopedia.org/wiki/index.php/Recombinase_A#Binding_Sites_on_RecA) [6 octubre 2016]
- Ramsey, J., et al. 1988. «Laboratory oviposition, fecundity and egg hatching ability of colonized *Anopheles albimanus* from southwestern Mexico». *Journal of the American Mosquito Control Association*. 4 (4): 509–515.
- Raven, P., y Johnson, G. 2006. Part IX Viruses and Simple Organisms. *Biology*. Boston: McGraw-Hill. 692 págs.
- R Development Core Team. *The R Project for Statistical Computing*. Software de computadora. Vers. 3.1.0.
- Rebaudet, S., y Parola, P. 2006. «Epidemiology of relapsing fever borreliosis in Europe». *FEMS Immunology y Medical Microbiology*. 48(1), 11-15.

- Rozeboom, L. 1969. «Distribution and Ecology of the Elms Mosquitoes of the Caribbean Anoph-». *The American Association for the Advancement of Science*. 15 (15): 98–107.
- Roca, Pilar; J. Oliver y A. Rodríguez. 2004. *Bioquímica: técnicas y métodos*. Madrid: Editorial Hélixe. 348 págs.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Rosano, G. L., y Ceccarelli, E. A. 2014. «Recombinant protein expression in Escherichia coli : advances and challenges». *Frontiers in Microbiology*, 5(4), 1-17.
- Ruggiu, Matteo, *et al.* 1997. «The mouse Dazl gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis». *Nature*. 389 (6646): 73–77.
- Saiki, Randall K., *et al.* 1985. «Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia». *Science*. 230 (4732): 1350–1354.
- Schwan, T. G., Raffel, S. J., Schrupf, M. E., Policastro, P. F., Rawlings, J. A., Lane, R. S. 2005. «Phylogenetic Analysis of the Spirochetes *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* and the Potential for Tick-Borne Relapsing Fever in Florida» *Journal of Clinical Microbiology*. 43(8), 3851-3859.
- Salazar, O., y Asenjo, J. 2007. «Enzymatic lysis of microbial cells». *Biotechnology Letters*, 29 (7), 985–994.
- Serrano, Roque. 2003. *Introducción al análisis de datos experimentales: tratamiento de datos en bioensayos*. 2ª ed. Castelló de la Plana: Publicacions de la Universitat Jaume I. 189.
- Shah, Chirag, *et al.* 2010. «Widespread Presence of Human BOULE Homologs among Animals and Conservation of Their Ancient Reproductive Function». *PLOS*. 6 (7): e1001022.
- Shiga, Masakazu. 1986. «Analysis of Spatial Distribution in Fruit Fly Eradication». En *Pest Control: Operations and Systems Analysis in Fruit Fly Management*, 11ª ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg. págs 387–398.
- Shiloach, J., Kaufman, J., Guillard, a. S., y Fass, R. 1996. «Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by Escherichia coli BL21 ( $\lambda$ DE3) and Escherichia coli JM109». *Biotechnology and Bioengineering*, 49(4), 421-428.

- Stigter, D. *et al.* 1991. «Protein stability: electrostatics and compact denatured states». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 (10): 4176–4180.
- Sigma-Aldrich. *PCR Technology Guide*. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/pcr-technologies-table-of-contents.html> [5 octubre 2016]
- Source BioScience. *Clone information and RNAi Feeding Protocol for HT115 (DE3)*. <http://www.lifesciences.sourcebioscience.com/clone-products/non-mammalian/c-elegans/c-elegans-rnai-library/ahringer-lab-clone-information-and-rnai-feeding-protocol/> [5 octubre 2016]
- Studier, F. 1990. «Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes». *Methods Enzymology*. 185 (14): 60–89.
- Sumba, Luenita, *et al.* 2008. «Regulation of oviposition in *Anopheles gambiae* s.s.: role of inter- and intra-specific signals». *Journal of Chemical Ecology*. 34 (11): 1430–1436.
- Taracena, Mabel L., *et al.* 2015. «Genetically modifying the insect gut microbiota to control Chagas disease vectors through systemic RNAi». *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 9 (2): e0003358.
- Thailayil, Janis, *et al.* 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): 13677–13681.
- ThermoFisher Scientific. 2016a. *Ethidium Bromide (EtBr) Dye for DNA and RNA Detection*. <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-stains/etbr.html> [5 octubre 2016]
- \_\_\_\_\_. 2016b. *PCR Cloning Support - Troubleshooting*. <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/technical-resources/technical-reference-library/cloning-technical-support-center/pcr-cloning/pcr-cloning-troubleshooting.html> [5 octubre 2016]
- Thomas, Donald y J. Loera-Gallardo. 1998. «Dispersal and Longevity of Mass-Released , Sterilized Mexican Fruit Flies (Diptera: Tephritidae)». *Environmental Entomology*. 27 (4): 1045–1052.
- Timmons, Lisa y A. Fire. 1998. «Specific interference by ingested dsRNA». *Nature*. 395 (Octubre): 854.
- Untergasser, Andreas, *et al.* «Primer3--new capabilities and interfaces». *Nucleic Acids Research*. 40 (15): e115.

- Vanden, John. 1997. *PCR Protocols in Molecular Toxicology*. Boca Raton: CRC Press. 256 págs.
- van Pelt-Verkuil, Elizabeth; A. van Belkum y J. Hays. 2008. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Nueva York: Springer Science and Business Media. 323 págs.
- Villarreal-treviño, Cuauhtémoc, *et al.* 2015. «Establishment of a free-mating , long-standing and highly productive laboratory colony of *Anopheles darlingi* from the Peruvian Amazon». *Malaria Journal*. 6 (6): 1–12.
- Vivian, A., Murillo, J., y Jackson, R. 2001. «The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria : mobile arsenals». *Microbiology*, 30(147), 763-780.
- Vreysen, Marc. J. B., *et al.* 2000. «*Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) Eradicated on the Island of Unguja, Zanzibar, Using the Sterile Insect Technique». *Journal of Economic Entomology*. 93 (1): 123–135.
- Waltz, Emily. 2016. «GM mosquitoes fire first salvo against Zika virus». *Nature Biotechnology*. 34 (3): 221–222.
- Whitney, M. S., Schwan, T. G., Sultemeier, K. B., Mcdonald, P. S., y Brillhart, M. N. 2007. «Spirochetemia caused by *Borrelia turicatae* infection in 3 dogs in Texas». *Veterinary Clinical Pathology*. 36(2), 212-216.
- Wilder, H. K., Wozniak, E., Huddleston, E., Tata, S. R., Fitzkee, C., y Lopez, J. E. 2015. «Case Report : A Retrospective Serological Analysis Indicating Human Exposure to Tick- Borne Relapsing Fever Spirochetes in Texas». *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9 (4) 1-5.
- Whyard, Steve, *et al.* 2015. «Silencing the buzz: a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs». *Parasites y Vectors*. 8 (1): 96.
- Wilfinger, William W.; K. Mackey y P. Chomecyzynski. 1997. «Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity». *Biotechniques*. 22 (3): 474–476, 478–481.
- Worrall, M. (1998). *Extraction of Recombinant Protein from Bacteria*. (Methods in Molecular Biology, Ed.). Totowa, NJ S Doonan Humana Press Inc. 30 págs.
- Young, C. L., Britton, Z. T., y Robinson, A. S. 2012. «Recombinant protein expression and purification : A comprehensive review of affinity tags and microbial applications». *Biotechnology Journal*, 7 (5), 620-634.
- Zamore, P. D., *et al.* 2000. «RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals». *Cell*. 101 (1): 25–33.

## XI. ANEXOS

### A. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DETECCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

1. Geles adicionales. En el gel de la Figura 69 se puede observar que la muestra no migró adecuadamente. Incluye la escalera usada, los tamaños esperados, las condiciones de corrida (100V por 90 minutos) Esto se debió a que el tampón de corrida era antiguo y ya se habían realizado más de 10 electroforesis, además de diferente pH.

**Figura 69:** Gel de poliacrilamida desnaturalizante SDS-PAGE 12% con estándares de BSA



(Fuente propia)

En la Figura 70 se puede observar la migración aberrante de las muestras. Esto se debió a la mala polimerización del gel de poliacrilamida, generando este tipo de migración.

**Figura 70:** Gel de poliacrilamida desnaturalizante SDS-PAGE 12% muestras de estándares de BSA



(Fuente propia)

En la Figura 71 se observa el gel con ruptura esto se debía a que se adhería a las placas y no se podía manipular para teñir adecuadamente.

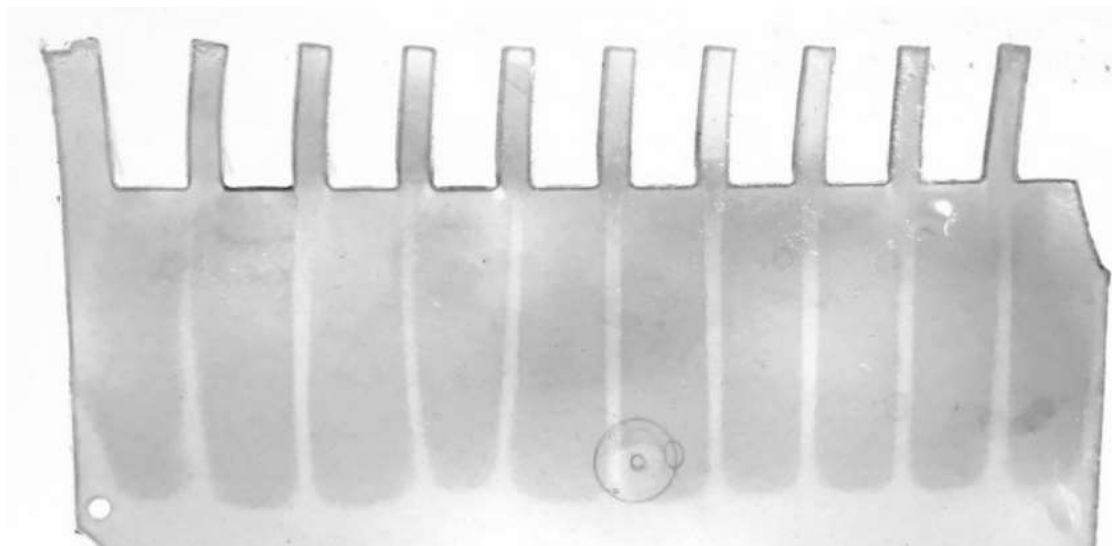
**Figura 71:** Ruptura del gel de poliacrilamida desnaturalizante SDS-PAGE 12 %



(Fuente propia)

En la Figura 72 se puede observar que los carriles se tiñeron incluso sin tener una muestra cargada.

**Figura 72:** Gel de poliacrilamida desnaturalizante SDS-PAGE 12 %, muestras de proteína recombinante



(Fuente propia)

2. Procedimiento operacional estandarizado para obtención de proteína recombinante.

**Universidad del Valle de  
Guatemala**

**Centro de estudios en  
biotecnología**



**Procedimiento Normado de  
Operación**

**Producción y purificación de  
proteína recombinante**

**PNO:**

**Versión:**

**Final**

**Fecha:**

**13/11/2016**

**Páginas**

**Totales:**

**Autores:**

**Augusto Franco  
y Mayra Valey**

**Preparado por:**

**Augusto Franco  
y Mayra Valey**

## **1 Propósito:**

Producir BipA recombinante mediante un Kit Champion™ pET102 Directional TOPO® Expression.

Establecer un protocolo de inducción con IPTG optimizando condiciones de operación que aumentaran la productividad y rendimiento de BipA recombinante en cultivos de *Escherichia coli* BL21 (DE3). Tener una guía rápida y clara para poder purificar proteínas recombinantes producidas en laboratorio. Así como tener una guía con la cual se pueda preparar el material necesario para la purificación.

## 2 Aplicación:

Este protocolo puede ser utilizado para la elaboración de proteínas recombinantes a partir de un kit de Invitrogen. Sin embargo también puede ser modificado para utilizar reactivos similares a los del Kit, si este no estuviera disponible.

La principal de aplicación de este Protocolo Operacional Estándar será tener una guía para poder expresar la proteína recombinante BipA de *Borrelia turicatae* que será utilizada como control para determinar presencia/ausencia de esta bacteria en suero de perros y roedores.

La principal de aplicación de este Protocolo Operacional Estándar es purificar la proteína recombinante BipA de *Borrelia turicatae* que será utilizada como control para determinar presencia/ausencia de esta bacteria en suero de perros y roedores.

## 3 Referencias:

- 3.1 Bornhorst, J. 2010. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol*, 326, 245–254.
- 3.2 García, J. *et. al.* 2013. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Consultado en: <http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/vaccimonitor/vm2013/a14.pdf> [Recuperado 16 de junio de 2015].
- 3.3 GE. 2011. *Recombinant Protein Purification Handbook*. General Electric Healthcare.
- 3.4 Guerrero, M. *et. al.* 2004. Biotecnología de Proteínas recombinantes para la Aplicación en Acuicultura. [http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion\\_acuicola/VII/archivos/23MartaGuerrero.pdf](http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/VII/archivos/23MartaGuerrero.pdf) [16 de junio de 2015].
- 3.5 Healthcare, G. 2012. Protein purification. Alemania: Amersham Biosciences AB.
- 3.6 Healthcare, G. 2014. HisTrap™ FF, 1. Alemania: GE Healthcare Amersham Biosciences.

- 3.7 Healthcare, G E Sciences, L. 2012. Recombinant Protein Purification. Alemania: GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- 3.8 Luz, A. N. A., Campano, Q., Guía, P., y Hakim, Z. G. 2010. Optimización del cultivo de *Escherichia coli* para la producción de cutinasas recombinantes.

#### 4 Terminología y abreviaciones:

- 4.1 LB= siglas de “*Luria Broth*” Es un tipo de medio nutricionalmente rico diseñado para que se produzca el crecimiento de medios puros de cepas recombinantes. Además, es utilizado para mantenimiento y propagación de *E. coli*. En procedimientos de microbiología molecular (Sambrook, 1989).
- 4.2 SOC: Iniciales en inglés para “Super Optimal Broth”.
- 4.3 IMAC: “*Immobilized metal-affinity chromatography*”
- 4.4 Tampón: es una solución capaz de mantener su pH en valores constantes, aun cuando se agreguen pequeñas cantidades de ácido o base, o se diluya la solución.
- 4.5 Elución: es un proceso que consiste en extraer, mediante un líquido apropiado, una sustancia del medio sólido que la ha absorbido.
- 4.6 Botón celular: comprimido sólido que se implanta en el tejido subcutáneo y es absorbido lentamente por el organismo.

#### 5 Principio:

La biotecnología de proteínas está relacionada con aislamiento, producción y mejoramiento de las propiedades biológicas de proteínas específicas que provienen de diversas fuentes naturales. La metodología del ADN recombinante es importante ya que se fundamenta en desarrollo de biotecnología de proteínas, esto se debe a la importancia de producir grandes cantidades de proteínas a través de

manipulación de genes. Estas proteínas se encuentran en concentraciones muy bajas en ambiente natural. Una proteína recombinante es aquella proteína la cual la síntesis se realiza en un organismo distinto al organismo original/nativo (Guerrero, 2004). Para la producción de proteína recombinante BipA, se utilizará *Escherichia coli*, cepa ya que es ampliamente utilizada en industria biotecnológica para producción de proteínas recombinantes. Las ventajas de este microorganismo como hospedero es la mayor velocidad específica de crecimiento que levadura y células de mamíferos; fácil manipulación genética, existencia de gran variedad de vectores de expresión estables (García, 2013).

En *E. coli* se requieren dos enzimas para poder metabolizar la lactosa. Este azúcar se degrada mediante rutas catabólicas que tienen como fin la obtención de energía. El sistema de utilización de lactosa en *E. coli* tiene dos clases de componentes. Genes estructurales que codifican las enzimas  $\beta$ -galactosidas (gen *LacZ*), permeasa (gen *LacY*) y transacetilasa que solo se utiliza en el metabolismo de ciertos  $\beta$ -galactosidos diferentes de la lactosa (gen *LacA*), necesarias para el transporte y degradación de lactosa. Y genes reguladores, el gen *Lac I*, el promotor *Lac P* y el operador *Lac O* y el sitio CRP). Menos el *Lac I*, el resto de genes componen una región del DNA que denominamos operón lac. Además, los genes estructurales están codificados en un solo mRNA policistrónico.

El proceso de purificación es importante para tener conocimiento que la proteína de interés está presente sin ningún contaminante (Bornhorst, 2010). Una purificación eficiente es un método que necesita de péptidos marcados para la afinidad, esta es unida con la proteína de interés y la purificación es acelerada por medio de cromatografía de afinidad. Las proteínas recombinantes marcadas con histidina tienen alta afinidad por  $\text{Ni}^{2+}$  y otros iones metálicos que pueden ser inmovilizados en cromatografía utilizando ligandos quelantes. Una proteína al tener una marca de histidina esta se une selectivamente a un ion de metal cargado. Estas marcas consisten en residuos de polihistidina que se utilizan en “*Immobilized metal-affinity chromatography*” (IMAC). Estas marcas son generalmente largas

para que el rendimiento de la interacción sea altamente afín con la matriz (GE, 2011).

Las marcas de polihistidina son comúnmente colocadas en el N-terminal o C-terminal de la proteína recombinante preparada. El lugar donde se ubica la marca permitirá que esta marca sea específica para la proteína. Marcas de polihistidina son pequeños y permiten incorporarse fácilmente en cualquier vector de expresión. En este caso el vector de expresión utilizado es una cepa de *E. coli*, este vector puede acumular proteína recombinante de dos formas, biológicamente como proteínas solubles o como cuerpos de inclusión. (Bornhorst, 2010).

Para realizar IMAC y purificar estas proteínas recombinantes producidas marcadas con polihistidina se utiliza un ion metálico. El ion  $Ni^{2+}$  es el metal preferido para la purificación de este tipo de proteínas recombinantes. La proteína al pasar por la matriz con el ion metálico ejerce su interacción con este y se queda en la fase estacionaria, dejando que se de la elución los demás componentes de la mezcla proteica. Al finalizar esta se lava la columna y se libera la proteína recombinante marcada. Esta última fracción obtenida es la proteína de interés purificada (GE, 2011).

## 6 Documentos asociados:

- 6.1 Healthcare, G. (2012). *Protein purification*. Alemania: Amersham Biosciences AB.
- 6.2 Healthcare, G E Sciences, L. (2012). *Recombinant Protein Purification*. Alemania: GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- 6.3 Sambrook, Fritsch and Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup>. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. U.S. Pharmacopeia. 2013.
- 6.4 Microbiological Best Laboratory Practices <1117> USP 36-NF 31. U.S. Pharmacopeia.

## **7 Seguridad:**

- 7.1** Al trabajar en este laboratorio se debe tener cuidado con los agentes infecciosos. Las normas de bioseguridad cumplen con la función de reducir el posible riesgo al manipular materiales biológicos, peligrosos o patógenos.
- 7.2** Todas las superficies deben de estar limpias y desinfectadas al momento de trabajar. Los residuos y muestras peligrosas deben ser depositados en contenedores especiales para su disposición.
- 7.3** Debe utilizarse ropa protectora que sea cómoda y de fácil ajuste. Esto incluye guantes, batas y lentes de protección. No deben usarse lentes de contacto y todo el personal debe llevar el pelo largo recogido.
- 7.4** Antes de empezar a trabajar, así como al quitarse los guantes y terminar el trabajo se debe lavar apropiadamente las manos con jabón antiséptico y secarse las manos con papel.
- 7.5** En caso de derrames reportar el lugar y que se derramó, colocarse guantes y cubrir con papel absorbente el área del derrame, verter un desinfectante adecuado y dejar actuar por el tiempo necesario. Retirar el material absorbente y colocarlo en un recipiente para residuos contaminados o bolsa de desechos.
- 7.6** Al utilizar la balanza colocar un papel para pesar sólido y tarar su peso para obtener solamente el valor del sólido que se está pesando. Cerrar la balanza para evitar que las corrientes de aire externas modifiquen el resultado. Esperar a que se estabilice el peso para anotarlo y remover con cuidado el papel para no perder parte de la muestra. También debe limpiarse el platillo para pesar, se debe asegurar que éste se encuentre libre de polvo y suciedad; para esto se debe utilizar una tela humedecida con agua o un cepillo de pelo suave para remover partículas.

**7.7** Campana de flujo laminar: Asegurarse que esta esté encendida antes de empezar a trabajar para evitar que se escapen posibles gases nocivos. Con el propósito de evitar la contaminación, es necesario realizar una limpieza de la campana con alcohol étílico al 70%. Es importante tomar en cuenta que los compuestos con cloro pueden provocar corrosión de las superficies de acero, por lo que no son del todo recomendables. Para la desinfección de la campana se recomienda utilizar una lámpara U.V, germicida. Media hora de radiación suele ser más que suficiente para lograr el objetivo; un tiempo prolongado de exposición será la causa de desgastes. Por lo menos dos veces al año debe revisarse la calidad de limpieza del aire. Esto puede realizarse por medio la utilización de placas con medio de cultivo, estas se colocan en áreas específicas donde se desea verificar la limpieza y se dejan allí por un período de 24 horas, al momento de retirarlas, si ningún crecimiento se presenta en ellas puede saberse con certeza que la calidad de limpieza del aire es buena.

**7.8** Autoclave: Llenarla con agua hasta el nivel indicado dentro del equipo. Ajustarla para los materiales que se van a introducir, cristalería y equipo o líquidos. Asegurarse de que esté bien cerrada y no tratar de apresurar el proceso ya que las altas temperaturas y presiones a las que este equipo trabaja pueden ser peligrosas.

## **8 Equipos, materiales y reactivos:**

### **8.1 Transformación de células bacterianas**

8.1.1 Hielera

8.1.2 Hielo

8.1.3 Cajas Petri

8.1.4 Baño María

8.1.5 Medio LB

8.1.6 Ampicilina (50mg/mL)

8.1.7 Esparcidor

8.1.8 Incubadora

8.1.9 Micropipeta 200 $\mu$ L

## **8.2 Inducción células bacterianas**

8.2.1 Incubadora con agitación

8.2.2 Ampicilina (50mg/mL)

8.2.3 IPTG (1mM)

8.2.4 Medio LB

8.2.5 Micropipeta 1000  $\mu$ L

8.2.6 Micropipeta 10  $\mu$ L

8.2.7 Gradilla

8.2.8 Tubos de 10 mL con rosca.

## **8.3 Lisis enzimática**

8.3.1 Tris-base 50mM

8.3.2 Glicerol al 10%

8.3.3 Triton X-100 al 0.1%.

8.3.4 Lisosima 100  $\mu$ g/mL

8.3.5 PSMF 1mM

8.3.6 ADNasa

8.3.7 Cloruro de magnesio 2mM

8.3.7 Tubos Falcon 50 mL

8.3.8 Tubos Eppendorf 1.5 mL

8.3.9 Centrifuga en frio

8.3.10 Baño ultrasónico

8.3.11 Incubadora con agitación

8.3.12 Micropipeta 1000  $\mu$ L

## **8.4 Purificación**

8.4.1 Colomuna para purificación *HisTrap<sup>TM</sup> FF, 1ml.*

8.4.2 Jeringa de 5ml

8.4.3 Micropipeta de 0.5-10 $\mu$ L

8.4.4 Puntas estériles de 0.5-10 $\mu$ L

8.4.5 Tubos eppendorf de 0.6ml autoclaveados

8.4.6 Agua ultra pura

8.4.7 Tampón de unión

8.4.8 Tampón de elución

8.4.9 PMSF 1mM

8.4.10 Imidazole

8.4.11 Fosfato de sodio

## **9 Procedimiento:**

### **9.1 Transformación de células BL21 (DE3) con pBipA**

9.1.1 Descongelar células en hielo por dos minutos.

9.1.2 Agregar 10 ng del ADN (pBipA) a 5 $\mu$ L de las células BL21 (DE3). Mezclar suavemente, nunca con pipeta.

9.1.3 Incubar en hielo por 30 minutos.

9.1.4 realizar un choque térmico por 30 segundos a 42°C en baño de agua.

9.1.5 Agregar 250 $\mu$ L de SOC a temperatura ambiente.

9.1.6 Incubar por 1 hora a 37°C y a 225 rpm.

9.1.7 Sembrar 25-100 $\mu$ L de células transformadas a placas con medio LB y ampicilina (50mg/mL).

9.1.8 Incubar por 24-48 horas a 37°C.

## 9.2 Inducción

9.2.1 Del procedimiento anterior de transformación colectar una colonia transformada y agregarla a medio LB con ampicilina (50mg/mL) por toda la noche.

9.2.2 Revisar el OD<sub>600</sub>, para poder proceder con el proceso de inducción este debe ser igual a 0.4. Si el OD se encuentra a 0.4 inducir con 5  $\mu$ L de IPTG 1mM por cada mililitro de medio incubado por la noche. Si el OD es mayor a 0.4 realizar un subinoculo en medio LB con antibiótico amp (50mg/mL), realizar mediciones constantes para asegurar densidad óptica igual a 0.4.

9.2.3 Incubar por 4 horas.

## 9.3 Lisis celular

9.3.1 Centrifugar 6,000 g por 5 minutos.

9.3.2 Descartar sobrenadante y almacenar pellet a -70°C.

9.3.3 Resuspender 1.5 mL de pellet en 0.75 mL de buffer de lisis (c.f.) (50 mM Tris pH 8.0, Glicerol 10%, 0.1% Triton X-100, 100  $\mu$ g/mL lisoenzima. 1mM PMSF (se preparó un stock a 10mM en etanol absoluto) (por sus siglas en inglés *Phenyl Methyl Sulfonyl fluoride*), y MgCl<sub>2</sub> 2mM.).

9.3.4 Incubar por 15 minutos a 30°C.

9.3.5 Colocar en un baño ultrasónico tres veces por 20 segundos o hasta que la muestra no se logre ver la muestra viscosa.

9.3.6 Agregar 3  $\mu\text{L}$  de ADNasa.

9.3.7 Centrifugar a 13,000 rpm por 20 minutos a 4°C.

9.3.8 Colectar 60 $\mu\text{L}$  de sobrenadante y pellet en tubos nuevos, a estos agregar 20 $\mu\text{L}$  de buffer de carga (Agua desionizada, 0.5M Tris-HCl, pH 6.8, glicerol, SDS 10%(p/v), azul de bromofenol 0.5% (v/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol).

9.3.9 Preparar muestras y colocar en agua a 98°C por 3 minutos y realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida.

#### **9.4 Preparación soluciones purificación**

9.4.1 Tampón de elución (15ml): pesar 0.5106g de imidazole, 0.0420g de fosfato de sodio y 0.4383g de cloruro de sodio, luego disolver en agua ultrapura y verificar que el pH sea de 7.4. Si no lo es ajustar con HCl o NaOH.

9.4.2 Tampón de unión (15ml): pesar 0.0306g de imidazole, 0.0420g de fosfato de sodio y 0.4383g de cloruro de sodio, luego disolver en agua ultrapura y verificar que el pH sea de 7.4. Si no lo es ajustar con HCl o NaOH.

#### **9.5 Preparación muestra para purificación**

9.5.1 Utilizar tubos cónicos Eppendorf, estériles, de 2 mL y pesarlos. Luego pese al botón de celular de la lisis y determine su peso mediante una resta con el peso de los tubos vacíos.

9.5.2 Resuspender el botón con 5 a 10 mL de tampón de unión frío (c.f.) (30 mM imidazol, 0.5 M NaCl y 20 mM fosfato de sodio) por cada gramo de botón celular y filtrar la muestra con un filtro de celulosa de 0.2 $\mu\text{m}$ .

## 9.6 Purificación

- 9.6.1 Llenar la columna con agua ultrapura y remover el el *stopper* y conectar la columna con la jeringa (utilizar adaptador) para evitar introducir aire al sistema.
- 9.6.2 Remover el extremo inferior (*snap-off*) de la columna para dejar caer el agua.
- 9.6.3 Lavar el interior de la columna 5 veces más con 1ml de agua ultrapura.
- 9.6.4 Equilibrar la columna, para ello se debe de lavar la columna 5 veces con 1ml de solución tampón de unión a un flujo de 1 ml/min.
- 9.6.5 Colocar la muestra preparada en la columna, dejar pasar la muestra.
- 9.6.6 Eluir la proteína con 3ml la solución tampón de elución para asegurarse de recuperar toda la proteína.
- 9.6.7 Por último lavar la columna con al menos 3 volúmenes de 1ml de agua ultrapura y guardar.
- 9.6.8 Recuperar la proteína eluida y agregar PMSF 1mM
- 9.6.9 Almacenar la proteína eluida en alícuotas de un solo uso (100µl) a -80°C para evitar congelar y descongelar varias veces.

## 9.7 Caracterización de proteína

- 9.7.1 Medición de concentración, realizar una curva de calibración desde 0.05-2 mg/ml de BSA disuelto en solución tampón de elución y medir la absorbancia a 280nm

- 9.7.2 Con las concentraciones y absorbancias generar la curva y determinar la ecuación de la gráfica que describa el modelo.
- 9.7.3 Luego medir la absorbancia a 280nm de una alícuota de la proteína purificada y con la ecuación de la curva de calibración realizada calcular la concentración.
- 9.7.4 Para caracterizar la proteína realizar un SDS-PAGE con gel de poliacrilamida 12% para verificar la estabilidad de la proteína y el peso molecular de la misma. Para correr el gel utilizar tampón de corrida, Tris-Glicina-SDS (c.f) (0.025M Tris, 0.192M glicina, 0.1% p/v SDS, pH: 8.9), por 90 minutos a 100 V en una cámara Bio-Rad Mini-PROTEAN System, (Cat. 1658004). Para la tinción del gel utilizar solución de azul de coomassie R250 tal como se describe en Lawrence y Besir, 2009.

## 10. Cálculos:

Buffer de lisis (lisis enzimática) (15mL)

50mM Tris pH 8.0

$$15mL * \left(\frac{1L}{1000mL}\right) * \left(\frac{50mmoles}{1L}\right) * \left(\frac{1mol}{1000mmoles}\right) * \left(\frac{121.14g}{1mol}\right) \\ = 0.09g \text{ o } 90 \text{ mg de Tris}$$

10% glicerol

$$C1V1 = C2V2$$

$$V2 = \frac{(10\%)(15mL)}{(99\%)} = 1.51 \text{ mL de glicerol}$$

0.1% triton X-100

$$C1V1 = C2V2$$

$$V2 = \frac{(0,1\%)(15mL)}{(100\%)} = 0.015 mL \text{ o } 1.5 \mu L$$

Lisoenzima 100 ug/ml

$$15mL * \left(\frac{100ug}{1mL}\right) * \left(\frac{1g}{100000ug}\right) = 0.0015 g \text{ o } 1.5mg$$

100 mM PMSF (diluir en etanol absoluto, stock)

$$1.5mL * \left(\frac{1L}{1000mL}\right) * \left(\frac{100mmoles}{1L}\right) * \left(\frac{1mol}{1000mmoles}\right) * \left(\frac{174.20g}{1mol}\right) \\ = 0.026g \text{ o } 25.13 mg \text{ PMSF en } 15 mL \text{ etanol absoluto}$$

$$C1V1 = C2V2$$

$$V2 = \frac{(1mM)(15mL)}{(100mM)} = 0.015mL \text{ o } 15\mu L \text{ solución stock PMSF}$$

DNAse 3U

2mM MgCl<sub>2</sub>

$$15mL * \left(\frac{1L}{1000mL}\right) * \left(\frac{2mmoles}{1L}\right) * \left(\frac{1mol}{1000mmoles}\right) * \left(\frac{203.30g}{1mol}\right) \\ * \left(\frac{1000mg}{1g}\right) = 6.01 mg \text{ de } MgCl_2$$

### **Preparación del antibiótico (Ampicilina 50mg/mL)**

Se prepararán 2 mL ya que preparar 10 mL es un volumen muy grande para la cantidad que se utilizara en la preparación de placas.

2 mL \* 50 mg/1mL \* 1g/1000mg = 0.1g de ampicilina en 2 mL de agua destilada

### **Preparación IPTG (1mM)**

$$15\text{mL} * \frac{1\text{mmol}}{1000\text{mL}} * \frac{1\text{mol}}{1000\text{mmoles}} * \frac{238.81\text{g IPTG}}{1\text{mol}}$$

$$= 0.35\text{g IPTG en } 15\text{ mL de agua destilada}$$

### Solución tampón de unión

- Imidazol 500Mm

$$15\text{ml} \frac{1\text{L}}{1000\text{ml}} * \frac{500 \times 10^{-3}}{1\text{L}} * \frac{68.08\text{g}}{1\text{mol}} = 0.5106\text{g de imidazol}$$

- Fosfato de sodio

$$15\text{ml} \frac{1\text{L}}{1000\text{ml}} * \frac{20 \times 10^{-3}}{1\text{L}} * \frac{141.96\text{g}}{1\text{mol}} = 0.0420\text{g de fosfato de sodio}$$

- Cloruro de sodio

$$15\text{ml} \frac{1\text{L}}{1000\text{ml}} * \frac{0.5\text{M}}{1\text{L}} * \frac{58.44\text{g}}{1\text{mol}} = 0.4383\text{g de cloruro de sodio}$$

### Solución tampón de elución

- Imidazol 500Mm

$$15\text{ml} \frac{1\text{L}}{1000\text{ml}} * \frac{30 \times 10^{-3}}{1\text{L}} * \frac{68.08\text{g}}{1\text{mol}} = 0.0306\text{g de imidazol}$$

- Fosfato de sodio

$$15\text{ml} \frac{1\text{L}}{1000\text{ml}} * \frac{20 \times 10^{-3}}{1\text{L}} * \frac{141.96\text{g}}{1\text{mol}} = 0.0420\text{g de fosfato de sodio}$$

- Cloruro de sodio

$$15\text{ml} \frac{1\text{L}}{1000\text{ml}} * \frac{0.5\text{M}}{1\text{L}} * \frac{58.44\text{g}}{1\text{mol}} = 0.4383\text{g de cloruro de sodio}$$

## 12. Reporte de datos y documentos utilizados:

12.1 Transformación de células transformadas: UFC/ $\mu\text{g}$

12.2 SDS-PAGE: presencia o ausencia de bandas de interés.

12.3 Para reportar los resultados de la purificación reportar la concentración obtenida de la proteína purificada y además calcular el rendimiento de la purificación, según el Cuadro 1.

Rendimiento de la purificación de proteínas recombinantes

Proteína	12.5 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	1 mg	10 mg	50 mg
Volumen del cultivo	5ml	20ml	400ml	4 L	20 L
Volumen del lisado	0.5ml	1ml	20ml	200ml	1000ml

Adaptado de GE, 2011

## 13. Reporte:

Se utilizó un gel vertical de poliacrilamida al 12% p/v (Solución de acrilamida / bis 30%, 37,5: 1 de mezcla (30% T, 2,67% de C) (Bio-Rad catálogo # 161-0158, 500 ml). Este se preparó con muestras que se trataron con Buffer de carga. Luego se activó la escalera de estándares de amplio rango (Bio-rad, Cat. No. 1610318) de 7,100-209,000 MM incubado 1 min a 40°Cy se cargó en los posos correspondientes. Se corrió el gel con buffer de corrida (c.f) 10X (0.025M Tris base, 0.192 glicina, 0.1% (p/v) SDS, pH 8.9) por 90 min a 100 voltios con amperaje

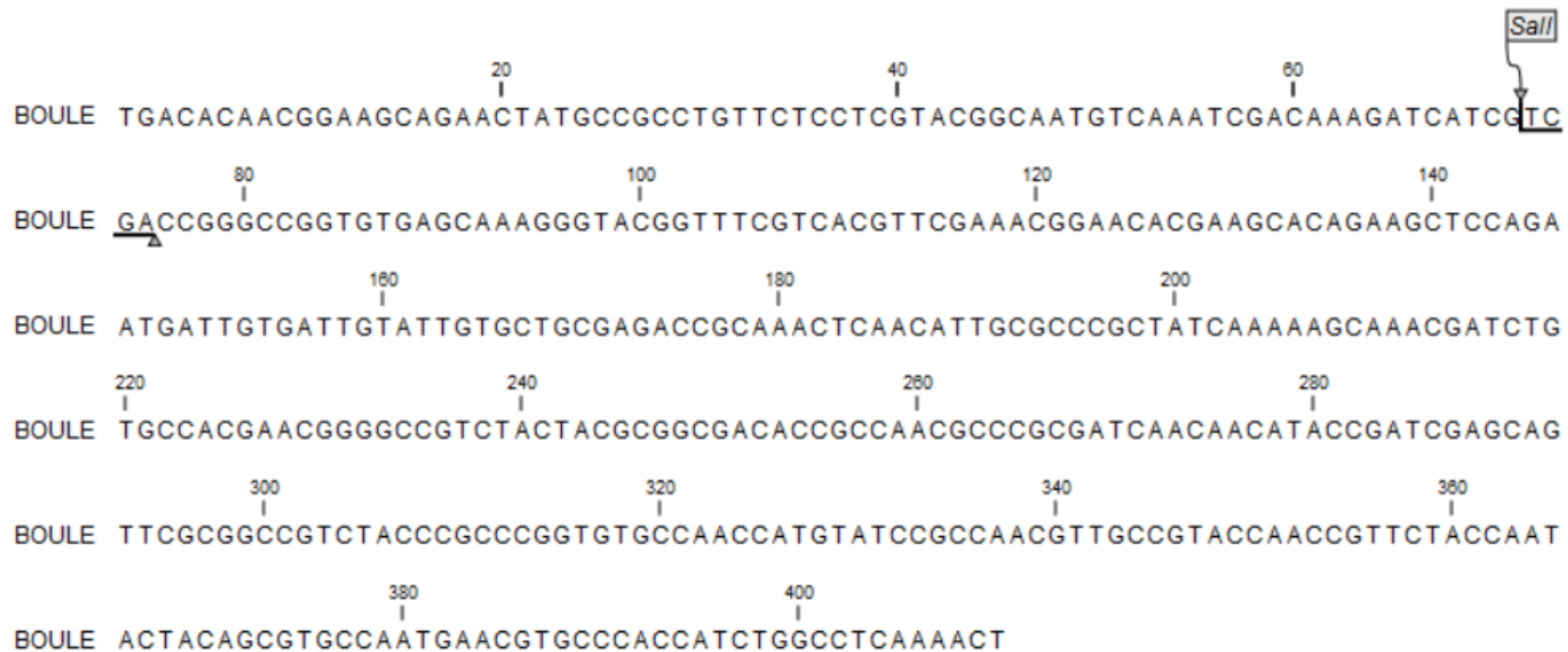
constante, para esto se utilizó una fuente de poder marca Thermo Scientific (Modelo: EC300XL).

La revelación del gel se realizó según (Lawrence y Besir, 2009). Esta consistía en la preparación de solución de tinción y está iniciaba preparando azul de coomassie G-250 7 % (70g en 1L) en agua ultrapura y con sistema de agitación por 2-4 horas. Finalmente se agregó 3 mL de HCl concentrado a la solución y agitó, esta terminó con un pH 2. El procedimiento de tinción de gel se basó en agregar 100 mL de agua ultra pura al gel y calentar en microondas por 30 segundos. Luego se colocó en un agitador por 5 minutos y se repieron los lavados 2 veces más. Luego del último lavado con agua se agregó solución de tinción, se calentó en microondas por 10 segundos y se colocó en agitador por 1 minuto. Para desteñir se agregó agua ultra pura y se esperó hasta que las bandas de proteína se pudieran observar.

## B. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA EL SILENCIAMIENTO DE LOS GENES *BOL* Y *ZPG* DE MACHOS DE *Anopheles albimanus* MEDIANTE EL USO DE ARN DE INTERFERENCIA

1. Análisis de sitios de restricción para la enzima EcoRI en secuencia de los genes *BOL* y *ZPG*. En la Figura 73 se presenta el análisis realizado con CLC Sequence Viewer 7 en donde se observa que la secuencia del inserto del gen *BOL* no posee sitios de restricción para la enzima EcoRI. Solamente posee un sitio de restricción para la enzima Sall.

**Figura 73:** Análisis de sitios de restricción dentro de la secuencia del inserto *BOL*



(CLC Bio Qiagen, 2015)

En la Figura 74 se presenta el análisis realizado con CLC Sequence Viewer 7 en donde se observa que la secuencia del inserto del gen *ZPG* no posee sitios de restricción para la enzima *EcoRI*. Solamente posee sitios de restricción para las enzimas *PstI* y *XbaI*.

**Figura 74:** Análisis de sitios de restricción dentro de la secuencia del inserto *ZPG*



(CLC Bio Qiagen, 2015)

2. Comparación de bacterias presentes en el agua de las bandejas y el agua de oviposición según fenotipo y tinción de Gram. Para obtener los resultados presentados en esta sección, se tomó 100  $\mu$ L de cada tipo de agua analizada y se sembró en placas de agar LB. Después de incubar las placas durante 24 horas, se observaron bajo estereoscopio las diferentes morfologías de colonias según cada tipo de agua. Se registró su fenotipo y se realizó una tinción de Gram para cada fenotipo diferente.

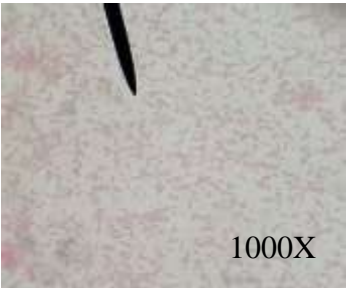
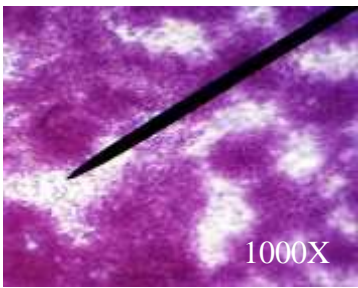
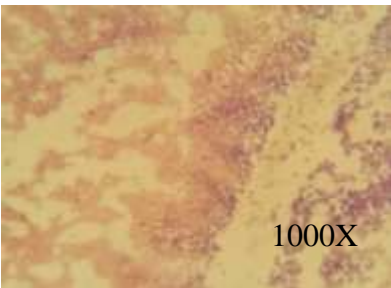
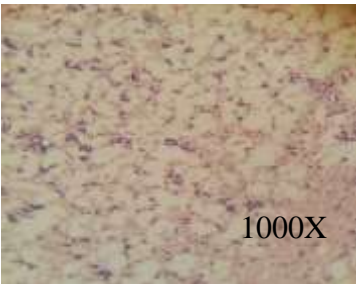
a. Agua de las bandejas del insectario

**Cuadro 28:** Fenotipo de bacterias presentes en el agua de bandejas del insectario

<b>Nombre asignado</b>	<b>Fenotipo observado</b>
Colonias pequeñas	Colonias blancas muy pequeñas de borde suave, elevadas, blancas.
Colonias medianas aisladas	Colonias de tamaño mediano, amarillas de borde suave y cóncavas.
Colonias grandes aisladas	Colonias grandes blancas elevadas y de borde suave.
Grande barrido	Barrido continuo, transparente opaco, planas.

Fuente: Elaboración propia

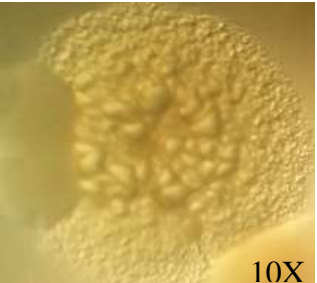



**Cuadro 29:** Tinción de Gram de bacterias presentes en el agua de bandejas del insectario

Nombre	Colonias pequeñas	Colonias medianas aisladas	Colonias grandes aisladas	Grande barrido
Morfología	Bacilo	Coco	Coco-bacilo	Bacilo
GRAM	Negativo	Positivo	Variable	Negativo
Foto				







Fuente: Elaboración propia

b. Agua de oviposición de huevos

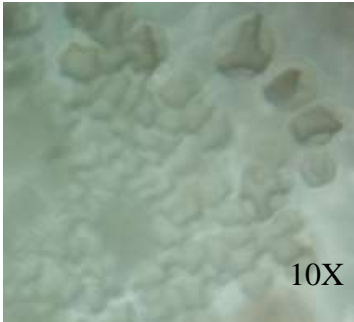



**Cuadro 30:** Fenotipo de bacterias presentes en el agua de oviposición de huevos de *An. albimanus*

Nombre	Fenotipo de la colonia				Foto vista aérea	Foto vista lateral
	Crecimiento	Margen	Elevación	Color		
<b>Grandes granuladas</b>	Complejo	Ondulado	Elevada acojinada con cráter en el medio	Amarillo #1		
<b>Grandes lisas</b>	Redondo	Suave	Elevada	Amarillo #1		

Continuación Cuadro 30.

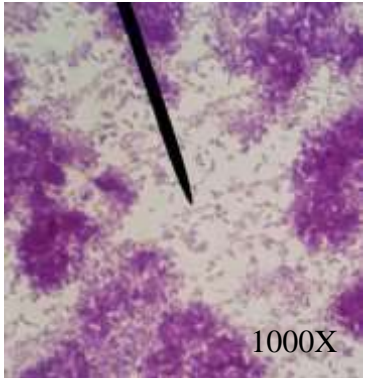
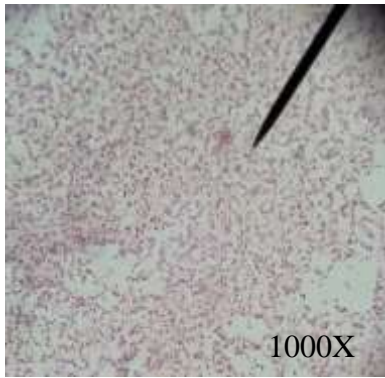
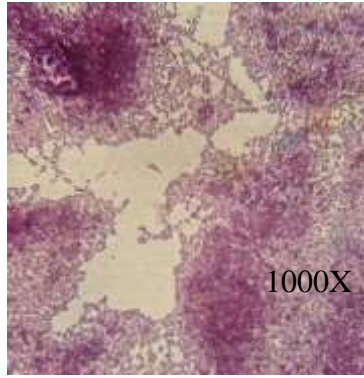
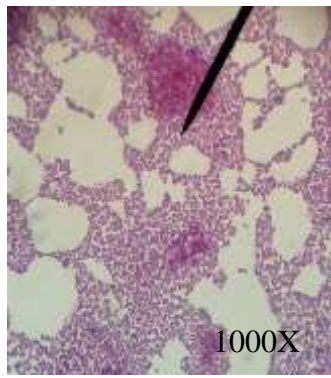
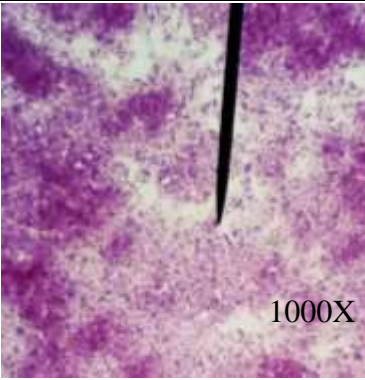
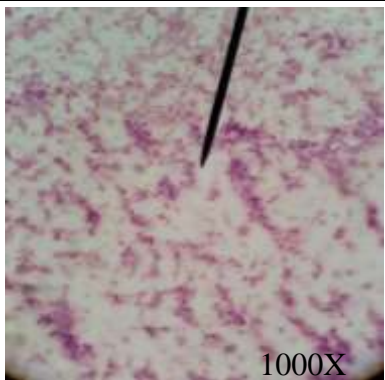
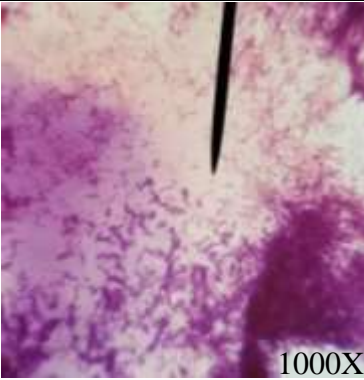
Nombre	Fenotipo de la colonia				Foto vista aérea	Foto vista lateral
	Crecimiento	Margen	Elevación	Color		
<b>Barrido liso</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Amarillo #1		
<b>Barrido filamentoso</b>	Irregular filamentoso	Lobulado	Plana	Amarillo #1		
<b>Medianas lisas</b>	Redondo	Suave	Medio elevada	Amarillo #1		

Continuación Cuadro 30.

Nombre	Fenotipo de la colonia				Foto vista aérea	Foto vista lateral
	Crecimiento	Margen	Elevación	Color		
<b>Pequeñas voluminosas</b>	Irregular rectangular	Irregular	Convexo acojinado	Amarillo #1	 10X	 10X
<b>Pequeñas planas</b>	Redondo	Suave	Media elevada	Amarillo #1	 10X	 10X

Fuente: Elaboración propia.

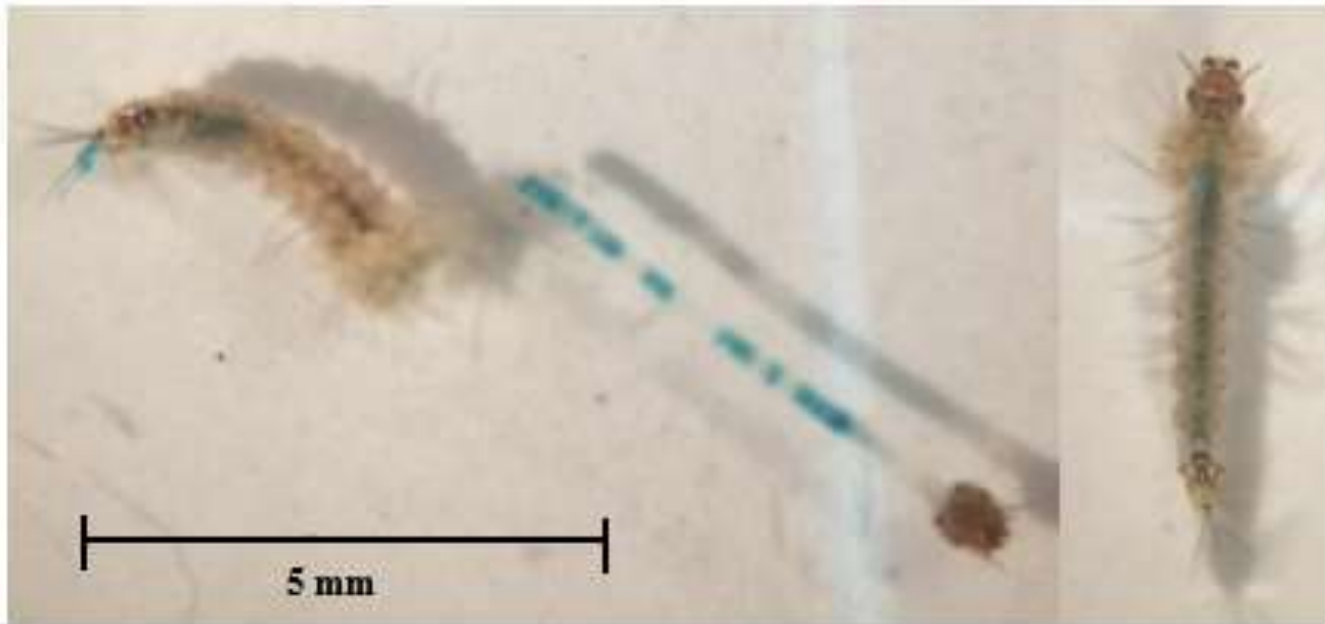
**Cuadro 31:** Tinción de Gram de bacterias presentes en el agua de oviposición de huevos de *An. albimanus*.

Nombre	Grandes granuladas	Grandes lisas	Barrido liso	Barrido filamentososo
Morfología	Bacilo	Coco-bacilo	Coco	Coco
GRAM	Positivo	Variable	Positivo	Positivo
Foto				
Nombre	Medianas lisas	Pequeñas voluminosas	Pequeñas planas	
Morfología	Bacilo	Bacilo	Bacilo (estrepto-bacilo)	
GRAM	Positivo	Positivo	Variable	
Foto				

Fuente: Elaboración propia.

3. Comprobación de alimentación con bacteria *E. coli* XL1-BLUE pUC 19 en el fondo de la placa. En la Figura 75 se observa que la larva de *An. albimanus* expuesta a la cepa *E. coli* XL1-BLUE pUC 19 en crecimiento continuo sobre un papel filtro colocado en el fondo de la caja Petri se ve azul por fuera. Además, luego de realizar la disección se pueden observar varios de los segmentos intestinales de color azul. Esto demuestra que la larva sí se alimentó de la bacteria ya que las colonias de esta son de color azul.

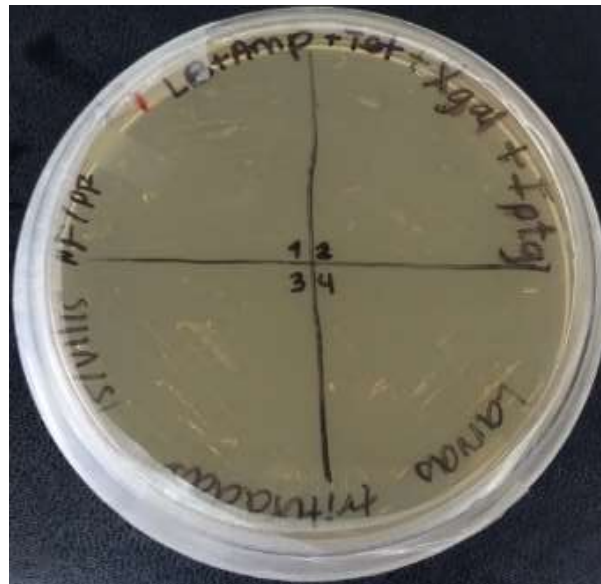
**Figura 75:** Comprobación de alimentación con cepa *E. coli* XL1-BLUE pUC 19 mediante la disección del intestino de *An. albimanus*



(Fuente: Foto propia)

4. Comprobación de ausencia de bacterias azules resistentes a ampicilina y tetraciclina en microbiota habitual de larvas de *An. albimanus*. La Figura 76 muestra una placa de agar LB + Amp [50 µg/mL] (c.f.) + Tet [12.5 µg/mL] (c.f.) + X-gal [35.2 µg/mL] (c.f.) + IPTG [0.1 mM] (c.f.) en la que se creció el triturado de larvas de *An. albimanus* de diferentes estadios (estadio indicado por el número en la esquina interna centra de cada cuadrante de la placa). La falta de crecimiento de colonias blancas resistentes a ambos antibióticos demuestra que en la microbiota habitual de las larvas no existe ninguna bacteria que pueda ser confundida con la bacteria transgénica productora de ARNdh que se pretende añadir al ABC.

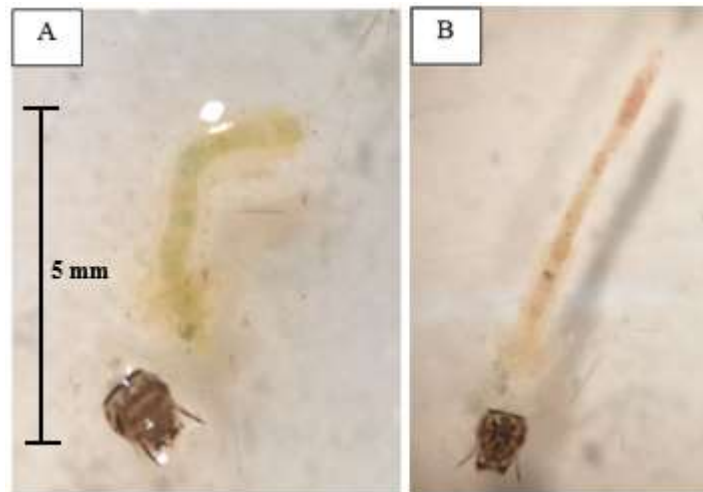
**Figura 76:** Crecimiento de la microbiota habitual de larvas de *An. albimanus* en sus diferentes estadios larvarios



(Fuente: Foto propia)

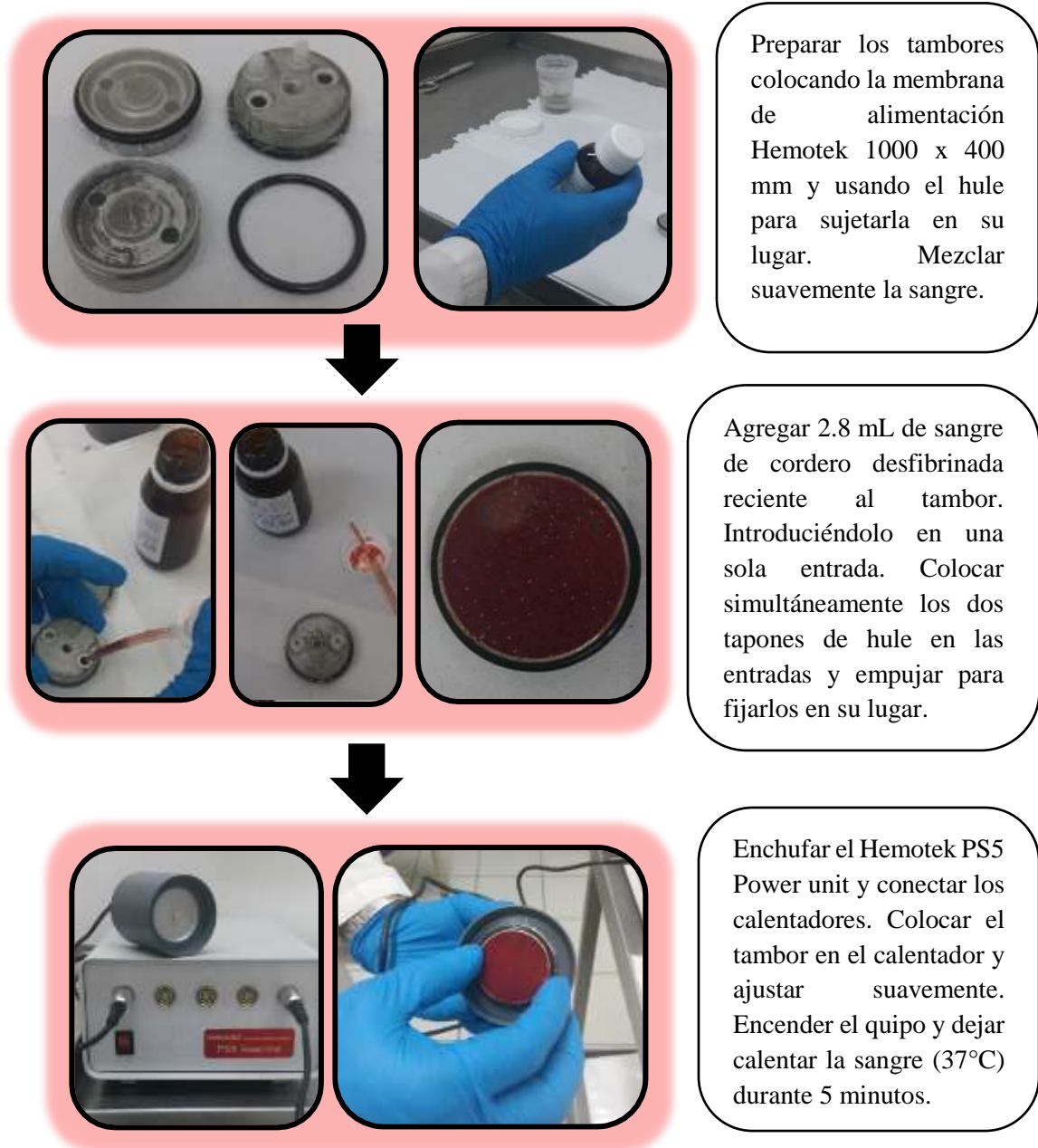
5. Comprobación de alimentación de larvas de *An. albimanus* con mezcla de alimento con goma guar y comida de pescado separada por colores. En la Figura 77 se observan dos imágenes correspondientes al intestino de larvas de cuarto estadio de *An. albimanus* expuestas a la mezcla de goma guar con comida de pescado de diferentes colores. Es posible observar que gran parte de los segmentos intestinales de las larvas en ambas imágenes están coloreados de verde (imagen A) o de rojo (imagen B). Esto confirma que las larvas sí ingieren esta mezcla de alimento, ya sea solo en color verde o rojo. Por lo tanto, para obtener mejores resultados se decidió mezclar ambos.

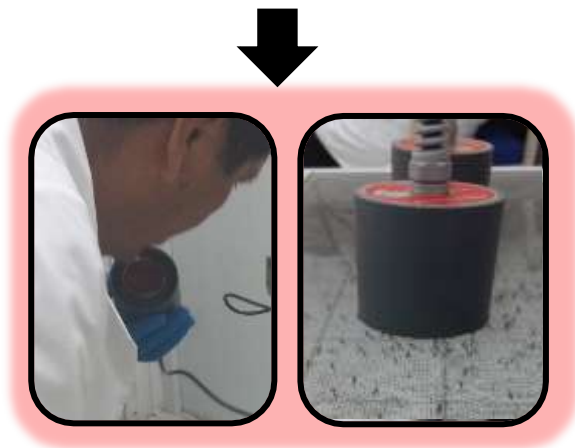
**Figura 77:** Comprobación de alimentación con mezcla de alimento de goma guar y comida de pescado de diferentes colores mediante la disección del intestino de *An. albimanus*



(Fuente: Foto propia)

6. Metodología estandarizada de un método de alimentación con la bacteria transgénica *E. coli* HT115 (DE3) que permita evaluar el desarrollo larvario de *An. albimanus*
- a. Alimentación de hembras de *An. albimanus* con sangre para obtener larvas para experimentos



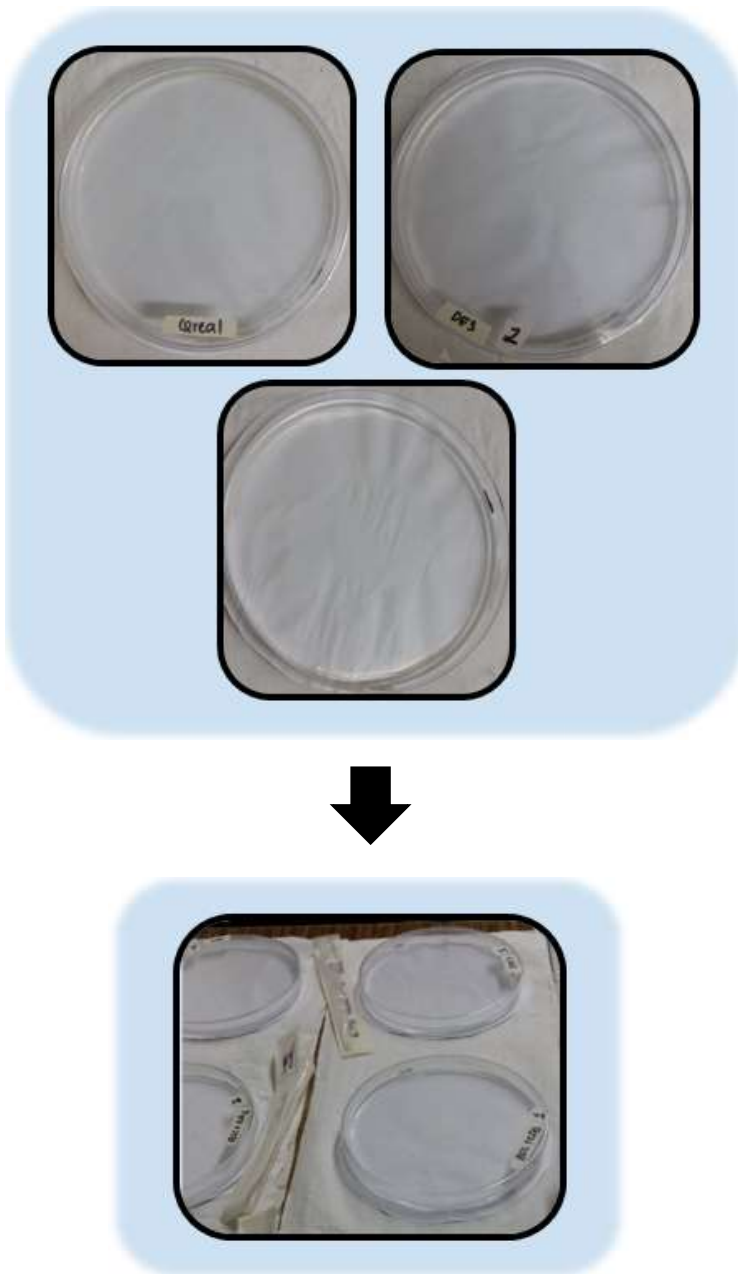


Soplar sobre la membrana un par de veces ( $\text{CO}_2$  atrae a las hembras) y colocarla sobre la jaula. Apagar la luz y dejar alimentar durante 30 minutos.



Colocar agua de chorro en galones y dejar desclorinar con la tapadera abierta. Dos días después de alimentar con sangre, colocar en la jaula, una charola con agua desclorada por 24 horas. Preparar una bandeja con agua desclorada y papel en los bordes. Dejar caer el agua de oviposición en la bandeja a través de una malla para evitar el paso de los cuerpos de las hembras muertas.

## b. Montaje de un nuevo experimento



Para iniciar un nuevo experimento se debe utilizar placas Petri de dimensiones: (marca Falcon, 150 x 25 mm). Agregar a cada placa 80 mL de agua de oviposición (4 mL/larva) y marcar el nivel del agua. Posteriormente etiquetar cada placa especificando el tratamiento y el número de réplica, por ejemplo: DE3 2. Luego utilizar una pipeta Pasteur para tomar con cuidado 20 larvas L1 (eclosionadas ese mismo día) y colocarlas en cada placa Petri.

Colocar todas las placas Petri sobre una mesa estable dentro de un cuarto con una temperatura entre 25 - 29 °C y un porcentaje de humedad entre 54 - 70 %. Exponer a las larvas a 12 horas de luz (6:00 a.m. - 18:00 p.m.) y 12 horas de oscuridad (18:00 p.m. - 6:00 a.m.).

c. Preparación del alimento de las larvas de *An. albimanus*

Para preparar el alimento con bacteria se debe iniciar preparando el cultivo bacteriano. Utilizar una punta para tomar una colonia de la cepa de interés e inocular 3 mL de medio LB + Amp [50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] (c.f.) + Tet [12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] (c.f.). Incubar O/N con agitación a 180 rpm y 30°C.



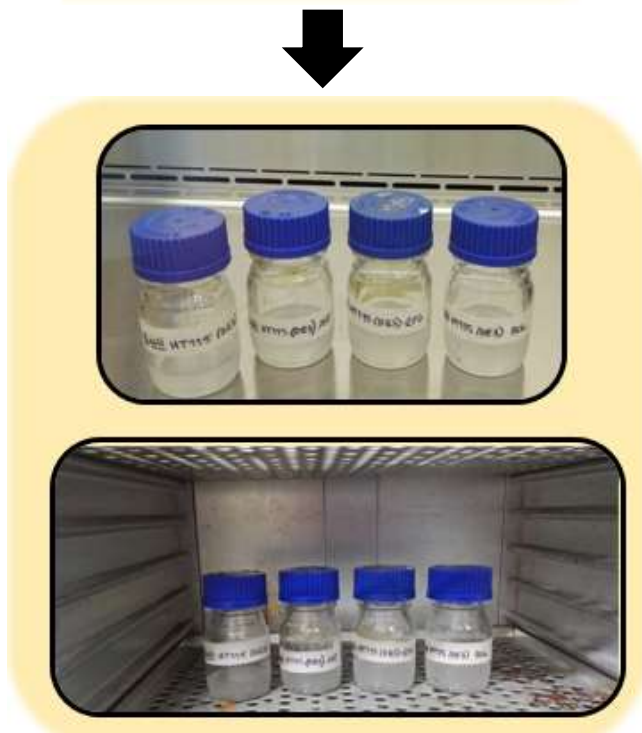
Al día siguiente inocular los 3 mL de cultivo O/N en 15 mL de medio 2xYT + Amp [50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] (c.f.) + Tet [12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] (c.f.). Dejar incubar durante 1 hora a 180 rpm y 30°C.



Utilizar un espectrofotómetro UV-Vis para medir el OD<sub>600 nm</sub> y asegurarse que esté a 0.4. Añadir 0.4 mM de IPTG e incubar durante 1 hora más a 180 rpm y 30°C.



Centrifugar los cultivos durante 7 minutos a  $7,647 \times g$ . Decantar el sobrenadante y resuspender en el mismo volumen de PBS con 1 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 0.5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Cold Spring Harbor Protocols, 2006). Repetir la centrifugación, decantar el sobrenadante y resuspender nuevamente en el mismo volumen de PBS.



Colocar el resuspendido en un contenedor de vidrio con tapadera asegurándose de no cerrar la tapadera por completo. Colocar el contenedor de vidrio dentro de un horno de secado y calentar durante una hora a  $105^\circ\text{C}$ .



Tomar 100  $\mu$ L del cultivo y sembrarlos en una placa de agar LB con los antibióticos necesarios según la cepa utilizada (Amp [50  $\mu$ g/mL] (c.f.); Tet [12.5  $\mu$ g/mL] (c.f.)). Dejar incubar O/N a 180 rpm y 30°C. Este es el control de la inactivación.



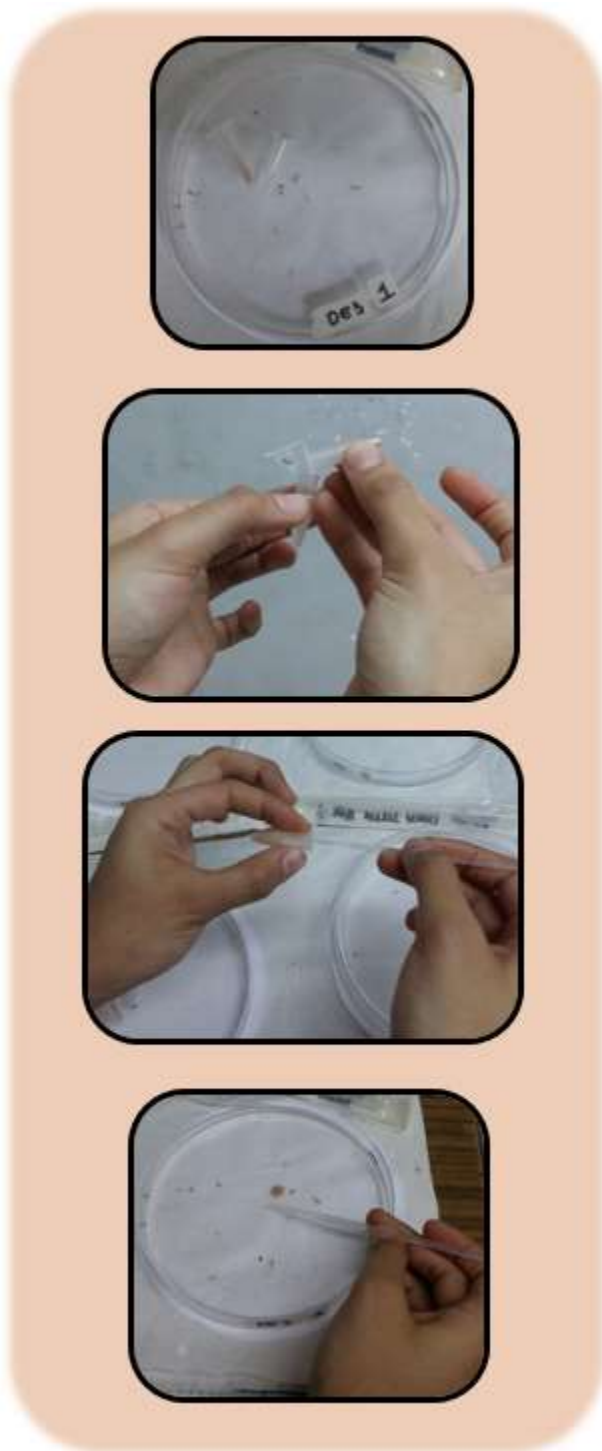
Separar el resuspendido, agregando 200  $\mu$ L del mismo en tubos de 0.6 mL correctamente etiquetados según cada tratamiento. Colocar los tubos de cada tratamiento en bolsas separadas y etiquetadas. Almacenar las bolsas a -20°C. Al utilizar el alimento, sacar un tubo a la vez.



Para preparar el alimento seco que será mezclado con la bacteria, se debe pesar lo siguiente: 0.009 g de comida de pez triturada marca Kijaro, 0.01 g de goma guar marca Sigma Aldrich® (No. G-4129), y 0.004 g de levadura seca activa no instantánea triturada marca Red Star. Colocar lo pesado en un tubo de 0.6 mL. Esto corresponde a la cantidad necesaria de alimento para mezclar con 200  $\mu$ L del resuspendido bacteriano.



Para preparar el alimento de cereal mezclar 75 g de cereal de bebé Nestum marca Nestlé y 25 g de levadura seca activa no instantánea triturada marca Red Star.

d. Alimentación de larvas de *An. albimanus*

Sacar del congelador a -20°C un tubo de resuspendido bacteriano según cada tratamiento. Por cada tubo de resuspendido bacteriano, tomar un tubo de alimento seco. Verter el contenido del alimento seco en el tubo con resuspendido bacteriano. Utilizar un asa de 1  $\mu$ L para mezclar. Dejar reposar por un minuto y luego utilizar el asa para sacar la totalidad de la mezcla de alimento y colocarla en el centro de cada placa Petri. Dejar a las larvas en exposición a dicho alimento durante 4 horas. Recordar utilizar un asa diferente para cada tratamiento. Al finalizar, utilizar papel para limpiar los restos de alimento en cada asa utilizada. Los tubos con restos de la mezcla fueron colocados en un beaker con solución de cloro al 10%.

Colocar este alimento en todos los tratamientos, menos el control. El control se expone solamente al alimento a base de cereal de bebé.



Utilizar una pipeta Pasteur para tomar los restos de alimento que no hayan sido ingeridos y colocarlos en un beaker con solución de cloro al 10%. Recordar utilizar una pipeta diferente para cada tratamiento.

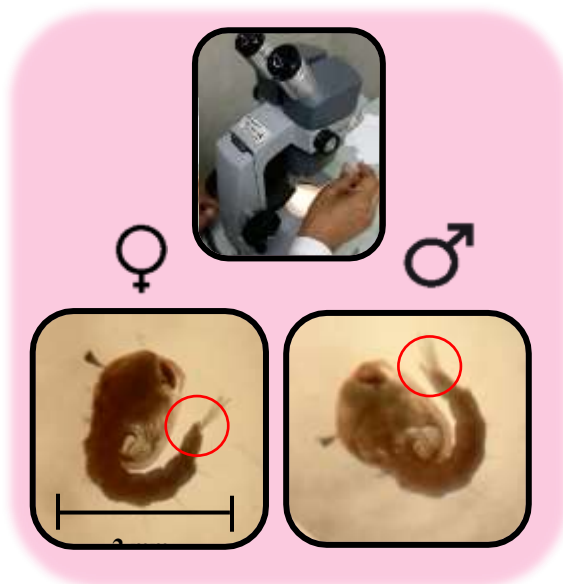


Después de sacar la mezcla de alimento seco con resuspendido bacteriano, utilizar un asa de 10  $\mu$ L para añadir un "scoop" del alimento a base de cereal a las placas Petri con larvas L1/L2 y dos "scoops" a las placas con larvas L3/L4. El alimento a base de cereal se deja en las placas lo que resta del día y nunca es sacado/limpiado de las mismas.



Cuando las larvas lleguen a tercer estadio en cualquiera de los experimentos, se debe cambiar el agua de las placas Petri. Para esto se debe filtrar el agua de las placas a través de un filtro que tenga un tamaño de poro que no permita el paso de las larvas L3. Agregar 80 mL de agua desclorinada a cada placa Petri y luego colocar las larvas en ellas.

#### e. Sexado de pupas



Succionar una pupa con ayuda de una pipeta Pasteur con la punta cortada. Colocar la pupa sobre un portaobjetos con la menor cantidad de agua posible. Observar la terminalia bajo el estereoscopio y clasificar.

**Macho:** dos aletas y terminación alargada en forma de flecha del noveno segmento abdominal.

**Hembra:** dos aletas y terminación corta del noveno segmento abdominal.



Para la variación experimental de análisis de machos vírgenes (evaluación de espermias). Después de sexar, colocar a los machos en un recipiente pequeño con agua desclorinada dentro de un vaso. Colocar los vasos en un cuarto cerrado con una temperatura entre 23 – 30 °C y humedad entre 40 – 90 %.

#### f. Desarrollo de pupa a adulto y tiempo de copulación



Preparar las jaulas cortando el interior de la tapadera de un recipiente plástico de 14.5 x 14.5 x 17.5 cm. Cortar un lado del recipiente y colocar masking tape en los bordes. Colocar una media gruesa cubriendo todo el recipiente y hacer un nudo al frente. Etiquetar con nombre de tratamiento y número de réplica.



Trasladar las pupas con una malla a una placa Petri (marca Falcon 100 x 15 mm) con agua desclorinada. Introducir dicha placa en la jaula correspondiente.



Colocar todas las jaulas en la parte superior de un estante (se pueden hacer dos filas). Poner una toalla húmeda en la parte superior abierta de las jaulas e introducir un algodón humedecido con agua miel (azúcar 7.5%). Mantener las jaulas en un cuarto cerrado con una temperatura entre 23- 30 °C y humedad entre 40 – 92 %. Cuando ya hayan eclosionado todas las pupas, sacar de la jaula la placa con agua. Dejar a adultos en jaula durante 5 días, contando como día 1 el día de mayor eclosión de hembras.

#### g. Alimentación de hembras experimentales con sangre



Alimentar con tambores de sangre de cordero desfibrinada reciente utilizando el equipo Hemotek de la misma forma especificada en el apartado 1 de la presente metodología. Tomar en cuenta las siguientes modificaciones: colocar el tambor con sangre caliente sobre las jaulas de experimentación y no poner charola.

#### h. Oviposición de hembras de *An. albimanus* experimentales



Preparar vasos con: orificio para captador, malla en boca sujeta con hule, algodón sobre malla humedecido con agua miel (azúcar 7.5 %) y algodón en el fondo humedecido con agua sobre el cual se coloca un círculo de papel filtro estéril. Dos días después de alimentadas, separar las hembras de dos en dos en cada vaso. Dejar en vaso 1 día.

#### i. Conteo de huevos



Sacar de los vasos de oviposición el papel filtro con los huevos. Observar el papel bajo estereoscopio y contar la cantidad de huevos presentes. Colocar una placa transparente con cuadrícula por encima para facilitar el conteo.

#### j. Eclosión de huevos y conteo de larvas



Preparar placas Petri (Falcon, 100 x 15 mm) con papel en el borde y con agua desclorinada. Con una pizeta de agua desclorinada, lavar bien el papel filtro con los huevos dejando caer el agua en las placas. Colocar las placas en el cuarto cerrado con una temperatura 23- 30 °C y humedad entre 40 – 92 %.



Cuando hayan eclosionado las larvas L1, separarlas en los pozos de una placa de porcelana con ayuda de una pipeta pasteur. Observar bajo el estereoscopio y contar. Utilizar una fuente de luz externa para facilitar la visualización.

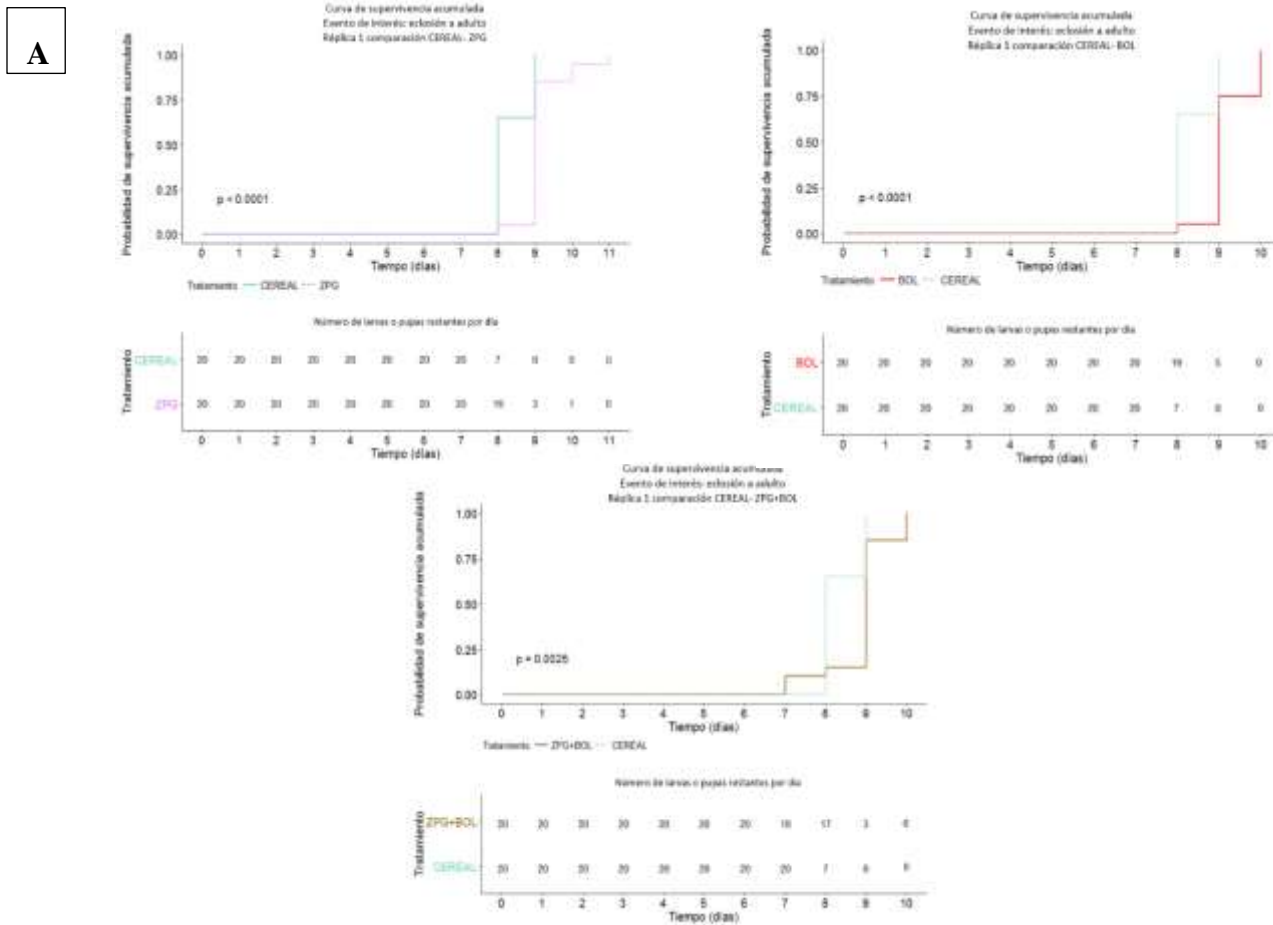


Colocar el mismo número de larvas L1 en placas Petri (Falcon, 150 x 25 mm). Alimentar con cereal de bebé (1 “scoop” para larvas L1 y L2 y 2 “scoops” para larvas L3 y L4) hasta que lleguen a adulto. Seguir mismos cuidados que con la primera generación experimental. Registrar cantidad de larvas eclosionadas que llegan a adulto.

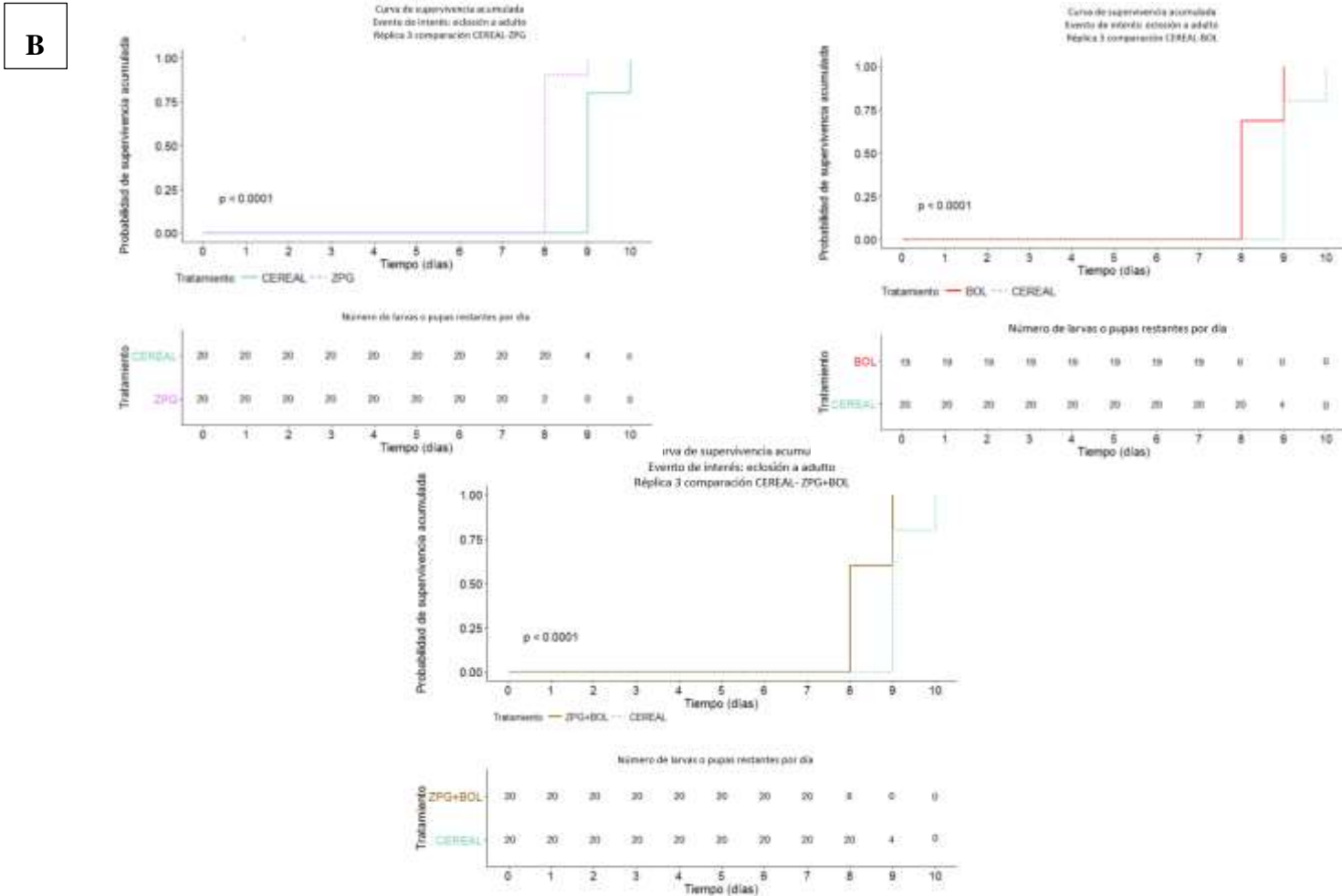
7. Comparación de curvas de supervivencia de eclosión de pupa a adulto para los tratamientos ZPG, BOL y ZPG+BOL según el tratamiento CEREAL

**Figura 78:** Curvas de supervivencia de comparación individual de los tratamientos ZPG, BOL y ZPG+BOL contra CEREAL en

(A) réplica 1 y (B) réplica 3.



Continuación Figura 78.



(Fuente: Elaboración propia utilizando el paquete “Survminer” en R (Kassambara y Kosinski, 2016))

En la Figura 78 se observa que el valor p de la comparación de los tratamientos ZPG, BOL y ZPG+BOL contra CEREAL en las réplicas 1 y 3 es menor que la significancia (0.05). Por lo cual se concluye que sí existe diferencia significativa entre las curvas de supervivencia de eclosión de pupa a adulto entre dichos tratamientos. La diferencia se debe tanto a un día de adelanto o atraso en la eclosión de las poblaciones de los tratamientos mencionados con respecto al CEREAL.

8. Pruebas estadísticas utilizadas para analizar el número de huevos por hembra y número de larvas por hembra
  - a. Huevos por hembra

- **Shapiro –Wilk:**

```
> shapiro.test(Individuales$huevos)

      Shapiro-Wilk normality test

data:  Individuales$huevos
W = 0.96822, p-value = 0.414
```

No se puede rechazar la hipótesis nula que dice que los datos provienen de poblaciones normalmente distribuidas debido a que valor  $p > 0.05$ .

- **Bartlett:**

```
> bartlett.test(Individuales$huevos, Individuales$Tratamiento)

      Bartlett test of homogeneity of variances

data:  Individuales$huevos and Individuales$Tratamiento
Bartlett's K-squared = 9.012, df = 5, p-value = 0.1086
```

Se acepta la hipótesis nula que dice que los datos provienen de poblaciones con varianzas homogéneas debido a que valor  $p > 0.05$ .

- **Prueba T de Student:**

```
> t.test(datos$Huevos[datos$Tratamiento=="ANT"], datos$Huevos[datos$Tratamiento=="CEREAL"])

Welch Two Sample t-test

data: datos$Huevos[datos$Tratamiento == "ANT"] and datos$Huevos[datos$Tratamiento == "CEREAL"]
t = 1.7163, df = 3.307, p-value = 0.176
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -28.70792 104.20792
sample estimates:
mean of x mean of y
 103.25    65.50
```

Se acepta la hipótesis nula que dice que no existe diferencia significativa entre las medias de huevos por hembra de los tratamientos ANT y CEREAL debido a que valor  $p > 0.05$ .

- **Mann-Whitney-Wilcoxon:**

```
> wilcox.test(Huevos ~ Tratamiento, data=datos)

Wilcoxon rank sum test

data: Huevos by Tratamiento
W = 21, p-value = 0.06667
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

Se acepta la hipótesis nula que dice que las muestras provienen de poblaciones idénticas debido a que valor  $p > 0.05$ . Esto significa que, con un 95% de confianza, se puede decir que las medias de las poblaciones de los tratamientos ANT y CEREAL no son significativamente diferentes entre sí.

- **ANOVA:**

```
> summary(anovahuevo)

      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tratamiento  5   7532  1506.4   1.803  0.145
Residuals   28  23391   835.4
```

Se acepta la hipótesis nula que dice que no existe diferencia significativa entre las medias de huevos por hembra de los tratamientos debido a que valor  $p > 0.05$ .

- **Prueba post-hoc TukeyHSD:**

```
> TukeyHSD(anovahuevo)
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = huevos ~ Tratamiento, data = Individuales)

$Tratamiento
      diff      lwr      upr      p adj
BOL-ANT  -23.375 -77.46217  30.712172  0.7713664
CEREAL-ANT -37.750 -94.76289  19.262886  0.3550491
DE3-ANT   -25.450 -84.69953  33.799529  0.7757373
ZPG-ANT   -29.250 -86.26289  27.762886  0.6253152
ZPG+BOL-ANT -55.050 -114.29953  4.199529  0.0801238
CEREAL-BOL -14.375 -62.07540  33.325402  0.9377708
DE3-BOL   -2.075 -52.42742  48.277417  0.9999950
ZPG-BOL   -5.875 -53.57540  41.825402  0.9989036
ZPG+BOL-BOL -31.675 -82.02742  18.677417  0.4102290
DE3-CEREAL  12.300 -41.18283  65.782827  0.9800609
ZPG-CEREAL   8.500 -42.49388  59.493875  0.9953830
ZPG+BOL-CEREAL -17.300 -70.78283  36.182827  0.9177871
ZPG-DE3     -3.800 -57.28283  49.682827  0.9999255
ZPG+BOL-DE3 -29.600 -85.46099  26.260991  0.5932925
ZPG+BOL-ZPG -25.800 -79.28283  27.682827  0.6827304
```

Los resultados del ANOVA se confirman con esta prueba. Es decir que no existe diferencia significativa entre las medias de huevos por hembra en ninguna de las comparaciones realizadas debido a que en todos los casos el valor  $p > 0.05$ .

- **Prueba Kruskal-Wallis:**

```
> kruskal.test(Huevos~Tratamiento, data=datos)

Kruskal-Wallis rank sum test

data: Huevos by Tratamiento
Kruskal-Wallis chi-squared = 6.2385, df = 5, p-value = 0.2837
```

Se acepta la hipótesis nula que dice que las muestras provienen de poblaciones idénticas debido a que valor  $p > 0.05$ . Esto significa que, con un 95% de confianza, se puede decir que las medias de las poblaciones de todos los tratamientos no son significativamente diferentes entre sí.

b. Larvas por hembra

- **Shapiro-Wilk:**

```
> shapiro.test(Individuales$larvas)

      Shapiro-Wilk normality test

data:  Individuales$larvas
W = 0.94595, p-value = 0.09281
```

No se puede rechazar la hipótesis nula que dice que los datos provienen de poblaciones normalmente distribuidas debido a que valor  $p > 0.05$ .

- **Bartlett:**

```
> bartlett.test(Individuales$larvas, Individuales$Tratamiento)

      Bartlett test of homogeneity of variances

data:  Individuales$larvas and Individuales$Tratamiento
Bartlett's K-squared = 2.7214, df = 5, p-value = 0.7428
```

Se acepta la hipótesis nula que dice que los datos provienen de poblaciones con varianzas homogéneas debido a que valor  $p > 0.05$ .

- **Prueba T de Student:**

```
> t.test(datos$Larvas[datos$Tratamiento=="ANT"], datos$Larvas[datos$Tratamiento=="CEREAL"])

      Welch Two Sample t-test

data:  datos$Larvas[datos$Tratamiento == "ANT"] and datos$Larvas[datos$Tratamiento == "CEREAL"]
t = 1.597, df = 4.686, p-value = 0.175
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -16.38751  67.38751
sample estimates:
mean of x mean of y
  61.5      36.0
```

Se acepta la hipótesis nula que dice que no existe diferencia significativa entre las medias de larvas por hembra de los tratamientos ANT y CEREAL debido a que valor  $p > 0.05$ .

- **Mann-Whitney-Wilcoxon:**

```
> wilcox.test(Larvas ~ Tratamiento, data=datos)

      Wilcoxon rank sum test

data:  Larvas by Tratamiento
W = 20, p-value = 0.1143
alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0
```

Se acepta la hipótesis nula que dice que las muestras provienen de poblaciones idénticas debido a que valor  $p > 0.05$ . Esto significa que, con un 95% de confianza, se puede decir que las medias de las poblaciones los tratamientos ANT y CEREAL no son significativamente diferentes entre sí.

- **ANOVA:**

```
> summary(anovalarvas)

              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Tratamiento  5   4065   813.0   1.027  0.421
Residuals   28  22166   791.6
```

Se acepta la hipótesis nula que dice que no existe diferencia significativa entre las medias de larvas por hembra de los tratamientos debido a que valor  $p > 0.05$ .

- **Prueba post-hoc TukeyHSD:**

```

|> TukeyHSD(anovalarvas)
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = larvas ~ Tratamiento, data = Individuales)

$Tratamiento
      diff      lwr      upr    p adj
BOL-ANT -24.3750000 -77.02668 28.27668 0.7180943
CEREAL-ANT -25.5000000 -80.99975 29.99975 0.7243115
DE3-ANT -16.1000000 -73.77703 41.57703 0.9544220
ZPG-ANT -24.8333333 -80.33308 30.66641 0.7453963
ZPG+BOL-ANT -41.1000000 -98.77703 16.57703 0.2794299
CEREAL-BOL  -1.1250000 -47.55942 45.30942 0.9999996
DE3-BOL   8.2750000 -40.74105 57.29105 0.9951004
ZPG-BOL  -0.4583333 -46.89275 45.97609 1.0000000
ZPG+BOL-BOL -16.7250000 -65.74105 32.29105 0.8992318
DE3-CEREAL  9.4000000 -42.66338 61.46338 0.9933089
ZPG-CEREAL  0.6666667 -48.97382 50.30715 1.0000000
ZPG+BOL-CEREAL -15.6000000 -67.66338 36.46338 0.9391854
ZPG-DE3   -8.7333333 -60.79671 43.33004 0.9952446
ZPG+BOL-DE3 -25.0000000 -79.37842 29.37842 0.7238145
ZPG+BOL-ZPG -16.2666667 -68.33004 35.79671 0.9281887

```

Los resultados del ANOVA se confirman con esta prueba. Es decir que no existe diferencia significativa entre las medias de larvas por hembra en ninguna de las comparaciones realizadas debido a que en todos los casos el valor  $p > 0.05$ .

- **Prueba Kruskal-Wallis:**

```

> kruskal.test(Larvas~Tratamiento, data=datos)

      Kruskal-Wallis rank sum test

data:  Larvas by Tratamiento
Kruskal-Wallis chi-squared = 6.0625, df = 5, p-value = 0.3002

```

Se acepta la hipótesis nula que dice que las muestras provienen de poblaciones idénticas debido a que valor  $p > 0.05$ . Esto significa que, con un 95% de confianza, se puede decir que las medias de las poblaciones de todos los tratamientos no son significativamente diferentes entre sí.

## XII. GLOSARIO

- **Tampón:** es una solución capaz de mantener su pH en valores constantes, aun cuando se agreguen pequeñas cantidades de ácido o base, o se diluya la solución.
- **Elución:** es un proceso que consiste en extraer, mediante un líquido apropiado, una sustancia del medio sólido que la ha absorbido.
- **Inducción:** producir o causar la expresión de determinados genes.
- **Lisis:** descomposición de una sustancia por rotura de sus enlaces químicos.
- **Botón celular:** comprimido sólido que se implanta en el tejido subcutáneo y es absorbido lentamente por el organismo.
- **ADNc:** ADN de doble hebra complementario al ARN mensajero (Farrell, 2005).
- **“Argonaute”:** familia de proteínas altamente conservada que interviene en el proceso de silenciamiento de genes mediante el sistema de ARN de interferencia. Las proteínas que pertenecen a esta familia establecen contacto con “dicer” y el complejo “RISC”. Se ha identificado que diferentes combinaciones de proteínas pertenecientes a esta familia pueden facilitar diferentes vías del silenciamiento con ARNi (Carmell, Xuan, Zhang, y Hannon, 2002).
- **ARN antisentido:** ARN de simple hebra que es complementario al ARNm y que por ende puede aparearse con éste último. Por ser de simple hebra, el ARN antisentido es más inestable que el ARN de doble hebra (ARNdh) (Farrell, 2005).
- **ARN con sentido:** ARN que es tiene la misma secuencia que el ARNm y que por ende puede aparearse con el ARN antisentido (Farrell, 2005).
- **ARNdh:** ARN conformado por la unión del ARN antisentido y el ARN con sentido. Este ARNdh es cortado por el “dicer” para formar siRNA. También conocido como ARN doble hebra (Farrell, 2005).
- **ARNsh:** ARN de hebra simple (Farrell, 2005).

• **ARNi (ARN de interferencia):** mecanismo de silenciamiento de genes que ocurre naturalmente en muchos organismos y que es activado por la presencia de ARNdh que es convertido a siRNA (Farrell, 2005).

• **siRNA (ARN corto de interferencia, por sus siglas en inglés):** moléculas de ARNdh cortas, de 21 a 23 pares de bases. Los siRNA's generalmente cuentan con una secuencia "colgante" en ambos extremos 3' que, en la mayoría de los casos se compone de dos nucleótidos uracilo (UU) (Zamore, Tuschl, Sharp, y Bartel, 2000).

• **RISC (Complejo de silenciamiento inducido por ARN, por sus siglas en inglés):** este complejo posee varias proteínas y dominios: 1) proteínas arganoute; 2) dominio PAZ y 3) dominio PIWI. Su función es asociarse con los siRNA producidos por la proteína "dicer". Este complejo puede funcionar, entre otras cosas, como una helicasa dependiente de ATP que separa el siRNA en dos hebras. Esto permite el apareamiento de la hebra antisentido del siRNA con la secuencia de ARNm de interés. Posteriormente, el complejo RISC realizar un corte en el ARNm, cerca del centro de la secuencia a la que se unión la hebra antisentido del siRNA (Farrell, 2005).

• **"Dicer":** ribonucleasa de tipo III específica para doble hebra que se encarga de cortar el ARNdh endógeno o extranjero. El ARNdh es cortado en fragmentos que constan de 21 a 23 pares de bases y que se conocen con el nombre de siRNA. Esta enzima cuenta con múltiples dominios: 1) dominio N-terminal que tiene función de helicasa; 2) dos dominios con función de ARNasa III; 3) un dominio llamado PAZ porque está conformado por tres proteínas (PIWI, arganoute y Zwillie) que reconoce los extremos 3' "colgantes" del siRNA y 4) un dominio C-terminal de unión al ARNdh (Farrell, 2005).

• **"Hairpin":** es un tipo de estructura secundaria que se forma entre dos partes complementarias de una hebra de ADN o ARN (De Felice y Restivo, 2005).

• **"Primer":** es una secuencia corta de ADN de hebra simple que ha sido diseñada de manera artificial según el interés del investigador. También conocido como oligonucleótido (Farrell, 2005). Existen "primers" sentido (llamados "Forward" en inglés

y denominados con la letra F) y “primers” antisentido (llamados “Reverse” en inglés y denominados con la letra R).

- **“Scoop”**: medida de la parte interior de un asa de inoculación de 10  $\mu$ L.

Silenciamiento de genes post-transcripcional (PTGS, por sus siglas en inglés): describe el proceso del silenciamiento de un gen (inhibición de su expresión, es decir que llegue a ser proteína) luego de que ya se llevó a cabo la transcripción del mismo. Este proceso puede tener diversas causas (Farrell, 2005).