

Técnicas innovadoras para el control de insectos

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Técnicas innovadoras para el control de insectos

Trabajo de graduación en modalidad de Megaproyecto presentado por

Victoria Quetzaly González López

Katia Sofía Illescas Brol

Ana Gabriela Lara de León

Ana Lucía Meléndez Muñoz

Mariana Beatriz Morales Castillo

María Elena Ortiz Osejo

Paula Villatoro González

Manuel Alberto Vásquez Ibarra*

para optar al grado académico de Licenciado en Física* y Licenciados en


Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2018


Aprobación del trabajo de graduación: Técnicas innovadoras para el control de insectos presentado por Quetzaly González, Katia Illescas, Gabriela Lara, Ana Lucía Meléndez, Mariana Morales, Elena Ortiz, Manuel Vásquez y Paula Villatoro.

Vo.Bo.:

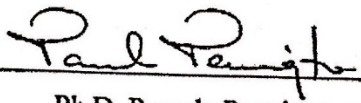
(f) 

Lic. Claudia Paiz
Asesora

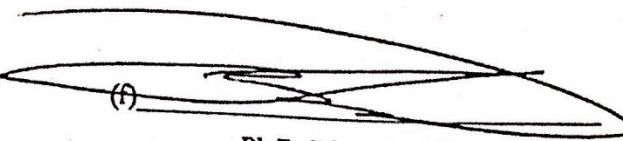
Tribunal Examinador:

(f) 

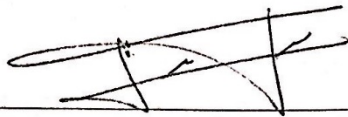
Lic. Claudia Paiz
Asesora

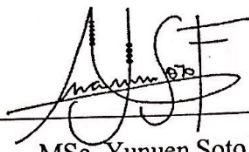
(f) 


Ph.D. Pamela Pennington


(f) 

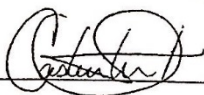
Ph.D. Diego Archila

(f) 
MSc. Julio Matute

(f) 
MSc. Yunuen Soto

(f) 
Ph.D. Krisztina Rios

(f) 
Ph.D. Dalia Lau

(f) 
MSc. David Castañeda

Fecha de aprobación: Guatemala 12 de noviembre de 2018

PREFACIO

Gracias a todas las personas e instituciones que han colaborado en la realización de este trabajo de graduación. Les agradecemos especialmente a:

A nuestra familia por su apoyo constante a lo largo de nuestra carrera universitaria, por su apoyo incondicional en cada decisión de nuestra vida. Gracias por su guía y paciencia necesaria para el desarrollo de este trabajo de graduación.

A la asesora de megaproyecto, Licda. Claudia Paiz por haber brindado su apoyo a lo largo de todo el trabajo de investigación. Por haber dado su tiempo y trabajo conjunto que permitió la fase de experimentación necesaria en el estudio, así como la elaboración del documento de graduación. Gracias por su asesoramiento en las partes claves del desarrollo de la investigación. Gracias por sus consejos y paciencia que permitieron el éxito del presente proyecto.

A la Dra. Pamela Pennington por su guía continua durante la elaboración de todo el estudio y por su asesoramiento en la toma de decisiones importantes a lo largo del proyecto. Gracias por el apoyo y consejos brindados. Gracias por su enseñanza y paciencia que contribuyó a la formación y conocimientos adquiridos durante el desarrollo del trabajo.

A la Licda. Pamela Flores y Licda. Ana Cristina Benedict por su constante asesoramiento y apoyo durante la fase experimental del presente trabajo de graduación. Gracias por su tiempo, supervisión y vocación de enseñanza que guiaron el proyecto y permitieron alcanzar el éxito del mismo.

A los financistas, International Atomic Energy Agency (IAEA), Open Philanthropy Project y el Center for Disease Control and Prevention (CDC) por brindar los fondos necesarios para la elaboración de este proyecto. Gracias a las instituciones, Centro de Estudios en Salud (CES), Centro de Estudios en Biotecnología (CEB), y al Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala por su apoyo con las instalaciones, reactivos y equipo utilizados en este estudio

Al personal de malaria, por dejarnos usar sus instalaciones, equipos de laboratorio (II-113,114) e insectario (edificio M). Especialmente un agradecimiento a Jorge, por ayudarnos a alimentar a los diferentes estadios de las larvas de *A. albimanus* y mantener limpia el área de insectario.

A la casa de estudios, Universidad del Valle de Guatemala, por contribuir a nuestra formación académica a lo largo de nuestra carrera universitaria. Gracias por brindarnos las herramientas y conocimientos para formarnos como profesionales íntegros en Bioquímica y Microbiología. Gracias por el apoyo financiero que contribuyó a nuestros estudios.

ÍNDICE

PREFACIO	ix
LISTADO DE FIGURAS	xiii
LISTADO DE CUADROS	xvii
LISTADO DE ABREVIATURAS	xxi
RESUMEN	xxiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	3
III. OBJETIVOS.....	5
IV. MARCO TEÓRICO	7
1. Reproducción y ciclo de vida	7
a. Reproducción de <i>Anastrepha ludens</i>	7
b. Ciclo de vida.....	7
2. Distribución <i>Anastrepha ludens</i>	8
a. A nivel mundial.	8
b. A nivel local.....	8
3. Daños cultivos	9
C. Métodos de control vectorial	17
V. ANTECEDENTES.....	39
VI. METODOLOGÍA.....	43
VII. RESULTADOS	65
A. Esterilización <i>Anastrepha ludens</i> por dosis de radiación gamma	65
B. Evaluación de expresión de genes de referencia en diferentes estadios de <i>Anopheles albimanus</i>	72
1. Diseño de cebadores.	72
2. Amplificación de <i>Rps4</i> , <i>RpL49</i> y <i>GAPDH</i> utilizando cebadores diseñados.	73
3. Determinación de niveles de expresión de genes candidatos (<i>RpS4</i> , <i>RpL49</i> y <i>GAPDH</i>).....	75
4. Análisis de niveles de expresión de los genes candidatos con el software NormFinder.....	77
5. Análisis de niveles de expresión de los genes candidatos con el software BestKeeper.....	78
C. Silenciamiento de <i>Boule</i> y <i>ZPG</i> en pupas macho de <i>A. albimanus</i> mediado por ARNi y diseño de cebadores de genes de espermatogénesis candidatos para silenciamiento.....	80
1. Producción de bacterias <i>Escherichia coli</i> HT115(DE3) transgénicas que expresen ARN de doble hebra del gen <i>Boule</i>	80
2. Optimización de la producción del ARN de doble hebra de los genes <i>Boule</i> y <i>ZPG</i> en bacterias transgénicas <i>E. coli</i> HT115 (DE3)	83
3. Extracción de ARN total de pupas macho y tratamiento con ADnasa	88
4. Síntesis de ADN complementario de pupa macho de <i>A. albimanus</i>	91

5.	Evaluación de la eficiencia de los cebadores de <i>Boule</i> para qPCR por curva de diluciones en serie. cebadores que se pretendía utilizar para el PCR tiempo real.....	92
6.	Expresión del gen <i>Boule</i> en pupas macho de <i>Anopheles albimanus</i> alimentadas con bacterias transgénicas inducidas e inactivadas	93
7.	Evaluación de la eficiencia de los cebadores de <i>ZPG</i> para qPCR por curva de diluciones en serie.....	96
8.	qPCR mediante curva estándar relativa para evaluación de expresión del gen <i>ZPG</i> en pupas macho de <i>Anopheles albimanus</i> alimentadas con bacterias inducidas e inactivadas, en paralelo a la evaluación de eficiencia de cebadores de <i>ZPG</i>	98
9.	Diseño de cebadores alternativos de <i>ZPG</i> para análisis por qPCR	101
10.	Diseño de cebadores para clonación y evaluación de expresión génica de genes de espermatogénesis candidatos para silenciamiento	104
VIII.	CONCLUSIONES.....	151
IX.	RECOMENDACIONES	155
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	157
XI.	ANEXOS	169
XII.	GLOSARIO	335

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Adultos de <i>Anastrepha ludens</i>	8
Figura 2. Distribución mundial de <i>Anopheles</i>	11
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Anopheles</i>	12
Figura 4. Formas eritrocitarias de <i>Plasmodium</i>	13
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp. en dos hospederos.....	14
Figura 6. Comparación de la distribución de Malaria en 2000 y 2016.....	15
Figura 7. Mapa de distribución de casos de malaria en Guatemala.....	16
Figura 8. Incidencia de malaria en Guatemala.....	16
Figura 9. Técnica del insecto estéril.....	17
Figura 10. Sistema de represión de tetraciclina hacia el gen de dominancia letal.....	18
Figura 11. Mecanismo de ARN de interferencia.....	20
Figura 12. Porcentajes de esterilidad de <i>zpg</i> en <i>Aedes aegypti</i>	23
Figura 13. Tipos de inexinas.....	24
Figura 14. Estructura de inexinas.....	24
Figura 15. Alineamiento de aminoácidos supuestos de familia de genes de actina.....	28
Figura 16. Estructura de ARNm eucariota.....	30
Figura 17. Cascada de diferenciación sexual en <i>Drosophila melanogaster</i>	32
Figura 18. Diferenciación sexual en moscas y mosquitos.....	33
Figura 19. Dominios del gen <i>Doublesex</i> en <i>Anopheles gambiae</i>	34
Figura 20. Diagrama del plásmido pGEMT-easy.....	40
Figura 21. Plásmido pGEM-T Easy Vector de Promega.....	40
Figura 22. Sexado de pupas de <i>A. albimanus</i>	57
Figura 23. Porcentaje de adultos emergidos luego de alcanzar la dosis completa con los diferentes tratamientos.....	65
Figura 24. Mortalidad a las 72 horas.....	66
Figura 25. Porcentaje de huevos eclosionados.....	67
Figura 26. Decrecimiento exponencial de eclosión.....	68
Figura 27. Inducción de esterilidad pruebas campo.....	69
Figura 28. Evaluación de efectividad de cebadores diseñados de genes <i>RpS4</i> , <i>RpL49</i> y <i>GAPDH</i> utilizando el método de PCR convencional.....	74
Figura 29. Diagrama de caja y bigotes que representa los niveles de expresión en términos de valores de Ct para los tres genes candidatos en los siete estadios del ciclo de vida de <i>Anopheles albimanus</i>	75
Figura 30. Comparación de niveles de expresión de los genes de referencia.....	76
Figura 31. Valores de estabilidad de expresión promedio (M) de genes de referencia candidatos mediante análisis NormFinder.....	77
Figura 32. Crecimiento en placas de LB con tetraciclina 12.5 µg/ml y carbenicilina 100 µg/ml de (A) <i>E. coli</i> HT115(DE3) pGEM-T-AmpR-Boule, (B) <i>E. coli</i> HT115(DE3) pGEM-T-AmpR-ZPG y (C) Control negativo.....	80
Figura 33. Crecimiento en placas de LB con tetraciclina 12.5 µg/ml y carbenicilina 50 µg/ml de (A) <i>E. coli</i> HT115(DE3) pGEM-T-AmpR-Boule, (B) <i>E. coli</i> HT115(DE3) pGEM-T-AmpR-ZPG y (C) Control negativo.....	81
Figura 34. Gel de agarosa 0.8% de productos de PCR de colonias de cepas de <i>E. coli</i> transformadas con los plásmidos pGEM-T Easy Vector-Boule y ZPG.....	82

Figura 35. Placas de LB con tetraciclina y carbenicilina para determinar muerte bacteriana según el método de inactivación.....	85
Figura 36. Gel de agarosa 1% de ARNdh de <i>Boule</i> y <i>ZPG</i> extraídos de cultivo bacteriano de <i>E. coli</i> HT115 (DE3) transgénica antes y después de inactivar la bacteria.....	86
Figura 37. Gel de agarosa 1% de ARNdh de <i>ANT</i> extraído de cultivo bacteriano de <i>E. coli</i> HT115 (DE3) transgénica antes y después de inactivar la bacteria.....	86
Figura 38. Concentraciones de ARNdh de <i>Boule</i> obtenidas con diferentes métodos de inactivación del cultivo bacteriano.....	87
Figura 39. Gel de agarosa 1% de integridad de ARN total extraído de pupas macho de <i>A. albimanus</i> tratadas.....	88
Figura 40. Gel de agarosa 1% de integridad de ARN total extraído de pupas macho de <i>A. albimanus</i>	89
Figura 41. Geles de agarosa 1% de confirmación de tratamiento con ADNasa del ARN total de pupa macho de <i>A. albimanus</i> de los diferentes tratamientos de alimentación.....	90
Figura 42. Geles de agarosa 1% de PCR de <i>actina</i> para confirmación de producción de ADNc de pupas macho de <i>A. albimanus</i>	91
Figura 43. Curva de eficiencia de los cebadores de qPCR de <i>Boule</i> a 0.4 μ M de concentración final.....	92
Figura 44. Curva de eficiencia de los cebadores de qPCR de <i>Boule</i> a 0.6 μ M de concentración final.....	92
Figura 45. Expresión relativa del gen <i>Boule</i> , con respecto a los genes de referencia <i>RPL49</i> y <i>RpS4</i> , en pupas macho de <i>A. albimanus</i> tratadas con <i>E. coli</i> HT115 (DE3) transgénica que expresa ARNdh de <i>Boule/Boule+ZPG/ANT</i>	94
Figura 46. Curva estándar de cebadores de <i>zpg</i> a una concentración de (A) 0.4uM (B) 0.3uM (C) 0.6uM y (D) 0.2uM.....	97
Figura 47. Curva estándar de cebadores de <i>zpg</i> a una concentración de 0.3uM (A) dilución de 1:25 a 1:250 (B) dilución 1:10 a 1:75.....	98
Figura 48. Gel de agarosa al 1% para verificación del amplicón con los cebadores de <i>zpg</i> por qPCR.....	100
Figura 49. Señalización de parejas de cebadores en la secuencia del gen <i>zpg</i> de <i>A. albimanus</i>	102
Figura 50. Cebadores diseñados en la secuencia del gen <i>gas8</i> de <i>A. albimanus</i>	104
Figura 51. Parejas de cebadores diseñados en la secuencia del gen <i>fzo</i> de <i>A. albimanus</i>	105
Figura 52. Ubicación de parejas de cebadores diseñados en la secuencia del gen <i>nht</i> de <i>A. albimanus</i>	110
Figura 53. Gel de integridad de ARN para tres réplicas biológicas de diferentes estadios de <i>A. albimanus</i>	118
Figura 54. Gel de integridad de ARN para tres réplicas biológicas de diferentes estadios de <i>A. albimanus</i>	118
Figura 55. Gel de tratamiento con DNasa para réplica 1 de diferentes estadios de <i>An. albimanus</i>	119
Figura 56. Gel de tratamiento con DNasa para réplica 2 y 3 de diferentes estadios de <i>A. Albimanus</i>	120
Figura 57. Gel de síntesis de ADNc a partir de muestras de ARN de diferentes estadios de <i>A. Albimanus</i>	121
Figura 58. Gel de síntesis de ADNc a partir de muestras de ARN de diferentes estadios de <i>An. albimanus</i>	121
Figura 59. Expresión relativa del gen <i>Doublesex</i> con respecto a los genes de referencia <i>RPL49</i> y <i>RPS4</i> en diferentes estadios de <i>An. albimanus</i>	123
Figura 60. Expresión relativa del gen <i>Transformer-2</i> con respecto a los genes de referencia <i>RPL49</i> y <i>RPS4</i>	124
Figura 61. Sitio de unión del cebador upstream diseñado.....	127
Figura 62. Amplificación de 3'-UTR de genes de <i>actina</i> de <i>Anopheles albimanus</i> usando 3' RACE.....	130
Figura 63. Gel de agarosa 1% con productos de PCR de aislamiento de bandas.....	133
Figura 64. Alineamiento de secuencias obtenidas de adultos hembra.....	134
Figura 65. Alineamiento de secuencias consenso y adultos hembra.....	136
Figura 66. Alineamiento de secuencias obtenidas de adultos macho.....	137
Figura 67. Alineamiento de secuencias obtenidas de adultos macho cerca de cola poliA.....	138
Figura 68. Alineamiento de secuencias obtenidas de pupas macho.....	139
Figura 69. Alineamiento de secuencias consenso y adultos macho.....	140

Figura 70. Alineamiento de secuencias obtenidas de macho cercanas a cola poliA.....	141
Figura 71. Alineamiento de secuencias consenso de hembras y machos.....	141
Figura 72. Productos de PCR amplificados de ligaciones para el aislamiento de bandas mayores a 1000 bp gel 1.....	142
Figura 73. Productos de PCR amplificados de ligaciones para el aislamiento de bandas mayores a 1000 bp gel 2.....	143
Figura 74. Productos de PCR amplificados de ligaciones para el aislamiento de bandas mayores a 1000 bp gel 3.....	143
Figura 75. Plásmidos extraídos de colonias tamizadas con Blue White screening para el aislamiento de bandas de pupas.....	146
Figura 76. Gráfico de eficiencia de los cebadores qPCRfemaleUTR_2F y qPCRfemaleUTR_2R en diferentes diluciones utilizando pupa hembra como estadio de prueba.	147
Figura 77. Diagrama de caja y bigotes de la expresión relativa obtenida a partir de qPCR en los diferentes estadios usando una dilución 1/500 del gen de <i>actina</i> presuntivo..	148
Figura 78. Señalización del sitio de unión de los cebadores en la secuencia codificante de proteína ribosomal S4 (<i>RpS4</i>)	172
Figura 79. Señalización del sitio de unión de los cebadores en la secuencia codificante de proteína ribosomal L49 (<i>RpL49</i>)	173
Figura 80. Señalización del sitio de unión de los cebadores en la secuencia codificante de proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<i>GAPDH</i>)	173
Figura 81. Gel de agarosa al 1% de extracciones de ARN de <i>A. albimanus</i>	175
Figura 82. Gel de agarosa al 1% de extracciones de ARN de <i>A. albimanus</i>	175
Figura 83. Tratamiento con ADNasas de muestras de ARN de los siete estadios del ciclo de vida de <i>A. albimanus</i>	176
Figura 84. Síntesis de ADNc de muestras con ARN libre de ADNasas de los siete estadios del ciclo de vida de <i>A. albimanus</i>	177
Figura 85. Estadística descriptiva sobre los diferentes métodos utilizados para la inactivación de la bacteria productora de ARNdh en <i>BOULE</i>	185
Figura 86. Estadística descriptiva sobre la concentración de ARNdh antes y después de la inactivación de la bacteria por ebullición por 15 min y concentrando el ARNdh de los distintos tratamientos.....	185
Figura 87. Curva de fusión de los cebadores de <i>zpg</i> a una concentración de 0.4uM.....	187
Figura 88. Curva de fusión de los cebadores de <i>zpg</i> a una concentración de 0.6 y 0.3uM.....	188
Figura 89. Curva de fusión de los cebadores de <i>zpg</i> a una concentración de 0.2uM.....	189
Figura 90. Curva de fusión de los cebadores de <i>zpg</i> a una concentración de 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa.....	190
Figura 91. Curva de fusión de los cebadores de <i>zpg</i> a una concentración de 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa de una dilución de 1:25 a 1:250.....	191
Figura 92. Curva estándar y de fusión de cebadores de genes de referencia (<i>RpS4</i> y <i>RpL49</i>) a una concentración de 0.33uM.....	191
Figura 93. Curva de fusión de los cebadores de <i>ZPG</i> a una concentración de 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa de una dilución de 1:10 a 1:150.....	192
Figura 94. Curva estándar y de fusión de cebadores de genes de referencia (<i>RpS4</i> y <i>RpL49</i>) a una concentración de 0.33uM.....	193
Figura 95. Análisis de gráfico de amplificación de PCR en tiempo real.....	235
Figura 96. Mapa de carga.....	235
Figura 97. Forma de colocar placa de LightCycler 96.....	237
Figura 98. Captura de pantalla de los comandos ingresados en el programa de R para introducir los datos y para la prueba Shapiro-Wilk	246
Figura 99. Captura de pantalla del comando ingresados en R para la prueba de Bartlett y los resultados..	246
Figura 100. Captura de pantalla de los comandos ingresados en R para verificar la independencia.....	246
Figura 101. Gráfica de independencia de los residuos.....	247

Figura 102. Captura de pantalla de los comandos ingresados para la prueba de ANOVA.....	247
Figura 103. Alineamiento de las secuencias del gen <i>nht</i> en diferentes especies de dípteros.....	248
Figura 104. Señalización de parejas de cebadores en la secuencia del gen <i>Dsx</i>	262
Figura 105. Información general del cebador qPCR_DSX1F.....	263
Figura 106. Horquillas del cebador qPCR_DSX1F.....	263
Figura 107. Homodímeros del cebador qPCR_DSX1F.....	264
Figura 108. Heterodímeros del cebador qPCR_DSX1F.....	265
Figura 109. Información general del cebador qPCR_DSX1R.....	266
Figura 110. Horquillas del cebador qPCR_DSX1R.....	266
Figura 111. Homodímeros del cebador qPCR_DSX1R.....	267
Figura 112. Heterodímeros del cebador qPCR_DSX1R.....	268
Figura 113. Información general del cebador qPCR_DSX2F.....	268
Figura 114. Horquillas del cebador qPCR_DSX2F.....	269
Figura 115. Homodímeros del cebador qPCR_DSX2F.....	269
Figura 116. Heterodímeros del cebador qPCR_DSX2F.....	270
Figura 117. Información general del cebador qPCR_DSX2R.....	271
Figura 118. Horquillas del cebador qPCR_DSX2R.....	271
Figura 119. Homodímeros del cebador qPCR_DSX2R.....	272
Figura 120. Heterodímeros del cebador qPCR_DSX2R.....	273
Figura 121. Regresión lineal obtenida del qPCR de los cebadores a diferentes concentraciones.....	274
Figura 122. Curva de amplificación de <i>Dsx</i> réplica 1 en qPCR.....	275
Figura 123. . Prueba de independencia de datos para diferentes estadios de <i>An, albimanus</i>	276
Figura 124. Análisis de gráfico de amplificación de PCR en tiempo real.....	288
Figura 125. Mapa de carga.....	289
Figura 126. Forma de colocar placa de termociclador lightCycler.....	290
Figura 127. Estadística descriptiva sobre los diferentes métodos utilizados para la inactivación de la bacteria productora de ARNdh en <i>BOULE</i>	295
Figura 128. Estadística descriptiva sobre la concentración de ARNdh antes y después de la inactivación de la bacteria por ebullición por 15 min y concentrando el ARNdh de los distintos tratamientos.....	296
Figura 129. Curva de fusión de los cebadores de <i>zpg</i> a una concentración de 0.4uM.....	298
Figura 130. Curva de fusión de los cebadores de <i>zpg</i> a una concentración de 0.6 y 0.3uM.....	299
Figura 131. Curva de fusión de los cebadores de <i>zpg</i> a una concentración de 0.2uM.....	300
Figura 132. Curva de fusión de los cebadores de <i>zpg</i> a una concentración de 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa.....	301
Figura 133. Curva de fusión de los cebadores de <i>zpg</i> a una concentración de 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa de una dilución de 1:25 a 1:250.....	301
Figura 134. Curva estándar y de fusión de cebadores de genes de referencia (<i>RpS4</i> y <i>RpL49</i>) a una concentración de 0.33uM.....	302
Figura 135. Curva de fusión de los cebadores de <i>ZPG</i> a una concentración de 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa de una dilución de 1:10 a 1:150.....	303
Figura 136. Curva estándar y de fusión de cebadores de genes de referencia (<i>RpS4</i> y <i>RpL49</i>) a una concentración de 0.33uM.....	303
Figura 137. Vector utilizado en clonación de 3'-UTR.....	321
Figura 138. Cebadores M13.....	321
Figura 139. Prueba de normalidad.....	333
Figura 140. Histograma de distribución de los datos de expresión relativa.....	333

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Especies hospederas de <i>Anastrepha ludens</i>	9
Cuadro 2. Secuencias de los cebadores para la clonación y producción de ARNdh de <i>zpg</i> y <i>boule</i>	39
Cuadro 3. Secuencia de los cebadores del control interno del estudio: <i>ANT</i>	41
Cuadro 4. Secuencia de cebadores del gen de <i>actina</i>	41
Cuadro 5. Secuencia de cebadores de genes de referencia para evaluación de <i>zpg</i> en qPCR.....	42
Cuadro 6. Número de individuos de <i>Anopheles albimanus</i> utilizados.....	44
Cuadro 7. Variables de interés en el presente estudio.....	45
Cuadro 8. Concentraciones y cantidades de los componentes de la reacción de qPCR para evaluación de eficiencia de cebadores 0.4uM.....	59
Cuadro 9. Concentraciones y cantidades de los componentes de la reacción de qPCR para evaluación de eficiencia de cebadores 0.6uM.....	59
Cuadro 10. Cantidades utilizadas para realizar el master mix para el PCR en tiempo real.....	60
Cuadro 11. Tratamientos y resultados.....	70
Cuadro 12. Matriz de correlación.....	70
Cuadro 13. Características de cebadores diseñados con PrimerQuest y Primer3 para hacer análisis de genes de referencia <i>RpS4</i> , <i>RpL49</i> y <i>GAPDH</i> en qPCR.....	73
Cuadro 14. Especificaciones y características de amplificación de genes de referencia candidatos.....	74
Cuadro 15. Ranking de genes candidatos utilizando NormFinder.....	78
Cuadro 16. Estadística descriptiva de BestKeeper de tres genes de referencia basados en sus valores de punto de umbral (Ct).	79
Cuadro 17. Concentraciones de ARNdh del gen <i>Boule</i> según diferentes métodos de inactivación.....	83
Cuadro 18. Eficiencias obtenidas de los cebadores de <i>zpg</i> a diferentes concentraciones.....	96
Cuadro 19. Expresión relativa de <i>zpg</i> y combinación <i>zpg</i> más <i>boule</i>	101
Cuadro 20. Nombre y secuencia de los cebadores diseñados para amplificar el gen de <i>zpg</i> de <i>A. albimanus</i>	103
Cuadro 21. Características de los cebadores diseñados para amplificar el gen de <i>zpg</i> de <i>A. albimanus</i>	103
Cuadro 22. Nombre y secuencia de los cebadores diseñados para amplificar <i>fzo</i> y <i>gas8</i> de <i>A. albimanus</i> .	106
Cuadro 23. Características de los cebadores diseñados para amplificar los genes de <i>fzo</i> y <i>gas8</i> de <i>A. albimanus</i> en Reacción de Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).....	107
Cuadro 24. Características de los cebadores diseñados para ARNdh los genes de <i>fzo</i> y <i>gas8</i> de <i>A. albimanus</i>	108
Cuadro 25. Secuencias y códigos de los cebadores para clonación de <i>nht</i> de <i>A. albimanus</i>	112
Cuadro 26. Características de los cebadores diseñados para clonar el gen <i>nht</i>	112
Cuadro 27. Secuencias de cebadores para amplificar <i>nht</i> de ADNc de <i>A. albimanus</i> en PCR tiempo real.	113
Cuadro 28. Características de cebadores diseñados para amplificación de <i>nht</i> en PCR tiempo real.....	113
Cuadro 29. Nombre y secuencia de los cebadores diseñados para amplificación del gen <i>Dsx</i>	114
Cuadro 30. Características de los cebadores diseñados para la amplificación de <i>Dsx</i>	115
Cuadro 31. Concentraciones obtenidas por estadio en cada réplica biológica.....	116
Cuadro 32. Características de cebadores diseñados a partir de regiones conservadas de <i>actina</i>	129
Cuadro 33. Tamaños de bandas obtenidas en cada estadio por amplificación con 3'RACE.....	130
Cuadro 34. Comparación de volúmenes calculados de bandas con aparente sesgo por sexo según cada estadio.....	132
Cuadro 35. ANOVA para comparación de volúmenes calculados.....	132
Cuadro 36. Pesos moleculares obtenidos en productos de PCR de ligaciones.....	144

Cuadro 37. Colonias seleccionadas para segunda ligación y clonación.....	145
Cuadro 38. Tamaños de bandas observadas en el gel anterior.....	146
Cuadro 39. Tamaños de bandas de interés.....	147
Cuadro 40. Valores Ct de gen candidato <i>GAPDH</i>	169
Cuadro 41. Valores Ct de gen candidato <i>RpS4</i>	170
Cuadro 42. Valores Ct de gen candidato <i>RpL49</i>	171
Cuadro 43. Valores Ct sin procesar de genes candidatos de todos los estadios de <i>A. albimanus</i>	171
Cuadro 44. Extracción de ARN de <i>Anopheles albimanus</i>	174
Cuadro 45. Concentraciones de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de incubación a 100°C por 1 hora.....	181
Cuadro 46. Concentraciones de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de incubación a 70°C por 1 hora y 30 minutos, incubación con estreptomycin y ebullición por 5 minutos.....	182
Cuadro 47. Concentraciones de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de ebullición a 10 minutos con diferentes tiempos de centrifuga.....	182
Cuadro 48. Concentración de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de ebullición a 15 minutos con freidora.....	183
Cuadro 49. Concentración de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de ebullición a 15 minutos con freidora y concentrando más el ARNdh, suspendiendo a la mitad del volumen inicial con agua ultrapura (Fue el alimento que se utilizó para alimentar a las larvas de <i>A. albimanus</i>).....	184
Cuadro 50. Concentración de ARN total extraído de la primera réplica biológica de un grupo de 5 pupas macho.....	186
Cuadro 51. Datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de <i>ZPG</i> 0.4uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.....	187
Cuadro 52. Datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de <i>zpg</i> 0.3uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.....	187
Cuadro 53. Datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de <i>zpg</i> 0.6uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.....	188
Cuadro 54. Datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de <i>zpg</i> 0.2uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.....	189
Cuadro 55. Resumen de los datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de <i>zpg</i> 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante, usando dilución 1:25, 1:50, 1:100, 1:2.....	189
Cuadro 56. Resumen de los datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de <i>zpg</i> 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante, usando dilución 1:10, 1:25, 1.....	190
Cuadro 57. Expresión de <i>zpg</i> en dilución 1:25-1:250.....	194
Cuadro 58. Expresión de <i>ZPG</i> en dilución 1:10-1:150.....	194
Cuadro 59. Reacción de PCR de colonias.....	213
Cuadro 60. Volúmen de medios y antibióticos a agregar.....	216
Cuadro 61. Individuos por extracción.....	223
Cuadro 62. Mezcla de reactivos.....	224
Cuadro 63. Muestra registro de datos.....	226
Cuadro 64. Muestras de ARN.....	228
Cuadro 65. Volúmenes utilizados para hacer PCR.....	230
Cuadro 66. Condiciones de termociclador.....	230
Cuadro 67. Preparación de reacción de Transcriptasa Reversa.....	231
Cuadro 68. Volúmenes utilizados para hacer PCR.....	232
Cuadro 69. Programa termociclador.....	232
Cuadro 70. Master mix.....	233
Cuadro 71. Programa de PCR para verificar presencia de ADN genómico y cDNA.....	233
Cuadro 72. Master mix para qPCR.....	236

Cuadro 73. Programa para qPCR.....	237
Cuadro 74. Temperatura melting para qPCR.....	237
Cuadro 75. Concentraciones de ARNdh de <i>Boule</i> en el cultivo bacteriano justo después de inducir y después del primer lavado.....	238
Cuadro 76. Datos crudos de PCR tiempo real de <i>Boule</i> para evaluación de eficiencia de cebadores.....	239
Cuadro 77. Datos crudos de PCR tiempo real de genes <i>Boule</i> , <i>RPL49</i> y <i>RpS4</i>	240
Cuadro 78. Análisis de cuantificación relativa de <i>Boule</i> en muestras de pupas macho de <i>A. albimanus</i> ...	245
Cuadro 79. Promedio de la expresión relativa de <i>Boule</i> en las seis réplicas analizadas de pupas macho de <i>A. albimanus</i> para cada tratamiento.	245
Cuadro 80. Estructuras secundarias posibles formadas por los cebadores diseñados para clonar el gen <i>nht</i>	253
Cuadro 81. Estructuras secundarias posibles formadas por los cebadores diseñados para amplificación de <i>nht</i> en PCR tiempo real.....	258
Cuadro 82. Nombre y secuencia de los cebadores diseñados para amplificación del gen <i>Dsx</i>	261
Cuadro 83. Datos obtenidos de qPCR con diferentes concentraciones de cebadores. Los datos en el cuadro 9 representan los valores obtenidos de los cebadores a diferentes concentraciones, este análisis se llevó a cabo con el software Excel.	274
Cuadro 84. Prueba de normalidad de datos de Shapiro -Wilk para diferentes estadios de <i>A. albimanus</i> ..	275
Cuadro 85. Prueba de homogeneidad de varianzas de Brown- Forythe para diferentes estadios de <i>Dsx</i> ...	276
Cuadro 86. Número de individuos utilizados.....	279
Cuadro 87. Preparación de reacción de Transcriptasa Reversa.....	285
Cuadro 88. Volúmenes de master mix.....	285
Cuadro 89. Programa de PCR usado.....	286
Cuadro 90. Master mix para qPCR.....	289
Cuadro 91. Programa para qPCR.....	290
Cuadro 92. Temperatura de melting en qPCR.....	290
Cuadro 93. Concentraciones de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de incubación a 100°C por 1 hora.....	291
Cuadro 94. Concentraciones de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de incubación a 70°C por 1 hora y 30 minutos, incubación con estreptomycin y ebullición por 5 minutos.....	292
Cuadro 95. Concentraciones de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de ebullición a 10 minutos con diferentes tiempos de centrifuga.....	293
Cuadro 96. Concentración de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de ebullición a 15 minutos con freidora.....	294
Cuadro 97. Concentración de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de ebullición a 15 minutos con freidora y concentrando más el ARNdh, suspendiendo a la mitad del volumen inicial con agua ultrapura.....	294
Cuadro 98. Concentración de ARN total extraído de la primera réplica biológica de un grupo de 5 pupas macho.	296
Cuadro 99. Datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de ZPG 0.4uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.....	297
Cuadro 100. Datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de zpg 0.3uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.....	298
Cuadro 101. Datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de zpg 0.6uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.....	298
Cuadro 102. Datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de zpg 0.2uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.....	299
Cuadro 103. Resumen de los datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de zpg 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante, usando dilución 1:25, 1:50, 1:100, 1:250 y 1:500.....	300

Cuadro 104. Resumen de los datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de <i>zpg</i> 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante, usando dilución 1:10, 1:25, 1:50, 1:75 y 1:100.....	301
Cuadro 105. Expresión de <i>zpg</i> en dilución 1:25-1:250.....	304
Cuadro 106. Expresión de <i>ZPG</i> en dilución 1:10-1:150.....	304
Cuadro 107. Componentes de master mix.....	326
Cuadro 108. Componentes master mix.....	326
Cuadro 109. Condiciones de PCR.....	326
Cuadro 110. Reacción de PCR de colonias.....	329
Cuadro 111. Datos obtenidos para realización de eficiencia de los cebadores qPCRfemaleUTR_2F y qPCRfemaleUTR_2R en diferentes diluciones utilizando pupa hembra como estadio de prueba.....	330
Cuadro 112. Datos de $\Delta\Delta CT$ de valores CT usando el gen de Referencia <i>RPL49</i>	330
Cuadro 113. Datos de $\Delta\Delta CT$ de valores CT usando el gen de Referencia <i>RPS4</i>	331
Cuadro 114. Datos de $\Delta\Delta CT$ de valores CT usando el promedio de los genes de referencia <i>RPL49</i> y <i>RPS4</i>	332
Cuadro 115. Prueba de Bartlett y Shapiro para verificación de normalidad de los datos.....	333
Cuadro 116. Prueba de Kruskal-Wallis de Expresión relativa para comparar entre estadios y réplicas biológicas.	334
Cuadro 117. Comparación de Expresión relativa en los estadios evaluados utilizando prueba de Dunn con método de Bonferroni.	334

LISTADO DE ABREVIATURAS

- *A. albimanus*: *Anopheles albimanus*
- ABC: Alimento Bacteriano Compuesto
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNc: ADN complementario
- AH: adulto hembra.
- AM: adulto macho.
- Amp: ampicilina.
- *ANT*: *Arabidopsis thaliana*
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNdh: ARN de doble hebra.
- ARNi: ARN de interferencia
- ARNsh: ARN de hebra simple.
- Carb: carbenicilina
- DSA: Dnase Stop Solution
- Dsx: Doublesex
- *E. coli* HT115 (DE3) pGEM-T-Amp^r-*ANT*: cepa de *Escherichia coli* transformada genéticamente con el plásmido pGEM-T Easy Vector-*ANT*, que le provee resistencia a ampicilina y la capacidad de expresar ARNdh del gen *ANT* de *A. albimanus*.
- *E. coli* HT115 (DE3) pGEM-T-Amp^r-*Boule*: cepa de *Escherichia coli* transformada genéticamente con el plásmido pGEM-T Easy Vector -*Boule*, que le provee resistencia a ampicilina y la capacidad de expresar ARNdh del gen *Boule* de *A. albimanus*.
- *E. coli* HT115 (DE3) pGEM-T-Amp^r-*ZPG*: cepa de *Escherichia coli* transformada genéticamente con el plásmido pGEM-T Easy Vector -*ZPG*, que le provee resistencia a ampicilina y la capacidad de expresar ARNdh del gen *ZPG* de *A. albimanus*.
- *fzo*: *Fuzzy onions*
- *gas8*: *Growth arrest specific protein 8*
- IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.
- L3: estadio larval 3.
- L4 tar: estadio larval 4 tardío.
- L4 tem: estadio larval 4 temprano (es considerado en este estadio el mismo cuando acaba de emerger).
- LB: medio de cultivo Lauria Bertani.

- O/N: toda la noche
- OD₆₀₀: densidad óptica, por sus siglas en inglés, medida a 600 nm.
- pb: pares de bases
- PH: pupa hembra.
- PM: pupa macho.
- qPCR: Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real.
- R1: réplica biológica 1
- R2: réplica biológica 2
- R3. Réplica biológica 3
- RPM: revoluciones por minuto
- RT-PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real de la Retrotranscriptasa reversa
- SDS: dodecilsulfato sódico
- SIT: técnica del insecto estéril, por sus siglas en inglés.
- Tet: tetraciclina
- UDG: glicosilasas de uracilo de ADN
- UV: ultravioleta
- ZPG: *Zero population growth*

RESUMEN

Los vectores son organismos vivos que pueden transmitir enfermedades infecciosas entre personas o de animales a personas, a demás existen vectores que pueden dañar plantaciones y causar pérdidas económicas. La mosca de la fruta se caracteriza por ovipositar debajo de la piel de la fruta por que ya no es apta para el consumo humano o su exportación. Por otro lado, la malaria es una de las enfermedades más mortales del mundo, es causada por los parásitos del género *Plasmodium*, transmitidos por la picadura de mosquitos hembra de *Anopheles*. En Guatemala, la mosca de fruta (*Anastrepha ludens*) es una de las principales plagas en frutos, y *Anopheles albimanus* es el principal vector de malaria.

A pesar de que se ha logrado disminuir la transmisión de malaria en el país aún no ha sido posible su erradicación; debido a que las técnicas utilizadas se basan en el uso de insecticidas y los mosquitos han desarrollado resistencia a los mismos. Por lo que es necesario el uso de técnicas alternativas como, la técnica del insecto estéril (SIT por sus siglas en inglés) la cual ya es utilizada en Guatemala para la mosca de fruta. Esta técnica consiste en la creación masiva de machos estériles por medio de radiación que luego son liberados al ambiente. La producción de machos estériles puede incrementarse al silenciar genes como *Boule* y *Zpg*, involucrados en espermatogénesis del insecto por medio de ARN de interferencia. Además, SIT requiere de un sexado genético ya que el fin del método es la liberación de machos y no de hembras debido a que son las causantes de la transmisión de la enfermedad por lo que sería contraproducente su liberación. Este sexado puede llevarse a cabo al silenciar genes como *Transformer- 2*, *Doublesex* y actina de músculo de vuelo al afectar específicamente a las hembras. El SIT es un método que se ha utilizado en moscas y no en mosquitos, sin embargo, es un proceso que causa daño fisiológico y que limita su competitividad en contra de poblaciones silvestres.

Debido a esto, se propuso la evaluación de radiación gamma en dosis parciales realizadas en *Anastrepha ludens*; y el uso de ARN de interferencia (ARNi) para disminuir la expresión de genes involucrados en la espermatogénesis del mosquito macho y la evaluación de la expresión relativa de genes candidatos en la eliminación de hembras, ambas para *Anopheles albimanus*. En la evaluación de radiación Gamma se probaron tres diferentes tratamientos de lo cuales se obtuvo porcentajes de eclosión de *Ana. ludens* menores al 1%, produciendo moscas estériles.

I. INTRODUCCIÓN

Algunos insectos son causantes de diversas plagas y enfermedades que afectan al ser humano. Las moscas de fruta representan una amenaza a la producción de frutas a nivel global. En Guatemala *Anastrepha ludens* es la mosca de fruta con mayor presencia en varias regiones y a pesar de esto no existe un programa de control a nivel nacional ni por métodos convencionales ni por la técnica del insecto estéril. El control de la plaga a nivel local conlleva el uso de grandes cantidades de pesticida, que logra controlar las plagas en pequeñas zonas, pero que terminan causando un gran daño a los polinizadores y contaminando las fuentes de agua. Por medio de la crianza, esterilización y liberación de grandes cantidades de moscas diversos programas han logrado controlar poblaciones silvestres de moscas. La esterilización se realiza mediante la inducción de mutaciones dominantes letales en los cromosomas, provocada por la exposición a radiación gamma. Al mismo tiempo se reducen significativamente los impactos ambientales asociados al control químico. El daño que la exposición a rayos gamma ocasiona en las moscas hace que su desempeño sea limitado comparado con el de las moscas silvestres y moscas de laboratorio no irradiadas. La administración de la dosis de forma parcial permitiendo un tiempo entre las dosis, puede ser una solución para mejorar el desempeño de las moscas irradiadas.

La malaria es una enfermedad que continúa siendo uno de los problemas de salud pública en la actualidad, provocando más de un millón de muertes al año (OPS/OMS 2017). Es una enfermedad transmitida por los mosquitos del género *Anopheles* spp. infectados por el parásito de género *Plasmodium* spp. Actualmente en Guatemala, se conoce que el principal vector es la especie de *Anopheles albimanus*, reportándose un total de 531 casos, siendo el 85% en el departamento de Escuintla (Chávez 2017). Sin embargo, también se encuentran en riesgo los departamentos de Izabal, Alta Verapaz, Petén, Retalhuleu, Santa Rosa y Suchitepéquez. La población guatemalteca es susceptible a esta enfermedad, principalmente los habitantes del área rural e indígena comprendidos entre las edades de 15-19 años (Chávez 2017).

Las técnicas para la disminución y/o erradicación del vector que transmite malaria establecidas como radiación, insecticidas e RIDL, comprende un efecto de vital intervención en diferentes entornos epidemiológicos (Bhatt *et al* 2015). A pesar del éxito de los programas para el control de la malaria en el pasado, la malaria continúa siendo un problema público en varios países (OMS 2017). La técnica aplicada en este estudio, ARNi genera un silenciamiento específico de genes involucrados en espermatogénesis mediante la alimentación directa de ARNd_h a un organismo, sin modificarlo genéticamente (Dong *et al.* 2016). La técnica de ARNi podría ser una estrategia efectiva para contrarrestar la enfermedad de malaria en Guatemala y poder lograr el objetivo del Ministerio de Salud Pública y Asistencia social del país, el cual es la eliminación de malaria para el año 2020 (Chávez 2017) y a la vez sustituir el uso de insecticidas que últimamente han mostrado resistencia (Organización Mundial de la Salud 2016).

El estudio involucró en el desarrollo de técnicas innovadoras para el control de *Anopheles albimanus*, para esto se requirió encontrar los mejores genes candidatos de referencia, donde la estabilidad de expresión genética es un requisito importante para lograr la estandarización interna de los genes *bol*, *zpg*, *tra 2*, *actina* y *double sex* (Pfaffl & Hageleit 2001). Los genes *ZPG* y *Bol* se encuentran relacionados en la espermatogénesis, lo que los hace los candidatos para esterilizar machos de mosquitos *A. albimanus*. El gen *ZPG* es un componente estructural en las uniones de células de la línea germinal, el cual es requerido para la diferenciación y supervivencia de los quistes de la línea germinal en las hembras y de la espermatogonia en los machos. El gen *bol* está conservado entre todos los metazoos, además, está involucrado en el desarrollo de células germinales debido a que desempeña un papel crucial en la espermatogénesis.

Los genes *Tra-2* y *Double sex* están involucrados en la cascada de diferenciación sexual, lo que los hace candidatos para eliminar hembras *A. albimanus* (Sekiné *et al* 2015). El gen *Tra-2* es requerido para la determinación del sexo femenino en las células somáticas y para la espermatogénesis en las células germinales masculinas. El gen *Double sex (dsx)* es inusual entre los genes de determinación de sexo, sin embargo, este gen codifica la proteína *dsx* femenina de un promotor constitutivo y este es un regulador positivo de la diferenciación femenina y regulador negativo de la diferenciación masculina (Waterbury *et al* 1999). Otras estrategias para eliminar hembras *A. albimanus* fue determinar genes de actina específicos que afecte el músculo de vuelo. La estructura muscular de insectos presenta fibras musculares de actina y miosina (Barrera *et al* 2015). La actina es una proteína fibrosa y contráctil la cual está altamente conservada y concentrada.

El presente estudio se enfoca en el desarrollo de dos técnicas innovadoras para la mejora de la técnica del insecto estéril (SIT) en el control de *Anastrepha ludens* y *Anopheles albimanus*, mediante el uso de dosis parciales de radiación gamma y del silenciamiento de genes de interés, cara cada especie respectivamente.

II. JUSTIFICACIÓN

Los insectos del orden Diptera son los principales causantes de la transmisión de enfermedades, plagas y deterioro de cultivos agrícolas. La especie de mosca *Anastrepha ludens* es la causante de pérdidas de cultivos de frutas cítricas y mango. En Guatemala *Anastrepha ludens* es la mosca de fruta con mayor presencia en varias regiones y a pesar de esto no existe un programa de control a nivel nacional ni por métodos convencionales ni por la técnica del insecto estéril. *Anopheles albimanus* es un mosquito vector de la enfermedad de malaria, que aún es transmitida en Guatemala. En el 2016 se reportó un total de 531 casos, siendo el 85% en el departamento de Escuintla (Chávez 2017). Sin embargo, también se encuentran en riesgo los departamentos de Izabal, Alta Verapaz, Petén, Retalhuleu, Santa Rosa y Suchitepéquez (Chávez 2017). Aunque no se han presentado muertes, toda la población guatemalteca es susceptible a esta enfermedad, principalmente los habitantes del área rural e indígena comprendidos entre las edades de 15-19 años (Chávez 2017).

El control vectorial más utilizado en Guatemala para ambas especies es el uso de insecticidas como deltametrina. Sin embargo, el uso excesivo de insecticidas en la salud pública y en la agricultura ha dado paso a la aparición de resistencia en estos insectos. Esto pone en relieve la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de control. Debido a su importancia económica y humanitaria, se ha dado prioridad al desarrollo de métodos para el control de estos insectos. Entre estos existen métodos de irradiación, químicos y moleculares (Padilla, 2012).

La técnica del insecto estéril (SIT) ha sido efectiva en el control de plagas de agricultura y ganadería como la mosca mediterránea de la fruta (*Ceratitis capitata*), el gusano barrenador (*Cochliomyia hominivorax*) y la mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens*) (Benedict & Robinson 2003, Dame *et al* 2009). Esta técnica consiste en irradiar mosquitos macho para volverlos estériles y luego liberarlos en zonas focales para controlar la propagación de su especie al competir con machos silvestres en la copulación con hembras (Acuña 2017). El uso de SIT por irradiación ha resultado efectivo en moscas, sin embargo, no ha sido viable en mosquitos debido a que los especímenes irradiados pierden competitividad en el apareamiento a comparación de los machos silvestres. Además, hay mayor dificultad en realizar separaciones por sexo en mosquitos que en moscas, ya que no existe un método estandarizado para eliminar hembras sistemáticamente (Oliva *et al* 2014).

En ambos organismos es necesario realizar mejoras en SIT. En el caso de *A. ludens* es la aplicación de una posible ruta es la irradiación por dosis parciales de radiación gamma. En el caso de *A. albimanus* se han investigado metodologías alternas a la radiación como el ARNi, que genera un silenciamiento específico de genes como los involucrados en diferenciación sexual, reproducción y movilidad, sin modificarlo genéticamente (Dong *et al.* 2016). Una de sus ventajas es que no provoca un daño somático al mosquito,

por lo que es capaz de competir con los machos silvestres para aparearse con las hembras silvestres (Whyard, S. *et al.* 2015). Tomando en cuenta lo anterior, se considera que estas técnicas podrían ser estrategias efectivas para contrarrestar la presencia de malaria y las pérdidas de cultivos en Guatemala.

III. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Mejorar la técnica del insecto estéril (SIT) para su uso en el control de *Anastrepha ludens* y *Anopheles albimanus* por medio de cambios en dosis de radiación y silenciamiento por ARN de interferencia (ARNi)

B. Objetivos específicos:

1. Comparar la competitividad de machos de *Anastrepha ludens* esterilizados por medio de una sola dosis de radiación gamma y de los esterilizados por medio de varias dosis con la de machos salvajes.

2. Determinar el perfil de expresión de genes de referencia en diversos estadios de vida de *Anopheles albimanus*.

3. Identificar un gen de actina cuya expresión sea exclusiva en el músculo de vuelo de hembras de *Anopheles albimanus*

4. Determinar el perfil de expresión de *Transformer-2*, *dsx* y *actina* en los diferentes estadios (L3, L4, pupas hembras, pupas machos, adultos hembras y machos, ovarios y testículos) de *Anopheles albimanus*.

5. Silenciar los genes *zero population growth (zpg)* y *Boule* en *Anopheles albimanus* mediante ARN de interferencia e identificar posibles genes de espermatogénesis para su posterior silenciamiento.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Plagas causadas por vectores: *Anastrepha ludens*

Las moscas de la fruta se han estudiado con bastante detalle, esto se debe a que estas tienen un gran impacto en la economía global. Las moscas de la fruta pertenecen al orden Díptera un grupo con alta adaptabilidad, se clasifican en la familia Tephritidae donde hay 977 especies diferentes, *Anastrepha ludens* también conocida como la mosca mexicana de la fruta es una de las especies con mayor impacto económico de la familia. (Hernandez-Ortiz y Guillén-Aguilar, 2010). La presencia de *Anastrepha ludens* se ha reportado en Guatemala, Honduras, El Salvador, Belice, Estados Unidos, México y Costa Rica (Hernandez-Ortiz y Aluja, 1993). *Anastrepha ludens* usa como hospedero para sus huevos frutos de cítricos de diferentes especies (Toledo y Liedo, 2001).

1. Reproducción y ciclo de vida

a. Reproducción de *Anastrepha ludens*. *Anastrepha ludens* es una peste común de cítricos y mangos entre otros árboles frutales. Luego de ser fecundada la mosca oviposita en fruta. Generalmente es bivoltina, aunque se han contabilizado años en los cuales se han dado tres generaciones (Thomas, 2003). Las hembras suelen reproducirse una sola vez, sin embargo, si el macho no logra proveer suficiente esperma puede que esta se reproduzca de nuevo este comportamiento se ha reportado en otras especies del género (Sivinski, 1988).

b. Ciclo de vida. El ciclo de vida de *Anastrepha ludens* está compuesto de 4 etapas y a lo largo de estas hace metamorfosis completa.

1) Huevos: Una hembra pone de 100 a 800 huevos por ovoposición. Los huevos son ovipositados en el interior de alguna fruta, luego de 6-12 días los huevos eclosionan (Weems *et al* 2001).

2) Larvas: Luego de la eclosión del huevo está el periodo larval, en este periodo las larvas atravesarán 3 estadios larvales en un tiempo de entre 3 a 4 semanas (Carroll y Wharton, 1989). En este periodo ellas se alimentan del fruto en el que nacieron. Son de color blanquecino y generalmente llegan a medir hasta 12mm de longitud (CABI Y EPPO, 2008).

3) Pupas: Posterior a esto está la etapa de pupa, las moscas estarán en forma de pupa durante 15-19 días. Luego de la pupa las moscas emergerán de la pupa para convertirse en adultos (Weems *et al* 2001). Las pupas son de forma cilíndrica, su color puede variar entre un color pálido a un color rojo oscuro (Green, 1929). En el caso de las pupas Familia 10 que se utilizan en Moscamed la cepa es de sexado genético, los machos tienen una coloración café mientras que las hembras tienen un color negro oscuro.

4) *Adultos*: Los adultos tienen la característica de vivir largas cantidades de tiempo lo que hace que el control de la especie sea más complicado. Se ha reportado que los adultos pueden llegar a vivir hasta 11 meses. Son de color café amarillento y de mayor tamaño que las moscas caseras (Weems *et al*, 2001)

Figura 1. Adultos de *Anastrepha ludens*

Fuente: United States Department of Agriculture (USDA), 2007

2. Distribución *Anastrepha ludens*

a. **A nivel mundial.** La mosca mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens*, es originaria de México y Centro América, su distribución original llega hasta Costa Rica. Actividades agrícolas a nivel internacional han facilitado que la distribución de esta aumente. En Arizona, Texas y Florida se han realizado campañas para lograr que Estados Unidos esté libre de la plaga (Nappo, 2012). La presencia de esta mosca se reportó en Colombia, sin embargo, la mosca había sido identificada incorrectamente como *Anastrepha ludens*, por lo que no se toma en cuenta en la distribución (Nuñez Bueno, 1981). En Guatemala la presencia de *Anastrepha ludens* es alta, se puede encontrar en varios hospederos en muchas zonas del país. En algunas zonas esta es la mosca de la fruta de mayor abundancia (CABI y EPPO, 2008).

b. **A nivel local.** La mosca mexicana de la fruta es nativa de Guatemala también, por lo que es común encontrarla. En 1988 se realizó un estudio en diferentes lugares de Guatemala en búsqueda de moscas de fruta. Se encontraron muestras de *Anastrepha ludens*, *Anastrepha obliqua*, *Anastrepha fraterculus* y *Ceratitis capitata*. *A. obliqua* y *A. fraterculus* eran las causantes del 1% de las infestaciones, *C. capitata* era responsable de 1% de las infestaciones, el resto de las infestaciones encontradas eran de *Anastrepha ludens* con un 98% de las infestaciones totales (Eskafi, 1988).

En 1975 inició el programa Moscamed en Guatemala. Este programa se dedica a la crianza de moscas a gran escala, para esterilizarlas y posteriormente enviarlas a diferentes partes del mundo para su liberación. Con unas cuantas pupas importadas de Viena se inició la producción de *Ceratitis capitata*. Actualmente Guatemala es uno de los mayores productores a nivel global de moscas estériles tanto de *C. capitata* como de *Anastrepha ludens* (Tween, 2002).

3. Daños cultivos. Las moscas de la fruta se caracterizan por ovipositar debajo de la piel de la fruta. Una vez ha sido infestada la fruta esta ya no es apta para consumo humano ni para la exportación. Es de interés de los agricultores poder exportar hacia otros mercados, esto hace que la fruta se venda a un mejor precio. En el caso de que un lote de frutas este infestado con moscas de la fruta, el contenedor entero se pone en cuarentena y se esteriliza y descarta la fruta. Además de representar pérdidas económicas inmediatas, al suceder esto se prohíben importaciones de dicho país lo que afecta a la economía del lugar a una mayor escala (Puente, 2009).

Las moscas Hospederas: *Anastrepha ludens* tiene la característica de que puede utilizar una gran variedad de frutas para ovipositar, esto hace que el control y la erradicación de la plaga sean más complicado (CABI y EPPO, 2008). Algunos de los hospederos conocidos de *Anastrepha ludens* son:

Cuadro 1. Especies hospederas de *Anastrepha ludens*

Especie	Familia
<i>Anacardium occidentale</i>	Anacardiaceae
<i>Annona cherimola</i>	Annonaceae
<i>Annona reticulata</i>	Annonaceae
<i>Annona squamosa</i>	Annonaceae
<i>Carica papaya</i>	Caricaceae
<i>Casimiroa edulis</i>	Rutaceae
<i>Casimiroa tetrameria</i>	Rutaceae
<i>Citrus aurantiifolia</i>	Rutaceae
<i>Citrus máxima</i>	Rutaceae
<i>Citrus aurantium</i>	Rutaceae
<i>Citrus limetta</i>	Rutaceae
<i>Citrus x paradisi</i>	Rutaceae
<i>Citrus medica</i>	Rutaceae
<i>Citrus reticulata</i>	Rutaceae
<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae
<i>Coffea arabica</i>	Rubiaceae
<i>Diospyros kaki</i>	Ebenaceae
<i>Feijoa sellowiana</i>	Myrtaceae
<i>Inga spp.</i>	Fabaceae
<i>Malus domestica</i>	Rosaceae
<i>Malus pumila</i>	Rosaceae

Continúa cuadro 1...

Continuación cuadro 1:

Especie	Familia
<i>Mammea americana</i>	Clusiaceae
<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae
<i>Sideroxylon capiri</i>	Sapotaceae
<i>Passiflora edulis</i>	Passifloraceae
<i>Persea americana</i>	Lauraceae
<i>Pouteria sapota</i>	Sapotaceae
<i>Prunus pérsica</i>	Rosaceae
<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae
<i>Psidium littorale</i>	Myrtaceae
<i>Punica granatum</i>	Punicaceae
<i>Pyrus communis</i>	Rosaceae
<i>Sargentia greggii</i>	Rutaceae
<i>Spondias purpurea</i>	Anacardiaceae
<i>Syzygium jambos</i>	Myrtaceae

Fuente: Modificado de White and Elson-Harris 1992 y Hernandez-Ortiz 1992.

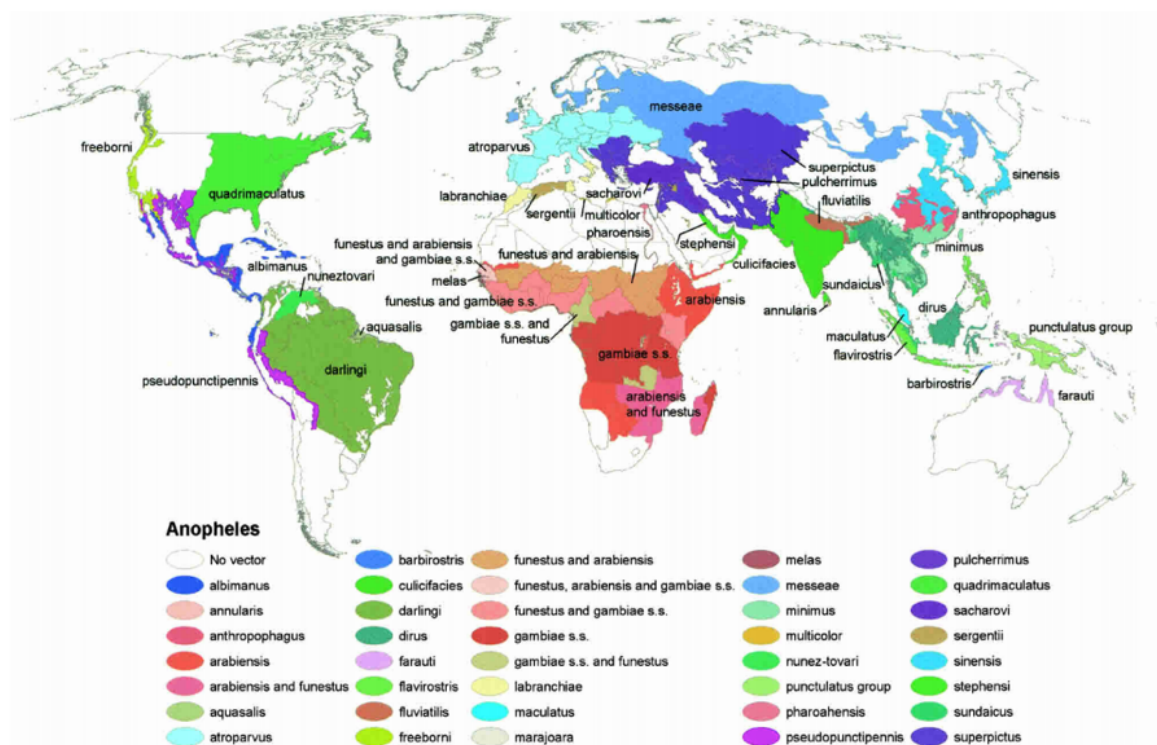
B. Plagas causadas por vectores: *Anopheles* spp., Malaria

También conocida como paludismo, es una enfermedad grave que puede llegar a provocar la muerte. Es causada por parásitos que se transmiten a través de las picaduras de mosquitos hembra del género *Anopheles* infectados. El parásito que lo transmite es del género *Plasmodium* siendo los más amenazantes: *Plasmodium falciparum* o *Plasmodium vivax* (Carabello, 2014). El primero es el más prevalente en el continente africano y responsable de la mayoría de las muertes relacionadas con malaria a nivel mundial. El segundo es un parásito dominante de la malaria en la mayoría de los países fuera del África subsahariana (OMS, 2017).

La malaria se caracteriza por ser una enfermedad febril aguda. Los síntomas generalmente aparecen entre 10-15 días después de la picadura del mosquito. Los primeros síntomas son fiebre, dolor de cabeza y escalofríos. Estos pueden ser leves y difíciles de reconocer como para adjudicarse a malaria (Nadjm & Behrens, 2012). Sin embargo, en el caso de *P. falciparum* si no se trata en 24h puede ser grave y conducir a la muerte. En el caso de los niños, se presentan síntomas como anemia severa, dificultad respiratoria en relación con la acidosis metabólica o malaria cerebral. En adultos, la participación de múltiples órganos es muy frecuente (OMS, 2017). En países donde no es muy común la enfermedad, se suele atribuir estos síntomas comúnmente a gripe u otras infecciones, por lo que no se diagnostican como malaria y la enfermedad puede seguir agravándose hasta causar la muerte (CDC, 2015).

1. Vector que transmite la malaria a humanos: Los insectos del género *Anopheles* son los responsables de la transmisión de diversas enfermedades como filariasis y malaria. Existen más de 400 especies diferentes; pero alrededor de 30 son vectores de malaria (OMS, 2017). Su distribución es a nivel mundial exceptuando el continente de Antártica, como se observa en la Figura 2.

Figura 2. Distribución mundial de *Anopheles*



Fuente: Kiszewski *et al.*, 2004.

Anopheles albimanus fue descrito originalmente por Wiedemann en 1820, a partir de especímenes recolectados en Santo Domingo, República Dominicana. Es una de las especies predominantes más abundantes de tierras bajas tropicales a elevaciones de menos de 100 metros sobre el nivel del mar (Pinault & Hunter, 2012). Su distribución geográfica se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Perú, incluyendo las islas de Antigua, Bahamas, Barbados, Barbuda, Caimán, Cuba, los Cayos de Florida, Guadalupe, República Dominicana, Haití y Jamaica (Bejarano, 2003).

2. Ciclo de vida de *Anopheles*: Los mosquitos del género *Anopheles* pasan por cuatro etapas de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 3). Las primeras tres etapas son acuáticas y duran de 5 a 14 días, dependiendo de la especie y temperatura (Mandal, 2015). La etapa adulta, para el caso de las hembras pueden vivir hasta un mes (o más en cautiverio) pero lo más probable es que no vivan más de 1 a 2 semanas en la naturaleza. Se alimentan de azúcar para obtener energía, pero requieren de sangre para el

desarrollo de los huevos; mientras que los machos viven alrededor de una semana alimentándose de néctar y otras fuentes de azúcar (CDC, 2016).

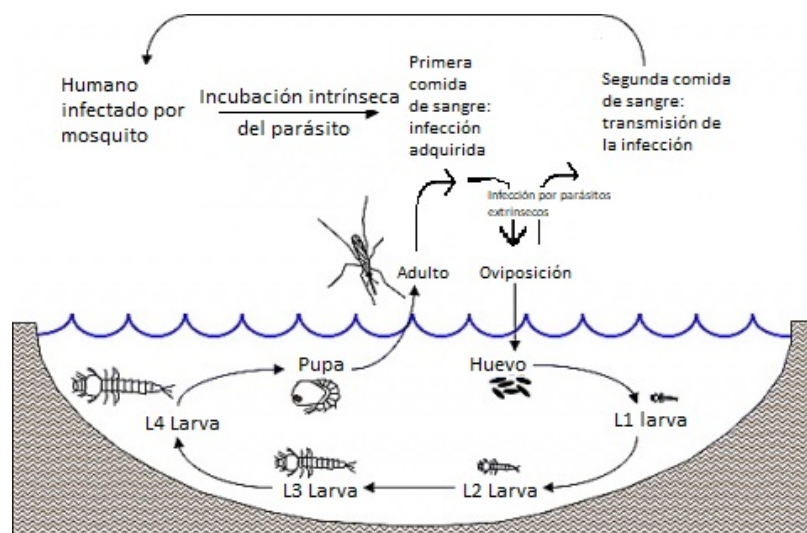
a. Huevos: Las hembras ponen de 50 a 200 huevos por oviposición. Los huevos se ponen individualmente directamente sobre el agua. Estos se caracterizan por poseer flotadores a cada lado. Eclosionan en 2 a 3 días en condiciones óptimas (CDC, 2016)

b. Larvas: Tienen una cabeza bien desarrollada con cepillos bucales que se usan para alimentarse, un tórax grande y un abdomen segmentado. Carecen de un sifón respiratorio en comparación con otros mosquitos y por esta razón se colocan de manera que su cuerpo esté paralelo a la superficie del agua. Respiran a través de espiráculos localizados en el 8º segmento abdominal (Becker *et al.*, 2013). Estas se sumergen bajo la superficie cuando se les molesta y nadan ya sea por movimientos bruscos de todo el cuerpo o por propulsión con los cepillos bucales. Se desarrollan a través de 4 instares (L1, L2, L3 y L4) (Mandal, 2015) Al final de cada instar, las larvas mudan, desprendiendo su exoesqueleto o piel, para permitir un mayor crecimiento. Su hábitat se ve influenciado por agua limpia ya sea dulce, salada, manglares, arroyos o ríos. Prefieren la vegetación, pero también pueden reproducirse en piscinas abiertas, iluminadas por el sol o en sitios sombreados de cría en los bosques o agujeros en los árboles (CDC, 2016).

c. Pupas: Tienen forma de coma. Su cabeza y el tórax se fusionan en un cefalotórax con el abdomen curvándose por debajo. Salen a la superficie con frecuencia para respirar a través de un par de trompetas respiratorias en el cefalotórax (Rey, 2006). Después de unos días de pupa, la superficie dorsal se divide y emerge a adulto (CDC, 2016).

d. Adultos: Poseen un cuerpo delgado con tres secciones: cabeza (información sensorial y para alimentación), tórax (locomoción) y abdomen (digestión y desarrollo de huevos) (CDC, 2016).

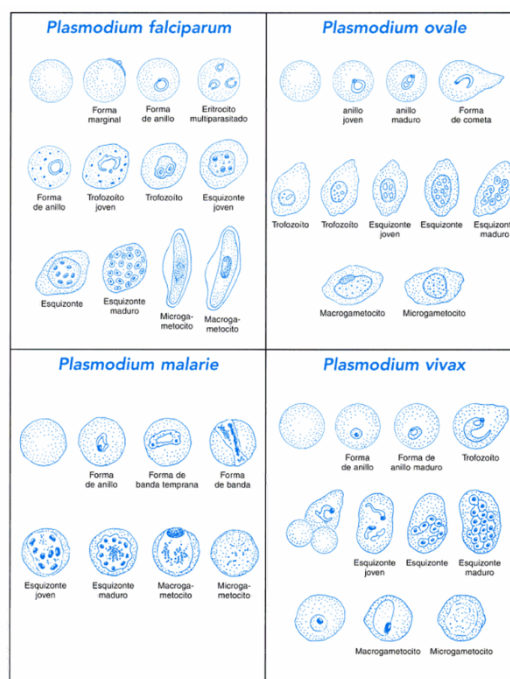
Figura 3. Ciclo de vida de *Anopheles*



Fuente: Modificado de Yamana, s.f..

3. Parásito: *Plasmodium* es un género perteneciente al subphylum *Apicomplexa*. Se conocen más de 100 especies de *Plasmodium* que infectan a mamíferos, aves, reptiles, pero sólo cuatro infectan al hombre (ver Figura 4). *Plasmodium vivax*, es el parásito de la malaria humano más ampliamente distribuido fuera de las regiones subsaharianas de África, se caracteriza por distribuirse en regiones templadas y es el causante de grandes tasas de morbilidad y mortalidad (Snow *et al.*, 2005). *Plasmodium falciparum*, produce las formas más graves y es muy importante en África Subsahariana y en áreas tropicales. *Plasmodium ovale*, se localiza casi sólo en África y *Plasmodium malariae*, se ubica en África, Latinoamérica y Nueva Guinea (Romero 2007).

Figura 4. Formas eritrocitarias de *Plasmodium*

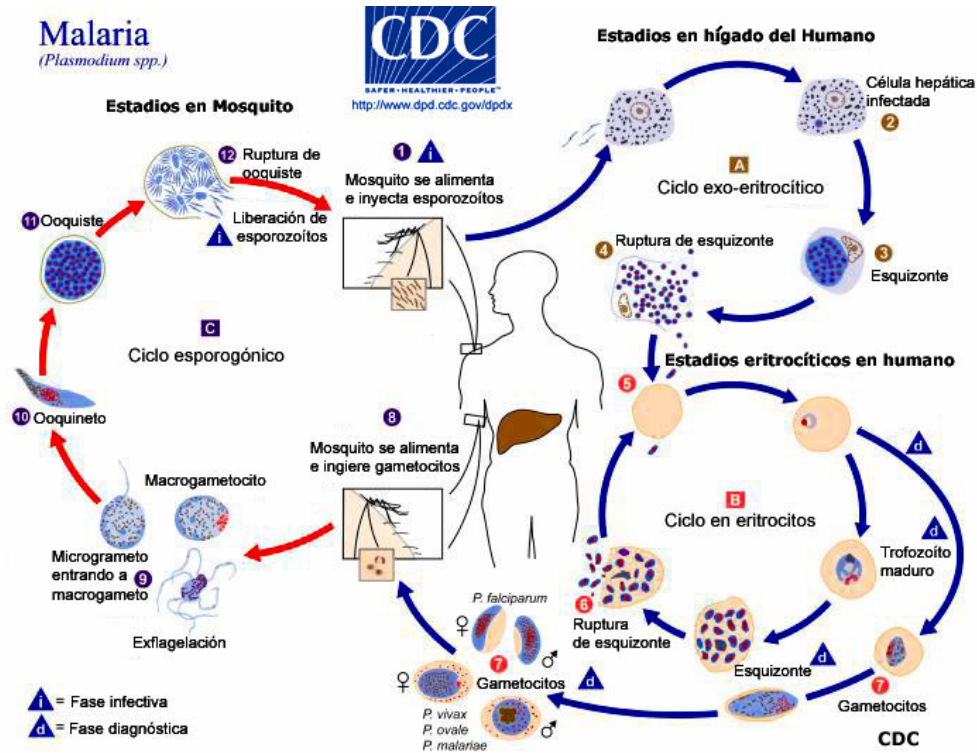


Fuente: Romero. 2007

a. Ciclo de vida de *Plasmodium*: Se caracteriza por infectar a dos hospederos: hembra de *Anopheles spp.* y al ser humano. En los humanos, los parásitos crecen y se multiplican en las células del hígado y luego en los glóbulos rojos de la sangre. En la sangre, crías sucesivas de parásitos crecen dentro de los glóbulos rojos y los destruyen, liberando parásitos hijos “merozoitos” que continúan el ciclo al invadir otros glóbulos rojos. Los parásitos en el estadio de la sangre son los que causan los síntomas de la malaria (Bledsoe, 2005). Cuando ciertas formas de parásitos en el estadio de la sangre “gametocitos” son captados por un mosquito *Anopheles* hembra durante una picadura, comienza otro ciclo diferente de crecimiento y multiplicación en el mosquito (C. for D. C. and P. (CDC), 2015). 10 a 18 días después, los parásitos se encuentran como “esporozitos” en las glándulas salivales del mosquito y cuando este se alimenta de otro humano, los esporozitos se inyectan con la saliva del mosquito y comienza otra infección humana cuando parasitan las células del hígado (Busula, *et al.*, 2017), como se puede observar en la Figura

5. Este tipo de reproducción es asexual. En el caso del mosquito se reproduce sexualmente y es esporogónico (Flores *et al.*, 2016).

Figura 5. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. en dos hospederos

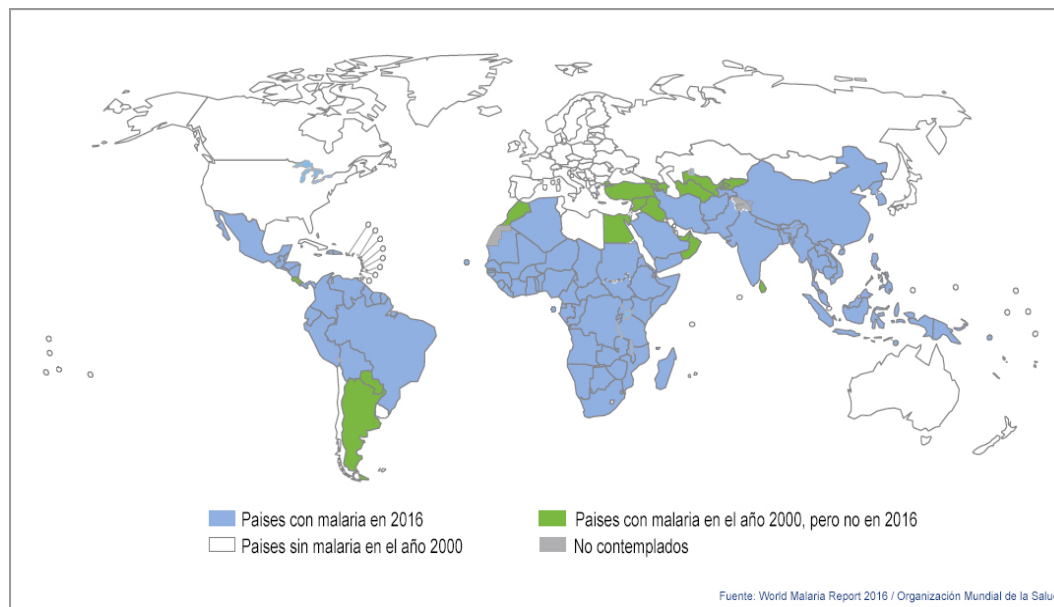


4. Distribución e incidencia de Malaria a nivel mundial: Por lo general su distribución ocurre en áreas donde las condiciones ambientales permiten la multiplicación del parásito en el vector. Actualmente, se encuentra restringida en zonas tropicales y subtropicales con altitudes inferiores a los 1,500 metros sobre el nivel del mar. Sin embargo, su incidencia y distribución se ha visto afectada por los cambios climáticos y los movimientos de la población (CDC), 2016). Aunque en algunos lugares ya este erradicada puede que se reintroduzca (enfermedad importada), ya que los viajeros que regresan o los visitantes de países endémicos pueden portarla (De Gier *et al.*, 2017). En el Informe Mundial sobre el Paludismo, se reportó que en el año 2016 la malaria era endémica en 91 países, frente a 108 países en el año 2000, como se puede ver en la Figura 6 (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2016). Se estima que la mayor parte de este cambio se debió a la distribución a gran escala de intervenciones para el control de la enfermedad.

A pesar de la disminución de incidencia y de mortalidad por malaria, cada año siguen apareciendo casos de la enfermedad. En el año 2015 hubo aproximadamente 212 millones de casos nuevos y 429,000

muerter, siendo la mayoría de casos (el 90%) de África (OMS, 2016). En el 2017 se reportó un aumento, con 216 millones de casos de la enfermedad y 445,000 muertes (OMS, 2017)

Figura 6. Comparación de la distribución de Malaria en 2000 y 2016



Fuente: World Malaria Report 2016 (OMS 2016).

5. Incidencia de malaria en Guatemala: En Guatemala, la distribución geográfica de la enfermedad varía según la temperatura ambiental (Figura 7), debido a que el mosquito no se desarrolla a temperaturas inferiores a 15°C, y es difícil encontrarlo a una altura mayor de 1200 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Chavez, 2015).

El agente causal en el primer trimestre del año 2017 fue *Plasmodium vivax*, provocando una alta tasa endémica en ciertas zonas del país; de las 29 áreas endémicas, 27 han presentado condiciones geográficas que permiten la transmisión de malaria. Totonicapán y Sacatepéquez por sus condiciones geográficas se han considerado no endémicas para malaria. Mientras que los demás departamentos se encuentran en vigilancia. Sin embargo, la tendencia en el primer trimestre disminuyó un 48% comparado con el año 2016. A la semana epidemiológica 2 del 2018 se reportaron 87 casos siendo el 87% provenientes de Escuintla (Sagastume *et al.*, 2018), siendo Escuintla con el mayor número de casos reportados (83%). Actualmente, todos los grupos de edad de la población guatemalteca presentan riesgos de portar la enfermedad, siendo los grupo más vulnerables los adolescentes de 15 a 39 años y el sexo femenino (Chávez, 2017) Los principales factores de riesgo son el aumento de temperatura, de precipitaciones y humedad que pueden resultar en mayor proliferación de los mosquitos que transmiten malaria (Chavez, 2015) (Figura 8).

Figura 7. Mapa de distribución de casos de malaria en Guatemala



Fuente: World Malaria Report (OMS, 2016).

Figura 8. Incidencia de malaria en Guatemala

MALARIA EN GUATEMALA



Actualmente, continúa siendo uno de los principales problemas de salud pública. Todos tienen riesgo de contraer la enfermedad, principalmente población rural entre los 15 y 39 años.



Fuente: Elaboración propia.

6. Diagnóstico y tratamiento de malaria: El diagnóstico se basa en técnicas microscópicas de referencia y otras pruebas especializadas como serología, PCR y de resistencia a los antibióticos. Para el tratamiento, se evalúa la gravedad de la enfermedad, las especies de parásitos de la malaria que causan la infección y la parte del mundo en donde se adquirió la infección. Esto con el fin de determinar la probabilidad de que el organismo sea resistente a ciertos medicamentos antipalúdicos. También se debe de

considerar la edad, peso, estado del embarazo (si lo hubiera), ya que esto puede limitar las opciones disponibles para el tratamiento de la malaria (CDC 2015).

C. Métodos de control vectorial

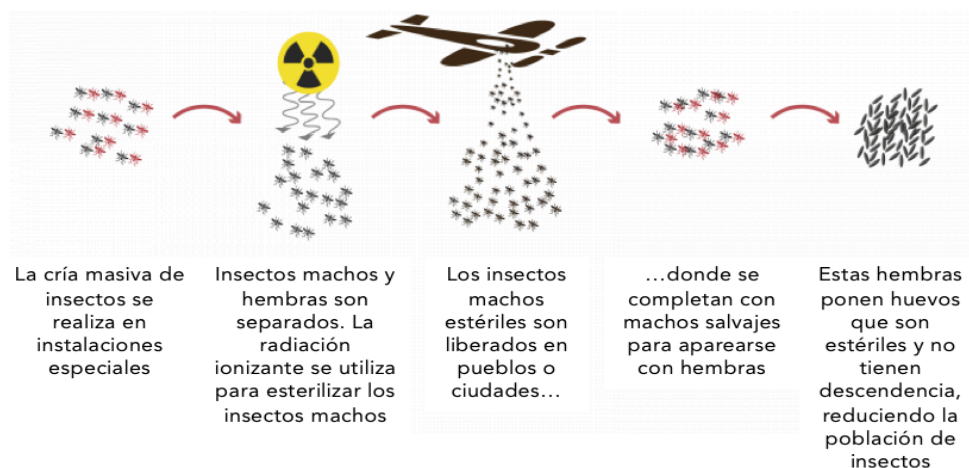
Comprender la biología y el comportamiento de los vectores de plagas y enfermedades puede ayudar a comprender cómo se transmiten y puede ayudar a diseñar estrategias de control apropiadas. Los factores que deben tener en cuenta al diseñar un programa de control vectorial incluyen la susceptibilidad de los vectores a los insecticidas y la ubicación preferida de alimentación y descanso de los mismos (Centers for Disease Control and Prevention 2015).

1. **Uso de insecticidas:** Los insecticidas de larga duración (LLIN) y las intervenciones de rociador/fumigación residual interior (IRS), pueden reducir la transmisión de enfermedades transmitidas por vectores. Sin embargo, se está incrementando la resistencia fisiológica a los ingredientes activos de los insecticidas (Killen, *et al.* 2017). Se ha detectado resistencia a cuatro clases de ellos: piretroides, organoclorados, carbamatos y organofosforados, por lo que se recomienda el uso rotatorio de diferentes clases de insecticidas para el IRS como un enfoque para manejar la resistencia de estos (OMS, 2016).

2. Métodos moleculares de control vectorial

a. **SIT:** La técnica del insecto estéril (SIT) es un método de control de poblaciones de plagas desarrollado en la década de 1950. Consiste en la liberación de grandes cantidades de machos esterilizados por irradiación para competir por hembras de tipo silvestre, reduciendo la proporción de progenie viable como se muestra en la Figura 9 (Labbé, *et al.* 2012).

Figura 9. Técnica del insecto estéril



Fuente: Modificado de International Atomic Energy Agency (IAEA, 2017).

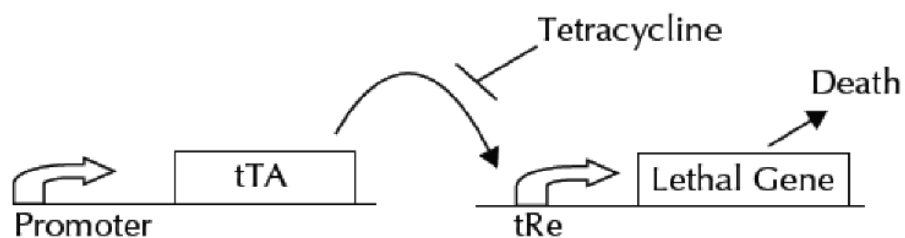
La irradiación mediante los rayos gamma y los rayos X, se ha utilizado con éxito por más de 60 años (Noguez *et al* 2017). Actualmente se aplica en seis continentes para la supresión, erradicación, contención y prevención de plagas. Dentro de las plagas en las cuales ha tenido éxito su aplicación, se encuentra las moscas de la fruta (mosca del mediterráneo, mosca mexicana, oriental y del melón. Debe existir un balance entre la dosis de radiación aplicada, esterilidad producida, competitividad sexual de los machos y el nivel de la esterilidad productora cuando se cruzan con las hembras silvestres (Noguez *et al* 2017).

1) Ventajas de SIT: la reducción significativa de pérdidas de producción de cultivo y ganado; protección de las industrias hortícola y ganadera mediante la prevención de plagas, proporcionar condiciones para las exportaciones de productos básicos a mercados de alto valor sin restricciones de cuarentena; reducción de costos de producción, salud humana y protección del medio ambiente, ya que se reduce el uso de insecticidas (IAEA, 2017).

2) Desventajas de SIT: La separación sexual puede ser difícil, los tratamientos de radiación, transporte y liberación pueden reducir la aptitud del apareamiento masculino (Noguez *et al* 2017); la crianza masiva e irradiación requieren procesos de precisión ya que es extremadamente específico de la especie, dado que los machos liberados se aparean sólo con las hembras de la misma especie (Alphey, *et al.* 2010).

b. Sistema de liberación de insectos con dominancia letal (RIDL): El sistema de liberación de insectos con dominancia letal (RIDL) es una variante de SIT que reemplaza la irradiación por la esterilización inducida por ingeniería genética (Noguez *et al* 2017). La esterilidad es inducida por la expresión zigótica condicional de un gen letal dominante: el transactivador retenido por tetraciclina tTA, el cual es colocado bajo el control de un promotor. En ausencia de tetraciclina, el transactivador de tTA se une a *tetO* y mediante la activación del promotor se induce la expresión del gen letal dominante. La tetraciclina evita que tTA se una a los sitios de *tetO*, reprimiendo el sistema y permitiendo que los insectos RIDL se desarrollen normalmente en una dieta suplementada con tetraciclina como se muestra en la Figura 10 (Labbé, *et al.* 2012). El resultado de la descendencia resultante del apareamiento entre el macho transgénico y la hembra salvaje es la muerte (Araújo, *et al.* 2015).

Figura 10. Sistema de represión de tetraciclina hacia el gen de dominancia letal



Fuente: (Wilke & Mt, 2011)

D. Silenciamiento de genes por ARN de interferencia (ARNi)

Este ha sido uno de los métodos alternativos de control vectorial más utilizados e investigados en los últimos 15 a 20 años. Consiste en interrumpir la expresión de genes específicos a nivel celular, mediante la introducción de ARN de doble cadena exógeno, con el objetivo de crear un silenciamiento génico (Correa 2018). Hoy en día, es una de las estrategias más prometedoras (Noriega, *et al.* 2016).

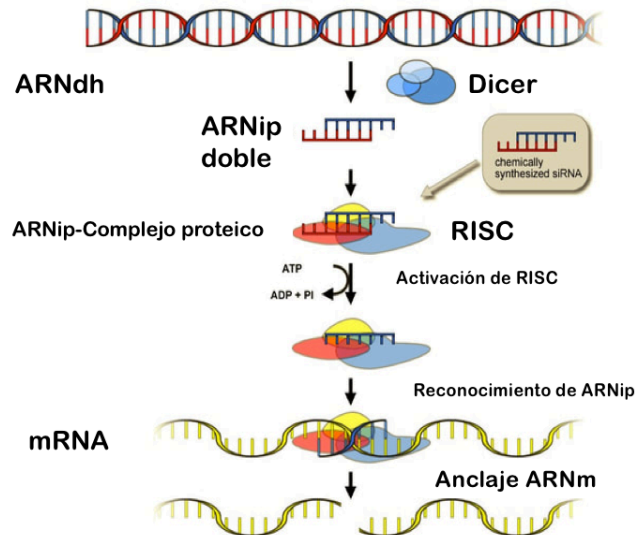
1. **Historia:** Los primeros indicios de la existencia de este mecanismo endógeno de supresión génica fue encontrado por Napoli *et al.* En el año 1990, al descubrir una inusual supresión de genes asociados a la coloración en petunias modificadas genéticamente. Dicha supresión fue atribuida al gen transgénico de chalcona sintasa, el cual había sido modificado por ellos. Posteriormente, Gui & Kempthues, en 1995 descubrieron un fenómeno similar en *Caenorhabditis elegans*, en donde los individuos tratados de forma independiente con hebras de ARN antisentido y ARN inhibían la expresión del gen *par-1*, lo cual resultaba contradictorio, ya que se esperaba que aquellos individuos tratados con la hebra sentido, se expresará normalmente (Noriega, *et al.* 2016). En 1998, experimentos llevados a cabo por Fire *et al.* con *C. elegans* permitieron aclarar en forma más detallada, la forma de cómo ocurre este proceso de silenciamiento, también conocido como ARN de interferencia, dando como resultados posteriores en un gran número de plantas, hongos y de animales de diferentes *phyla*, corroborando que este proceso se encontraba ampliamente distribuido en organismos eucariotas (Noriega, *et al.* 2016).

2. **Mecanismo:** Se fundamenta en la degradación de ARN mensajero (ARNm) endógeno, a nivel celular, un evento que sucede posterior a la aplicación exógena de ARN de doble hebra (ARNdh) complementario a la secuencia blanco, por lo que el ARNm específico es sujeto al silenciamiento. Se han descrito al menos tres funciones principales del mecanismo de ARNi en los organismos eucariotas: regulación génica específica, protección contra agentes virales y la defensa del organismo frente a elementos génicos transponibles o transposones; sin embargo, no son las únicas funciones asociadas al ARNi, también se encuentran las relacionadas con plantas, mamíferos y actualmente insectos, para el manejo de plagas (Noriega, *et al.* 2016).

El mecanismo detallado se puede observar la Figura 11, en donde se inicia con la separación del ARNdH en fragmentos pequeños (21 a 15 pares de bases). Estos fragmentos por la acción de ARNasas de la familia III, denominadas “DICER”, cortan el ARNdH en fragmentos uniformes, llamados siARN. Es importante mencionar, que DICER disminuye si el organismo no posee ATP disponible para usar (Figura 11). Posteriormente, estos fragmentos de ARNdH se unen a un tipo de nucleasas pertenecientes al grupo de proteínas “Argonaute”. El ARNdH forma un complejo con dicha enzima, la cual genera dos hebras simples. Una de ellas, es degradada, mientras que la otra actúa como guía para dirigir a la endonucleasa al ARNm blanco que contenga la secuencia homóloga. Por lo tanto, se forma un complejo con la hebra guía y la endonucleasa con otra proteína denominada RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Este

complejo se une al ARNm y luego la endonucleasa lo rompe en varios fragmentos, los cuales son degradados y por ende ya no son traducidos (Agrawal, *et al.* 2003).

Figura 11. Mecanismo de ARN de interferencia



Fuente: Zgene Biotech Inc. 2010.

A. Ventajas: alta especificidad para reducir efectos en organismos no blanco y también como potencial de reemplazo a los métodos basados en insecticidas (Noriega, *et al.* 2016).

E. Genes de referencia

La estabilidad de la expresión de un gen control es un requisito importante para la estandarización interna de la expresión de un gen objetivo. Los genes control mantienen una expresión estable, siendo capaces de exhibir una regulación alta o baja en algunas condiciones experimentales (Pfaffl & Hageleit 2001). La preparación de ARN mensajero objetivo requiere ser precisa y debe contar con una estandarización relevante. La estandarización tiene un impacto sobre métodos avanzados de estudio de expresión genética, como el PCR tiempo real o microarreglos. Los genes control internos deben ser capaces de controlar varios parámetros del procesamiento de cuantificación, como factores inhibitorios del tejido, integridad del ARN, error de carga, rendimiento de enzimas o cebadores, etc. por lo que se han propuesto diversos métodos de estandarización (Pfaffl *et al.* 2004).

Los datos de la expresión bruta de un gen objetivo deben ser estandarizado para la cantidad de material biológico, de tal forma que entonces los residuos inhibitorios que se encuentran en las muestras sean descartados (Suzuki *et al.* 2000). Si los datos de cuantificación se expresan por cantidad de ARN total extraído, entonces los ARNs ribosómicos predominantes, que se sabe que varían en proporción del ARN total, pueden causar cambios significativos en los resultados. Esto significa que es necesario un control

total del procedimiento (Pfaffl 2004). La estandarización con otro gen, cuya expresión se cree que es constante, es un método de elección (Suzuki *et al* 2000). La secuencia del gen estándar debe estar presente en todo el ensayo, este imita todas las perturbaciones de la secuencia de la expresión del gen objetivo.

La literatura ha descrito una gran cantidad de genes control o housekeeping genes (HKG), tales como la tubulina, actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), proteínas ribosómicas (RpS4), etc. Sin embargo, no existe una forma absoluta para el control de perturbaciones en el procedimiento de cuantificación. El gen control debe ser elegido mediante una búsqueda exhaustiva para garantizar que no se produzca una regulación significativa. Sin embargo, esto puede ser un problema circular, ya que los datos de expresión del gen control que se desea probar deben estandarizarse (Pfaffl 2004). Una posible solución podría ser el uso de más de un gen control en forma de índice de expresión.

1. Genes de referencia candidatos

a. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH): El gen GAPDH es uno de los genes de referencia más comúnmente utilizados denominado como el “clásico” (de Jonge *et al* 2010). El uso del gen GAPDH en diversos estudios ha demostrado buenos resultados, por otro lado, no se recomienda en otros casos debido a la variabilidad de expresión causado por la exposición a factores experimentales específicos. Sin embargo, ningún resultado puede excluir la utilidad de GAPDH como un gen de referencia dentro del mismo tejido, pero es necesaria la validación todo el tiempo. El nivel de expresión de ciertos genes puede variar dependiendo del tejido, como se mencionó anteriormente, este factor se debe de tomar en cuenta para no obtener falsos positivos en los resultados. La necesidad absoluta de la validación de GAPDH como gen de referencia puede generar una base de datos confiable. Una forma de incluir o excluir GAPDH como gen de referencia en un estudio es su categorización en una especie relacionada (Kozera & Rapacz 2013). El gen GAPDH ha demostrado en diversos estudios ser el más estable entre los genes evaluados, ya que no muestra variación entre tejidos por lo que su utilidad se ha demostrado tanto en plantas como en insectos (Scharlaken *et al* 2008).

b. Proteína ribosomal S4 (RpS4): El gen RpS4 (proteína ribosomal S4) se encuentra en una región evolutivamente conservada de los cromosomas sexuales (Hughes *et al* 2015). La proteína S4 de la subunidad ribosómica más pequeña es importante por su papel de anclaje en el ensamblaje del ribosoma 22 y la unión de ARN ribosomal (ARNr). También, la proteína ribosomal S4 facilita la síntesis de ARNr y restringe la traducción de proteínas ribosomales del mismo ARN mensajero policistrónico (Sudhamalla *et al* 2013). El gen RpS4 ha demostrado ser adecuado para la normalización de los datos de RT-qPCR obtenidos en un conjunto de muestras biológicas de frutas y algunos mosquitos del género *Anopheles* (Hall *et al* 2013) en diversas etapas de desarrollo, varios tejidos, etc. (Chen *et al* 2011).

c. Proteína ribosomal L49 (RpL49): El gen RpL49 es utilizado como un gen de referencia, para el control interno de muestras biológicas de algunas especies de *Anopheles*, por ejemplo,

Anopheles sinensis, *Anopheles gambiae* (Qiao *et al* 2016), etc. Además, el gen RpL49 codifica una proteína ribosomal que es un componente de la subunidad 60S (GeneCards 2008). La proteína ribosomal L49 particularmente están compuestas por un dominio globular expuesto a la superficie con proyecciones largas en forma de dedo que se extienden hasta el núcleo del ARNr para estabilizar la estructura. La mayoría de las proteínas ribosomales interactúan con múltiples elementos de ARN, a menudo de diferentes dominios (Gao *et al* 2012).

F. Genes de espermatogénesis para silenciamiento por ARNi

La espermatogénesis es el proceso de formación de las células sexuales masculinas, por lo que se lleva a cabo en los testículos, en donde los espermatozoides pasan por las etapas de maduración y diferenciación. Dicho proceso abarca siete etapas distintas de diferenciación: formación de células concentradoras, células madre del quiste, células del quiste, células madre de la línea germinal (GSC), espermatogonias, espermátocitos y espermátides. Estas etapas son reguladas por los cambios dinámicos en la expresión génica a nivel transcripcional, postranscripcional y postraduccional (Dong, *et al.* 2016). Dentro de los genes candidatos de silenciamiento para el control de plagas, según Whyard, *et al.* 2015, se encuentran los involucrados en el proceso de gametogénesis para reducir la población, por medio de machos estériles:

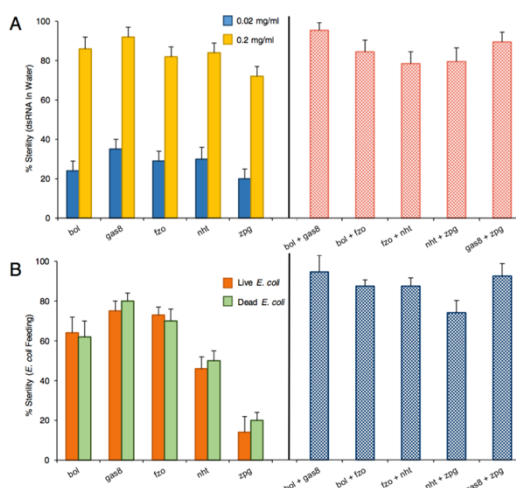
1. *Zero population growth (zpg)*

a. **Función e importancia:** Juega un papel muy importante en la diferenciación y supervivencia de las células germinales tempranas. La proteína ZPG se localiza en la superficie de las células germinales tempranas y en algunas etapas aparece especialmente concentrada en la interfaz entre la línea germinal y las células somáticas, ya que se comportan como uniones gap, conformadas por hemicanales en la célula (Cao *et al* 2008). La ausencia de *zpg* conduce a la falta de diferenciación y confiere la pérdida de espermatogonias en los machos y la división de los quistes de la línea germinal en las hembras (Tazuke, *et al.* 2002). En *Drosophila melanogaster*, *zpg*, codifica una proteína de unión gap específica de la línea germinal denominada Inexina 4 en ambos sexos y se encuentra en el cromosoma III, localizada en la posición 65B5 (Bauer, *et al.* 2005). En ausencia de ella, los mosquitos son viables pero estériles, tienen diminutas gónadas y en adultos poseen un pequeño número de células germinales tempranas que carecen de etapas posteriores de diferenciación de células germinales (Whyard, S. *et al.* 2015). En el macho, la proteína ZPG se localiza en la superficie de las espermatogonias, principalmente en los lados adyacentes a las células del quiste somático. En las hembras se localiza a las superficies de células germinales, tanto las adyacentes a las células somáticas circundantes como las adyacentes a otras células germinales (Tazuke *et al.* 2002).

Whyard, S. *et al.* 2015, identificó genes de testículos en el vector del dengue *A. aegypti* utilizando una técnica de hibridación sustractiva de supresión. Las larvas de mosquito fueron alimentadas con ARN de doble cadena que se dirigían tanto a los genes de los testículos como a un gen de determinación del sexo femenino (*doublesex*) para inducir la esterilidad mediada por la interferencia del ARN (ARNi) y la

inhibición del desarrollo femenino. La fertilidad y la aptitud de apareamiento de los machos tratados se evaluaron en experimentos de competencia de apareamiento a pequeña escala. Dentro de los genes testículos se encontraba *zpg*, el cuál presento aproximadamente un 70% y 30% de mosquitos viables y estériles probado *in vitro* (Figura 12A) y con *E. coli* que expresaba ARNdh de *zpg* (Figura 12B) respectivamente. De igual manera *zpg* había sido identificado previamente como importante para la fertilidad masculina en el vector de malaria *A. gambiae*, donde el ARNdh dirigido a transcripciones de *zpg* inyectadas en embriones de *A. gambiae* produjeron machos que carecían de esperma, pero aún podían transferir fluidos de glándulas accesorias masculinas a las hembras para inducir comportamientos femeninos posteriores al apareamiento, incluida la oviposición de huevos no fertilizados (Whyard, S. *et al.* 2015).

Figura 12. Porcentajes de esterilidad de *zpg* en *Aedes aegypti*



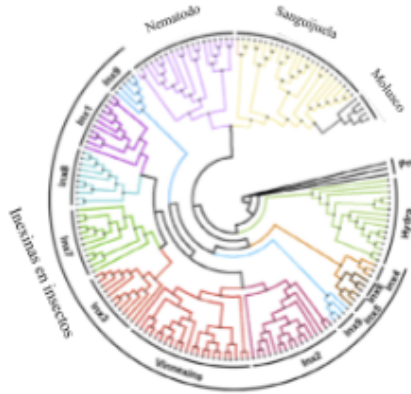
Fuente: Whyard, S. *et al.* 2015

b. Relación y expresión con otras inexas: Tazuke, *et al.* 2002 propone que los hemicanales de ZPG en la superficie de las células germinales interactúan con hemicanales de otras isoformas de inexas (Figura 14) en la superficie de las células somáticas para formar uniones gap funcionales. En 2015, Smendziuk, *et al.* identificaron que de las 8 inexas, la inexas 2 se encuentra colocalizada con *zpg* en los límites del soma-germinal. De igual manera concluye que se requiere de la señalización de las uniones gap entre la línea germinal y el soma para regular las tasas de proliferación de las células del quiste somático (CySCs) y la diferenciación, asegurando el funcionamiento adecuado de la espermatogénesis en *Drosophila*. Por otro lado la inexas 1 cumple la función para el desarrollo de neuronas retínales (Curtin *et al.* 2002) y la inexas 3 es necesaria para el cierre dorsal en embriogénesis (Giuliani *et al.* 2013). Las inexas 1,2,3 y 7 son expresadas a lo largo del ciclo de vida y en ambos sexos de *D. melanogaster*, mientras que la inexas 4 y 8 poseen funciones específicas en sólo algunas etapas del ciclo de vida y dependientes del sexo (Calkins, *et al.* 2015).

c. Estructura general de las inexas: Poseen dos bucles extracelulares (EL1 y EL2), 4 dominios transmembranales hidrofóbicos (TM1-4) y 3 dominios citoplasmáticos que incluyen un bucle

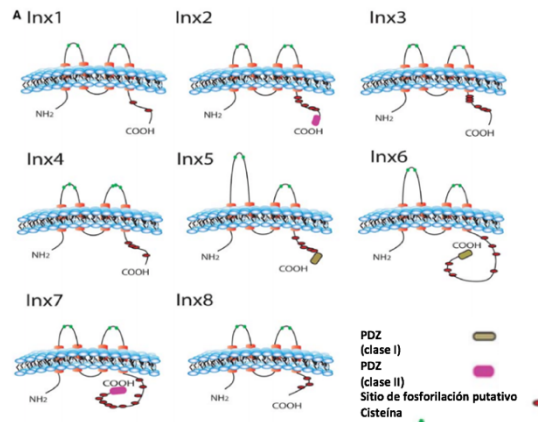
intracelular (IL). Poseen una terminación amino (NH₂) y otra terminación carboxílica (COOH) (Bahuer, *et al.* 2005). En comparación con todas las inexas, la inexina 4 que hace referencia al gen *zpg* el cual posee 3 residuos de cisteínas en lugar de 2 entre sus dominios extracelulares, como se puede observar en la Figura 13 (Bauer, *et al.* 2005).

Figura 13. Tipos de inexas



Fuente: Modificado de Hasegawa, *et al.* 2014

Figura 14. Estructura de inexas



Fuente: Bauer, *et al.* 2005

2. *Growth arrest specific protein 8 (gas8)*: los genes específicos de detención del crecimiento (Gas) son loci genéticos estructural y funcionalmente diversos que se expresan en células cultivadas que entran en estado inactivo, comúnmente como consecuencia de la privación del suero de crecimiento hasta la confluencia. Sus actividades van desde el control de la diferenciación de las células nerviosas hasta la regulación de la organización del microfilamento, la apoptosis, proliferación y ciclo celular. Gas8 es predominantemente una proteína testicular, cuya expresión en ratones está regulada por el desarrollo durante la pubertad y la espermatogénesis, y en humanos está ausente en hombres fértiles que carecen de la capacidad de generar gametos. Su localización se encuentra en el aparato de motilidad de gametocitos

postmeióticos y espermatozoides maduros, como también en cilios en las superficies apicales de las células epiteliales que recubren los bronquios pulmonares y las trompas de Falopio, lo cual indica que el principal papel de funcionamiento de esta proteína se encuentra en la motilidad celular (Der-Yeh, *et al.* 2002).

3. *Fuzzy onions (fzo)*: es una GTPasa transmembrana evolutivamente conservada y miembro fundador de la clase de proteínas mitofusina. Las mitofusinas comprenden una familia de guanosina trifosfatasa mitocondriales codificadas nuclearmente, las cuales controlan la fusión y morfología mitocondrial. En el caso del gen *fzo* y mitofusina de *Drosophila* (*dmfn*), que codifican los únicos homólogos de Mitofusin en *Drosophila* se expresan diferencialmente durante el desarrollo. La expresión de *fzo* se encuentra estrechamente restringida a la línea germinal masculina, con la acumulación de ARNm en espermátocitos y espermátidas tempranas. En un estudio realizado por Hales y Fuller, 1997 se detectó que la proteína Fzo únicamente se detecta al final de la meiosis y en las primeras etapas de la espermátida cuando se produce la fusión mitocondrial (Hwa, *et al.* 2002).

Ambos genes (*gas 8* y *fzo*) han sido estudiados para la supresión de la población de mosquitos por la alimentación de larvas con ARN de doble hebra, debido a que ambos son expresados específicamente en los testículos de los dípteros. Como resultado han obtenido que se logra inducir la esterilidad masculina y que provocan reducciones significativas (>75%) en el número de la progenie viable producida. Por lo que pueden ser posibles candidatos para el control de poblaciones de Anopheles, los cuales son los principales causantes de la enfermedad de malaria. Además, se ha observado que en combinación con otros genes pueden aumentar la eficiencia para producir machos estériles (Whyard, S. *et al.* 2015).

4. *Boule*: El gen *Boule (Bol)* fue reportado en 1992 en la base de datos de FlyBase como un gen regulador de la traducción con rol importante en espermatogénesis (proceso de formación de los espermatozoides) en *Drosophila melanogaster*. El gen está implicado en el inicio de la meiosis masculina y en la diferenciación espermática posterior a la meiosis (Castrillon *et al.*, 1993). Se ha demostrado que *Boule* solamente se expresa en el citoplasma de espermátocitos durante la meiosis (Cheng *et al.*, 1998). El gen codifica para una proteína de unión a ARN que está conservada en varias especies ya que es necesaria para la fertilidad masculina (Joiner & Wu, 2004).

Se ha probado que en *Drosophila* hay un aumento en la transcripción de *Boule* en la vida adulta y en la etapa embrionaria media (Arbeitman *et al.*, 2002), lo que implica que es posible que el gen tenga importancia en funciones diferentes de la línea germinal masculina. En el estudio de Joiner *et al.* (2004) se encontró que una diferente isoforma de *Boule* se expresa fuera de la meiosis masculina y está involucrada en la función neuronal.

Se ha encontrado genes ortólogos en el humano (genes *DAZ*), y en especies de *Arthropoda* y *Diptera*. Entre las especies de *Diptera* en los que se ha encontrado el gen están *Drosophila* sp., *Glossina* sp., *Bactrocera* sp., *Ceratitis capitata*, *Anopheles* sp., *Aedes aegypti* y *Polypedilum* sp.

5. *Guy1 (Gene unique to the Y)*: El gen *Guy1* es un gen específico del cromosoma Y del mosquito de malaria asiático *Anopheles stephensi*. El cromosoma Y de dípteros, incluido *Anopheles*, tiene un rol importante en el comportamiento sexual del insecto (Zhou *et al.*, 2012), en el dimorfismo sexual, y además participa en el inicio de la determinación sexual (Criscione *et al.*, 2013). *Guy1* fue descrito en 2013 por Criscione *et al.* y se encontró que no está interrumpido por intrones y tiene un ORF corto que codifica para una proteína de 56 aminoácidos rica en lisina.

La proteína *Guy1* forma dos α -hélices y se puede unir al ADN. Además, se expresa al inicio de la transición materna a cigoto, antes de la formación del blastodermo sincicial. Los patrones de expresión de *Guy1* sugieren que tiene un rol en el desarrollo embrionario temprano en machos y puede servir como señal inicial de determinación de sexo (F. Criscione *et al.*, 2013).

La proteína es una señal iniciadora que afecta el desarrollo embrionario de forma específica al sexo, lo cual podría sugerir que el gen *Guy1* sea el factor determinante masculino en *A. stephensi* (Criscione *et al.*, 2016).

6. *β 2-tubulina*: El gen *β 2-tubulina* se ha identificado en *Drosophila* sp. como un gen específico de testículos que funciona en prácticamente todos los aspectos de espermatogénesis. El gen se sintetiza durante el tercer estadio larval antes de que inicie la meiosis en los testículos en desarrollo. La β 2 tubulina también se expresa en la edad adulta y comprende aproximadamente el 90% del total del pool de tubulina de los testículos (Kempthues *et al.*, 1982).

El gen es de una sola copia. Se encontró que la β 2 tubulina de *Aedes aegypti* tiene funciones en la conformación celular, producción del huso meiótico y montaje del axonema de la cola de espermatozoos de una manera similar al ortólogo del gen en *Drosophila* (Smith *et al.*, 2007).

7. *no-hitter (nht)*: El gen *nht* se identificó por primera vez en *Drosophila melanogaster*. Es un gen que codifica para TAF4, que es un factor de transcripción asociado a TBP específico de testículos (tTAF, por sus siglas en inglés). Los tTAFs son parálogos de las subunidades TAF que son expresadas del factor iniciador de la transcripción (TFIID). Se localiza en el nucléolo de los espermatozoos y se encarga de regular la transcripción de genes involucrados en la espermatogénesis, específicamente en la entrada de espermatozoos en la meiosis. Se ha reportado que el gen se expresa exclusivamente en testículos de *Drosophila melanogaster* (Hiller *et al.*, 2004) y de *Aedes aegypti* (Whyard *et al.*, 2015).

G. Genes candidatos para el silenciamiento génico de hembras y obtención de machos

1. **Actina:** Un posible gen candidato para la selección de machos es el de la actina de músculo de vuelo, que es vital para la contracción muscular que se requiere para el vuelo. La actina es una proteína altamente conservada que se encuentra en múltiples isoformas, ya que es codificada por una familia de genes (Dominguez & Holmes, 2011). Cada isoforma tiene una función diferente y un patrón de expresión espacial y temporal específico. Se ha reportado que, en algunas especies de mosquitos, como *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* y *Anopheles gambiae*, ciertas actinas se expresan de forma preferencial en las pupas y adultos hembras en los músculos indirectos de vuelo (IFM) (Muñoz *et al.*, 2004). El uso de la técnica de liberación de insectos portadores de un gen letal dominante (RIDL, por sus siglas en inglés) permite la creación de un fenotipo incapaz de volar que es único en hembras y que es reversible por la aplicación de tetraciclina, lo cual las deja expuestas a depredación e incapaces de realizar rituales de apareamiento una vez son liberadas pero a la vez permite que puedan criarse en el laboratorio (Fu *et al.*, 2010; Labbé, Scaife, Morgan, Curtis, & Alphey, 2012; Marinotti *et al.*, 2013). Esto último se debe a que los machos las reconocen por el sonido que producen sus alas (Matthews, McBride, DeGennaro, Despo, & Vosshall, 2016). Aún no se ha identificado un gen como este en *A. albimanus*. *An. albimanus*, pero sí se han encontrado en *Anopheles stephensi* (Marinotti *et al.*, 2013) y en *Anopheles gambiae* (Labbé *et al.*, 2012).

a. **Estructura:** en mosquitos, específicamente *An. gambiae*, existen cinco actinas que se clasifican en tres grupos: citoplasmática, de músculo adulto y de músculo larval (Sandiford *et al.*, 2015). Las variaciones entre las distintas isoformas de actina en una misma especie son de pocos amino ácidos, sin embargo, interesantemente estas variaciones se conservan entre isoformas homólogas de diferentes especies (Salazar *et al.*, 1994). Es por esto que se estudian las actinas de insectos en comparación con las de *D. melanogaster*, que han sido más ampliamente estudiadas (Lovato *et al.*, 2001). Se puede observar que cuando se comparan los productos codificados por genes de Actina 88F de *D. melanogaster* (DMEL88F), Actina E2 de *D. virilis* (DVIR-E2) y una actina de *An. gambiae* (ANGAACT1), las secuencias de aminoácidos es casi idéntica (Fig. 8). Existen dos formas en la que se encuentra organizada la actina, como actina-G que es un monómero, o como actina-F que son polímeros en forma de filamentos (Dominguez & Holmes, 2011)

Figura 15. Alineamiento de aminoácidos supuestos de familia de genes de actina

A

AeAct-4:	MCDDDAGALVIDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPISIVGRPRHQVMVGMGQKDAYVGVDEAQS	KRGILT	TKY	70
ANGAAct:	70
DMEL88F:	S.....	70
DVIR-E2:	S.....	70
AeAct-4:	PIEHGIITNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPPEEHPVLLTEAPLNPKSNREKMTQIMFETFASPAVYVAIQAV			140
ANGAAct:	140
DMEL88F:	A.....	N...M.....	140
DVIR-E2:	A.....	N...M.....	140
AeAct-4:	LSLYASGRTTGIVLDSGDVSHTVPIYEGYALPHAILRMDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIV			210
ANGAAct:	210
DMEL88F:	F.....	L.....	210
DVIR-E2:	F.....	LX.....	210
AeAct-4:	RDIKEKLCYVALDFEQEMQAAAATSSSEKSYELPDGQVITIGNERFRAPEALFQPSFLGMESTGIHETVY			280
ANGAAct:	S.....	280
DMEL88F:	AT..ST.L.....C.....C.....	280
DVIR-E2:	AT..ST.L.....C.....C.....	280
AeAct-4:	NSIMRCDVDIRKDLANSVLSGGTTMYPGIADRMQKEITSLAPSTIKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASL			350
ANGAAct:	350
DMEL88F:	K.....A.....	350
DVIR-E2:	K.....A.....	350
AeAct-4:	STFQAMWISKQEYDEGGPGIVHRKCF			376
ANGAAct:	S.....H.....	376
DMEL88F:	Q.....S.....	376
DVIR-E2:	Q.....S.....	376

Fuente: Muñoz *et al.*, 2004

b. Funciones

1) Contracción muscular: los músculos están compuestos por conjuntos de células con forma de fibras que se dividen en sarcómeros. Estos sarcómeros contienen dos tipos de filamentos: los delgados que contienen actina y los gruesos que contienen miosina. La miosina y la actina contienen sitios que hacen que la unión entre ellos sea altamente favorable, sin embargo la actina está rodeada por el complejo de troponina-tropomiosina, que causa impedimento estérico. La contracción muscular ocurre cuando los filamentos de actina se liberan de las proteínas protectoras de troponina-tropomiosina y son capaces de unirse a miosina. La miosina se une y suelta a la actina de forma continua, moviendo el filamento de actina hasta forzar la contracción de un sarcómero. Esta se repite en todas las células musculares, por lo que el músculo entero también se contrae (Viswanathan 2015).

2) Citoesqueleto: el citoesqueleto celular es una estructura que se encuentra en todas células de todos los dominios y está compuesta por polímeros de proteínas que varían según el tipo de célula. En el caso de las eucariotas, estos polímeros son de tres tipos: microfilamentos compuestos de actina, microtúbulos compuestos de tubulina y filamentos intermedios compuestos de proteínas variadas (Dominguez & Holmes, 2011). Los microfilamentos forman una red conocida como la corteza celular, que está asociada a la membrana celular y le da soporte y forma. Otros microtúbulos crecen alrededor de la corteza celular y son capaces de alterar su forma y de empujarla para movilizar la célula. Esto lo hacen

polimerizándose para expandir la célula y contrayéndose por interacciones con miosina (Fletcher & Mullins, 2010).

2. Actina 4

a. Expresión específica en hembras: el gen de *Aedes aegypti* Actin-4 (*AeAct-4*) ha sido previamente estudiado debido a que se buscaba usar su promotor para la liberación de insectos portadores de un gen letal dominante (RIDL, por sus siglas en inglés). Encontraron que esta isoforma de actina se expresaba únicamente en el músculo de vuelo de hembras, por lo que era un buen candidato para desarrollar un método de selección sexual (Muñoz 2004). La expresión de un gen letal controlada por promotores derivados de *AeAct-4* crea hembras que no pueden volar, lo cual las deja expuestas a depredación, incapaces de buscar sangre y sin poder participar en rituales de apareamiento (Fu 2010).

b. ¿Por qué no se expresa en machos?: lo que ocurre es que ocurre corte y empalme diferente en el ARN de machos y de hembras. En la actina de machos se agrega un codón STOP prematuro, por lo que no se produce una proteína funcional (Fu *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2004). Obviamente existen otras actinas de músculo de vuelo en machos, ya que ambos sexos necesitan volar para alimentarse, huir de depredadores y aparearse (Labbé *et al.*, 2012).

c. Ortólogos de actina 4: El primero en reportarse fue el gen de *Aedes aegypti* Actin-4 (*AeAct-4*), en un estudio en el que se buscaba un promotor para expresar genes letales dominantes en hembras (Muñoz 2004). Encontraron que esta actina era parte del músculo de vuelo de las hembras pupas y adultas y que no se encontraba en machos debido a corte y empalme específico de cada sexo (Muñoz 2004). Otro estudio demostró que el uso del promotor resultaba en hembras sin vuelo, lo cual las deja expuestas a depredación, incapaces de buscar sangre y sin poder participar en rituales de apareamiento (Fu 2010). Posteriormente se identificaron ortólogos en otras especies de mosquitos: Labbé *et al.* encontraron el primero de estos en *Aedes albopictus* (*AealbAct-4*), mientras que Marinotti *et al.* identificaron uno en *Anopheles stephensi* (*AsAct-4*) (Labbé 2012) (Marinotti 2013). Todos estos ortólogos comparten las características de expresión sexo y tejido específicas.

H. 3'UTR

1. ¿Qué es?: El ARN eucariota está compuesto por: una región codificante que contiene exones, intrones no codificantes que se eliminan por corte y empalme, regiones no traducidas (UTR) que flanquean a la codificante en 3' y 5', una guanina metilada unida por un enlace trifosfato 5' (*cap-5'*) (Shatkin, 1976) y una cola de poliadenina (poli(A)) en el extremo 3'. La 3'UTR se encuentra al terminar la región codificante y es seguida por la cola poli(A), como puede verse en la Fig.9 (Andreassi & Riccio, 2009).

Figura 16. Estructura de ARNm eucariota



Siglas: regiones no traducidas (UTR), una guanina metilada unida por un enlace trifosfato 5' (*cap-5'*), poliadenina (poli(A)) en el extremo 3'.

(Imagen de dominio público)

a. **Función:** la regulación de ARNm es importante para la expresión espacial y temporal específica de proteínas. La mayoría de las secuencias reguladoras conocidas se encuentran en las regiones 5' y 3' UTR (Andreassi & Riccio, 2009). Estas son reconocidas por proteínas especializadas (RBP) (Kuersten & Goodwin, 2003), en el 5'UTR estas controlan la traducción, mientras que en el 3'UTR controlan el metabolismo, localización, eficiencia y estabilidad del ARNm. Se ha reportado que la longitud de la 3'UTR es más corta cuando las células se activan, lo que sugiere que acortar esta región impide que se unan proteínas inhibitorias (Andreassi & Riccio, 2009). La represión de la traducción también puede darse por la unión de microARN (miARN), que son ARN no codificante que funciona como silenciador endógeno de la expresión de genes. Estos nucleótidos también tienen sitios de reconocimiento en la 3'UTR y al unirse a esta provocan que se detenga la traducción y que el ARN elegido sea degradado (Lytle, Yario, & Steitz, 2007).

2. **Relevancia:** el problema con el uso de actina como gen a silenciar es que esta proteína es uno de los dos componentes más importantes de todos los músculos, ya que son las responsables de la contracción (Buxbaum 2014). Esto hace que la actina sea una proteína altamente conservada, así que aunque existan varios tipos diferentes que tienen funciones específicas en células determinadas, todas las secuencias son casi idénticas en la región codificante (Lovato *et al.*, 2001). Por eso se requiere de métodos para diferenciar las que permitan crear dsRNA que sea específico para la que sea de interés.

Se ha determinado que una forma útil de hacer esto es por medio de la comparación de la región no codificante de la parte 3' (3'UTR). En *Aedes aegypti*, se encontró que todos los ARNm de actina podían ser identificados por la secuencia de nucleótidos que se encontraba en esta región (Muñoz *et al.*, 2004). Además, en *Anopheles gambiae*, se ha reportado que la cola poli(A) variaba en longitud en cada ARNm (Salazar *et al.*, 1994).

Esto puede hacerse por medio de Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE), que utiliza un cebador complementario a la cola poli(A) en lugar de un cebador reverso. El resultado es que se puede diseñar un cebador específico para cualquier ARN y utilizar este cebador universal para amplificar regiones desconocidas (Clontech Laboratories, 2013).

I. Diferenciación sexual

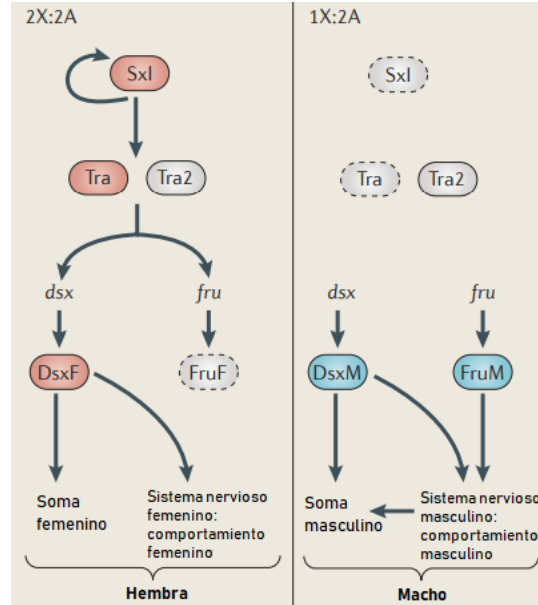
Existen distintos mecanismos de determinación sexual en insectos. Se pueden mencionar tres tipos básicos en función de cuál sea la señal primaria que determine el sexo: constitución cromosómica o genética del cigoto, efecto materno y condiciones ambientales (Sánchez 2010).

1. Diferenciación sexual en *Drosophila melanogaster*, organismo modelo: La determinación sexual ha sido ampliamente estudiada en *Drosophila melanogaster*, esta ha servido como referencia sobre lo que sucede en la diferenciación sexual en varios insectos (Verhulst *et al* 2010).

En *D. melanogaster* la determinación sexual revela que los genes se encuentran organizados jerárquicamente de manera que el producto de un gen controla el procesamiento específico de sexo del pre-ARNm del gen que se encuentra por debajo de la cascada (Sánchez 2010). Por lo tanto, el sexo está determinado por una serie de eventos de splicing (proceso que elimina una secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica para originar una proteína madura) en los genes involucrados en la cascada de diferenciación sexual (Yamamoto 2013).

El primer gen de la cascada es *Sex lethal (Sxl)*, este se transcribe solo cuando la relación X/A (la relación cromosoma X a autosoma) es igual o superior a 1. Debido a que las hembras tienen dos cromosomas X y los machos tienen uno, *Sxl* se transcribe solo en hembras (Yamamoto 2013). *Sxl* controla el procesamiento de su propio pre-ARNm, así como el procesamiento del pre-ARNm del gen *Transformer (Tra)* (Sánchez 2010) este gen (*Tra*) junto con *Transformer-2 (Tra-2)* se unen al ARN primario de *Doublesex (Dsx)* y *Fruitless (Fru)*. El ARN primario de *Dsx* produce un ARNm específico para hembras, *Doublesex female (Dsx)* y *Fruitless female (FruF)* que confiere características morfológicas y comportamiento de hembras (Yamamoto 2013). En machos, *Tra-2* no está expresado por lo que se expresa una proteína *Doublesex male (DsxM)* y *Fruitless male (FruM)* lo que hace que la morfología y el comportamiento de la mosca sea macho (Figura 17) (Sánchez 2010). La presencia (femenina) y la ausencia (masculina) de *Tra* dan como resultado el ARNm de *Fru* de tipo femenino (*FruF*) y el ARNm de *Fru* de tipo masculino (*FruM*), pero aquí, solo el ARNm de *Fru* de tipo masculino codifica una proteína funcional (Figura 17) (Yamamoto 2013)

Por lo tanto, el gen *Transformer-2 (Tra-2)* en *D. melanogaster* tiene un papel importante en la determinación sexual, en hembras ya que está involucrado en el soma femenino (Hoang *et al* 2016). Además, se cuenta con literatura que muestra que *Tra-2* tiene proteínas conservadas en insectos dípteros y no dípteros (Hoang *et al* 2016).

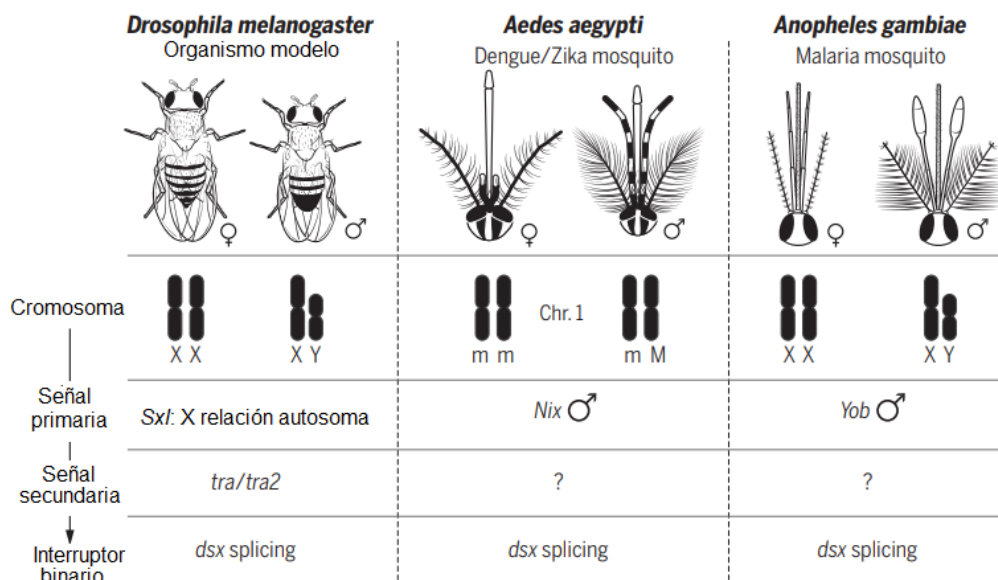
Figura 17. Cascada de diferenciación sexual en *Drosophila melanogaster*

Fuente: Modificado de Yamamoto y Koganezawa 2013

2. **Diferenciación sexual en mosquitos:** La determinación sexual en mosquitos es controlada por un factor M dominante (M factor). Este factor reside en el cromosoma heteromorfo Y en mosquitos de *Anopheles* y en el locus M (M locus) del cromosoma homomórfico en mosquitos de *Culicinae*, incluyendo especies del género *Aedes* y *Culex*. En *Anopheles culicifacies* se encontró que el genotipo XXY era masculino, sugiriendo la existencia de un factor M dominante en el cromosoma Y. En *D. melanogaster* no existe el factor M dominante y un individuo XXY se desarrolla como hembra debido a la presencia de dos cromosomas X (Adelman y Tu 2016).

A pesar de la rápida evolución aparente de las señales primarias que determinan el sexo, los genes posteriores de la cascada de diferenciación sexual, *Dsx* y *Fru*, están altamente conservados; el splicing *Dsx* y *Fru*, específico del sexo o sesgado por el sexo, se reporta ampliamente en muchos insectos, lo que indica funciones conservadas en la diferenciación sexual. El splicing de *Dsx* se ha descrito tanto en *Aedes* como en *Anopheles*, lo que sugiere la presencia de una actividad similar a *Tra*. Los elementos reguladores cis conservados que probablemente corresponden a los sitios de unión a *Tra/Tra-2* se encuentran en *An. gambiae* y *Ae. aegypti* en genes *Dsx* y *Fru*. A pesar de que se ha encontrado a *Tra* en cualquier mosquito, sigue siendo posible que el factor M y quizás factores adicionales puedan inhibir directa o indirectamente el splicing *Tra/Tra-2* para conferir splicing *Dsx* específico para macho (Figura 18) (Adelman y Tu 2016).

Figura 18. Diferenciación sexual en moscas y mosquitos



Fuente: Modificado de Sinkins 2016

En *Anopheles albimanus* no se ha determinado exactamente la cascada de diferenciación sexual. Sin embargo, se sabe que el gen *Transformer-2* está involucrado. Por lo tanto, con las cascadas descritas anteriormente se tiene una idea generalizada de lo que puede pasar para que ocurra la diferenciación sexual (Sánchez 2010).

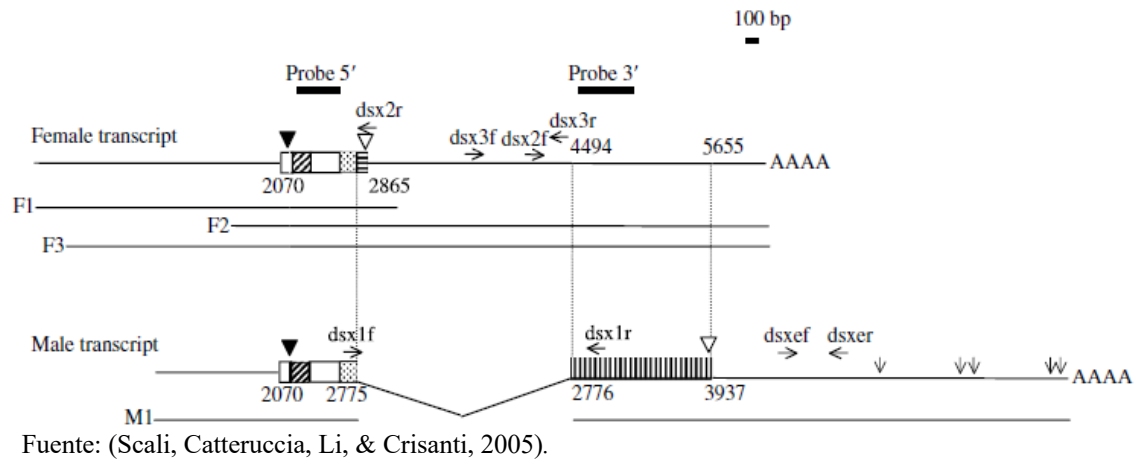
a. *Doublesex (Dsx)*: El gen *dsx* ha sido caracterizado en dípteros *M. scalaris*, *M. domestica*, *A. gambiae*, *B. tryoni*, *B. oleae*, *B. dorsalis*, *C. capitata* y en especies de *Anastrepha*. La organización molecular del gen varía entre los insectos, pero en todos ellos *dsx* presenta un procesamiento alternativo específico de sexo, lo que da lugar a proteínas *Dsx* específicas de macho y hembra (Sánchez, 2010).

Este se encuentra en la cascada de determinación del sexo y juega un papel esencial en la definición del sexo del insecto. *Dsx* codifica para dos factores de transcripción específicos del sexo, para hembras (*DsxF*) y para macho (*DsxM*); estos activan o reprimen los genes finales necesarios para la diferenciación de los rasgos sexuales (Scali, Catteruccia, Li, & Crisanti, 2005).

Tanto *DsxF* como *DsxM* comparten un dominio N-terminal, pero poseen dominios C-terminales diferentes. Esta diferencia se da por el splicing específico del sexo en el último exón de *dsx* pre-ARNm (Waterbury, Jackson, & Schedl, 1999). La región N terminal que contienen un dominio de dedos de zinc que depende de la fusión del gen *Transformer (tra)* (Scali, Catteruccia, Li, & Crisanti, 2005).

Las isoformas específicas de *dsx* son las responsables de la apropiada diferenciación de sexos en los tejidos somáticos y en las gónadas. El empalme femenino de *dsx*-pre ARNm se encuentra bajo el control de la proteína Transformer (Tra) y Transformer 2 (Tra-2) (la cual sólo se expresa en hembras) (Salvemini *et al.*, 2011)

Figura 19. Dominios del gen *Doublesex* en *Anopheles gambiae*



Los cuadros sombreados diagonalmente representan el dominio de unión del ADN y el dominio de oligomerización OD1. Los cuadros punteados señalan la región no específica del sexo del dominio de oligomerización OD2. La región masculina se encuentra rayada vertical y la región femenina rayada horizontal.

J. Evaluación de la expresión génica

La evaluación de expresión génica se mide mediante técnicas moleculares que permiten conocer y cuantificar la expresión de genes en una célula determinada. Para ello, se extrae ARN. El ARN o ácido ribonucleico es un ácido nucleico que media la síntesis de proteínas en las células. Se compone por una cadena sencilla, la cual está compuesta por una ribosa (azúcar) unida a una de las cuatro bases nitrogenadas y grupo fosfato (NIH, 2010). Dentro del proceso, por el cuál pasa el ARN para poder evaluar la expresión génica se encuentran:

1. Extracción de ARN: Consiste en tres etapas importantes: (a) lisar las células para liberar el ARN (b) purificación y (c) aislamiento (Frank & Holland, 2009). La lisis celular se puede llevar mediante métodos químicos, físicos o enzimáticos. La purificación y aislamiento se puede llevar a cabo por solventes orgánicos como fenol-cloroformo (Thermo Fisher Scientific 2018), o por cromatografía de intercambio iónico, unión a perlas magnéticas o unión a sílica (Frank & Holland, 2009). En este estudio se aplicó la

extracción de ARN total de pupas machos utilizando el kit SV Total RNA Isolation System, el cual se basa en una membrana de sílica (Promega 2018).

2. **Síntesis de ADNc:** Utiliza ARNm como material de partida. Después de la unión del cebador se sintetiza ADNc mediante la transcriptasa inversa o retro-transcriptasa, la cual es una enzima polimerasa de ADN (Roca & Mroginski, 1991). El ADNc sintetizado es utilizado como molde para una nueva cadena de ADN y posteriormente producir múltiples copias de ADNc por PCR (Passarge, 2009). En esta técnica se utilizan cebadores control como B-actina o Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para demostrar que al menos uno puede amplificar el ARN obtenido (Farrell 2010). Para la síntesis de ADNc en este estudio se utilizó el kit comercial GoScript Reverse Transcription System. Este kit incluye una transcriptasa inversa y un conjunto de reactivos para sintetizar ADNc para que posteriormente pueda ser amplificado por qPCR (Promega, 2018).

3. **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Es un procedimiento *in vitro* que permite amplificar secuencias de ADN definidas a partir de pequeñas cantidades de ADN de diferentes orígenes. Consta de tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión. Durante la primera etapa, las cadenas del ADN se separan en cadenas simples, en donde una de ellas, sirve como molde para la síntesis de una nueva cadena. Luego los cebadores que se encuentran cerca de la zona a amplificar se unen con las cadenas simples para comenzar la síntesis de una cadena sencilla, con ayuda de la enzima ADN polimerasa (Passarge, 2009). Se utilizó esta técnica en el presente estudio para confirmar la síntesis de ADNc del gen de interés y para verificar que no existiera contaminación de ADN genómico.

4. **PCR en tiempo real (qPCR):** Se desarrolló como un método preciso, eficiente y rápido para la detección de ácidos nucleicos. Se basa en la tecnología tradicional de la reacción en cadena de la polimerasa con algunas modificaciones, dentro de ellas se puede mencionar que está técnica combina la amplificación y la detección en un solo paso, puede usar cantidades menores de material de partida que la PCR tradicional, cuantifica el producto según la detección fluorescente y no hay proceso de post-amplificación (Biocompare 2010). Su unidad básica de medida es el ciclo umbral (CT), el cual indica cuando se cruza un nivel umbral determinado por el usuario, debido a que la fluorescencia irradia una muestra por la acumulación del producto de PCR. Cuanto mayor sea la cantidad de la muestra en el inicio de una reacción, más pronto se detectará un aumento significativo de fluorescencia (Farrell 2010). La cuantificación genética puede realizarse en términos absolutos o relativos (Mallona 2008).

a. **Cuantificación relativa:** Analiza cambios en la expresión de un gen en respuesta a un tratamiento comparando y relativizando a un gen de referencia previamente normalizado, donde su expresión no cambia en respuesta al tratamiento. A diferencia de la cuantificación absoluta, está no requiere de una curva de calibración (Fernández 2009).

b. **Cuantificación con curva estándar relativa:** Determina el cambio de expresión de un gen diana en una muestra en relación con el mismo gen en una muestra de referencia. Para ello se utiliza una curva estándar con diluciones seriadas de una muestra de concentración conocida. Las aplicaciones de este

método son: comparar niveles de expresión de un gen en diferentes tejidos, comparar los niveles de expresión de un gen en una muestra tratada y una no tratada y comparar la expresión de alelos de tipo salvaje y alelos mutados (Applied Biosystems 2010). Además, este tipo de cuantificación es muy utilizada cuando la eficiencia del gen de interés y los genes de referencia no son equivalentes. Por esta razón se utilizó este método en el presente estudio.

Todas estas técnicas requieren de la evaluación de calidad del ARN, por lo que se utiliza geles de integridad, los cuales se basan en geles de agarosa que miden la fluorescencia entre el ARNr 28S y el 18S. Las muestras excelentes de ARN muestran una cantidad mínima de manchas por encima, entre y debajo de las subunidades de ARNr 28S y 18S. La falta de definición de 28S y 18S significa regularmente que la muestra fue contaminada por nucleasas. Si la banda se encuentra en la parte inferior del gel, por debajo del nivel de la subunidad 18S indica una degradación limitada de la muestra o que el ARN no fue desnaturalizado correctamente. Un frotis o una banda distorsionada refleja la estructura de ARN secundario (Farrell, 2010).

Sin embargo, la técnica de PCR en tiempo real necesita estar normalizada por métodos apropiados para validar los resultados, y así, alcanzar su máximo potencial analítico. Un problema común es la diferencia de extracción de ARN mensajero entre muestras y el rendimiento de la transcripción reversa y la PCR en sí (Huggett *et al* 2005). Para evitar la influencia de estos factores, se aplica el gen de normalización contra el cual se determinará el nivel de expresión.

El proceso de normalización con uso de genes de referencia o control interno sigue siendo un problema recurrente que se está abordando por los científicos en los últimos años (Hugget & Bustin 2011). La variedad de protocolos es enorme y existen diversas metodologías y datos disponibles que de alguna manera afectan la integridad de la literatura científica.

K. Secuenciación Sanger

El método de Sanger fue inventado en 1975 por Frederick Sanger como una forma rápida de obtener secuencias de ADN (Sanger *et al.*, 1975). El procedimiento comienza con el diseño de cebadores cuyo extremo 3' termina justo antes de la secuencia de interés. El ADN por secuenciar se amplifica por medio de una PCR, a la que se le añaden didesoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con fluorescencia de diferentes colores para representar cada base. Estos no contienen un grupo 3'-OH, por lo que la amplificación no puede continuar luego de que ellos sean añadidos. Los ddNTPs se insertan de forma aleatoria, por lo que se obtienen fragmentos de ADN de tamaños diferentes que tienen un marcador que indica en qué base terminan. Esto también causa que todas las bases que existen en el fragmento eventualmente sean copiadas con un ddNTP. La electroforesis capilar permite que los fragmentos pasen en orden ascendente de tamaño por detector que identifica el fluorocromo al final de cada secuencia. Con una computadora se crea un

electroferograma, que muestra cada base detectada en orden, con lo cual se determina la secuencia del fragmento de ADN de interés (Guo *et al.*, 2008).

L. Software de análisis de estabilidad de expresión de genes

El RT-qPCR es un método rápido y sensible que proporciona datos precisos y confiables de amplificación de genes objetivo o de referencia. Sin embargo, la eficiencia de la amplificación puede ser sobrestimada debido a que ningún gen individual cumple los criterios de una referencia endógena ideal. Por lo tanto, es necesario seleccionar genes de referencia específicos utilizando tres algoritmos estadísticos diferentes, NormFinder, Bestkeeper y GeNorm (Wang *et al* 2012). Se utilizan tres indicadores principales para determinar el mejor candidato: desviación estándar, covarianza y análisis de correlación (Scharlaken *et al* 2008). Se han desarrollado varios algoritmos estadísticos capaces de detectar qué gen o genes candidatos son los más apropiados para la normalización (Mallona 2008).

1. **NormFinder**: El software NormFinder es un algoritmo para la identificación del gen de referencia más óptimo entre un conjunto de candidatos. La clasificación del conjunto de genes de referencia depende de la estabilidad de expresión, debido a que, el algoritmo está arraigado a un modelo matemático de expresión genética y utiliza una estadística sólida para estimar la variación de la expresión de los genes de referencia así como, también, la variación de la expresión entre los subgrupos de muestras (Nakamura *et al* 2016). El software NormFinder es capaz de analizar datos de expresión genética obtenidos a través de cualquier método cuantitativo, por ejemplo RT PCR en tiempo real y análisis de expresión basados en microarreglos. Los valores Ct de una prueba de RT PCR en tiempo real no se utilizan directamente, puesto que se usa una curva estándar o ΔCt , este método es para transformar los valores de Ct en cantidades de expresión genética en una escala lineal (Scharlaken *et al* 2008).

2. **BestKeeper**: El software Bestkeeper estima la correlación de los niveles de expresión de los genes candidatos, y, los genes más estables (Nakamura *et al* 2016). La estabilidad de la expresión genética estándar es un pre-requisito elemental para la normalización interna de los datos de expresión y los genes de referencia con una expresión estable asumida en algunas condiciones experimentales. El software desarrollado, denominado Bestkeeper, determina los genes de referencia más adecuados, de cierta cantidad de genes candidatos, y los combina en un índice. El índice se puede comparar con otros genes objetivo para decidir si se expresan diferencialmente con un tratamiento aplicado (Pfaffl *et al* 2004), con el objetivo de proponer un ranking de los genes analizados. La cuantificación relativa, que consiste en la estandarización con otro gen que se cree constante, es el método de elección para los genes candidatos (Suzuki *et al* 2000).

En estudios previos, se ha desarrollado un método para alimentar larvas de *Anopheles albimanus* con bacterias *Escherichia coli* que expresan ARNdh específico para los genes ZPG y BOL, con el objetivo de silenciar genes de espermatogénesis y producir machos estériles para el control vectorial (Flores *et al* 2016). Además, se analizó la expresión del gen ZPG en todos los estadios de *A. albimanus* (Ramos 2017).

V. ANTECEDENTES

A. Esterilización de *Anopheles albimanus* por silenciamiento de *Boule* y *ZPG* mediado por ARNi

El presente estudio contó con diversos recursos previamente disponibles, los cuales fueron utilizados durante la parte experimental. Se contó con los plásmidos pGEM-T Easy Vector con los insertos de los genes *Boule* y *ZPG* ligados. Adicionalmente, se utilizó la cepa de *E. coli* HT115 (DE3) transformada con un plásmido con el inserto de *ANT*. Además, se usaron los cebadores para *Boule* en qPCR diseñados por Flores *et al.*, (2016) y los cebadores para los genes de referencia *RPL49* y *RpS4* diseñados por Ortiz (2018).

1. Plásmido pGEM-T Easy Vector-*Boule* y plásmido pGEM-T Easy Vector-*ZPG*. En el presente estudio se utilizó los plásmidos donados por el Centro de Estudios en Biotecnología. Para diseñar estos, se partió de una muestra de ADNc de hembras de *A. albimanus*, donada por el Dr. Álvaro Molina del National Institute of Health (NIH). Se utilizaron los cebadores descritos en el Cuadro 2 para amplificar los genes *Boule* y *ZPG*. Los genes *ZPG* (*Zero population growth*) y *Boule* fueron los tratamientos experimentales. Se preparó cada reacción de PCR con 12.5 µl de GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix (Promega), 2µl de cada cebador (cuadro 2), 3.5µl de agua libre de nucleasas y 5µl de la muestra de ADN. Se amplificó con el siguiente programa de PCR: desnaturalización a 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C de 30 segundos, hibridación a 55°C por 3 minutos, extensión de 72°C por 30 segundos y extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron ligados en el plásmido pGEM-T Easy Vector (Fig. 20) con la enzima ADN T4 ligasa para producir los vectores completos con los insertos de interés (Fig. 19) (Flores, *et al.* 2016).

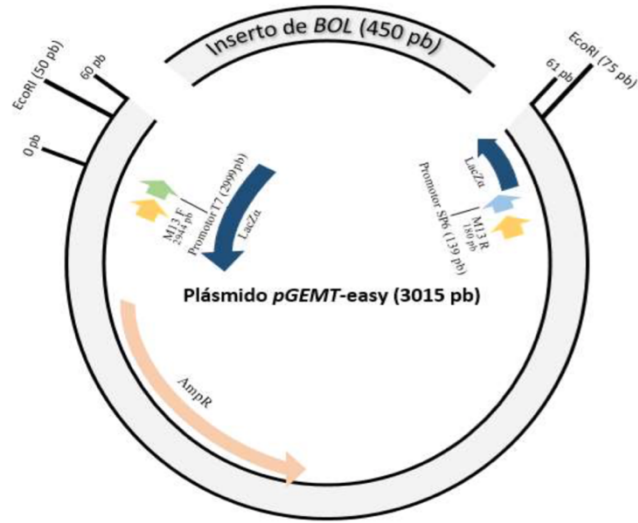
Cuadro 2. Secuencias de los cebadores para la clonación y producción de ARNdh de *zpg* y *boule*

Gen	Cebador forward	Cebador reverse	Tamaño esperado del inserto
<i>zpg</i>	5'-TTC GGT GGT TGT CAA CAA TG-3'	5'-AGA TCG CCA TCT TGG TCC T -3'	204pb
<i>Boule</i>	5'-TGA CAC AAC GGA AGC AGA AC-3'	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG GTC TCG CAG CAC AAT ACA A-3'	176pb

Fuente: Ana Gabriela Lara

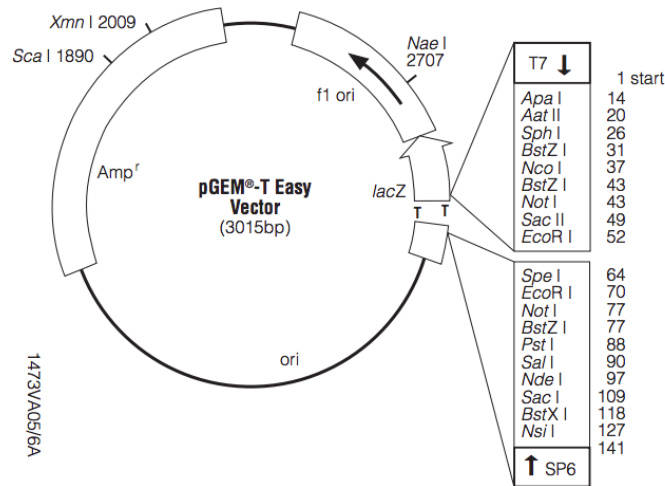
Los números indicados representan sitios clave en la secuencia del plásmido. Las flechas indican la dirección de los promotores, “primers” o genes. La imagen muestra únicamente el inserto de *boule*, pero el de *zpg* fue realizado de la misma manera.

Figura 20. Diagrama del plásmido pGEMT-easy



Fuente: Flores, P. & Flores, N. 2016

Figura 21. Plásmido pGEM-T Easy Vector de Promega



Fuente: Promega, 2015.

Por lo tanto, el presente estudio utilizó el plásmido pGEM-T-*Amp^r*-BOULE y pGEM-T-*Amp^r*-ZPG para producir ARNdh dirigido a cada gen. La producción del ARNdh se realizó en paralelo con el estudio de Villatoro, 2018 y Lara 2018, en el cual se pretendía analizar la expresión del gen *boule*. Esta asociación tenía el objetivo de analizar la expresión de la combinación entre ambos genes (*boule* y *zpg*) para determinar un porcentaje de silenciamiento mayor y presentar mejores resultados de esterilidad.

2. *E. coli* HT115(DE3) pGEM-T-*Amp*^R-*ANT*: El estudio involucró el uso de la cepa de *E. coli* HT115(DE3) transformada con el plásmido del inserto del gen *ANT*. Dicho plásmido fue generado utilizando los cebadores diseñados por Taracena, *et al.* 2015 presentados en el Cuadro 3. Dicha cepa transformada con el gen *ANT* (*Aintegumenta*) de *Arabidopsis thaliana* fue utilizada como el control experimental en el presente estudio.

Cuadro 3. Secuencia de los cebadores del control interno del estudio: *ANT*

Gen	Cebador forward	Cebador reverse	Tamaño esperado del inserto
<i>ANT</i>	5' – GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA ATT GGG TGG AGG ATT TCT TTG GGA CC – 3'	5' – GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA ATT GAC GCC TCG GTA TTG AGA AGT TCG – 3'	572pb

Fuente: Elaboración propia.

3. Cebadores para amplificación de PCR convencional utilizados para síntesis de ADNc: Se utilizaron los cebadores del gen de *actina* (Cuadro 4) diseñados por Taracena, *et al.* 2015 para verificar el tratamiento con DNasa y la síntesis de ADNc de la muestra de extracción de ARN de pupas macho de *An. albimanus*.

4. Cebadores para amplificación de PCR convencional utilizados para síntesis de ADNc: Se utilizaron los cebadores del gen de *actina* (Cuadro 4) diseñados por Taracena, *et al.* 2015 para verificar el tratamiento con DNasa y la síntesis de ADNc de la muestra de extracción de ARN de pupas macho de *An. albimanus*.

Cuadro 4. Secuencia de cebadores del gen de *actina*

Gen	Cebador forward	Cebador reverse	Tamaño esperado del inserto
<i>Actina</i>	-5'-CCA TGT ACC CAG GTA TTG CT-3'	5'- ATC TGT TGG AAG GTG GAC AG -3'	150pb

Fuente: Elaboración propia.

Para llevar a cabo el análisis de expresión relativa del gen *zpg* y *Boule* en el presente estudio se realizó un PCR en tiempo real utilizando los cebadores de amplificación de *zpg* diseñados por Ramos, A. 2018, los cebadores de amplificación para *Boule* diseñados por Flores *et al.*, (2016) y los cebadores de amplificación de los genes de referencia (*RpS4* y *RpL49*) diseñados por Ortiz, 2018. A continuación, se muestran las secuencias de los cebadores.

Cuadro 5. Secuencia de cebadores de genes de referencia para evaluación de *zpg* en qPCR

Gen	Cebador forward	Cebador reverse
<i>zpg</i>	5'-CACGACCGATCTCGTCTGG-3'	5'-TCGAAATGGAGACATCGCCG-3'
<i>Boule</i>	5'-ATG TCC CTA CCG AAC CCGC -3'	5'-CCG CTG ATG CCG CCG ACA AA -3'
<i>RpL49</i>	5'-AGG GTG GAA GGT GAT ATC TG-3'	5'-ACA TGG TCG CCC TTA AAT G-3'
<i>RpS4</i>	5'-AGG TGA TGG AGG TGC TGA AG-3'	5'-CGA TGA TGA ACA CGT TGG AG-3'

Fuente: Gabriela Lara

B. Evaluación de la expresión de los genes *Transformer -2*, *Doublesex* y Actina de músculo de vuelo

En un estudio realizado por Paiz, 2017 se sintetizaron cebadores para amplificar ARN de doble hebra de *Transformer-2* y ser utilizados para clonar esta secuencia en bacterias de *E. coli*. Se sintetizaron dos sets de cebadores, el primero tiene como cebador forward 5'-GCGGGGTGATTACTATCGCA-3' y como cebador reverse 5'-GCGGGGTGATTACTATCGCA-3' esperando un amplicón de 556 pb. El segundo set, con un cebador forward de 5'- GAACTACCACCAGCAAACAG-3' y cebador reverse 5-'GAACTACCACCAGCAAACAG-3' y un tamaño de amplicón esperado de 360 pb.

Para la amplificación de *Doublesex* por PCR en tiempo real se utilizó el cebador reverse qPCR-DSX1F 5'-CGACTTACCTCCGAGATG-3'. Para el gen presuntivo de Actina de músculo de vuelo en la hembra de *A. albimanus* fueron: qPCRfemaleUTR_2F: 5'GAC ATC CAA TCA CTA CAT CC3', qPCRfemaleUTR_2R: 5'CAA AGG CAA ACA CA GCT AAC3' diseñados para ambos genes por Paíz 2018.

VI. METODOLOGÍA

A. Sitio de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en la Ciudad de Guatemala, Guatemala. Los experimentos con *A. albimanus* se realizaron en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala utilizando los siguientes laboratorios: Laboratorio de Malaria del Centro de Estudios en Salud (CES) y Centro de Estudios en Biotecnología (CEB), Laboratorio del departamento de Bioquímica y Microbiología e Insectario. La secuenciación de los productos del gen de *actina* se realizó en las instalaciones del CDC en Atlanta por Pamela Flores. Los experimentos con *Anastrepha ludens* se llevaron a cabo en la planta de Moscamed ubicada en San Miguel Petapa. Las pruebas de competencia se realizaron en una finca en Villa Canales.

B. Sujetos de estudio

Población de mosquitos de *A. albimanus* recolectada en Sanarate, del insectario de la Universidad del Valle de Guatemala. Pupas y adultos de *Anastrepha ludens* de la cepa de sexado genético llamada familia 10. Adicionalmente se utilizarán pupas y adultos de *Anastrepha ludens* silvestres colectados alrededor del Lago de Amatitlán de frutos de *Casimirova edulis*.

C. Diseño, enfoque y tipo de investigación

El diseño de esta investigación es experimental verdadero, con un enfoque cuantitativo.

D. Tipo y tamaño de muestra

El tipo de muestra es no probabilístico aleatorio simple. Para los experimentos de silenciamiento de *zpg* y *boule* se realizaron tres réplicas biológicas, cada réplica con un grupo de 5 pupas macho. Se realizó el análisis de silenciamiento por qPCR mediante dos réplicas internas por cada réplica biológica. En los experimentos de expresión de genes de referencia (*RpS4*, *RpL49* y *GAPDH*), *Transformer-2*, *doublesex* y *actina* se tomaron muestras de individuos de diversos estadios de *Anopheles albimanus*. Se muestrearon los estadios L3, L4 temprano, L4 tardío, pupa hembra, pupa macho, adulto hembra y adulto macho (Cuadro 6).

Cuadro 6. Número de individuos de *Anopheles albimanus* utilizados

Estadio	Número de individuos
L3	20
L4 temprano	7
L4 tardío	7
Pupa hembra	5
Pupa macho	5
Adulto hembra	15
Adulto macho	25

Los experimentos de *Anastrepha ludens* para cada una de las 4 semanas se tomó una muestra de 8 litros de pupas. De estos se irradiaron aproximadamente un litro por tratamiento. De este litro se tomó una muestra de menos de 100 mL donde se encontraban las moscas que se utilizaron en los parámetros de control de calidad y del litro inicial se utilizaron para la prueba de competitividad.

E. Criterios de inclusión y exclusión

Para los estudios de silenciamiento de *zpg* y *boule* se utilizaron larvas (L2 a L4) para la alimentación con ARNdh y mosquitos macho de *Anopheles albimanus* de la cepa de Sanarate, el Progreso, en estadio de pupa para la expresión de ARN. Las pupas analizadas se encontraban sincronizadas, es decir se tomaron aquellas pupas que salieron el mismo día. No se utilizaron mosquitos hembra debido a que sólo se quería observar la esterilidad en machos ni se tomaron en cuenta pupas que posean malformaciones o que hayan muerto antes de la extracción de ARN. Para los estudios de expresión con los genes de referencia (*RpS4*, *RpL49* y *GAPDH*), *Transformer-2*, *doublesex* y actina no se utilizaron larvas en los estadios L1 y L2 adultos con más de dos días de eclosión.

En el caso de *Anastrepha ludens* únicamente se utilizaron machos que tuvieran la característica de ser pupas de color café. Las pruebas de control de calidad se hicieron solamente en los machos que habían sido irradiados, excepto por la prueba de fertilidad en la que se utilizaron hembras de la familia 10. Finalmente, en las pruebas de competitividad se usaron hembras y machos silvestres de las colectas en el Lago de Amatitlán y machos familia 10 con su respectivo tratamiento de radiación.

F. Variables

En el Cuadro 7, se explica con detalle la conceptualización y operacionalización de las variables de interés para el presente estudio.

Cuadro 7. Variables de interés en el presente estudio

Nombre	Definición	Naturaleza	Interrelación	Unidades de medición
Presencia de inserto del gen	Situación en la que el inserto del gen <i>Boule/ANT/ZPG</i> se encuentra ligado al plásmido pGEM-T clonado en cepa de <i>E. coli</i> HT115 (DE3).	Cualitativa	Independiente	Presente/Ausente
Método de inactivación de bacteria	Técnica utilizada para inactivar las bacterias <i>E. coli</i> HT115 (DE3) que producen el ARNdh.	Cualitativa	Independiente	Número de colonias de bacterias vivas para cada método.
Concentración de ARNdh producido	Proporción entre la cantidad de ARNdh y la cantidad de disolvente de agua ultra pura.	Cuantitativa	Dependiente	ng/μl
Tratamiento de alimentación a larvas	Tipo de comida dada a las larvas de <i>Anopheles albimanus</i> . Puede ser, ARNdh de <i>Boule</i> , ARNdh de <i>Boule+ZPG</i> , ARNdh de <i>ANT</i> y Cereal.	Cualitativa	Independiente	- <i>E. coli</i> HT115 (DE3) inactivada con <i>pGEMT-Amp^r-Boule</i> - <i>E. coli</i> HT115 (DE3) inactivada con <i>pGEMT-Amp^r-ZPG</i> - <i>E. coli</i> HT115 (DE3) inactivada con <i>pGEMT-Amp^r Boule+ZPG</i> - <i>E. coli</i> HT115 (DE3) inactivada con <i>pGEMT-Amp^r-ANT</i>
Temperatura	Temperatura a la cual se encontraba el lugar de desarrollo de las larvas	Cuantitativa	Independiente	°C
Humedad	Porcentaje de humedad al cual se encontraba el lugar de desarrollo de las larvas	Cuantitativa	Independiente	%

Continúa cuadro 7...

Continuación cuadro 7:

Nombre	Definición	Naturaleza	Interrelación	Unidades de medición
Desarrollo de larvas a pupas	Desarrollo de larvas a estadio de pupa en presencia de alimento con <i>E. coli</i> inactivada.	Cuantitativa	Dependiente	Número de pupas
Cantidad de mosquitos utilizados	Los individuos utilizados para realizar lisis.	Cuantitativa	Ayuda a obtener una buena concentración de ARN.	Número de individuos
Calidad de extracción de ARN	ARN íntegro sin contaminantes para llevar a cabo de forma confiable la síntesis de ADNc.	Cuantitativa	Dependiente	Gel de agarosa, Valor de absorbancia (280/230, 280/260) cercano a 2.
Presencia de gen de actina sexo-específico	3'-UTR que se encuentre únicamente en hembras	Cualitativa	Dependiente	Presente/Ausente
Similitud con otras actinas de otras especies	Porcentaje de similitud según alineamiento múltiple	Cualitativa	Dependiente	97% de similitud
Expresión de genes	Cambio de la expresión de <i>Boule</i> , <i>zpg</i> , <i>RpS4</i> , <i>RpL49</i> , <i>GADPH</i> , <i>Tra-2</i> , <i>dsx</i> y <i>actina</i> en relación con un gen de referencia.	Cuantitativa	Dependiente	$2^{-\Delta\Delta Ct}$: la expresión relativa del gen.
Eficiencia de cebadores	Eficiencia de amplificación de los cebadores para los genes: <i>zpg</i> , <i>boule</i> , <i>RpS4</i> , <i>RpL49</i> , <i>GADPH</i> , <i>Tra-2</i> , <i>dsx</i> y <i>actina</i> en la reacción de qPCR basada en la pendiente de la curva estándar de los promedios de C_q .	Cuantitativa	Dependiente	%

Continúa cuadro 7...

Continuación cuadro 7:

Nombre	Definición	Naturaleza	Interrelación	Unidades de medición
Longevidad	Cantidad de días que una mosca adulta puede sobrevivir en ausencia de luz, comida y agua.	Cuantitativa	Independiente	Días
Emergencia	Porcentaje de adultos que emergen de sus pupas	Cuantitativa	Independiente	%
Voladoras	Porcentaje de adultos que logran volar y salir de la pupa.	Cuantitativa	Independiente	%
Huevos	Cantidad de huevos que son puestos por una o varias hembras.	Cuantitativa	Independiente	Número de huevos
Fertilidad	Porcentaje de los huevos colocados que eclosionan y vivieron.	Cuantitativa	Independiente	%
Dosis	Cantidad de radiación absorbida por unidad de peso.	Cuantitativa	Independiente	Gray o Joule/kg
Número de dosis	Número de veces que se irradia para obtener una dosis completa.	Cuantitativa	Independiente	Número
Tiempo de dosis	Tiempo que se dejó la pupa en reposo en presencia de oxígeno antes de irradiar de nuevo.	Cuantitativa	Independiente	Horas

Fuente: Elaboración propia

G. Hipótesis

Las hipótesis planteadas fueron:

1. Genes de referencia

a. Hipótesis nula (H_0): El gen *RpS4* no cumplirá con una de las características (Ct, eficiencia, etc) adecuadas para ser un gen de referencia apto para qPCR.

Hipótesis alternativa (H_a): El gen *RpS4* cumplirá con las características (Ct, eficiencia, etc) adecuadas para ser un gen de referencia apto para qPCR.

b. Hipótesis nula (Ho): El gen *RpL49* no cumplirá con una de las características (Ct, eficiencia, etc) adecuadas para ser un gen de referencia apto para qPCR.

Hipótesis alternativa (Ha): El gen *RpL49* cumplirá con las características (Ct, eficiencia, etc) adecuadas para ser un gen de referencia apto para qPCR.

c. Hipótesis nula (Ho): El gen *GAPDH* no cumplirá con una de las características (Ct, eficiencia, etc) adecuadas para ser un gen de referencia apto para qPCR.

Hipótesis alternativa (Ha): El gen *GAPDH* cumplirá con las características (Ct, eficiencia, etc) adecuadas para ser un gen de referencia apto para qPCR.

2. Determinación del perfil de expresión de *Tra-2*, *dsx*, *actina*

a. Hipótesis nula (Ho): La expresión de *Transformer-2* y *dsx* es igual en los diferentes estadios (L3, L4 temprano y tardío, pupa hembra, pupa macho, adulto hembra y adulto macho de *Anopheles albimanus*.

Hipótesis alternativa (Ha): La expresión de *Transformer-2* y *dsx* es diferente al menos en uno de los estadios (L3, L4 temprano y tardío, pupa hembra, pupa macho, adulto hembra y adulto macho, de *Anopheles albimanus*.

b. Hipótesis nula (Ho): No hay una mayor expresión del gen presuntivo de actina de vuelo en adultos hembra que en los demás estadios del ciclo de vida de *Anopheles albimanus*.

Hipótesis alternativa (Ha): Hay una mayor expresión del gen presuntivo de actina de vuelo en adultos hembra que en los demás estadios del ciclo de vida de *Anopheles albimanus*.

3. Identificación de un gen presuntivo de actina con expresión específica *A. albimanus* hembra

a. Hipótesis nula (Ho): Se encontrará una isoforma del gen de actina que se exprese únicamente en hembras de *Anopheles albimanus* y con una región 3'UTR que permita diferenciarlo de otras actinas del mismo organismo.

Hipótesis alternativa (Ha): No se encontrará un gen de actina que se exprese únicamente en hembras de *Anopheles albimanus*.

4. Silenciamiento de genes de espermatogénesis: *zpg* y *boule*

a. Hipótesis nula (Ho): La inactivación por calor no afectará significativamente la concentración de ARNdh producida por bacterias transgénicas.

Hipótesis alternativa (Ha): La inactivación por calor afectará significativamente la concentración de ARNdh producida por bacterias transgénicas.

b. Hipótesis nula (Ho): La alimentación de larvas de *Anopheles albimanus* con bacterias transgénicas productoras de ARNdh de *Boule* y *zpg* no tendrá efecto significativo sobre la expresión del gen en las pupas macho.

Hipótesis alternativa (Ha): La alimentación de larvas de *Anopheles albimanus* con bacterias transgénicas productoras de ARNdh de *Boule* y *zpg* tendrá efecto significativo sobre la expresión del gen en las pupas macho.

5. Esterilización de *Anastrepha ludens* por medio de varias dosis de radiación gamma

a. Hipótesis nula (Ho): La emergencia de los adultos macho Familia 10 luego de la irradiación con dosis parciales es igual que la emergencia de los adultos macho Familia 10 irradiados con una dosis.

Hipótesis alternativa (Ha): La emergencia de los adultos macho Familia 10 luego de la irradiación con dosis parciales es mayor que la emergencia de los adultos macho Familia 10 irradiados con una dosis

b. Hipótesis nula (Ho): La longevidad de los adultos macho Familia 10 luego de la irradiación con dosis parciales es igual que la emergencia de los adultos macho Familia 10 irradiados con una dosis.

Hipótesis alternativa (Ha): La longevidad de los adultos macho Familia 10 luego de la irradiación con dosis parciales es mayor que la emergencia de los adultos macho Familia 10 irradiados con una dosis.

c. Hipótesis nula (Ho): El porcentaje de eclosión de los huevos puestos por hembras familia 10 al reproducirse con machos familia 10 irradiados con dosis parciales es igual al porcentaje obtenido de la reproducción con machos irradiación con una sola dosis.

Hipótesis alternativa (Ha): El porcentaje de eclosión de los huevos puestos por hembras familia 10 al reproducirse con machos familia 10 irradiados con dosis parciales es mayor al porcentaje obtenido de la reproducción con machos irradiación con una sola dosis.

d. Hipótesis nula (Ho): La cantidad de pupas colectadas de la fruta donde ovipositaron las hembras silvestres por las que compitieron machos silvestres con machos familia 10 irradiados con varias dosis es igual a la cantidad de pupas colectadas en las pruebas de competitividad con machos tratados con una sola dosis.

Hipótesis alternativa (Ha): La cantidad de pupas colectadas de la fruta donde ovipositaron las hembras silvestres por las que compitieron machos silvestres con machos familia 10 irradiados con varias dosis es menor a la cantidad de pupas colectadas en las pruebas de competitividad con machos tratados con una sola dosis.

H. Metodología

1. Control de *Anastrepha ludens* utilizando diferentes dosis de radiación gamma

a. Material Biológico:

1) Silvestre: Las moscas silvestres de *Anastrepha ludens* se obtuvieron de frutos dematasano (*Casimirova edulis*) colectados en fincas ubicadas en los alrededores del lago Amatitlán. Se colocaron los frutos en un área confinada para permitir su maduración y el crecimiento de las larvas, cuando estaban listas para pupar las larvas fueron colectadas. La maduración de las pupas se dió en un cuarto donde se registró la temperatura y humedad promedio. Luego de emerger se colocaron las moscas en grupos de 50 separando machos y hembras dentro de recipientes de plástico con alimento y una fuente de agua. Cada día se remplazaron los muertos por moscas vivas. Estas fueron utilizadas en las pruebas de competitividad en el campo.

2) Laboratorio: El material de laboratorio vino de la planta de Moscamed ubicada en San Miguel Petapa municipio del departamento de Guatemala. La cepa utilizada fue Familia 10. Esta es una cepa de sexado genético, las pupas de los machos son de color negro, mientras que las pupas de las hembras son de color café.

b. Tratamientos: La radiación gamma se aplicó con una fuente de cesio 137. Se evaluaron tratamientos y un grupo control, para cada uno se realizaron tres repeticiones. La irradiación se realizó en condiciones de hipoxia, para minimizar el daño en el tejido. Las moscas de los tratamientos en dos dosis fueron colocadas en un recipiente que les permitía estar en contacto con el aire determinado tiempo antes de realizar la siguiente parte del tratamiento. Para realizar la siguiente dosis se colocaron nuevamente en una bolsa y se succionó el aire para quedaran nuevamente en condiciones de hipoxia. Los tratamientos fueron los siguientes:

- 1) Control(80Gy)
- 2) 40Gy6hrs40Gy
- 3) 40Gy24hrs40Gy
- 4) 80Gy Adultos
- 5) 26.6Gy12Hrs26.6Gy12Hrs26.6Gy

c. Control de Calidad: Luego de los tratamientos se evaluó el daño que estos provocaron en las moscas. Para esto se realizaron diferentes actividades a fin de poder cuantificar cómo las dosis parciales afectaron de forma diferente a las moscas.

1) Emergencia: Se colocaron 100 pupas en un recipiente. Cada día se contó el número de moscas que emergieron exitosamente al cabo de 5 días se calculó un porcentaje que indica la emergencia promedio. Se realizaron tres repeticiones para cada uno de los tratamientos cada una de las semanas de prueba. Es decir, en total se realizaron doce pruebas para cada tratamiento a lo largo del periodo de prueba establecido.

2) Voladoras: Se colocaron 100 pupas en una jaula que con un orificio en la parte de arriba conectado a una trampa con alimento. Al emerger las moscas volaron hacia el alimento y una vez estén en esta jaula se contabilizaron. Cada día se contará el número de moscas que lograron volar hacia la comida y

luego de dos semanas se calculó el porcentaje total de moscas que volaron exitosamente. Para cada tratamiento se hicieron tres repeticiones por semana. Es decir, al fin del periodo de prueba se realizaron doce réplicas de cada tratamiento.

3) Eclosión: Para esto se juntaron hembras no tratadas con machos tratados, luego de la copulación se colectaron los huevos. Se colocaron diez machos tratados con diez hembras de laboratorio no tratadas en un vaso con alimento y agua. Los vasos estuvieron en un cuarto donde se registró la temperatura y la humedad promedio. En el fondo del vaso había una pequeña malla para que las moscas puedan ovipositar. Se recolectaron los huevos y se pusieron 100 en una incubadora. Posteriormente se cuantificó el porcentaje que eclosionó. Se realizaron cinco pruebas por tratamiento cada semana. Al final del periodo de prueba se hicieron 20 pruebas por cada tratamiento

4) Longevidad: Se evaluó la cantidad de días que sobreviven las moscas en ausencia de luz, comida y agua. Se colocaron 150 moscas en cajas Petri. Cada día se contará el número de moscas que han muerto hasta que pasaran 72 horas. Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento en cada semana de prueba. Al final del periodo de prueba se hicieron doce réplicas de cada tratamiento. Para estos tratamientos se calculó la mortalidad 72 horas, que indica el porcentaje de moscas que han fallecido a las 72 horas.

5) Competitividad con moscas silvestres: El objetivo de la técnica del insecto estéril es producir insectos infértiles que puedan competir exitosamente con los machos silvestres por copular con hembras silvestres. Para evaluar esto se realizaron pruebas en jaulas de campo de 7.5m de largo * 6m de ancho * 2.45m de altura con malla de 1mmx1mm. Estas jaulas estaban ubicadas en el municipio de Villacanales en la Finca San Agustín, con el fin de imitar condiciones de campo. Estas jaulas tenían fruta (Guayaba Tailandesa) colgada para que las hembras ovipositaran y también tenían bebederos y alimento. Para evitar que animales silvestres rompieran las jaulas en búsqueda de las frutas se colocaron frutas alrededor de las jaulas. Dentro de las jaulas se colocaron 100 hembras silvestres 100 machos silvestres de los colectados en la fruta alrededor del lago de Amatitlán para cada replica. También se agregaron 10000 machos tratados para que exista una razón de 100:1 entre machos tratados y machos silvestres, similar a lo que sucedería en la implementación real del programa. Las moscas silvestres se contaron y los machos tratados se agregaron tomando en cuenta el peso de las moscas y la emergencia promedio que es del 80%. Para poder empacar los machos tratados estos se colocaron en un cuarto frío donde se pusieron en un estado de movilidad casi nula para así poder facilitar el manejo.

6) Cuantificación de las pruebas de competitividad: Luego de que transcurrió tiempo suficiente para que las moscas copulen y ovipositen, se colectó la fruta y se llevó de vuelta a la Planta en San Miguel Petapa. Se cuantificó el número de larvas que nacen de la fruta y cuantas llegaron a pupa. Para cada uno de los tratamientos y para un grupo control se hicieron tres pruebas por cada una de las 4 semanas de prueba, el tratamiento de tres dosis irradiando cada 12 horas se evaluó, pero solo con una jaula, por motivos de disponibilidad de jaulas.

d. Plan de análisis de los datos y presentación de resultados: Para el análisis de los datos se utilizaron las medias de los grupos control y se compararán con los demás tratamientos mediante

pruebas t y pruebas ANOVA. Los datos control de moscas silvestres reproduciéndose en campo se utilizaron para calcular el porcentaje de inducción de esterilidad. Este porcentaje sirvió para determinar si alguno de los tratamientos es significativamente diferente de los otros en cuanto a su eficiencia. Finalmente se utilizó una matriz de correlaciones para hacer una comparación entre los tratamientos.

2. Control de *Anopheles albimanus*

a. Selección de genes candidatos

1) Genes de referencia: Se utilizó literatura citada para elegir los genes candidatos que permitió validar el método.

2) Genes de espermatogénesis: Se realizó búsqueda de literatura para identificar genes candidatos que estén involucrados en la formación de esperma de dípteros. Se escogió el gen *nht*, *fzo* y *gas8* de *Aedes aegypti* descrito por Whyard *et al.* (2015), debido a que estos genes ya fueron silenciados exitosamente en dicha especie, y se demostró que su silenciamiento sí produjo el fenotipo de esterilidad deseado.

b. Diseño de cebadores

1) Genes de referencia (*RpS4*, *RpL49*, *GDAPH*): Se utilizó Primer designing tool-NCBI-NIH, Primer3 y BLAST para el diseño de cebadores. Se eligieron los cebadores que presentaban una temperatura de fusión de 60 grados Celsius. El G_{C} fue otro criterio que se tomó en cuenta para seleccionar los cebadores, siendo el valor aceptable mayor a -5, tanto para horquillas, homodímeros y heterodímeros.

2) Gen *Transformer-2*: Se buscó la secuencia codificante para el gen *Transformer-2* en la plataforma Vector Base. Se utilizó la secuencia del ADNc de *Tra-2* (AALB005281-RA) para diseñar sets de cebadores, el T_m para todos los cebadores diseñados fue de 60. Se siguieron otros parámetros comunes para obtener un diseño de cebadores adecuado. De los sets de cebadores diseñados se seleccionaron 3, y de esos 3 los 2 mejores fueron sintetizados por Promega.

3) Gen *Doublesex*: La secuencia de *Dsx* para *An. albimanus* no se encuentra completa por lo que fue necesario el uso de dos. Las cuales se obtuvieron en VectorBase bajo el código de acceso: AALB0003344-RA y AALB0003342-RA (ver anexos) ya que ambas pertenecen a dos segmentos diferentes de la secuencia de interés, estas se unieron para complementar la secuencia. Las secuencias codificantes de los genes fueron analizadas en el programa Primer Quest Tool. Para la elección de los cebadores, estos deben cumplir ciertas características como: tamaño de 18-20 pb, T_m de 55°C – 63°C y con un porcentaje de CG de 20-50%.

Cada posible cebador fue analizado de manera individual con programa Oligo Analyzer Tool, en donde se eligieron los cebadores con menos cantidad de “Hairpins”, ΔG positivo y sin formación de heterodímeros y homodímeros en los extremos 3'. En base a estas características se obtuvieron cuatro parejas posibles candidatos como cebadores. De los cuales dos fueron sintetizadas y una utilizada para los análisis de qPCR.

4) *Gen zero population growth*: Se diseñaron dos parejas de cebadores alternativas para el gen *zpg* para el análisis de expresión mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Se obtuvo la secuencia del gen *zpg* de *A. albimanus* en la base de datos de Vector Base con el código de acceso AALB006050. Se realizaron alineamientos de la secuencia entre diferentes especies de dípteros: *Ae. Aegypti*, *A. gambiae*, *A. darlingi* y *D. melanogaster*, para verificar que la secuencia a utilizar para el diseño de cebadores era la Inexina 4 que representa el gen de *zpg*. De igual manera se realizaron alineamientos con otras inexinas de *Aedes aegypti* (ver anexos) para poder diseñar los cebadores en regiones semiconservadas, con el objetivo de evitar la interacción o silenciamiento de otra inexina. Se utilizó el programa de Primer 3 Plus versión 0.4.0 y Oligo Analyzer Tool versión 3.1. para diseñar las dos mejores parejas de cebadores de acuerdo a los siguientes parámetros: tamaño del cebador, Tm del cebador, %GC, menor cantidad de “hairpins” posible con un DG positivo que no formará homodímeros/heterodímeros con uniones en sus extremos 3’ y tamaño de amplicón.

5) Genes candidatos de espermatogénesis: Se obtuvo la secuencia del gen en la base de datos de Vector Base con el código de acceso AAEL005975 (*nht*), AAEL004471 (*fzo*), AAEL004231(*gas8*). Se realizaron alineamientos de las secuencias proteicas de estos genes de *Ae. aegypti* con *An. albimanus*, *An. darlingi* y *An. gambiae* mediante la herramienta Protein Blast de NCBI para determinar las regiones conservadas entre todas las especies.

Puesto que se encontró similitud entre las secuencias proteicas, se buscaron las secuencias de ADN codificante, sin UTRs y se realizaron los alineamientos de estas para las cuatro especies. En base a las regiones conservadas de las secuencias de ADN se diseñaron los cebadores de 20 a 25 nucleótidos para amplificación de ARNdh y cebadores de 19 a 21 nucleótidos para amplificación por PCR en tiempo real. Los cebadores de ARNdh se diseñaron para amplificar en las regiones reportadas por Whyard *et al.* (2015) para asegurar la producción de ARNdh con potencial de silenciamiento del gen. Se utilizó el software OligoAnalyzer para determinar la temperatura de anillamiento, % de guaninas y citosinas y los ΔG de formación de hairpins, homodímeros y heterodímeros.

6) Gen de *actina*: Se sintetizaron cebadores basados en las regiones complementarias de los genes de *actina* de *Anopheles gambiae* y *Aedes aegypti*. Se seleccionaron los que cumplan con las características siguientes:

- Menor complementariedad con AP
- Temperatura desanillamiento de menos de 68°C
- No tener repeticiones de más de 3 bases idénticas seguidas
- Terminar en C o G
- Porcentaje GC cercano al 50%
- Menor cantidad de horquillas y dímeros

c. Alimentación y mantenimiento de mosquitos para evaluación de expresión y silenciamiento de genes estudiados

1) Alimentación de larvas de *A. albimanus* para la evaluación de expresión de genes *GAPDH*, *RPS4*, *RPL49*, *Tra-2*, *Dsx*, y *actina* de músculo de vuelo: Los estadios larvarios L3, L4 temprano, L4 tardío, pupa hembra y pupa macho fueron alimentados diariamente con cereal (mezcla 3:1 de Nestum y levadura seca activa). A las hembras y machos adultos se les alimentó con un algodón humedecido con agua miel (7:3 de azúcar y agua).

2) Optimización de producción de ARN de doble hebra del gen *zpg* y *boule*

a) Producción de *Escherichia coli* HT115 (DE3) transgénica: Se llevó a cabo la transformación de *E. coli* HT115 (DE3) con el plásmido pGEM-T Easy Vector *Amp^r* con inserto de *Boule*, y otra transformación con el mismo plásmido con el inserto del gen *zpg*. Para realizar las transformaciones, se utilizaron los plásmidos mencionados en antecedentes producidos por Flores *et al.* (2016).

Para la transformación con los plásmidos con insertos de *Boule* y *zpg* se utilizaron células de *E. coli* HT115 (DE3) competentes, brindadas por el CEB. La transformación fue realizada mediante choque térmico según el POE 1 (ver anexos). Brevemente, se añadió 1 µl de dilución 1:5 del ADN plasmídico a 50 µl de células *E. coli* HT115 (DE3) competentes. Se dejó la mezcla en hielo por 30 minutos y se colocó en baño de agua a 45°C por 50-60 segundos. Se volvió a poner el tubo en hielo por 2 minutos y luego se añadió 900 µl de medio S.O.C Medium. Se incubó por 1 hora y 30 minutos con agitación constante de 130-150 rpm. Se sembró las bacterias transformadas en placas de agar LB con tetraciclina (12.5 µg/ml) y carbenicilina (100 µg/ml) y en placas LB+tetraciclina (12.5 µg/ml) + carbenicilina (50 µg/ml), para determinar si las bacterias retenían el plásmido con ambas concentraciones de carbenicilina. Se utilizó tetraciclina y carbenicilina marca Merck.

b) Evaluación de estabilidad de los insertos de *boule*, *zpg* y *ANT* en cepas de *E. coli* transformadas: Se evaluó la estabilidad de los insertos de *Boule* y *ZPG* en las cepas transformadas. Además, se evaluó también la estabilidad del inserto de *ANT* en la bacteria transgénica *E. coli* HT115 (DE3) pGEM-T-*Amp^r*- *ANT* mencionada en antecedentes que fue transformada por Flores *et al.* (2016) y proveída por el Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) por la Dra. Pamela Pennington. Se determinó la estabilidad de los insertos de los genes en las cepas transformadas mediante PCR de colonias según el POE2 (ver anexos). Se preparó una reacción de PCR de colonias con los cebadores M13F y M13R universales. Estos cebadores permiten la amplificación de un segmento del plásmido pGEM-T Easy Vector de 252 pb, y el plásmido con el inserto ubicado entre los promotores T7. Se utilizó ADN plasmídico con los insertos de *Boule* y *ZPG* como controles positivos del PCR.

La estabilidad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8%) por la presencia de bandas del tamaño esperado para cada inserto. Para esto, se compararon las bandas de los productos de PCR de las muestras de *E. coli* HT115 (DE3) transformadas con las bandas de los controles positivos de ADN plasmídico para determinar la presencia o ausencia de cada inserto en las colonias analizadas.

c) Inducción de producción de ARN de doble hebra de *zpg*, *boule* y *ANT*: Se preparó el ARNdh mediante inducción con IPTG según el POE 3 (ver anexos). Se realizaron tres cultivos de bacteria transformada, uno de *E. coli* HT115 (DE3) pGEM-T-*Amp^r-Boule*, otro de *E. coli* HT115 (DE3) pGEM-T-*Amp^r-ANT* y el último de *E. coli* HT115 (DE3) pGEM-T Easy Vector *Amp^r-ZPG*. Brevemente, para cada cepa de *E. coli* transformada, se preparó el pre-cultivo en LB caldo+Tetraciclina+Carbenicilina y se inoculó una colonia aislada de la cepa de *E. coli* correspondiente. Se dejó crecer el cultivo toda la noche a 37°C con agitación constante de 130rpm. A las 15-20 horas se diluyó el pre-cultivo a 6.66X en caldo 2XYT+Tet+Carb y se incubó a 37° y 130rpm por 20-30 minutos hasta que se alcanzó un OD₆₀₀ = 0.4. Una vez se llegó a dicho OD₆₀₀ se indujo con IPTG (Sigma), a una concentración final de 0.4mM. Se incubó en las mismas condiciones por 2 horas.

Las bacterias *E. coli* HT115 (DE3) se inactivaron para la posterior alimentación de las larvas de *A. albimanus*. Se probaron diferentes métodos de inactivación con el fin de obtener una concentración óptima de ARNdh.

Los métodos evaluados fueron:

- Lisis celular por ebullición de 5 minutos en baño maría
- Lisis celular por ebullición de 10 minutos en baño maría
- Lisis celular por ebullición de 15 minutos en freidora
- Lisis celular con calor seco a 100°C por 1 hora
- Lisis celular con calor seco a 70°C por 30 minutos
- Lisis celular con calor seco a 70°C por 1 hora
- Exposición a estreptomycinina.

Para los métodos por ebullición a 100°C, (en freidora o en baño maría en beaker), se colocó el cultivo inducido en tubos falcon de 50ml y se dejaron flotando en el agua por el tiempo establecido. Luego se colocaron los tubos en agua con hielo por 8 minutos para evitar que el cultivo se mantenga mucho tiempo en la temperatura óptima de las RNAsas de la bacteria, que es alrededor de los 30°C (Misra y Apirion, 1979). El método de ebullición por 15 minutos incluyó la concentración del cultivo a 2X, para aumentar la concentración de ARNdh. Para la lisis celular por calor seco los cultivos se pasaron a frascos de vidrio pyrex y se colocaron dentro de un horno de secado de cristalería previamente calentado a 100°C o 70°C, según corresponda. La inactivación por antibiótico se realizó añadiendo 25 ml de cultivo y 50µl de estreptomycinina 50µg/µl (Gibco de Invitrogen Corp.), para obtener una concentración final de 0.1µg/µl. Se incubó 1 hora a 37°C y 130 rpm.

d) Evaluación de la concentración e integridad de ARNdh producido: Se realizó la extracción del ARNdh producido para verificar su integridad y concentración posterior a la inactivación por ebullición. Se extrajo utilizando TRIzol LS Reagent, (Thermo Fisher Scientific), US. El procedimiento se realizó según el POE 4 (ver anexos). Brevemente, se comenzó con 0.25ml de muestra de cultivo de bacteria

inactivado. Este se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió en 50µl de SDS 1% y se lisó las células por ebullición 2 minutos en beaker. Se añadió 64µl de Buffer RNAase A (composición descrita en el POE 4) y 1µl de RNase A bovina (Sigma) en dilución 1:10. Se incubó a 37°C por 5 minutos para activarla y se añadió 0.75ml de TRIzol LS Reagent y 0.2ml de cloroformo. Se centrifugó y se traspasó la fase superior acuosa a otro tubo. Luego se añadió 0.5ml de isopropanol, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El botón se resuspendió en 1ml de etanol 75%, se centrifugó y dejó secar a temperatura ambiente. De último se resuspendió en 20µl de agua libre de ARNasa y se incubó a 55°C por 10 minutos. Se midió la concentración del ARN con el Nanodrop One (Thermo Scientific, US).

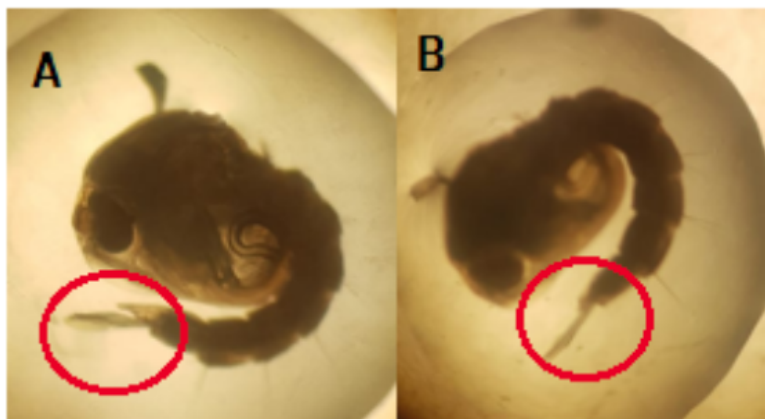
e) Alimentación de larvas de *A. albimanus* con *E. coli* HT115 (DE3) inducida e inactivada: El experimento de alimentación contó con 40 larvas por cada tratamiento (ARNdh *Boule*, ARNdh de *Boule*+*ZPG*, ARNdh de *ANT*, *E. coli* HT115(DE3), comida ABC y Cereal), siendo el ARNdh de *ANT* control experimental de silenciamiento. Los tratamientos de *E. coli*, comida ABC y cereal se utilizaron como controles internos de insectario para asegurar que estos no tuvieran un efecto negativo sobre el desarrollo de las larvas. Se colocaron 20 larvas en estadio L1 en una placa Petri (marca Falcon, de 150 x 25 mm) con 80ml de agua desclorada (4 ml/larva). Las placas se mantuvieron en un cuarto de insectario con temperatura controlada entre 27-30°C y humedad de 54-70%. Las larvas L1 fueron alimentadas con cereal de bebé Nestum marca Nestlé y levadura seca activa no instantánea marca Red Star (3:1). A partir del estadio L2, a cada placa con 20 larvas se le colocó la comida de cada tratamiento. Esta se preparó de la siguiente forma:

- Comida ABC: 0.023 g de comida ABC triturada (0.009 g de comida de pez marca Kijaro, 0.01 g de goma guar marca Sigma y 0.004 g de la levadura seca activa no instantánea marca Red Star).
- Tratamiento con ARNdh de *Boule*: 200 µl de cultivo bacteriano inactivado con ARNdh del gen *Boule*, y 0.023 g de comida ABC triturada.
- Tratamiento con ARNdh de *zpg*: 200 µl de cultivo bacteriano inactivado con ARNdh del gen *zpg*, y 0.023 g de comida ABC triturada.
- Tratamiento con ARNdh de *Boule*+*ZPG*: 100 µl de cultivo bacteriano inactivado con ARNdh del gen *Boule*, 100 µl de cultivo bacteriano inactivado con ARNdh del gen *ZPG* y 0.023 g comida ABC.
- Tratamiento con ARNdh de *ANT*: 200 µl de cultivo bacteriano inactivado con ARNdh del gen *ANT* y 0.023g de comida ABC.
- Tratamiento de *E. coli* HT115(DE3): 200 µl de cultivo bacteriano inactivado sin transformar y 0.023g de comida ABC.
- Tratamiento de Cereal: cereal de bebé Nestum y levadura seca activa no instantánea (3:1).

La mezcla de ARNdh y comida ABC se dejó por 4 horas por la mañana en cada placa y luego de ser retirada se les dio la comida de cereal y levadura. Cuando las larvas llegaron a estadio de pupa se procedió a realizar el sexado para separar las pupas machos. El sexado se realizó con ayuda estereoscopio, y se buscaron los rasgos característicos de cada sexo. Si la pupa contaba con una terminación alargada al lado de las dos aletas al final de su cola, se clasificó como macho (Fig. 22). Se formaron grupos de 5 pupas

macho (empupadas el mismo día) y a estos grupos se les realizó el análisis de expresión de *Boule* en los tres tratamientos (*Boule*, *Boule+ZPG* y *ANT*).

Figura 22. Sexado de pupas de *A. albimanus*. (A) pupa hembra con dos aletas y terminación corta. (B) pupa macho con dos aletas y terminación alargada.



Fuente: Foto tomada por Ana Lucía Meléndez, 2018

d. Extracción de ARN total: Se realizó la extracción de grupos de cinco pupas macho con kit SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation), según el POE 5 (ver anexos). El kit utiliza columnas que atrapan el ARN total de las pupas y luego este se eluye. Para ello se inició añadiendo 175 μ l de buffer de lisis (RNA Lysis Buffer, Promega Corp.) y se maceraron las cinco pupas, dejando el buffer actuar de 15 a 20 minutos. Luego se agregó buffer de dilución, se centrifugó y se transfirió parte del lisado a un tubo nuevo. Se añadió etanol al 95% y se pasó a una columna del kit. Se realizó un lavado con solución de lavado de ARN y se centrifugó. Luego se añadió una mezcla de DNasa I diluida en Buffer Yellow Core y MnCl₂ 0.09M (composición de la mezcla dada en el POE 5), y se dejó incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó solución Stop y se hicieron otros dos lavados con la solución de lavado del kit. Se transfirió a una nueva columna, se agregó agua libre de nucleasas y se centrifugó. Lo eluido se pasó a un nuevo tubo y se midió la concentración de ARN con el Nanodrop One (Thermo Scientific, US) a 230, 260 y 280 nm.

Este procedimiento también fue realizado para extraer ARN de estadios larvarios L3, L4 temprano, L4 tardío, pupa hembra, pupa macho, adulto hembra y adulto macho. Las extracciones fueron realizadas en triplicado.

e. Producción de ADN complementario de ARN de *A. albimanus*: Se realizó el tratamiento con ADNasa del ARN extraído para eliminar la contaminación con ADN genómico y proceder al PCR de transcripción reversa para producción de ADN complementario (ADNc). Para ver el procedimiento detallado ver POE 6 (anexos). Brevemente, para realizar el tratamiento con ADNasa a 1 μ g de ARN se le

añadió 1uL de RQ1 Buffer de reacción RNase-free DNase 10x, 1uL de RQ1 RNase-free DNase (1 unidad/ μg ARN) y agua libre de nucleasas hasta llevarlo a un volumen final de 10uL. Se incubó por 1 hora a 37°C y luego se añadió 1uL de RQ1 Solución Stop de DNase y se dejó incubando a 65°C por 10 minutos.

El tratamiento se verificó mediante un PCR de *actina* para determinar las muestras libres de ADN genómico. La reacción de PCR se preparó con 7.5 uL de GoTaq Hot Start Master Mix 2x de Promega, 1uL del cebador de *actina* forward (5'-CCA TGT ACC CAG GTA TTG CT-3') y 1uL del cebador de *actina* reverse (5'- ATC TGT TGG AAG GTG GAC AG -3') a 10uM cada uno y 1 μL del ARN tratado con ADNasa. Se utilizó el programa de PCR descrito en el POE 6 en el termociclador Mastercycler Nexus gradient (Eppendorf). Se confirmó mediante una electroforesis en gel de agarosa 1%. La ausencia de bandas de 150 pb (gen de *actina*) y 300pb de ADN genómico indica que se eliminó la contaminación genómica y por lo tanto se realizó un tratamiento con ADNasa exitoso.

La síntesis de ADN complementario se realizó mediante un PCR de transcripción reversa (RT-PCR) con el kit GoScript™ Reverse Transcription System de Promega. Para ello a cada muestra de ARN tratado se le añadió 1uL de cebadores Oligo (dT) (0.5 μg) y 1uL de “random primers” (0.5 μg) del kit. Se incubó a 70°C por cinco minutos. Se preparó la mezcla de transcriptasa reversa según el POE 3, y se añadió 9 uL de la mezcla de transcriptasa a cada muestra de ARN con cebadores. Se realizaron dos los ciclos del termociclador según las especificaciones del SOP. Finalmente, se realizó un PCR convencional de *Actina* para confirmar la presencia de ADNc en cada muestra.

f. Evaluación de la eficiencia de los cebadores

1) *Boule* y *zpg*: Previo a evaluar la expresión de *Boule* y *zpg* en las pupas macho tratadas de *A. albimanus*, se llevó a cabo reacciones de qPCR con el fin de evaluar la eficiencia del par de cebadores de *Boule* diseñados por Flores *et al.* (2016) y *zpg* diseñados por Ramos, A. 2018 (descritos en la sección de antecedentes). Dichos cebadores tenían eficiencias reportadas por Ramos (2018) de 150.27% y 166.4% con concentraciones de 0.4 μM y 0.6 μM , respectivamente para *boule*. En el caso de *zpg* tenían eficiencias reportadas de 89.37% y 118.24% con concentraciones de 0.4 μM y 0.6 μM , respectivamente para *zpg*. Estos valores no se encuentran en el rango óptimo de 90-110%, por lo cual se evaluó la eficiencia con un nuevo programa de PCR especificado en el POE 7 (ver anexos). Este programa contaba con las condiciones recomendadas por el fabricante para PowerUp SYBR Green Master Mix, y se esperaba obtener eficiencias adecuadas, en comparación a los porcentajes de eficiencias mencionados anteriormente. Los genes de referencia utilizados fueron *RpS4* y *RpL49* diseñados por Ortiz, E. 2018, a una concentración de 0.33 μM . Se utilizaron estos genes de referencia para poder obtener la expresión de *zpg* y *boule* relativa a los genes de referencia de *A. albimanus*. La evaluación de eficiencia de los cebadores se realizó mediante una curva de diluciones en serie.

Brevemente, se limpió y desinfectó la campana de área blanca y se dejó 15 minutos en UV. Se preparó dos mezclas de reacción de PCR, una reacción con concentración $0.4\mu\text{M}$ y otra con $0.6\mu\text{M}$ de los cebadores de *Boule* y *zpg*. Se agregó el PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, US), agua y cebadores según los cuadros 8 y 9 para cada mezcla de reacción. Se añadió $7.5\ \mu\text{l}$ de la mezcla a cada pozo de la placa de qPCR. Posteriormente, en la campana de ARN (previamente desinfectada) se añadió $2.5\ \mu\text{l}$ de la dilución de la plantilla de ADNc de pupas de *A. albimanus* silvestres correspondiente en cada pozo de la placa, en triplicado. Se utilizó las diluciones 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:250 y 1:500 para poder realizar la curva de eficiencia.

Cuadro 8. Concentraciones y cantidades de los componentes de la reacción de qPCR para evaluación de eficiencia de cebadores $0.4\mu\text{M}$

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μl) para n=1
Power up Sybr green	2x	1x	5
Agua			1.7
Primer F (Boule)	$10\ \mu\text{M}$	0.4	0.4
Primer R (Boule)	$10\ \mu\text{M}$	0.4	0.4
Plantilla diluida			2.5
Total			10

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 9. Concentraciones y cantidades de los componentes de la reacción de qPCR para evaluación de eficiencia de cebadores $0.6\mu\text{M}$

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μl) para n=1
Power up Sybr green	2x	1x	5
Agua			1.3
Primer F (Boule)	$10\ \mu\text{M}$	0.6	0.6
Primer R (Boule)	$10\ \mu\text{M}$	0.6	0.6
Plantilla diluida			2.5
Total			10

Fuente: Elaboración propia

Se centrifugó la placa de qPCR y se colocó en el termociclador LightCycler 96 System (Roche) y se utilizó el programa indicado en el POE 7. Con los datos de C_q obtenidos del programa LightCycler 96 se realizó la gráfica de curva de eficiencia, se determinó la pendiente de la recta con Microsoft Excel y se utilizó la herramienta “qPCR efficiency calculator” de ThermoFisher Scientific para obtener el porcentaje de eficiencia con cada concentración de cebadores evaluada.

Para los cebadores de *boule* se determinó que la concentración de 0.4uM daba la mejor eficiencia, sin embargo para *zpg* ninguna de las dos concentraciones presentó buena eficiencia. Debido a ello se evaluaron en concentración final de 0.2μM y 0.3μM. Las diluciones en agua DEPC fueron: 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:250 y 1:500, con el objetivo de determinar a qué dilución amplificaba mejor el cebador de *zpg* y si contaba con una eficiencia entre 90-110%.

2) *Transformer-2*: Se utilizó el kit Power up Sybr Green de Thermo Scientific, descrito anteriormente. El ADNc que se utilizó para la optimización fue una mezcla en volúmenes iguales de pupa hembra y pupa macho, o el ADNc de adulto macho. Se evaluaron diferentes reacciones variando la concentración de los cebadores diseñados en 0.6, 0.4 y 0.3 uM (Cuadro 10). Además, se realizó una curva de ADNc a diferentes diluciones para evaluar la eficiencia de los cebadores. La reacción consistió en la mezcla de Power up Sybr Green 1x, de agua DEPC, cebadores forward, cebador reverse y la dilución de ADNc correspondiente (Cuadro 10), obteniendo un volumen final de 10 uL. Al finalizar la mezcla de la reacción, esta se llevó al Lightcycler 96 qPCR. Esta optimización se realizó hasta obtener un porcentaje de eficiencia entre 90% y 110%.

Cuadro 10. Cantidades utilizadas para realizar el master mix para el PCR en tiempo real.

Set de cebadores	Cebador forward (uL)	Cebador reverse (uL)	Agua DEPC (uL)	Power up Sybr green (1x)	Plantilla total diluida (uL)*
TRA2A TRA2B TRA2C TRA2D	0.6	0.6	1.3	5	2.5
TRA2A TRA2C TRA2D	0.4	0.4	1.7	5	2.5
TRA2A TRA2C TRA2E	0.3	0.3	1.9	5	2.5

Fuente: Elaboración propia

3) *Actina y doublesex*: Se utilizaron los cebadores forward y reverse diseñados y evaluados por Paiz *et al.* 2018, datos no publicados, a una concentración de 0.33uM.

g. PCR en tiempo real. Una vez evaluada la eficiencia de los cebadores, se llevó a cabo el qPCR para evaluar la expresión de los genes *Boule*, *zpg*, *dsx*, *Tra-2* y *actina* de músculo de vuelo. Los genes

Boule y *zpg* se evaluaron en las pupas macho tratadas de *A. albimanus*. La expresión de los genes de *dsx*, *Tra-2* y *actina* se evaluaron en todos los estadios de *A. albimanus* tanto machos como en hembras. Se realizó la amplificación del gen de interés, así como amplificación de dos genes de referencia (*RPL49* y *RpS4*). Esto se hizo con el fin de obtener la expresión de *Boule*, *zpg*, *dsx*, *Tra-2* y *actina*, relativa a los genes de referencia de *A. albimanus*.

El procedimiento se realizó según el POE 7 (ver anexos). Brevemente, se preparó la reacción con el Power up SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, US), cebadores del gen a amplificar y agua libre de nucleasas. Los cebadores de *Boule* se utilizaron en concentración final de 0.4 μM ; *dsx* y *actina* a una concentración final de 0.33 μM ; *Tra-2* a una concentración final de 0.3 μM . Los cebadores de los genes de referencia se utilizaron en concentración final de 0.33 μM , según la eficiencia optimizada por Ortiz (2018).

Se colocó 7.5 μl de la reacción en cada pozo de una placa para qPCR y se añadió 2.5 μl de la dilución 1:10 de plantilla de ADNc correspondiente en cada pozo, en triplicado. Se selló la placa y se centrifugó. Se colocó dentro del termociclador LightCycler 96 System de Roche y se utilizó el programa indicado en el POE 7.

Para evaluar la expresión de *zpg* relativa a los genes de referencia de *A. albimanus* se utilizó el método de Curva Estándar Relativa, ya que no se obtuvo una eficiencia óptima de cebadores y además la eficiencia de los cebadores de *zpg* no eran equivalentes con las eficiencias de los genes de referencia. Este método este método utilizó un calibrador, el cual es una base para comparar los resultados. En este caso los calibradores fueron los ADNc sintetizados a partir de los tratamientos con ARNdh de *ANT* y de *E. coli* HT115(DE3) sin transformar. Las muestras a analizar en conjunto con los cebadores fueron los tratamientos de ARNdh de *zpg* y ARNdh de la combinación entre *zpg* y *boule*. El tratamiento utilizado para la elaboración de la curva estándar y poder evaluar la eficiencia de los cebadores de *zpg* fue el ADNc sintetizado a partir del tratamiento con ABC.

El procedimiento de la mezcla de reacción de qPCR con el SYBR Green de Thermo Fisher Scientific, US y las condiciones utilizadas en el termociclador Light Cycler 96 Roche fueron las mismas a las descritas anteriormente (SOP 7). Los cebadores de *zpg* se evaluaron a una concentración final de 0.3 μM y 0.33 μM para los cebadores de los genes de referencia. La dilución de ADNc para *zpg*, *zpg+boule*, *ANT* y *E.coli* HT115(DE3) fue en 1:25 en agua DEPC. Las diluciones del ADNc para la curva con ABC en agua DEPC fueron: 1:10, 1:25, 1:50, 1:75, 1:100, 1:250 y 1:500.

h. Análisis de expresión de los genes evaluados. Los datos obtenidos de Cq del qPCR se analizaron mediante el método de cuantificación relativa, que utiliza la fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Este método mide el cambio relativo de niveles de expresión de ARNm.

Para determinar el nivel de expresión, se trabajó con la media del valor Cq (Ct) de las tres réplicas experimentales del qPCR para cada muestra. Primero se calcularon los ΔCt para las muestras de pupas tratadas para *boule* y *zpg* (alimentación con ARNdh de *Boule*, ARNdh de *zpg* y con ARNdh de *Boule+ZPG*). Para los genes de *Tra-2*, *dsx* y *actina* de músculo se calcularon los ΔCt para las muestras de los diferentes estadios (L3, L4 temprano, L4 tardío, pupa hembra, pupa macho, adulto hembra y adulto macho) de *A. albimanus*. Se realizó calculando las diferencias (descritas como Δ) entre los valores Ct de amplificación de cada gen de interés y de los valores Ct de la media de los genes de referencia, con la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct_{\text{Tratamiento}} = Ct (\text{gen de interés}) - Ct (\text{genes de referencia})$$

Luego, se procedió a calcular los ΔCt para las muestras control (alimentación con ARNdh de *ANT* para los genes *boule* y *zpg*; estadio L3 para *Tra-2*, *dsx* y *actina*). Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct_{\text{Control}} = Ct (\text{gen de interés}) - Ct (\text{genes de referencia})$$

Se calculó el promedio de todos los $\Delta Ct_{\text{Control}}$ y luego se calculó la diferencia entre el $\Delta Ct_{\text{Tratamiento}}$ y el $\bar{x}\Delta Ct_{\text{Control}}$, descrito como $\Delta\Delta Ct$. Se usó la fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Tratamiento}} - \bar{x}\Delta Ct_{\text{Control}}$$

Donde $\bar{x}\Delta Ct_{\text{Control}}$, es el promedio de los ΔCt control.

Finalmente, se calculó el “fold” (expresión relativa) del gen de interés. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Los resultados obtenidos de expresión relativa de los genes de interés de *Boule* y *zpg* se analizaron con el software R versión 3.4.1. Se buscó determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de expresión relativa del gen de interés en los diferentes tratamientos de alimentación de larvas. Para esto llevó a cabo una prueba de ANOVA de un factor con significancia de 0.05. Primero se verificó que se cumplieran los supuestos del modelo mediante: 1) Una prueba Shapiro-Wilk para determinar si los datos provenían de una población normalmente distribuida; 2) Una prueba Bartlett para verificar la homogeneidad de varianzas; y 3) Una prueba de independencia de residuos.

La estadística para analizar los datos obtenidos de la expresión del gen *Transformer-2*, *dsx* y *actina* en los diferentes estadios evaluados fue, inicialmente, ANOVA de un factor, previo a realizar el ANOVA se comprobaron los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia, utilizando el programa R. Debido a que no se cumplieron los supuestos de ANOVA el análisis estadístico se realizó con una prueba no paramétrica, Kruskal Wallis. Al determinar que existe diferencia estadísticamente

significativa de la expresión del gen *Tra-2*, *dsx* y *actina* entre estadios se realizó la prueba post hoc Dunn con el ajuste de Bonferroni, para determinar qué estadios presentan diferencia estadísticamente significativa en la expresión de *Tra-2*, *dsx* y *actina*.

i. Identificación de un gen presuntivo de actina con expresión específica en *A. albimanus* hembra: Para ello se realizó lo siguiente:

a) Amplificación de 3'-UTR de genes de actina: Se siguieron las instrucciones del fabricante del kit de Rapid Amplification of cDNA Ends de Invitrogen. Se utilizó el cebador upstream específico del gen como cebador forward. La reacción se llevó a cabo a partir de ARN sin tratamiento de ADNasas. Se siguieron las instrucciones del kit para la síntesis de ADNc con el cebador adaptador (AP, 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') incluido. Luego se utilizó el cebador específico y el cebador universal largo (UAP, por sus siglas en inglés) para la amplificación del 3' UTR. Ver POE 3 en anexos para concentraciones de reactivos y condiciones de PCR.

b) Aislamiento de bandas: El resultado de la reacción 3'RACE se corrió en gel de agarosa 1% en buffer TAE a 50V por 90 minutos. Las bandas se visualizaron bajo luz UV y fueron aisladas por medio de cortes en gel. El material obtenido se amplificó por PCR para llevar a cabo su clonación.

c) Ligación en pGEM-T Easy: Los fragmentos amplificados fueron ligados a plásmidos pGEM-T Easy por medio de TA cloning con el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen). Brevemente, se utilizó 1ul de productos de PCR y estos se mezclaron con el plásmido, solución de sal y agua estéril. La reacción se dejó overnight a 4°C.

d) Transformación de *E. coli* XL-1 Blue: Se utilizó el método de choque térmico, que consiste en someter las muestras a 30 minutos de frío en hielo, seguido de 45 segundos de calor a 42°C e inmediatamente 2 minutos de hielo. Luego de esto se les transfirió a 950ul de medio SOC y se les incubó 60 minutos a 37°C. Las células se concentraron por medio de centrifugación y luego se transfirieron 200ul de células transformadas a placas con medio LB, tetraciclina 12.5 ug/ml, carbenicilina 75 ul/ml, X-gal 0.08 ug/ml, IPTG 800mM. Las placas se incubaron por 24h a 37°C. Ver POE 4.

e) Tamizaje de clones: Se extrajeron los plásmidos de las colonias que mostraron coloración blanca tras Blue-white screening. Se amplificó el producto por medio de PCR con el cebador específico utilizado anteriormente. Los amplicones se corrieron en gel de agarosa 1% para observar si alguno de los plásmidos contenía el constructo esperado. Ver POE 5.

f) Secuenciación: Se realizó secuenciación Sanger a partir del material extraído de *E coli* XL-1 Blue en el paso anterior. Se utilizaron cebadores M13 (Forward: 5'-TGAAAACGACGGCCAGT-3' Reverse: 3'-CAGGAAACAGCTATGAC-5').

g) Análisis de datos: Se utilizaron las secuencias de los dos cebadores con los que se llevó a cabo la amplificación por 3'RACE para eliminar el área del plásmido que se encontraba entre el inserto y los cebadores M13. Se analizaron los insertos en MUSCLE y se determinaron secuencias consenso usando Consensus Maker Tool (www.hiv.lanl.gov). Se realizaron comparaciones *in silico* de las regiones 3'-UTR obtenidas y de las identificadas en otras especies de mosquito (*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*). Se

utilizó el software MUSCLE para realizar alineamientos múltiples de las secuencias obtenidas y se utilizó el software Gel Analyzer 2010 para realizar comparaciones de la cantidad de píxeles en cada banda, que da un estimado de la concentración.

VII. RESULTADOS

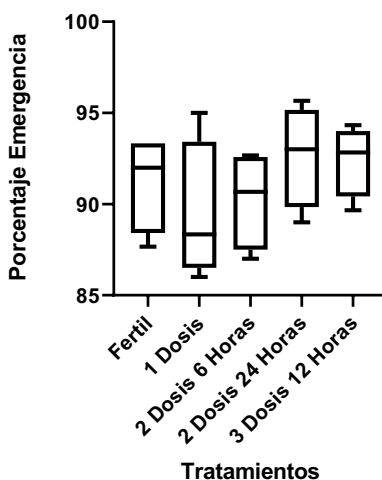
A. Esterilización *Anastrepha ludens* por dosis de radiación gamma

Los resultados serán discutidos en el orden de los objetivos planteados previamente.

1. Determinar el porcentaje de pupas familia 10 que emergen exitosamente luego de la irradiación con dosis parciales de rayos gamma. Con las muestras de pupas macho que se tomaron luego de las irradiaciones de los diferentes tratamientos, se contabilizó la emergencia de las pupas. En la Figura 23 se puede observar los porcentajes experimentales para cada uno de los tratamientos al completar la dosis de 80Gy. A simple vista no se observa una gran diferencia entre los datos, sin embargo, se puede notar que la emergencia media en los tratamientos con 2 y 3 dosis es mayor al grupo de una dosis, los rangos de resultados obtenidos son similares.

Figura 23. Porcentaje de adultos emergidos luego de alcanzar la dosis completa con los diferentes tratamientos

Porcentaje de adultos emergidos luego de alcanzar la dosis completa con los diferentes tratamientos.



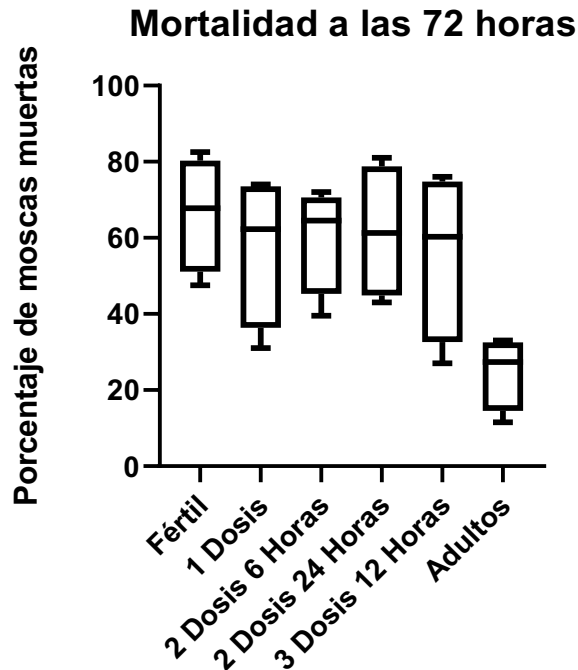
Fuente: Elaboración propia.

Al realizar una prueba ANOVA con una significancia del 95% entre los tratamientos y las muestras fértiles se obtuvo que el valor de P es de 0.4740, un valor mucho más alto del esperado con un R^2 de 0.1983, en base a esta prueba no se puede determinar que existe una diferencia real entre las medias de los datos obtenidos. Con ayuda de pruebas t de una cola se hizo una comparación directa entre los tratamientos 2 Dosis 24 Horas y 3 Dosis 12 Horas con una significancia del 95% y se obtuvieron valores de

0.1120 y 0.1090 respectivamente. Debido a esto podemos decir que no existe una diferencia significativa respecto al porcentaje de emergencia al comparar la dosis normal de 80Gn y con las demás dosis probadas. No obstante, resulta interesante que la media y los rangos sean un poco mayores. En la implementación de programas de control de *Anastrepha ludens* por medio de la técnica del insecto estéril, este parámetro es de suma importancia debido a que las cantidades liberadas son del orden de cientos de miles o incluso de millones (Ito & Yamamura, 2005). En estos casos unos cuantos puntos porcentuales se pueden traducir a miles de moscas de diferencia.

2. Determinar la longevidad de los adultos familia 10 que emergieron exitosamente luego de la irradiación con dosis parciales de rayos gamma. Se determinó el porcentaje de moscas que habían fallecido luego de 72 horas de estar en ausencia de luz, agua y alimento. Los datos obtenidos se resumen en el diagrama de caja y bigote en la Figura 24. Se puede observar que el grupo control de moscas fértiles parece tener el mismo comportamiento que los tratamientos de radiación en pupas. Al hacer una prueba ANOVA con significancia del 95% donde se compararon todos los tratamientos y el grupo fértil obtuvimos que, con una significancia de 0.0363, sí existe una diferencia significativa entre las muestras. Si se elimina al grupo de adultos del análisis el nivel de significancia sube a 0.933 y nos da como resultado que esta diferencia ya no es significativa.

Figura 24. Mortalidad a las 72 horas

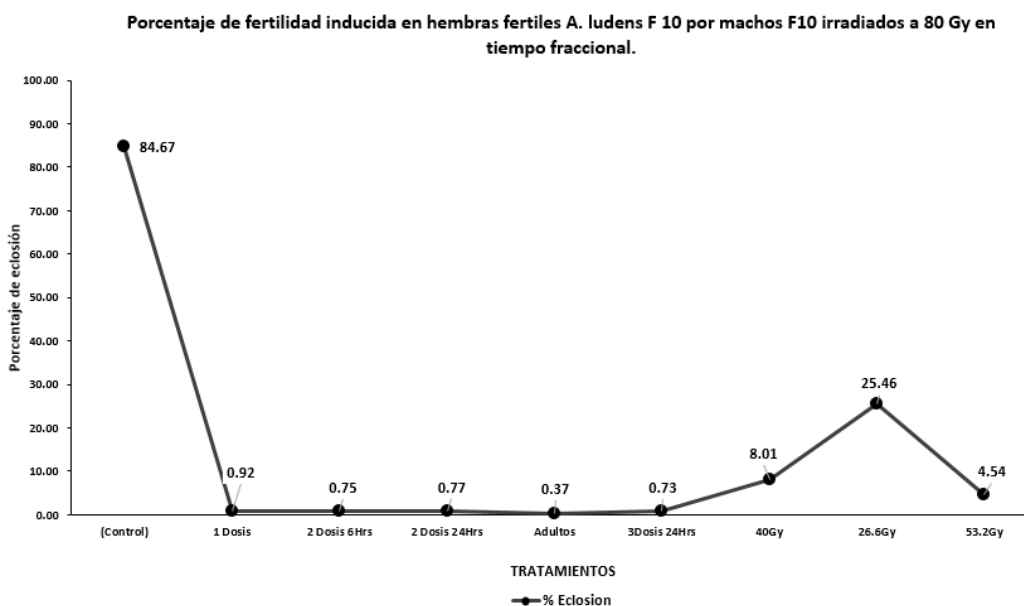


Fuente: Elaboración propia.

Esta disminución en el porcentaje de moscas muertas a las 72 horas se puede ver fácilmente en la Figura 24, aun antes de hacer pruebas estadísticas. La longevidad de las moscas en ausencia de alimento es importante debido a que al ser liberadas en lugares sin recursos o con alta competencia, las moscas pueden viajar en busca de otro lugar para reproducirse. Generalmente, se elige el estadio de pupa para realizar las irradiaciones debido a la facilidad con la que se pueden manejar las moscas en este estadio, sin embargo, como sugieren los datos obtenidos, realizar la irradiación cuando las moscas son adultas podría traer beneficios en cuanto a la salud y la calidad de los insectos producidos para la liberación. Cuando la mosca está en estadio de pupa están sucediendo diversos cambios que permiten que luego la mosca emerja como un adulto (Bakri *et al* 2005), el hecho de estar en proceso de pupación y no haber logrado la maduración completa de su organismo puede ser una de las causas por la cual en este estudio se observó una cantidad menor de moscas muertas a las 72 horas al analizar este grupo.

3. Determinar el porcentaje de eclosión de los huevos obtenidos luego de reproducir machos familia 10 tratados con una sola dosis o dosis parciales con hembras familia 10 no tratadas.

Figura 25. Porcentaje de huevos eclosionados



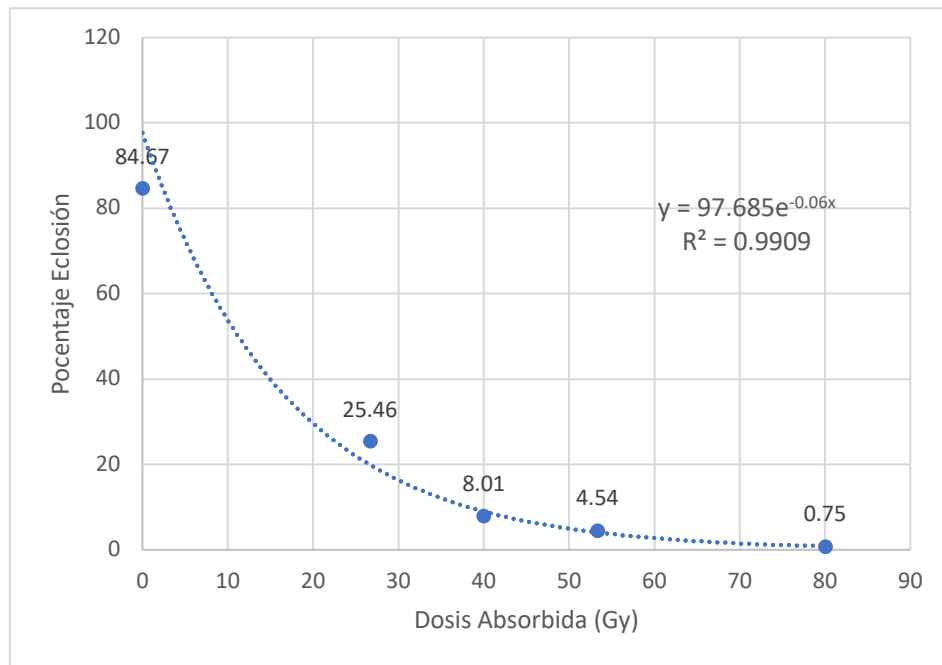
Fuente: Elaboración propia.

La fecundidad de los huevos es de gran importancia para determinar la funcionalidad de los tratamientos que se están evaluando. Si proporcionar la dosis en fracciones no provoca el mismo efecto de inducción de esterilidad que se busca, no importa que todos los otros parámetros sean mejores. Los datos de la Figura 25 fueron obtenidos luego de colocar machos familia 10 de cada tratamiento con hembras familia 10 no tratadas. Como es común en *Anastrepha ludens*, las hembras que se reproducen con machos tratados

ponen huevos (Rull *et al* 2007). Luego de contar grupos de 100 huevos en la incubación se obtuvieron los datos de la Figura 25. Como se puede observar del grupo control, cuando los machos familia 10 no han sido tratados, las hembras con las que se reproducen ponen huevos y en promedio eclosiona un 84.67%. El tratamiento de una dosis que es el que se utiliza de forma tradicional en los programas de control tiene un porcentaje de eclosión de 0.92%. Como se puede observar todos los tratamientos completos tienen un porcentaje de eclosión menor a 1% en este caso la dosimetría biológica sugiere que todos los tratamientos provocan el efecto de esterilidad deseado y dependerá de otros factores como el desempeño en el campo la viabilidad de los mismos.

Los últimos tres datos de la gráfica son los porcentajes de huevos eclosionados al reproducirse con las etapas intermedias de la dosis, es decir los machos que solo habían sido irradiados con la mitad, un tercio y dos tercios de la dosis. La mitad de la dosis tiene un 8.01% de eclosión, un tercio tiene 25.46% y dos tercios 4.54% esto también encaja con lo que se ha descrito en varios artículos sobre el efecto de la radiación en la eclosión de los huevos, un decrecimiento exponencial a medida que aumenta la dosis (Lanouette *et al* 2017).

Figura 26. Decrecimiento exponencial de eclosión



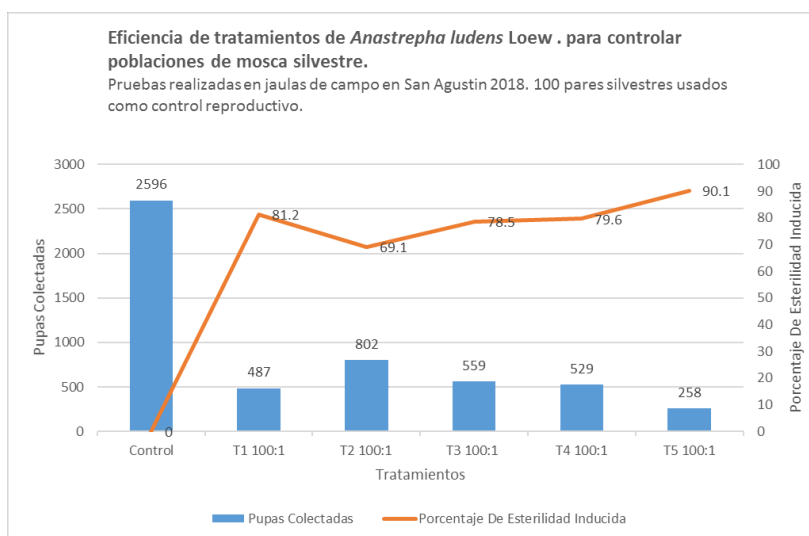
Fuente: Elaboración propia.

4. Comparar la inducción de esterilidad de los diferentes tratamientos en las pruebas de competitividad entre machos familia 10 tratados, con machos silvestres para fecundar hembras silvestres con una razón 100:1. Una de las pruebas más importantes para evaluar que tan buenas son las moscas de laboratorio con sus tratamientos para competir con las

poblaciones silvestres de *Anastrepha ludens*, son las pruebas de campo. En cada una de las cuatro semanas de repeticiones se realizaron tres pruebas (12 pruebas) para cada tratamiento, excepto para el tratamiento t en el que solo se realizó una réplica (4 Pruebas). La inducción de la esterilidad se evaluó utilizando el grupo control como el 100% y calculando cuanto porcentaje se redujo en promedio la población en las jaulas en las que además de los machos y las hembras silvestres había 100 machos tratados por cada macho silvestre.

En la línea roja de la Figura 27 se pueden observar los porcentajes de esterilidad inducida por cada uno de los tratamientos. El tratamiento 5 que representa la irradiación en 3 dosis con 12 horas entre dosis es el que tiene un mayor porcentaje de esterilidad inducida. A pesar de que este resultado demuestra que el tratamiento funcionó mejor que el tratamiento tradicional, es importante recordar que solo se cuentan con 4 réplicas de este tratamiento, por lo que no podemos concluir que este sea mejor. En el caso de los tratamientos 3(2 Dosis 40Gy 24 horas) y 4(adultos) podemos observar que, a pesar de ser un poco menores, los tratamientos inducen prácticamente la misma esterilidad.

Figura 27. Inducción de esterilidad pruebas campo.



Fuente: Elaboración propia.

El tratamiento 2 correspondiente a 2 dosis de 40Gy con 6 horas. Lo primero que se puede observar es que este tratamiento induce la esterilidad en un 10% menos. Al observar los datos de cada una de las réplicas se puede observar que en gran mayoría estos se comportan como los demás, excepto en un par de casos donde la cantidad de pupas recolectada fue mayor. En el caso de las moscas hembra de *Anastrepha ludens* un solo evento en el que se reproduzcan dos moscas fértiles pueda ocasionar que se pongan hasta 300 o más huevos fértiles. Vale la pena explorar cuales aspectos pudieron causar la diferencia entre la cantidad de pupas colectadas; los dos tratamientos de 2 dosis se comportaron de forma diferente. Esto podría sugerir que aumentar el tiempo que transcurre entre las dosis puede ayudar a disminuir el daño y que

irradiar con poco tiempo entre dosis incluso podría limitar la competitividad en una mosca en vez de ayudarla. Los mecanismos de reparación celular suelen ser lentos ante la exposición a radiación, esto podría estar relacionado con lo observado.

5. Comparar los parámetros de competitividad entre moscas irradiadas con una sola dosis o con dosis parciales. Para evaluar cómo se relacionan entre si los diferentes parámetros que fueron evaluados durante las pruebas se realizó una matriz de correlación. El cuadro utilizado para eso fue el siguiente;

Cuadro 11. Tratamientos y resultados

Tratamientos	Numero d	Tiempo er	Dosis Acui	Emergenc	Voladoras	Mortalida	Peso	Eclosión	Inducción
Fertil	0	0	0	91.25	90.08	66.4	16.6	84.67	0
Control (80 Gy)	1	0	80	89.42	87.83	57.4	16.2	0.92	81.2
1 40 Gy6	1	0	40	89	87.83	59.3	17	8.01	
240Gy6	2	6	80	90.25	88.67	60.1	16.4	0.75	69.1
1 26Gy 12	1	0	26.66	92.67	89.5	67	17	25.46	
2 22Gy12	2	12	53.32	87.83	86.67	67	16.8	4.54	
3 22Gy 12	3	12	79.98	92.42	90.33	55.9	16.6	0.73	90.1
1 40 Gy 24	1	0	40	90	87.33	64	16.9	8.01	
2 40 Gy 24	2	24	80	92.67	91.25	61.6	16.6	0.77	78.5
Adultos	1	0	80		90.5	24.8		0.37	79.6

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos para las relaciones entre los diferentes resultados fue la siguiente:

Cuadro 12. Matriz de correlación

	Numero do	tiempo entre d	osis Acumula	Emergencia	Voladoras	mortalidad 72	Peso	eclosion	duccion esterilida
Numero do	1								
Tiempo ent	0.7115385	1							
Dosis Acum	0.6862579	0.460047349	1						
Emergencia	0.1534441	0.299548774	0.0058788	1					
Voladoras	0.099938	0.349881234	0.1563362	0.91136052	1				
Mortalidad	0.0074126	0.176924428	-0.4984759	-0.057016	-0.36588	1			
Peso	-0.161615	-0.16197533	-0.5676236	-0.0032929	-0.17321	0.508199	1		
eclosion	-0.658595	-0.329693493	-0.8398271	0.20282288	0.199956	0.33523	0.096698776	1	
Induccion e	0.7379289	0.369722239	0.9794324	0.0716013	-0.05414	-0.40507	-0.30811268	-0.979	1

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro se pueden observar coeficientes ya sea positivos o negativos que están comprendidos entre 0 y 1. En este caso 1 representa una correlación perfecta y 0 una correlación nula. El tiempo entre dosis y la dosis acumulada tiene un coeficiente sin embargo estos se ignoran debido a que no existe una relación entre ellos. Al ver los resultados de la emergencia podemos ver que existe una pequeña correlación

entre el número de dosis y la correlación más fuerte que tiene es con el tiempo entre dosis, pero esta solo es de 0.299.

En el caso de las voladoras, se puede observar que tiene una correlación un poco mayor con el tiempo entre dosis. Su mayor correlación es con la emergencia, esto tiene sentido debido a que si una mosca no emerge no puede llegar a volar.

En el caso de la mortalidad se observa que tiene una correlación de -0.4984 al comparar con la dosis acumulada, esto se ha reportado en previas ocasiones y es conocida que mientras más radiación ha recibido una mosca más dañada estará y morirá más rápido, la correlación con el tiempo entre dosis es de 0.17, pequeño valor, sin embargo, esta es mayor que el número de dosis, por lo que podemos ver que el tiempo entre dosis puede llegar a ser más importante que el número de dosis.

Para el peso se observa que la mayoría de las correlaciones son negativas, factores como la dosis acumulada se ve que afectan el peso de forma directa con un factor de -0.5676.

La eclosión se ve afectada por distintos factores, la emergencia, voladoras, mortalidad y peso no parecen tener mayor efecto. La dosis acumulada, el número de dosis y el tiempo entre dosis parece tener un efecto grande en la cantidad de moscas que eclosionan de los huevos, esto es lo esperado debido a que la radiación es la que induce la esterilidad y según lo observado en las demás gráficas, lo induce a medida que la dosis aumenta y es de forma exponencial.

La inducción de la esterilidad es uno de los parámetros más importantes de esta investigación. A fin de cuentas, lo que interesa es que a la hora de experimentar en el campo se obtengan los mejores resultados para este parámetro. Primero podemos observar que existe una relación fuerte entre el número de dosis y la dosis absorbida, esto es de esperarse debido a que una dosis completa es la que induce la esterilidad y el número de dosis está asociado con la magnitud de la misma. El tiempo entre dosis parece tener una relación un no tan fuerte pero importante, al comparar los tratamientos 40+6horas y 40+24horas se observó un cambio importante en la inducción de la esterilidad, esto sugiere que es importante investigar el tiempo de descanso que se da a las pupas entre dosis. La emergencia, voladoras y eclosión no parece tener un efecto importante sobre la inducción de la esterilidad. Finalmente se puede observar que el peso y la mortalidad 72 horas tiene una relación, no tan significativa debido al valor de los coeficientes, sin embargo, es importante. Es de esperarse que dependiendo de la mortalidad de las moscas estas puedan inducir esterilidad durante más tiempo o de forma más efectiva. El hecho de que el peso tenga importancia no se esperaba, pero tiene sentido, ya que una mosca más grande será más fuerte y puede que esto le dé una ventaja a la hora de competir.

No podemos concluir directamente que uno de los tratamientos es mejor a otro y mucho menos considerar que en algún momento cercano se reemplazarán los procesos ya estandarizados de esterilización

de insectos por estos. A pesar de esto cada una de las pruebas tiene resultados interesantes que nos indican que el daño que la radiación gamma provoca a los insectos puede variar dependiendo de la forma y el estadio en el que se realiza la irradiación. La diferencia en pequeñas cifras porcentuales en la emergencia, la mejora en la longevidad de las moscas al esterilizar en etapa adulta, son indicios de que estos tratamientos pueden ser estudiados más a fondo para comprender con mayor detalle el efecto que esta energía tiene en estos insectos.

El resultado de una menor inducción de esterilidad en las jaulas de campo con el tratamiento 2 y la diferencia con el tratamiento 3 sugiere que aún hay mucho que podemos llegar a entender sobre los procesos de esterilización y los mecanismos internos de reparación celular de *Anastrepha ludens*.

B. Evaluación de expresión de genes de referencia en diferentes estadios de *Anopheles albimanus*

La normalización es un paso esencial para el estudio cuantitativo de la expresión relativa de genes, lo que significa que la expresión relativa de un gen objetivo debe determinarse frente a un gen de referencia, cuyos niveles de expresión deben ser estables y no deben estar influenciados por el procedimiento experimental. Actualmente, no se cuenta con investigaciones o estudios previos que hagan uso de genes de referencia para *A. albimanus* específicamente. Por lo que, se eligieron tres genes candidatos para la normalización del estudio cuantitativo de la expresión relativa de genes en la especie de mosquito, principal vector de malaria, *A. albimanus*, dado que los niveles de expresión en los genes de referencia pueden variar según la especie estudiadas, o incluso en condiciones ambientales o desarrollo, ningún gen de referencia debe considerarse universal (Nakumara *et al* 2016).

1. Diseño de cebadores. Los cebadores fueron diseñados para amplificar los genes *RpS4*, *RpL49* y *GAPDH*, genes candidatos que fueron investigados para evaluar genes de referencia para *A. albimanus*. Los genes candidatos fueron obtenidos a través de revisiones bibliográficas de estudios con *Aedes aegypti*, entre otros *Dipteros* (Dzaki *et al* 2017; Plachetka & Augustyniak 2017). Las secuencias utilizadas para el diseño de cebadores fueron extraídas de Vector base, las que codifican para la proteína ribosomal S4, proteína ribosomal L49 y Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y se utilizó la plataforma de OligoAnalyzer para evaluar horquillas, heterodímeros, homodímeros, %GC y delta G. Los genes candidatos fueron seleccionados para encontrar la mejor combinación de genes de referencia para la normalización de expresión de genes en los diferentes estadios de *A. albimanus*.

Las características de los cebadores que se tomaron en cuenta fueron la formación de dímeros, porcentaje de GC y la temperatura de fusión (Tm). En el siguiente cuadro se observa que la formación de dímeros no es espontánea, por lo que los cebadores son efectivos, además, el porcentaje de GC está en un rango de 50-55%. También, se eligieron los cebadores con Tm igual o con diferencia poco significativa

(~60° Celsius), pues el par de cebadores deben de tener temperatura de fusión “Tm” cercanos, dentro de los 5 °C para evitar amplificaciones inespecíficas.

Cuadro 13. Características de cebadores diseñados con PrimerQuest y Primer3 para hacer análisis de genes de referencia *Rps4*, *RpL49* y *GAPDH* en qPCR

Gen	Temperatura de fusión (oC)	%GC	Heterodímeros (G kcal/mol)	Homodímeros (G kcal/mol)
<i>Rps4</i>	F: 60.26	F: 55.00	F: -3.3	F: -3.14
	R: 60.11	R: 50.00	R: -3.3	R: -6.30
<i>RpL49</i>	F: 59.89	F: 50.00	F: -0.67	F: 0.16
	R: 60.00	R: 55.00	R: -0.85	R: 0.87
<i>GAPDH</i>	F: 60.00	F: 50	F: -0.72	F: 0.80
	R: 60.00	R: 52.6	R: -1.43	R: 0.75

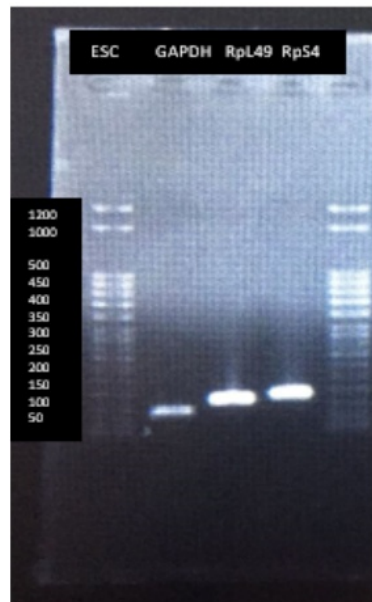
La herramienta que fue utilizada para obtener las secuencias de los cebadores fue con PrimeQuest y Primer3, estos softwares lograron especificar las variables presentadas en el siguiente cuadro permitiendo agregar el número de acceso de la secuencia, que se halla en las bases de datos. También, los softwares permiten discriminar las regiones de la secuencia que se desea incluir y excluir y el rango de tamaño del producto, los cuales en los pares de cebadores diseñados de los tres genes candidatos fue aproximadamente 100 pb.

2. Amplificación de *Rps4*, *RpL49* y *GAPDH* utilizando cebadores diseñados. Los cebadores diseñados fueron probados utilizando PCR convencional, con el gel de agarosa 1% se logró determinar que los tres pares de cebadores son efectivos debido a que lograron amplificar en las regiones esperadas (ver cuadro siguiente). Se logró obtener especificidad con los cebadores diseñados debido a que el tamaño de banda corresponde al tamaño del amplicón para *Rps4*, *RpL49* y *GAPDH* de 142 pb, 138 pb y 132 pb, respectivamente (ver siguiente figura). El uso de la herramienta PCR es de suma importancia y uno de los pasos fundamentales es contar con los cebadores y características adecuadas. Esto permitió el éxito donde se obtuvo la mejor calidad del producto de amplificación.

Cuadro 14. Especificaciones y características de amplificación de genes de referencia candidatos

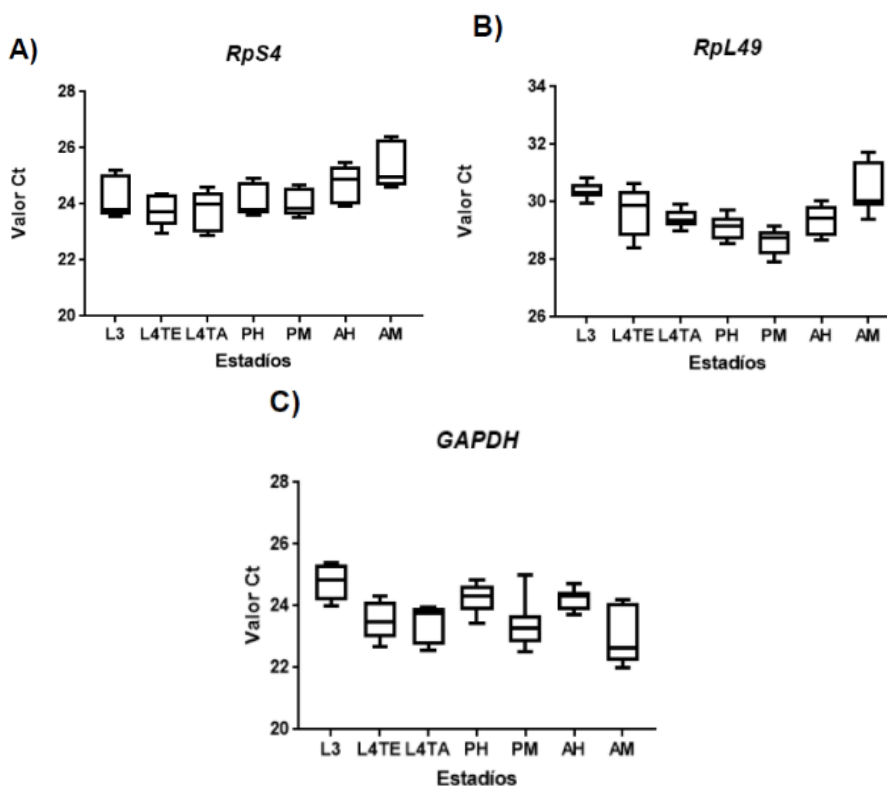
Gen	Secuencia de cebadores	Tamaño de amplicón	Rango Ct	std dev
<i>RpS4</i>	FW 5' AGG TGA TGG AGG TGC TGA AG 3' RV 5' CGA TGA TGA ACA CGT TGG AG 3'	142 pb	22.8-26.4	1.57
<i>RpL49</i>	FW 5' AGG GTG GAA GGT GAT ATC TG 3' RV 5' ACA TGG TCG CCC TTA AAT G 3'	138 pb	28.2-30.6	1.57
<i>GAPDH</i>	FW 5' GCC AAG AAG GTC ATC ATC TC 3' RV 5' CGA CGA TGC AGT TAT C 3'	132 pb	23.0-25.3	1.56

Figura 28. Evaluación de efectividad de cebadores diseñados de genes *RpS4*, *RpL49* y *GAPDH* utilizando el método de PCR convencional. La escalera utilizada fue Introgen™ 50 bp DNA Ladder Thermo Fisher Scientific. Se cargó 7 ul de la muestra y 4 ul de escalera. El gel de agarosa fue de 1%.



3. Determinación de niveles de expresión de genes candidatos (*RpS4*, *RpL49* y *GAPDH*). Se cuantificó el nivel de expresión de cada gen por medio de PCR en tiempo real y la variabilidad individual de los genes candidatos en los siete estadios del ciclo de vida de *A. albimanus*. Los ensayos se resumen como gráficos de Box-plot en la siguiente figura. El valor más alto entre los tres genes candidatos fue *RpL49*, mientras que el más bajo fue *RpS4*, mientras que el gen *GAPDH* presentó niveles moderados altos. Se tomaron en cuenta los datos de tres réplicas biológicas de cada estadio del ciclo de vida de *A. albimanus*. Los valores de Ct promedio de *RpL49*, *RpS4* y *GAPDH* fueron 32.37, 23.61 y 28.35. La variación más estrecha de los tres genes de referencia la mostró el gen *RpS4*, pues los sus valores de Ct entre estadios tuvo una variación de 23.43- 25.15. La siguiente figura muestra valores Ct poco variables en el gen *RpS4*, mientras que el gen *GAPDH* muestra mucha variabilidad en sus niveles de expresión.

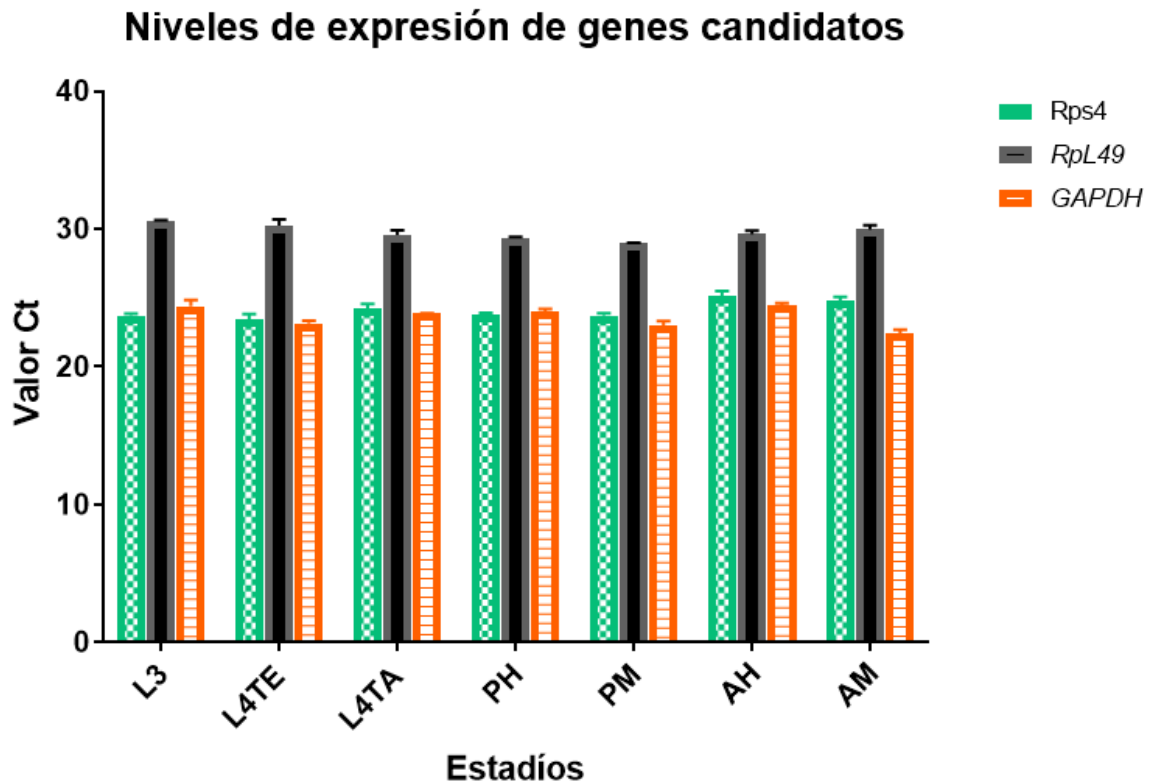
Figura 29. Diagrama de caja y bigotes que representa los niveles de expresión en términos de valores de Ct para los tres genes candidatos en los siete estadios del ciclo de vida de *Anopheles albimanus* (AH: Adulto hembra, AM: Adulto macho, L3, L4TE: L4 temprano, L4TA: L4 tardío, PH: Pupa hembra y PM: Pupa macho). Las cajas abarcan percentiles de 10 a 90.



Se utilizaron tres réplicas biológicas de cada estadio (L3, L4 TE, L4 TA, PH, PM, AH y AM) y se utilizó una muestra de ADN complementario de cada estadio por réplica.

La siguiente figura mostró una diferencia en términos de niveles de expresión utilizando los valores Ct de los genes candidatos. Los genes *RpS4* y *RpL49* muestran menos variabilidad que el gen *GAPDH*. De acuerdo con la estabilidad de la expresión se considera *RpS4* y *RpL49* como genes de referencia aptos para el estudio. Al contrastar el nivel de expresión de los tres genes se puede observar el nivel de expresión de cada gen en cada estadio de *A. albimanus*.

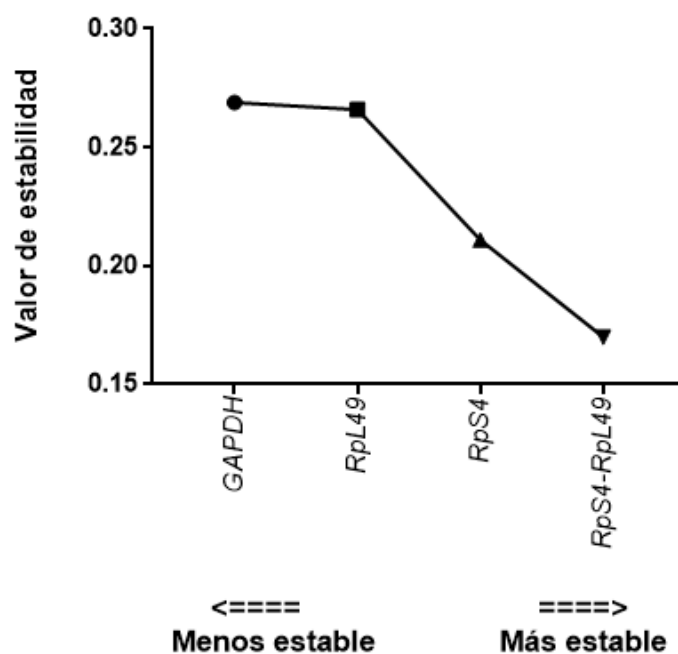
Figura 30. Comparación de niveles de expresión de los genes de referencia: (a) *RpS4*, (b) *RpL49*, (c) *GAPDH* para cada estadio del ciclo de vida de *An. albimanus*.



La Figura 30 es una gráfica de barras de los valores de Ct sin procesar en los softwares NormFinder y BestKeeper. Además, son los valores de Ct por estadio donde se puede observar que el gen *RpL49* tiene un Ct mayor a 30. Abreviaturas: Ct se refiere al punto de umbral donde los genes se expresan, L3 es el primer estadio larvario de *An. albimanus*, L4TE se refiere al estadio L4 temprano (horas después de cambiar de estadio de L3 a L4), L4TA se refiere al estadio L4 tardío (un día después de cambiar de estadio de L3 a L4), PH es pupa hembra, PM es pupa macho, AH es adulto hembra y AM se refiere a los adultos machos.

4. Análisis de niveles de expresión de los genes candidatos con el software NormFinder. NormFinder es un algoritmo para identificar un gen de referencia entre un grupo de candidatos mediante el parámetro del valor de estabilidad, donde éste es un valor absoluto de la media + 1 SD. Los datos utilizados por el programa NormFinder se basan en valores relativos y no en datos Ct sin procesar. El algoritmo produce un valor de estabilidad para cada gen donde un valor más bajo indica mayor estabilidad (0.2). Las clasificaciones formadas por NormFinder se resumen en el siguiente cuadro, se puede observar que al combinar *RpS4* y *RpL49* la estabilidad incrementa. El gen que tuvo mayor desempeño fue *RpS4* para el uso de gen de referencia en *A. albimanus*, mientras que no se recomienda utilizar *GAPDH*. En ausencia de identificadores de grupo, se presume que los dos genes con el valor de estabilidad más bajo dentro de un conjunto de muestras proporcionan la mejor combinación para las estrategias de normalización de genes de dos genes de referencias (*RpS4* y *RpL49*). En la siguiente figura se puede observar que el valor de estabilidad de *RpS4* es la más baja (0.211) a comparación con los genes *RpL49* (0.266) y *GAPDH* (0.269). NormFinder mostró la mejor combinación de genes candidatos (*RpS4* y *RpL49*) con un valor de estabilidad de 0.170 para la normalización del análisis de expresión relativa de genes.

Figura 31. Valores de estabilidad de expresión promedio (M) de genes de referencia candidatos mediante análisis NormFinder.



Cuadro 15. Ranking de genes candidatos utilizando NormFinder

Rank	Genes candidatos
1	<i>RpS4</i>
2	<i>RpL49</i>
3	<i>GAPDH</i>

Fuente: Elaboración propia, según calificación obtenida de NormFinder.

5. Análisis de niveles de expresión de los genes candidatos con el software BestKeeper. BestKeeper estima el valor de desviación estándar (SD) de cada gen candidato a partir de los números de Ct sin procesar. Un $SD > 1$ significa que las variaciones en la expresión de un gen dentro de una muestra del mismo origen son altas, lo que indica su inestabilidad. Los bajos niveles de expresión basal ($Ct \geq 30$) incluso a una alta concentración de ADN complementario de inicio no permite que el gen sea usado como referencia, es por eso que se utilizó Bestkeeper para analizar los tres genes seleccionados para eliminar los genes que no tienen potencial para ser genes de referencia para *A. albimanus*. La selección mal informada de genes de referencia podría conducir a falsos positivos o falsos negativos, enmascarando efectivamente la verdadera naturaleza de los patrones de expresión de un gen. No obstante, los estudios con *A. albimanus* con qPCR a menudo adopta genes que ya se utilizan exhaustivamente como genes de referencia para insectos de otros géneros con fines de normalización. En la mayoría, la falta de información confiable con respecto a los genes de referencia para *A. albimanus* tiene una normalización con interpretación limitada, debido a que esta puede ser inexacta.

En el siguiente cuadro se muestra la correlación por pares de cada gen candidato, Bestkeeper utiliza la correlación por pares y la compara con cada individuo con cada gen candidato para obtener un índice basado en la media geométrica del gen de referencia seleccionado (Płachetka-Bożek *et al* 2017). El factor de normalización de la expresión génica no se puede calcular basándose en la media geométrica de un número definido de genes de referencia seleccionados. Para estos estudios, fue importante verificar la distribución de las diferencias entre las muestras. Los parámetros mínimos y máximos mostraron una clara inestabilidad en la expresión de genes de referencia. El uso de los parámetros mínimo-máximo mostró la variación real entre cada muestra individual (ver Cuadro 16). Muchas investigaciones y grandes compañías de biotecnología aceptan como máximo una diferencia de 0,5 ciclos entre las muestras y creen que es aceptable usar un gen como referencia para el análisis de qPCR. En este experimento se utilizó la desviación estándar de Ct, los genes candidatos *RpS4*, *GAPDH* y *RpL49* mostraron una desviación estándar por debajo de 1.5, por lo que, ninguno de los tres debe ser excluido.

Los datos obtenidos demostraron que todos los candidatos se mantuvieron estables en todas las muestras, según el siguiente cuadro. La expresión parece variar más entre estadios en el gen *GAPDH*.

Cuadro 16. Estadística descriptiva de BestKeeper de tres genes de referencia basados en sus valores de punto de umbral (Ct).

Datos analizados en Bestkeeper de genes de referencia candidatos (n=3)			
Factor	<i>RpL49</i>	<i>RpS4</i>	<i>GAPDH</i>
N	21	21	21
Geo Media [CP]	29.60	24.26	23.77
A Media [CP]	29.61	24.28	23.78
min [CP]	28.10	22.96	22.15
max [CP]	31.70	26.33	25.31
SD [\pm CP]	0.65	0.65	0.65
CV [% CP]	2.20	2.69	2.71
min [x-fold]	-2.83	-2.47	-3.07
max [x-fold]	4.28	4.19	2.92
SD [\pm x-fold]	1.57	1.57	1.56

Abreviaturas: N: número de muestras; Geo Media [CP]: la media geométrica de CP; A Media [CP]: la media aritmética de CP; Min [CP] y Max [CP]: los valores extremos de CP; SD [\pm CP]: la desviación estándar de la PC; CV [% CP]: el coeficiente de varianza expresado como un porcentaje en el nivel de CP; Min [x-fold] y Max [x-fold]: los valores extremos de los niveles de expresión expresados como un coeficiente absoluto de sobre-o baja regulación; SD [\pm x-fold]: desviación estándar de los coeficientes de regulación absoluta.

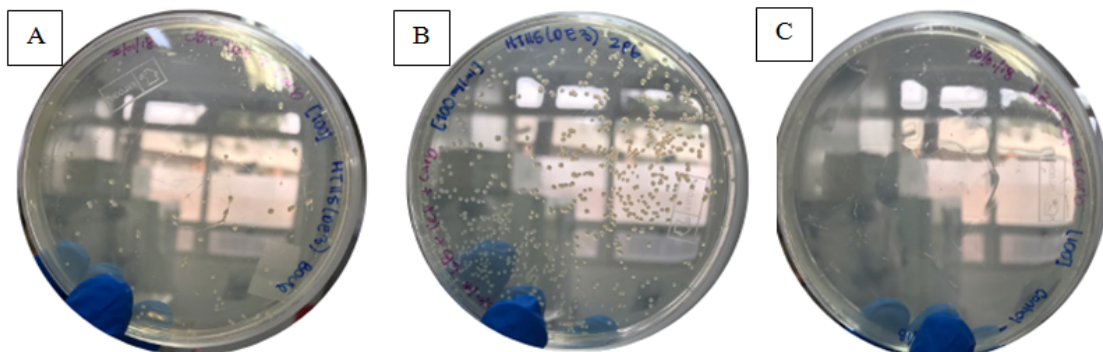
Los genes de referencia candidatos investigados mostraron una variación considerable en los niveles de expresión. Sin embargo, la clasificación final es dada principalmente del uso corregido de datos, pues, el uso de datos no corregidos conducirá a una elección errónea de genes de referencia, es decir, el riesgo de usar genes menos estables no surge del uso de los softwares BestKeeper o NormFinder. Anteriormente, se

mostró que NormFinder indica que el mejor gen de referencia para *Anopheles albimanus* es *RpS4*, lo que no difiere del software Bestkeeper, debido a que según el coeficiente de correlación *RpS4* es el mejor gen de referencia para *Anopheles albimanus*. Sin embargo, no se debe descartar *RpL49* o *GAPDH*. La combinación de *RpS4* y *RpL49* mostró mayor estabilidad, por lo que, se puede hacer más análisis con la combinación de genes para mejorar la estabilidad en los niveles de expresión. Además, no se debe olvidar factores de edad, tratamientos, etc para el uso de genes de referencia. Según los resultados anteriores se determinó que el uso de *RpS4* y *RpL49* es la mejor combinación de genes de referencia para la validación de análisis de expresión de genes silenciados en *Anopheles albimanus*.

C. Silenciamiento de *Boule* y *ZPG* en pupas macho de *A. albimanus* mediado por ARNi y diseño de cebadores de genes de espermatogénesis candidatos para silenciamiento

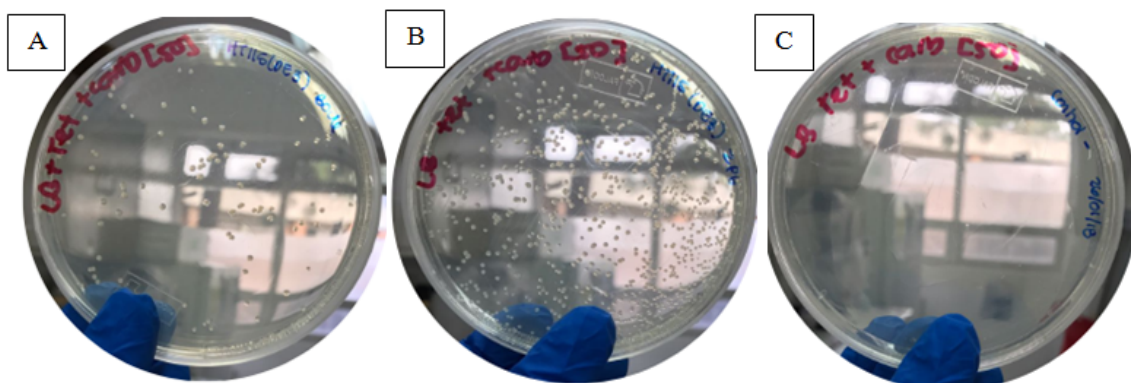
1. Producción de bacterias *Escherichia coli* HT115(DE3) transgénicas que expresen ARN de doble hebra del gen *Boule*. Se determinó que la transformación de bacterias *E. coli* HT115 (DE3) con los plásmidos pGEM-T Easy Vector-*Boule* y pGEM-T Easy Vector-*ZPG* fue exitosa. Las cepas de bacterias de *E. coli* HT115 (DE3) cuenta con resistencia a tetraciclina, pero al ser transformadas obtuvieron la resistencia a ampicilina o carbenicilina dada por los plásmidos. Esto se confirmó por el crecimiento de colonias transformadas en placas de LB con carbenicilina (100 µg/ml) y tetraciclina (12.5 µg/ml). Se puede observar la presencia de colonias de las cepas transformadas con los plásmidos de *Boule* (Fig. 32A) y *ZPG* (Fig. 32B). Así como la ausencia de colonias en la placa control de *E. coli* HT115 (DE3) sin transformar. Además, se comprobó que las bacterias retienen ambos plásmidos de pGEM-T Easy Vector-*Boule* y pGEM-T Easy Vector-*ZPG*, siendo sembradas a una concentración de carbenicilina de 50 µg/ml (Figura 32A y 32B). El crecimiento de las bacterias en presencia de carbenicilina indicó que las cepas adquirieron el plásmido, pero no confirma la presencia del inserto de los genes de interés.

Figura 32. Crecimiento en placas de LB con tetraciclina 12.5 µg/ml y carbenicilina 100 µg/ml de (A) *E. coli* HT115(DE3) pGEM-T-AmpR-*Boule*, (B) *E. coli* HT115(DE3) pGEM-T-AmpR-*ZPG* y (C) Control negativo.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 33. Crecimiento en placas de LB con tetraciclina 12.5 $\mu\text{g/ml}$ y carbenicilina 50 $\mu\text{g/ml}$ de (A) *E. coli* HT115(DE3) pGEM-T-AmpR-Boule, (B) *E. coli* HT115(DE3) pGEM-T-AmpR-ZPG y (C) Control negativo.

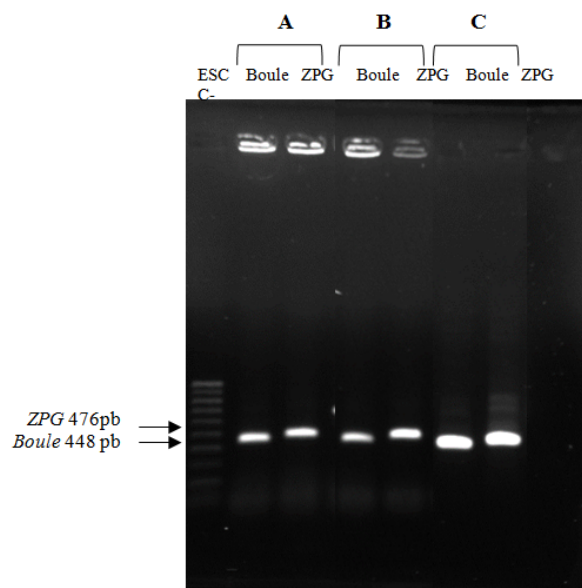


Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 34 se muestran los resultados del PCR de colonias realizado para comprobar la estabilidad de los insertos de los genes de *Boule* y *ZPG* en los plásmidos. En el gel se observa la presencia de una banda en los pozos del 2 al 7. Se muestra la banda esperada para pGEM-T-Amp^R-*Boule* de 448 pb, conformada por 252 pb del segmento del plásmido amplificado por los cebadores universales M13, 176 pb del inserto de *Boule* y 20pb de la cola T7. También se encuentra la banda del tamaño esperado de 476 pb para las cepas con pGEM-T-Amp^R-*ZPG*, dada por los 252 pb del segmento de plásmido, 204 pb del inserto de *ZPG* y 20pb de la cola T7. Estas bandas coinciden con las obtenidas en los controles positivos del PCR realizados con el ADN plasmídico con el inserto correspondiente. Además, las dos reacciones fueron realizadas correctamente sin contaminación, ya que no se obtuvo bandas en el control negativo del PCR en el último pozo. En el gel se observan bandas difusas menores a 100 pb, que se cree que son dímeros de los cebadores.

Se determinó que se obtuvo bandas del mismo tamaño en los productos de PCR de las bacterias sembradas en carbenicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$. Lo cual verifica que las bacterias *E. coli* HT115 (DE3) transformadas fueron capaces de retener el plásmido a ambas concentraciones del antibiótico. Por lo tanto, es posible sembrar las bacterias para la inducción con IPTG para producir el ARNdh, en placas con carbenicilina con concentración menor de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 34. Gel de agarosa 0.8% de productos de PCR de colonias de cepas de *E. coli* transformadas con los plásmidos pGEM-T Easy Vector-*Boule* y *ZPG*. Se muestran los productos de *E. coli* HT115(DE3) pGEM-T- *Amp^R*-*Boule* clon 3.1 y *E. coli* HT115(DE3) pGEM-T- *Amp^R*-*ZPG* clon 2.1. Se cargó 6µl de cada muestra y 3µl de la escalera Millipore Novagen de 100pb (A) Productos de PCR de bacterias sembradas en placas de LB con Tet (12.5 µg/ml) y Carb (100 µg/ml). (B) PCR de bacterias sembradas en LB con Tet (12.5 µg/ml) y Carb (50 µg/ml). (C) Controles positivos, plásmidos pGEM-T Easy con inserto de *Boule* y *ZPG* utilizados para la transformación.



Fuente: Elaboración propia

Los resultados presentados anteriormente comprueban que fue posible la transformación de las cepas *E. coli* HT115 (DE3) con los plásmidos pGEM-T-Easy Vector con los insertos de los genes de *Boule* y de *ZPG*. Se comprobó la retención de los plásmidos mediante crecimiento en placas con carbenicilina (100 y 50 µg/ml), así como la estabilidad de los insertos en las cepas transformadas mediante el PCR de colonias. Estos resultados indican que es posible utilizar las cepas *E. coli* HT115(DE3) pGEM-T-*Amp^R*-*Boule* clon 3.1 y *E. coli* HT115(DE3) pGEM-T-*Amp^R*-*ZPG* clon 2.1 en la posterior inducción con IPTG para la producción del ARNdh de ambos genes.

2. Optimización de la producción del ARN de doble hebra de los genes *Boule* y *ZPG* en bacterias transgénicas *E. coli* HT115 (DE3). Se llevó a cabo la inducción con IPTG de las bacterias transgénicas para producir el ARNdh de los genes de interés. En presencia de IPTG se dio la modificación del represor, de modo que este no se une al promotor *lac* modificado (*lacUV5*) y se permite la transcripción de la polimerasa T7 (Schumpert *et al.*, 2015). Esto resultó en la transcripción de las dos hebras de ARN del inserto ligado entre los promotores T7 del plásmido pGEM-T-Easy Vector. La inducción fue realizada en el momento en que el cultivo bacteriano incubado alcanzó un OD₆₀₀ de 0.4 y se dejó induciendo por 2 horas, según los protocolos estandarizados por Flores *et al.*, 2016. Esta metodología brindó concentraciones e integridades óptimas del ARNdh producido. Sin embargo, sería ideal realizar ensayos con diferentes momentos de iniciar la inducción y diferentes tiempos de incubación con el fin de determinar las condiciones que brindan concentraciones mayores de ARNdh.

Después de la inducción, fue necesario realizar la inactivación de las cepas de bacteria, para asegurar que esta no tenga un efecto negativo en las larvas de *A. albimanus*. En estudios previos se han utilizado diferentes métodos de inactivación de la bacteria, tales como exposición a 100°C por 1 hora (Flores *et al.*, 2016) y exposición a 70°C por 1 hora (Whyard *et al.*, 2015). Sin embargo, cuando se probó a inactivar la bacteria con estos métodos, se obtuvo concentraciones de ARNdh muy bajas (menores a 60 ng/μl), comparadas a las concentraciones obtenidas del cultivo sin inactivar (mayores de 250 ng/μl). Por esta razón, se intentó inactivar la bacteria *E. coli* HT115 (DE3) pGEM-T-*Amp^R*-*Boule* inducida con métodos diferentes, con el fin de optimizar la producción del ARNdh de los tres genes.

En el siguiente cuadro se muestran los resultados de cuantificación del ARNdh extraído de los cultivos de *E. coli* inducidos e inactivados. Se muestran las concentraciones (en ng/μl) en duplicado o triplicado, según se realizó cada extracción. También se presentan los promedios de la concentración de las réplicas, así como la desviación estándar entre las réplicas de extracción.

Cuadro 17. Concentraciones de ARNdh del gen *Boule* según diferentes métodos de inactivación.

Método de inactivación	Concentración de ARNdh (ng/μl)	Promedio de concentración de ARNdh (± desviación estándar) (ng/μl)
100°C por 1hr	36.60	28.95 (±10.82)
	21.30	
70°C por 30min	40.6	49.50 (±12.59)
	58.4	
70°C por 1hr	91.2	51.20 (±56.57)
	11.2	

Continúa cuadro 17...

Continuación cuadro 17:

Método de inactivación	Concentración de ARNdh (ng/μl)	Promedio de concentración de ARNdh (± desviación estándar) (ng/μl)
Ebullición por 5 min	376.6	221.0 (±220.1)
	65.4	
Exposición a estreptomicina	159.3	265.0 (±149.5)
	370.7	
Ebullición 10 min, y centrifugación 10 min	206	168.8 (±35.57)
	135.1	
	165.4	
Ebullición 10 min, y centrifugación 5 min	153.1	191.1 (±59.69)
	160.3	
	259.9	
Ebullición por 15 min	214.3	270.0 (±133.9)
	422.7	
	172.9	

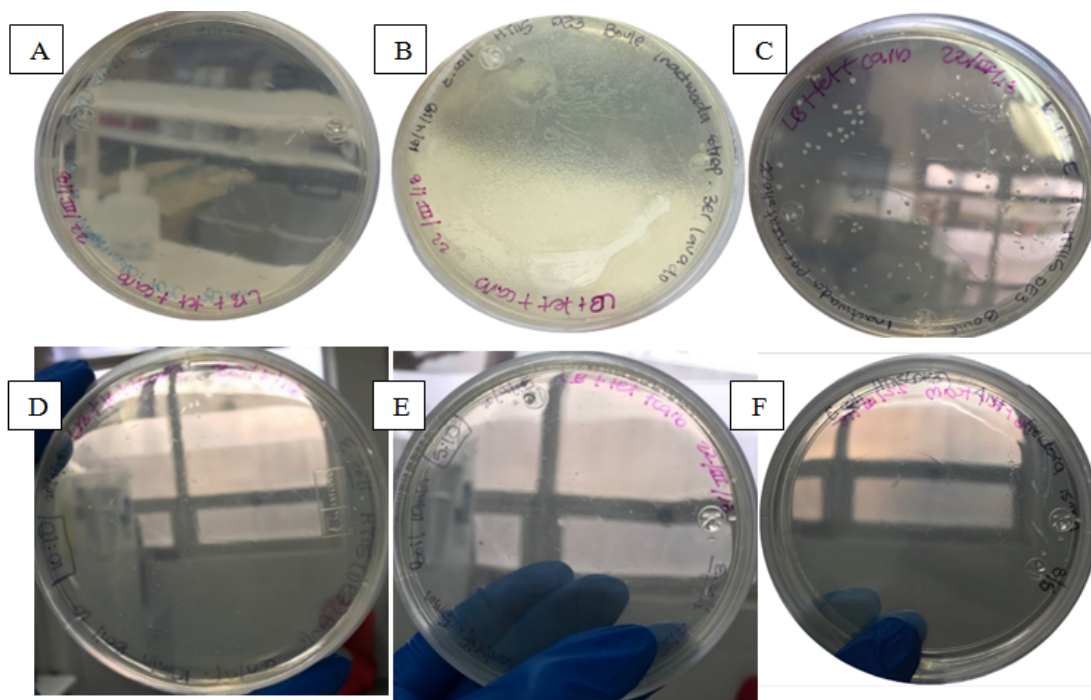
Fuente: Elaboración propia

Debido a que de los estudios previos mencionados anteriormente se sabe que la exposición a calor seco de 100°C y 70°C mostró ser efectiva para la muerte bacteriana, se planteó probar con 70°C por 30 minutos. Esto se realizó para determinar si la mitad del tiempo del planteado por Whyard *et al.*, 2015 era suficiente para inactivar, dando mayores concentraciones del ARNdh. Se determinó que 30 minutos fue suficiente para provocar la muerte de la bacteria (Fig. 35A). Sin embargo, no se obtuvo una concentración óptima del ARNdh (Cuadro 17).

Posteriormente se intentó inactivar el cultivo con exposición a estreptomicina (0.1 μg/μl) por 1 hora, este antibiótico inhibe la síntesis de proteínas de las bacterias por lo que se esperaba que provocara la muerte celular. Sin embargo, a pesar de que las concentraciones de ARNdh obtenidas con este método fueron mejores (Cuadro 17) no se logró la inactivación adecuada debido a que hubo crecimiento de muchas colonias en las placas de LB con tetraciclina y carbenicilina (Fig. 35B).

En un estudio de Ongvarrasopone *et al.*, 2007 se realizó lisis celular por ebullición 2 minutos para inactivar la bacteria. En dicho artículo no se mostró comprobación de muerte bacteriana, por lo cual para la presente investigación se planteó comprobar la efectividad de ebullición para inactivar el cultivo. Los métodos probados de lisis celular por ebullición 5 y 10 minutos aun mostraron crecimiento microbiano en las placas de LB con antibióticos (Fig. 35C y 35D). Por otro lado, el método de ebullición 15 minutos fue exitoso para inactivar la bacteria inducida (Fig. 35E) y mostró concentraciones altas de ARNdh. Esto se debe a que se decidió concentrar el cultivo bacteriano a 2X, ya que la ebullición por 10 minutos no era suficiente para provocar lisis celular y aun así mostraba concentraciones bajas de ARNdh.

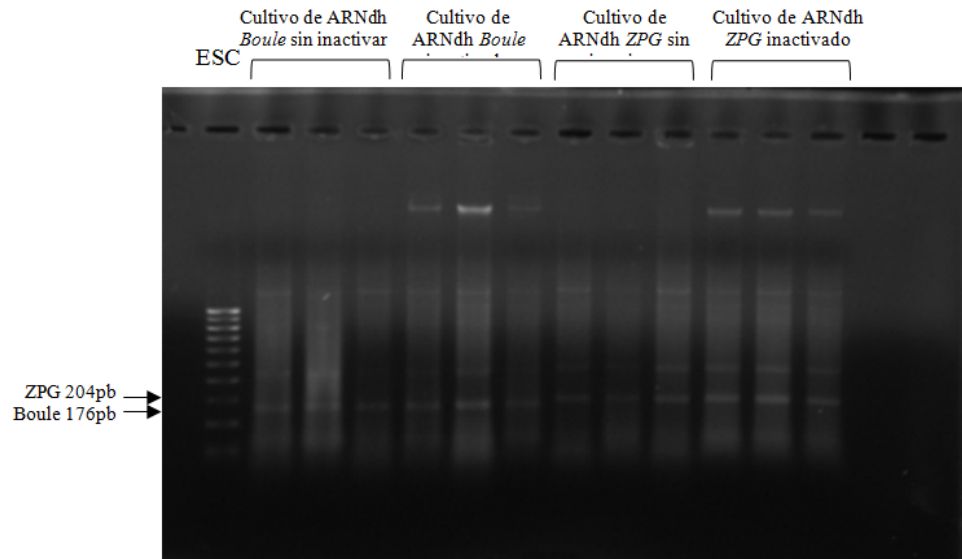
Figura 35. Placas *de LB* con tetraciclina y carbenicilina para determinar muerte bacteriana según el método de inactivación (A) Ausencia de colonias de bacteria inactivada por calor seco a 70°C 30 minutos. (B) Crecimiento de bacteria inactivada con estreptomomicina. (C) Crecimiento de bacteria inactivada por ebullición 5 minutos. (D) 10 minutos ebullición y 10 minutos centrifugación. (E) 10 minutos ebullición y 5 minutos centrifugación. (F) Ausencia colonias de bacteria inactivada por ebullición 15 minutos en freidora.



Fuente: Elaboración propia.

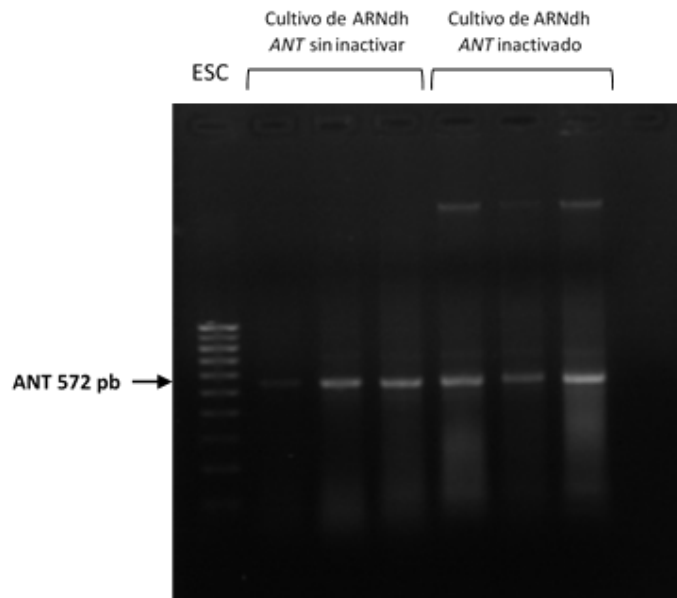
Debido a que el método de ebullición por 15 minutos obtuvo los mejores resultados de concentración de ARNdh de *Boule*, se realizó la inducción con IPTG de los cultivos de bacteria *E. coli* HT155 (DE3) para expresar ARNdh de *ZPG* y *ANT*, con el fin de confirmar la efectividad del método para todos los ARNdh que se necesitaba producir. En las siguientes figuras, se muestran geles de agarosa 1% del ARNdh extraído de los cultivos bacterianos antes y después de inactivar. Se puede observar que se presentan las bandas de los tamaños esperados de 204 pb para el ARNdh *ZPG*, 176 pb del ARNdh *Boule* y 572 pb del ARNdh *ANT* tanto antes de la inactivación por ebullición 15 minutos, como después. Además, con el gel se verificó que el ARNdh de las muestras contaba con la integridad deseada, ya que los pozos no cuentan con el barrido característico de un ARN degradado. Se muestra el ARNdh de *ZPG* ya que este fue utilizado para la alimentación de las larvas con la combinación de *Boule*+*ZPG* para evaluar solamente el silenciamiento de *Boule*.

Figura 36. Gel de agarosa 1% de ARNdh de *Boule* y *ZPG* extraídos de cultivo bacteriano de *E. coli* HT115 (DE3) transgénica antes y después de inactivar la bacteria. Se cargó 6µl de cada muestra y 3µl de la escalera Millipore Novagen de 100pb



Fuente: Elaboración propia.

Figura 37. Gel de agarosa 1% de ARNdh de *ANT* extraído de cultivo bacteriano de *E. coli* HT115 (DE3) transgénica antes y después de inactivar la bacteria. Se cargó 6µl de cada muestra y 3µl de la escalera Millipore Novagen de 100pb

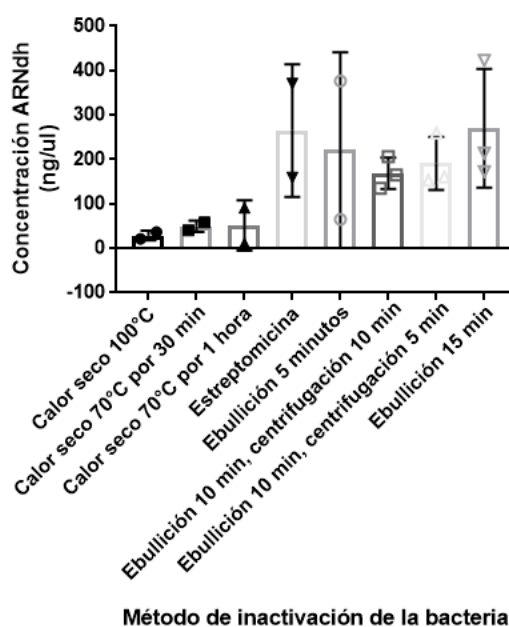


Fuente: Elaboración propia.

A continuación, en la siguiente figura se muestra una gráfica de las concentraciones de ARNdh obtenidas con cada método de inactivación. Se muestra que se obtuvo una concentración mayor con los

métodos de exposición a estreptomycin, ebullición por 5 minutos y ebullición por 15 minutos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, de estos solo el método de ebullición 15 minutos produjo muerte bacteriana total. Se muestran las barras de error para cada método de inactivación, que corresponde a la desviación estándar de la concentración de ARNdh entre las réplicas extraídas. Según estos resultados, se escogió la inactivación del cultivo bacteriano concentrado 2X por ebullición 15 minutos, como el mejor método para la producción de ARNdh de concentración y calidad óptima. Se logró producir hasta 270 ± 134 ng/ μ l de ARNdh mediante dicho método de inactivación.

Figura 38. Concentraciones de ARNdh de *Boule* obtenidas con diferentes métodos de inactivación del cultivo bacteriano. Las barras de error indican la desviación estándar de al menos dos réplicas.



Fuente: Elaboración propia

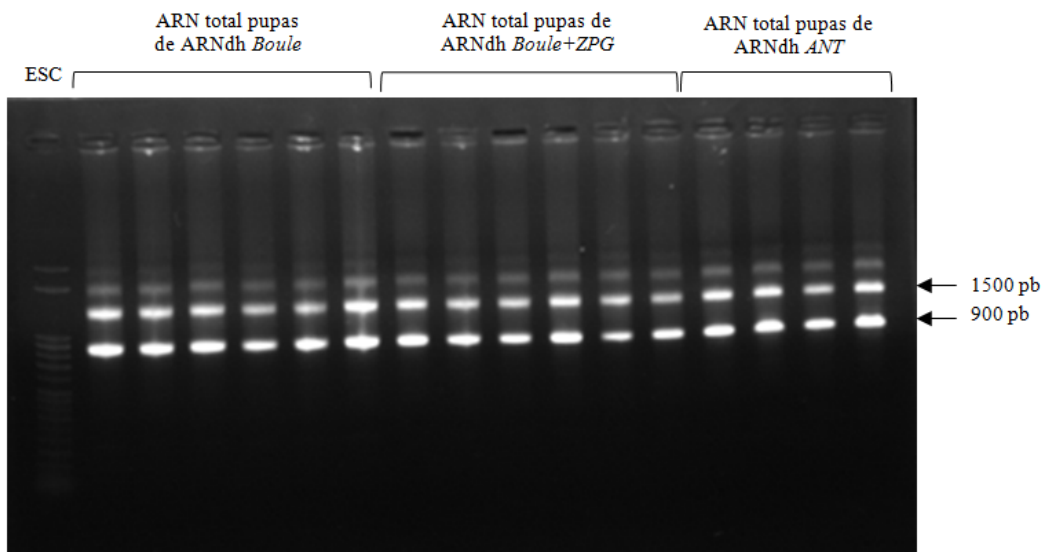
Al realizar un ANOVA (anexos), se determinó que no existe una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los métodos de inactivación ni tampoco antes y después de inactivar en cada uno de los tratamientos (anexos). Esto se debe a que la desviación estándar entre réplicas es muy grande, como se puede observar en las barras de error representadas en la figura anterior. Por ello, no se logró determinar diferencia entre métodos. Se cree que esta desviación tan grande entre las concentraciones del ARNdh de un mismo método se debió a que el cultivo bacteriano no se logró homogeneizar posterior a los lavados con PBS y las centrifugaciones. Esto se cree debido a que el botón celular de bacterias se concentraba al fondo del tubo y no se logró diluirlo conforme se resuspendía en PBS y la última resuspensión en agua ultra pura. Además, la desviación estándar del promedio de concentración de ARNdh subió considerablemente después de realizar los lavados y centrifugaciones, en comparación a la desviación del ARNdh justo después de inducir (cuadro de anexos). Sin embargo, los datos fueron normales ($p=0.07$) y provenían de poblaciones con

varianzas homogéneas ($p=0.1774$). Por lo tanto, no se rechaza H_0 , para la hipótesis planteada 4a de la sección de metodología.

Se recomienda repetir el procedimiento con al menos 5 réplicas de extracción para cada método de inactivación. Además, sería importante desarrollar un método que permita la homogenización adecuada del cultivo antes de la inactivación. Esto es principalmente necesario para poder estandarizar la alimentación de las larvas de *A. albimanus* con un rango establecido de concentración de ARNdh.

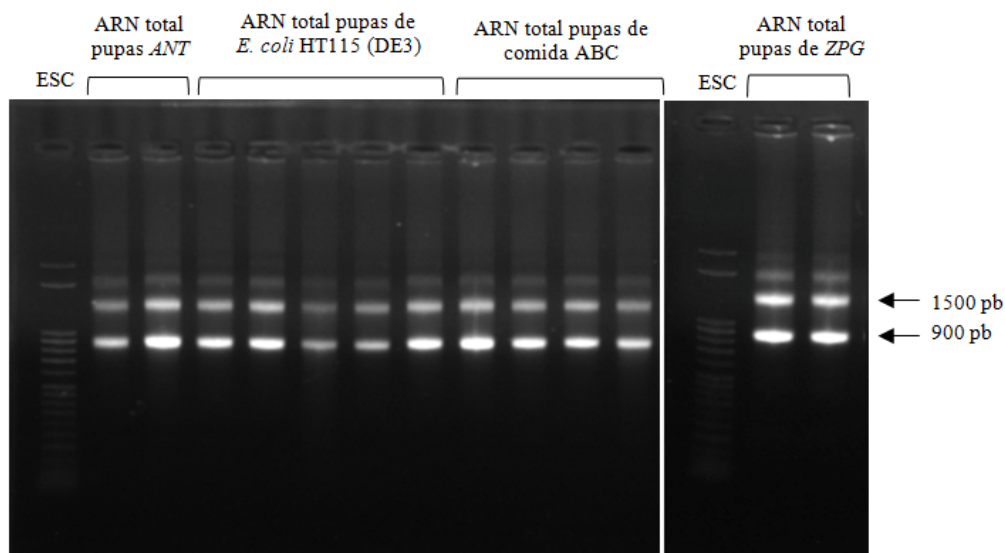
3. Extracción de ARN total de pupas macho y tratamiento con ADnasa. Se realizó la extracción de ARN total de pupas macho tratadas y se determinó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa. En las siguientes dos figuras, se determinó que el ARN extraído en todas las muestras era de buena calidad, ya que contaba con bandas definidas de las subunidades 28S (1500pb) y 16S (900pb). Además, no se muestra ninguna mancha o barrido de ARN degradado. Se observó que el ARN total de las muestras de tratamiento con *E. coli* HT115 (DE3) no transformada y comida ABC muestran la misma integridad que las de tratamiento de ARNdh.

Figura 39. Gel de agarosa 1% de integridad de ARN total extraído de pupas macho de *A. albimanus* tratadas. Se muestran todas las muestras extraídas de las pupas de los tratamientos de alimentación (ARNdh de *Boule*, de *Boule*+ZPG y de *ANT*). Se cargó 6 μ l de las muestras y 3 μ l de escalera de 50pb Millipore Novagen.



Fuente: Elaboración propia.

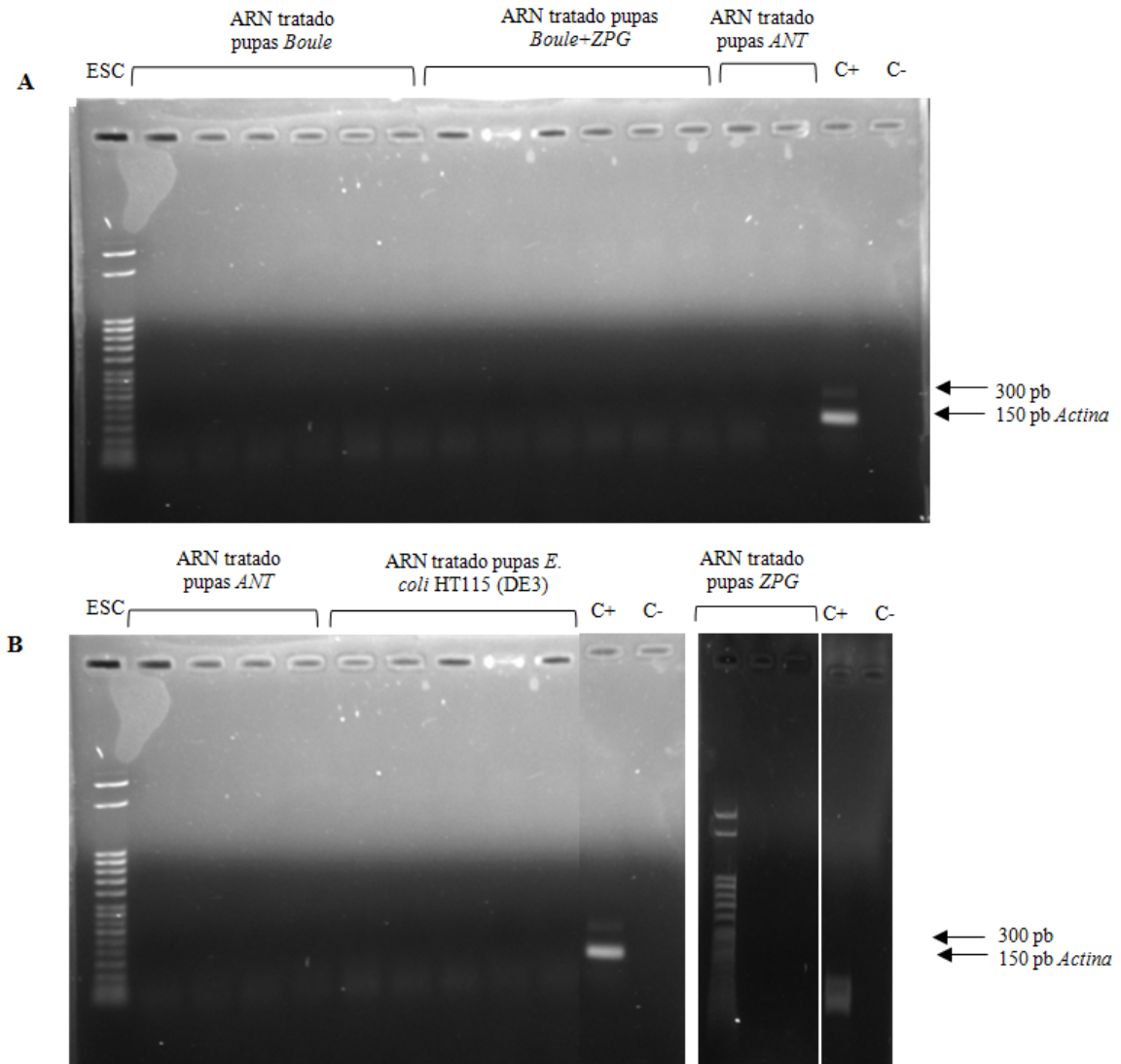
Figura 40. Gel de agarosa 1% de integridad de ARN total extraído de pupas macho de *A. albimanus*. Se muestran todas las muestras extraídas de las pupas de los diferentes tratamientos de alimentación (ARNdh de *ANT*, *E. coli* HT115 (DE3), comida ABC y ARNdh de *ZPG*). Se cargó 6µl de cada muestra y 3µl de la escalera de 50pb Millipore Novagen.



Fuente: Elaboración propia

En la siguiente figura se muestra el gel de PCR de actina, en el que se comprueba el tratamiento exitoso con ADNasa del ARN total extraído. Se puede observar la ausencia de la banda del gen de actina de 150pb. La cual, si se encuentra en el pozo de control positivo del PCR, así como la banda de 300 pb de ADN genómico. Esto indica que las muestras tratadas estaban libres de contaminación con ADN genómico de pupa, y por lo tanto el ARN era óptimo para plantilla del RT-PCR para sintetizar el ADN complementario. Además, no hay bandas en el control negativo del PCR en el último pozo de cada gel, lo cual demuestra que la reacción se llevó a cabo adecuadamente.

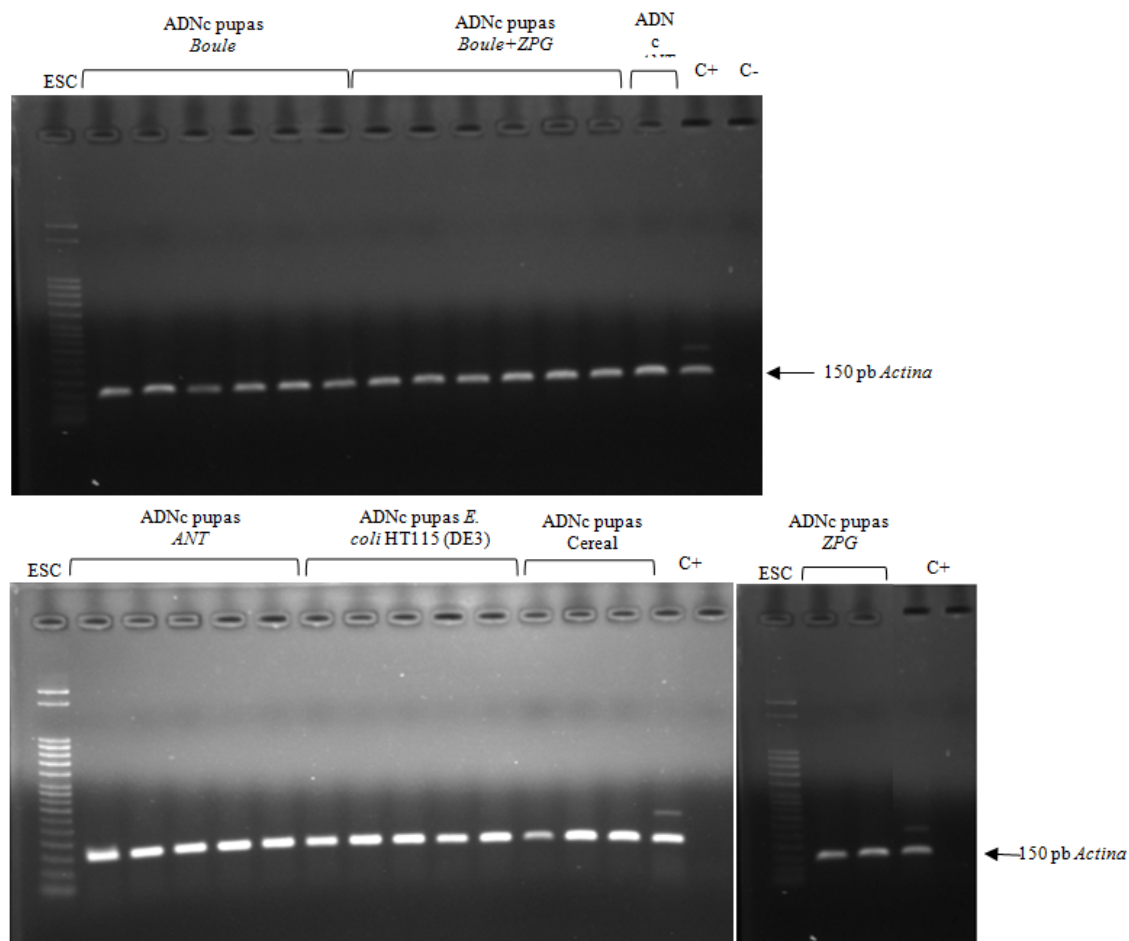
Figura 41. Geles de agarosa 1% de confirmación de tratamiento con ADNasa del ARN total de pupa macho de *A. albimanus* de los diferentes tratamientos de alimentación. Se utilizó la escalera de 50pb Millipore Novagen. (A) Muestras de ARN tratado de pupas macho de la alimentación con *E. coli* HT115 (DE3) pGEM-T-*Amp^R-Boule*, *Boule*+*ZPG* y *ANT* inducidas e inactivadas. (B) Muestras de ARN tratado total de pupas macho la alimentación con *E. coli* HT115 (DE3) pGEM-T-*Amp^R-ANT*, *ZPG* y *E. coli* HT115(DE3) sin transformar. En ambos geles se muestran los controles positivos y negativos del PCR de actina.



Fuente: Elaboración propia.

4. Síntesis de ADN complementario de pupa macho de *A. albimanus*. Se llevó a cabo la reacción de transcripción reversa (RT) para la producción de ADNc de las pupas macho de los tratamientos de alimentación de larvas de: ARNdh *Boule*, ARNdh de *ZPG*, ARNdh *Boule*+*ZPG*, ARNdh de *ANT*, *E. coli* HT115 (DE3) no transgénica, ABC y cereal. Sin embargo, solamente el ADNc de las muestras de los primeros seis tratamientos (ARNdh *Boule*, *ZPG*, *Boule*+*ZPG*, *ANT*, *E. coli* HT115(DE3) y ABC). Se determinó que se logró la síntesis del ADN complementario a partir de las muestras de ARN tratado. En la siguiente figura se puede observar la presencia de la banda característica del gen *Actina* del PCR confirmatorio de ADNc, en comparación al control positivo. Así como la ausencia de bandas en los pozos de control negativo (C-) en cada gel.

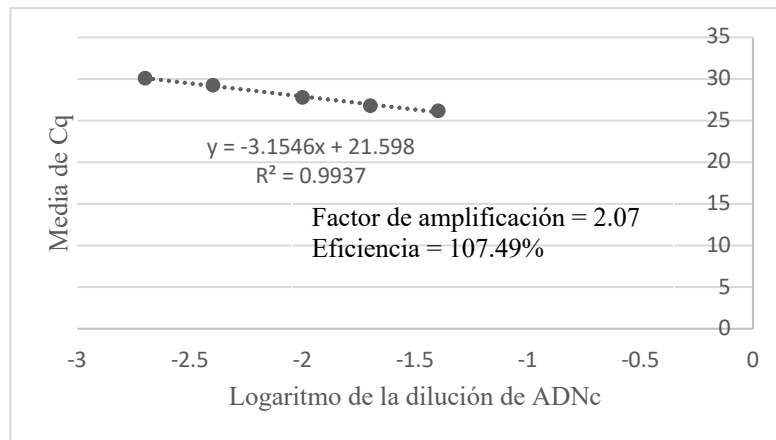
Figura 42. Geles de agarosa 1% de PCR de actina para confirmación de producción de ADNc de pupas macho de *A. albimanus*. Escalera de 50 pb de Millipore Novagen.



Fuente: elaboración propia

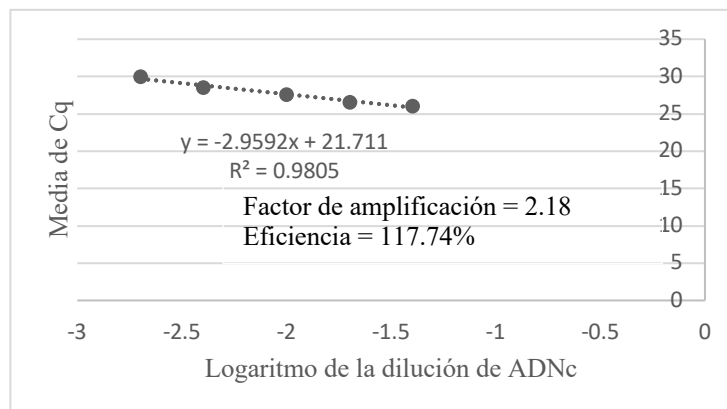
5. Evaluación de la eficiencia de los cebadores de *Boule* para qPCR por curva de diluciones en serie. Previo a realizar el análisis de expresión relativa de *Boule*, se determinó la eficiencia de los cebadores que se pretendía utilizar para el PCR tiempo real. Se realizó la gráfica de eficiencia a partir de los obtenidos de valores Cq. Como se muestra en las siguientes figuras, se obtuvo una eficiencia de 107.49% con concentración 0.4μM de los cebadores para *Boule* con un coeficiente de determinación de 0.9937. Por otro lado, se encontró que una concentración de 0.6μM de los cebadores brindó una eficiencia de 117.74% con un coeficiente de determinación de la recta de 0.9805. Se obtuvieron estos valores de eficiencias eliminando la dilución 1:10 de ADNc, ya que con una dilución muy concentrada en la reacción de PCR puede haber presencia de inhibidores.

Figura 43. Curva de eficiencia de los cebadores de qPCR de *Boule* a 0.4 μM de concentración final. Se muestra la ecuación de la recta y el porcentaje de eficiencia de los cebadores.



Fuente: Elaboración propia

Figura 44. Curva de eficiencia de los cebadores de qPCR de *Boule* a 0.6 μM de concentración final. Se muestra la ecuación de la recta y el porcentaje de eficiencia de los cebadores



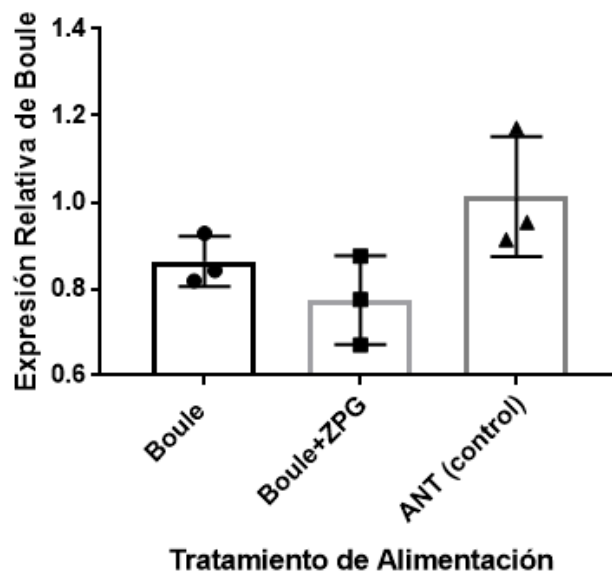
Fuente: Elaboración propia

En base a estos resultados, se determinó que la primera concentración evaluada de los cebadores de *Boule* (0.4 μ M) obtuvo una eficiencia dentro del rango aceptable de 90-110%. Por lo tanto, utilizar esta concentración de cebadores con el programa evaluado (POE 7) es válido para el análisis de expresión relativa.

6. Expresión del gen *Boule* en pupas macho de *Anopheles albimanus* alimentadas con bacterias transgénicas inducidas e inactivadas. Como resultado de la expresión del gen *Boule* en pupas macho tratadas de *A. albimanus* se determinó, con un 95% de confianza, que la media de la expresión relativa no mostró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos de alimentación de larvas. En la siguiente figura se muestran los resultados de la media de expresión relativa de *Boule* para cada tratamiento analizado. Se muestra la expresión con respecto a los genes de referencia, y comparando contra el control de *ANT*. Se determinó que las pupas macho del tratamiento con 100 μ l de ARNdH de *Boule* + 100 μ l de ARNdH de *ZPG* diarios, presentaron una expresión relativa promedio de *Boule* levemente más baja (0.774) que las pupas del tratamiento con 200 μ l de ARNdH de *Boule* (0.863).

Así mismo, ambos tratamientos mostraron expresiones relativas del gen ligeramente más bajas que el tratamiento control de 200 μ l de ARNdH de *ANT* (expresión de 1.01). Se determinó que, en comparación al control, la expresión relativa de *Boule* se redujo 23.4% mediante la alimentación con ARNdH combinado de *Boule*+*ZPG*. Mientras que la alimentación ARNdH de *Boule* mostró una reducción de expresión relativa del gen de 14.6%. Esto puede indicar que la alimentación con menor contenido de ARNdH de *Boule* (100 μ l del cultivo bacteriano inducido e inactivado) brinda mayor porcentaje de silenciamiento en comparación a la alimentación con 200 μ l del ARNdH. A pesar de la tendencia descrita anteriormente, las diferencias de las medias no fueron estadísticamente significativas, ya que en la prueba de ANOVA (anexos) se obtuvo un valor-p de 0.079 que es mayor al nivel de significancia de la prueba de 0.05. Por lo tanto, no fue posible rechazar la hipótesis nula, la cual establece que la alimentación de las larvas con el ARNdH de *Boule* no tendrá efecto significativo sobre la expresión del gen en las pupas macho.

Figura 45. Expresión relativa del gen *Boule*, con respecto a los genes de referencia *RPL49* y *RpS4*, en pupas macho de *A. albimanus* tratadas con *E. coli* HT155 (DE3) transgénica que expresa ARNdH de *Boule*/*Boule*+ZPG/*ANT*. Las barras de error indican la desviación estándar de seis réplicas biológicas.



Fuente: Elaboración propia.

Los promedios de expresión relativa de *Boule* para ambos tratamientos fueron muy altos, por lo que se considera que no se obtuvo silenciamiento del gen en las pupas macho analizadas. En un estudio realizado por Ali *et al.*, 2017, se demostró silenciamiento exitoso de *Boule* con expresión relativa menor a 0.5 en *Bactrocera dorsalis* (mosca oriental de la fruta) mediante ARNi. En este artículo se reporta que los adultos alimentados con concentraciones de 250, 500 y 1000 ng/μl de ARNdH de *Boule* presentaron silenciamiento del gen a las 24 horas del tratamiento. Sin embargo, cabe resaltar que en este estudio el ARNdH fue extraído de la bacteria transgénica, purificado, y cuantificado, por lo que se sabía con exactitud el contenido en ng administrado a las moscas. Además, Ali *et al.* llevaron a cabo la extracción de ARN total de los adultos cada 24 horas después del inicio de exposición a ARNdH para determinar el silenciamiento del gen a lo largo del período de alimentación. Por el contrario, en el presente trabajo de investigación solamente se realizó la extracción de ARN total de las pupas macho de *A. albimanus* al final del periodo de alimentación (5-6 días) y es posible que la expresión de *Boule* fuese variable durante este tiempo.

En el estudio de Whyard *et al.*, 2015 se demostró hasta un 60% de esterilidad de adultos machos de *A. aegypti* mediada por alimentación de las larvas con una cepa de *E. coli* muerta que expresaba ARNdH de *Boule*. Esto sugiere que el gen fue silenciado exitosamente mediante el mecanismo de ARNi por la administración de la bacteria transgénica. Sin embargo, es importante mencionar que en el estudio de Whyard, la cepa de *E. coli* fue introducida en cubos de agar con comida de larva y estos cubos fueron administrados a las larvas. Por otro lado, en la presente investigación el cultivo de *E. coli* con el ARNdH fue mezclada con comida ABC para formar una masa semi sólida. Sin embargo, las larvas no siempre se

terminaban la mezcla y muchas veces la cantidad ingerida variaba entre réplicas biológicas. Esta es una de las principales limitaciones del uso de administración por ruta oral del ARNdh para el silenciamiento. Por esta razón, se considera que, para estudios preliminares a pequeña escala, podría ser conveniente administrarlo mediante inyección de las pupas. Sin embargo, la inyección no es un método óptimo para utilizarlo a mayor escala, debido a que es costoso y requiere mucho tiempo. Por otro lado, la alimentación por ruta oral con bacterias inactivadas que expresan el ARNdh es la herramienta más efectiva con respecto a costos y tiempo.

Se cree que el principal motivo por el cual no se obtuvo una diferencia significativa en el efecto de los tratamientos es la falta de homogenización del cultivo de bacteria con ARNdh, lo cual se demostró mediante la extracción por Trizol. Al finalizar la inducción de las cepas de *E. coli* HT115 (DE3) transgénicas, fue necesario centrifugar y realizar lavados con PBS para eliminar los residuos de antibióticos e IPTG. Como se mencionó anteriormente, durante las centrifugaciones el botón celular de bacterias se concentraba al fondo del tubo y no se logró una homogenización completa del cultivo. Esto pudo provocar que el contenido de ARNdh dado a las larvas no fuera constante, tanto entre réplicas como entre tratamientos.

Otro factor que pudo afectar los resultados de expresión relativa es la variación de la temperatura reportada en el cuarto de insectario donde las larvas crecieron y empuparon. Las larvas de *Anopheles albimanus* deben mantenerse a temperatura constante, por lo que la inestabilidad de temperatura durante su desarrollo pudo afectar la expresión del gen analizado. Además, la temperatura constante es necesaria si se desean realizar ensayos de fertilidad posteriores, ya que puede afectar la capacidad competitiva y reproductiva del mosquito.

Según los resultados descritos anteriormente, la alimentación de las larvas de *A. albimanus* con ARNdh de *Boule* o *Boule+ZPG* no demostró tener un efecto significativo en la expresión relativa del gen *Boule*. Por lo tanto, para futuras investigaciones se recomienda utilizar un cultivo bacteriano con el ARNdh homogéneo para asegurar una alimentación con contenido de ARNdh constante. Así mismo, se debe mantener las temperaturas óptimas de desarrollo de las larvas y pupas, para evitar que esto tenga un efecto negativo. Se recomienda administrar diferentes dosis de ARNdh y medir la expresión relativa de *Boule* en diferentes tiempos durante el período de alimentación. Se plantea que para futuros estudios se hagan ensayos de fertilidad de los adultos machos, para determinar si la administración del ARNdh resulta en el fenotipo de esterilidad deseado.

7. Evaluación de la eficiencia de los cebadores de *ZPG* para qPCR por curva de diluciones en serie. Se utilizaron los cebadores diseñados para *zpg* propuestos por Ramos, A. 2018. Dichos cebadores contaban con una eficiencia de 89.37% a una concentración de 0.4uM y 118.24% a una concentración de 0.6uM. Según Svec, *et al.* 2015, la eficiencia de un PCR se define como la fracción de moléculas objetivo que copian en un ciclo de PCR, es decir que el número de moléculas de la secuencia objetivo debería duplicarse durante cada ciclo de replicación y que, en ausencia de sustancia interferentes en la matriz de la muestra, amplificar el ADN objetivo con al menos un 90-100%. Lo que demuestra que las eficiencias de los cebadores de *zpg* descritos por Ramos, A. 2018 no cuentan con la eficiencia aceptable. Debido a ello, se decidió re evaluar la eficiencia mediante una curva de diluciones en serie utilizando diferentes concentraciones de cebadores bajo las condiciones del protocolo de PowerUp SYBR Green descrito por el fabricante.

Como resultado, se obtuvo que ninguna de las concentraciones evaluadas de los cebadores de *zpg* obtuvieron una eficiencia dentro del rango aceptable de 90-110% como se puede observar en el siguiente cuadro.

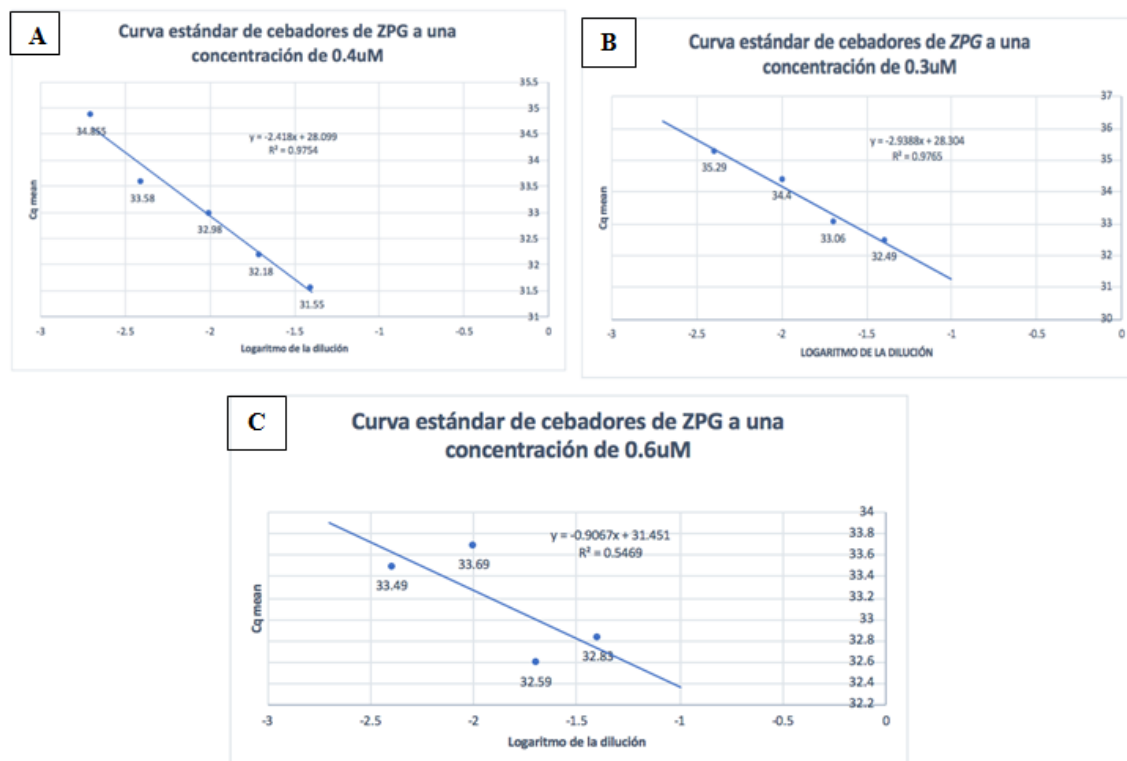
Cuadro 18. Eficiencias obtenidas de los cebadores de *zpg* a diferentes concentraciones

Concentración (uM)	Dilución en serie de ADNc en DEPC	Eficiencia (%)	R ²
0.20	1:25, 1:50, 1:100, 1:250	153.87	0.9797
0.30	1:25, 1:50, 1:100, 1:250	118.91	0.9765
0.40	1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500	159.98	0.9754
0.60	1:25, 1:50, 1:100, 1:250	191.55	0.5469

Fuente: Elaboración propia

Estos resultados se deben a que la pendiente de la línea de tendencia era mayor a -3.3, que es la ideal para una eficiencia de 100%, como se puede observar en las gráficas de la siguiente figura. Para las concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.2uM se eliminó la dilución 1:10, para la elaboración de la regresión ya que a una dilución muy concentrada puede existir presencia de inhibidores, los cuales incluyen cantidades excesivas de ADNc o material de transferencia en la muestra, mientras que a concentraciones más bajas (diluciones más altas), los inhibidores se diluyen junto con el ADNc. Sin embargo, para el caso de *zpg* se puede observar que el punto superior de la dilución 1:500 (-2.60,34.85) en la siguiente figura (A), queda fuera de la línea de tendencia, demostrando que la expresión del gen de *zpg* es muy baja, por lo que necesita de diluciones más concentradas.

Figura 46. Curva estándar de cebadores de *zpg* a una concentración de (A) 0.4uM (B) 0.3uM (C) 0.6uM y (D) 0.2uM.



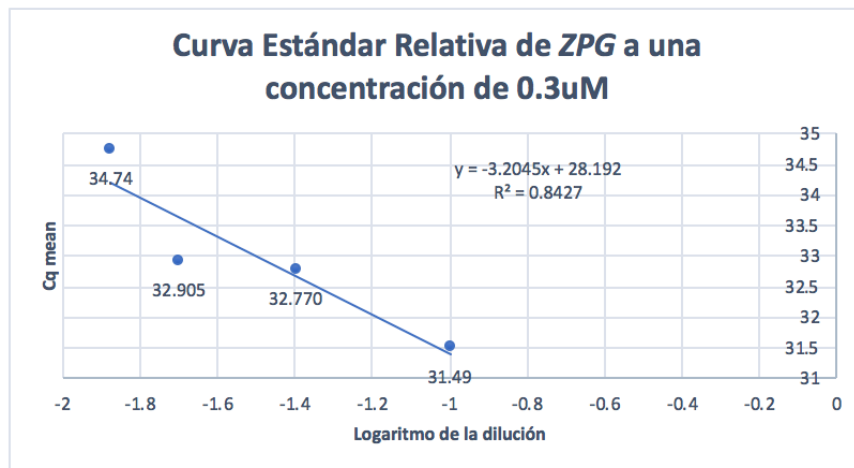
Fuente: Elaboración propia

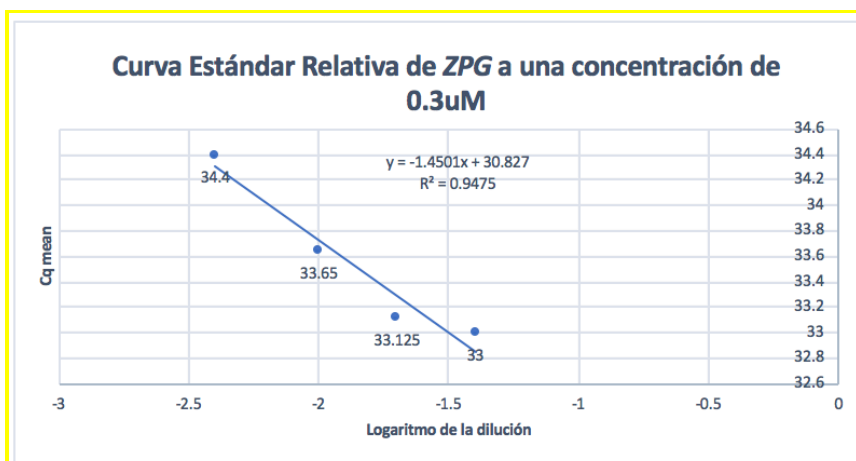
Según, Zupancic, U. 2017 cuando la eficiencia de amplificación supera el 100% puede deberse a diversos factores: (1) la polimerasa está siendo inhibida, resultando en una pendiente más baja. Los inhibidores de la enzima polimerasa incluyen cantidades excesiva de ADNc como se mencionó anteriormente, además posee contaminantes como heparina, hemoglobina, polisacáridos, clorofilas, proteinasa K, acetato de sodio; así también los cuales pueden transferirse desde la etapa de aislamiento de ADN/ARN como etanol, fenol y SDS. Por lo que es necesario, realizar más ciclos para cruzar el umbral de detección. (2) Los cebadores diseñados no son los más óptimos (3) Se realizó un pipeteo inexacto de ADNc y de reactivos, sin embargo este se descarta para estos resultados, ya que el R^2 presentados en la ecuación de la recta se encuentran en 0.97, lo cual indica que las desviaciones estándar no variaron mucho entre sí. En el caso de la concentración a 0.6uM sí se obtuvo un R^2 de 0.5469, sugiriendo un pipeteo deficiente (Applied Biosystems 2015).

8. qPCR mediante curva estándar relativa para evaluación de expresión del gen *ZPG* en pupas macho de *Anopheles albimanus* alimentadas con bacterias inducidas e inactivadas, en paralelo a la evaluación de eficiencia de cebadores de *ZPG*. La concentración del cebador de *zpg* utilizada fue de 0.3mM, ya que fue la concentración que mejor eficiencia presento, según el cuadro anterior. En la siguiente figura (A) se muestra que se obtuvo una eficiencia de *ZPG* de 389.39% en una dilución seriada de 1:25, 1:50, 1:100, 1:250 y 1:500. Este resultado sugirió que se necesitaban más puntos para la curva en un rango de 1:10 a 1:100. Por lo que al repetir el método ampliando la curva con las diluciones de 1:10, 1:25, 1:50, 1:75, 1:100 y 1:150, se obtuvo una eficiencia de 105.15%, la cual ya se encuentra dentro del rango óptimo de eficiencia para cebadores de *zpg*. Sin embargo, el R^2 obtenido fue de 0.8427, indicando una desviación estándar de C_q alta (según la siguiente figura B), para esta curva se eliminaron las diluciones 1:100 y 1:150, debido a que no hubo expresión de *zpg* a dichas concentraciones, por lo que se vuelve a comprobar que dicho gen se expresa muy poco y por ende requiere de diluciones muy concentradas.

Por otro lado, los genes de referencia utilizados (*RpL49* y *RpS4*) presentaron un R^2 de 0.99 indicando pipeteo constante, sin embargo, la pendiente de ambos se vio disminuida (anexos), debido a que estos genes se expresan de mejor manera a diluciones más altas, es decir concentraciones más bajas. Por lo que para un análisis de expresión se necesitan genes control con expresión similar al gen *zpg*.

Figura 47. Curva estándar de cebadores de *zpg* a una concentración de 0.3uM (A) dilución de 1:25 a 1:250 (B) dilución 1:10 a 1:75.

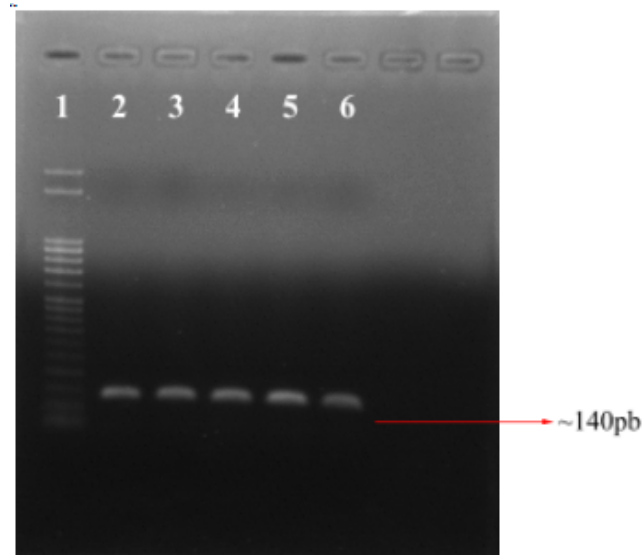




Fuente: Elaboración propia

Por otro lado, se observó que en las curvas de fusión, se encontraban dos picos en lugar de uno, lo cual indicaba que posiblemente había presencia de dos amplicones (anexos). Sin embargo, al observar los productos en un gel de agarosa como se muestra en la siguiente figura, no hay presencia de dos bandas sino sólo de la banda en el tamaño esperado de 140pb. Esto se debe a que a medida que el ADNdh comienza a fundirse, las regiones del amplicón que son más estables (ricas en G/C) no se funden inmediatamente (Farell, 2010). Estas regiones estables mantienen su configuración de ADNdh hasta que la temperatura es lo suficientemente alta como para hacer que se derrita. Por lo que dicho proceso da lugar a dos fases de fusión (Downey 2014). Además, se determinó que los cebadores analizados no presentan estructuras secundarias como dímeros, ya que no se observa una banda debajo del tamaño esperado, así también el ADNc está integro debido a la intensidad del mismo.

Figura 48. Gel de agarosa al 1% para verificación del amplicón con los cebadores de *zpg* por qPCR. El gel de agarosa fue realizado al 1% (p/v) en buffer de corrida TBE 1X y visualizado con bromuro de etidio a 300nm. (1) Escalera Millipore Novagen de 50pb. (2) Producto de qPCR de *zpg* (3) Producto de qPCR de la combinación *zpg* y *boule*. (4) Producto de qPCR del calibrador ANT (5) Producto de qPCR del calibrador *E. coli* HT115(DE3) (6) Producto de qPCR de ABC utilizado para la curva estándar. Se cargó 4uL de escalera y 5uL de muestra.



Fuente: Elaboración propia

Según la eficiencia de 105.15% se calculó la expresión del gen *zpg* y combinación *zpg* y *boule* en pupas macho de *A. albimanus* mediante el método de curva estándar relativa y cuantificación relativa simple. Como se muestra en el siguiente cuadro, a pesar de que se mejoró la eficiencia de los cebadores no se determinó silenciamiento, sino al contrario se observa sobreexpresión del gen *zpg* y de la combinación entre *zpg* y *boule*. El valor aceptado para confirmar un silenciamiento o disminución de la expresión de un gen, su expresión debe estar por debajo de 0.5 (Ali *et al.* 2017). Por otra parte, se observa que los valores de expresión difieren entre los métodos utilizados para el análisis de expresión. Esta diferencia puede deberse a que el método de curva estándar relativa toma en cuenta la curva de calibración, ajustando los valores según la ecuación de la recta. Mientras que el método de cuantificación relativa no posee una curva, sino se toman directamente los datos de Cq y asume que tanto el gen de interés como los calibradores poseen la misma eficiencia y R^2 , cosa que en este caso difiere. Por lo tanto, los resultados presentados no son concluyentes y debido a ello se diseñaron dos parejas de cebadores.

Cuadro 19. Expresión relativa de *zpg* y combinación *zpg* más *boule*

Muestra	Control	Expresión relativa
Método de curva estándar relativa		
<i>zpg</i>	<i>ANT</i>	1.1460
	HT	0.8776
<i>Zpg+boule</i>	<i>ANT</i>	1.0935
	HT	0.8630
<i>ANT</i>	<i>ANT</i>	1.3135
HT	HT	1.3150
Método de cuantificación relativa		
<i>zpg</i>	<i>ANT</i>	1.110
	HT	1.376
<i>Zpg+boule</i>	<i>ANT</i>	2.114
	HT	2.621
<i>ANT</i>	<i>ANT</i>	1.000
HT	HT	1.000

Fuente: Elaboración propia.

*Utilizando una eficiencia del cebador: 105.15% con un R: 0.8427

Tratamientos: *Zpg*: ARNdh con *zero population growth*, *zpg+boule*: ARNdh con combinación de *zero population growth* y *boule*. *ANT*: ARNdh del control *Arabidopsis thaliana*. HT: Control de la cepa utilizada de *E.coli* HT115 sin transformar.

9. Diseño de cebadores alternativos de *ZPG* para análisis por qPCR. A continuación, se presenta parte de la secuencia del gen *zpg*, señalando los fragmentos que se amplificaron por las diferentes parejas de cebadores diseñados.

Figura 49. Señalización de parejas de cebadores en la secuencia del gen *zpg* de *A. albimanus*. Los exones están representados por los diferentes colores. La secuencia en la que se une cada uno de los cebadores diseñados está señalizado con una flecha y subrayados en negro. La pareja de cebadores subrayados con doble línea fueron los utilizados para la evaluación de las eficiencias de *zpg*, diseñados por Ramos, 2018. Los subrayados con puntos discontinuos fueron los cebadores diseñados por Paiz, 2017 y los subrayados con ondas y en cursiva fueron diseñados por Flores, 2016.



Fuente: Elaboración propia, basados en el modelo presentado por Flores, 2016.

En el siguiente cuadro se presentan las secuencias y nombres otorgados a los cebadores diseñados para la amplificación y cuantificación del gen de *zpg*. También se presentan características especiales de cada cebador. Se puede observar que las secuencias de los cebadores diseñados poseen un tamaño adecuado para que funcione en qPCR ya que no supera los 25pb recomendados (Farrell 2005). No fue posible evitar repeticiones de secuencia, lo cual podría intervenir en el adecuado funcionamiento de los cebadores porque facilita la formación de dímero e impediría la adición de nucleótidos para amplificar el gen (Farrell 2005). Cabe resaltar que la segunda pareja de cebadores diseñados (ZPGqPCR_R2) es compartida con la región amplificada por los cebadores de ARNdH descritos por Flores, P. & Flores, N. 2016 (Cuadro 2 de antecedentes). Esto se debió a que se diseñaron cebadores diferentes a los ya existentes, y cómo el genoma completo de *zpg* es muy pequeño de aproximadamente 389 aminoácidos (1170pb) se optó a considerar el gen completo para los nuevos cebadores. Sin embargo, la primera pareja de cebadores (ZPGqPCR_R1 y ZPGqPCR_F1), no comparten la región del clon para producir ARNdH, por lo que podrían ser óptimos para cuantificar el silenciamiento del gen de *zpg* en pupas de *A. albimanus*, sin tomar en cuenta interferencias por el ARNdH proveniente del alimento.

Cuadro 20. Nombre y secuencia de los cebadores diseñados para amplificar el gen de *zpg* de *A. albimanus*

ID del gen	ID Cebador	q-PCR primers
AALB006004 <i>A. albimanus</i>	ZPGqPCR-F1	5'-TGG CTG TGG TTC GGG ATTC-3'
	ZPGqPCR-R1	5'-ATT TGC CGA TAC ATT CGC CG-3'
	ZPGqPCR-F2	5'-TGG GTC GTG TTC ATA CTG GC-3'
	ZPGqPCR-R2	5'-GTC GTC AGG TAG CGG ATC AG-3'

Fuente: Elaboración propia

En el siguiente cuadro se observa que ambas parejas de cebadores diseñados cumplen con que su T_m no difiera en más de 3 grados centígrados (Farrell 2005). De igual manera se espera que estos cebadores sean efectivos ya que el porcentaje de GC no supera el 60%, lo cual reduce la posibilidad de que se formen enlaces fuertes en los “hairpins” y dímeros (Farrell 2005). Los rangos de energía libre de Gibbs (ΔG) son levemente negativos, lo que indica que existe menor probabilidad de que las reacciones de formación de dímeros y “hairpins” ocurran de manera espontánea (Melo y Cuamatzi, 2007).

Cuadro 21. Características de los cebadores diseñados para amplificar el gen de *zpg* de *A. albimanus*

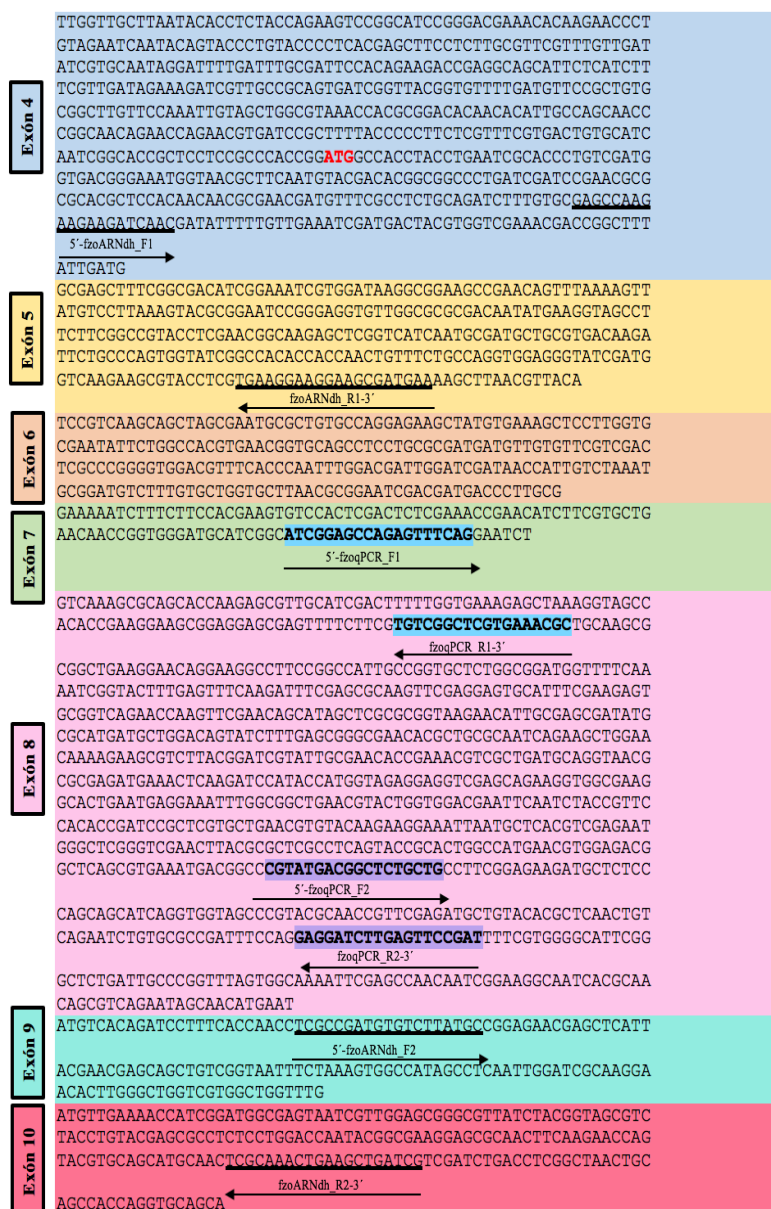
ID cebador	Tamaño del primer	%GC	T_m (°C)	Hairpins ΔG (kcal/mol)	Homodímeros ΔG Kcal/mol	Tamaño de amplicón	Heterodímeros ΔG kcal/mol
ZPGqPCR-F1	19	57.9	57.8	3 positivos	Ninguno >-5	166	-7.13
ZPGqPCR-R1	20	50.0	56.1	-2.17	-5.19		
ZPGqPCR-F2	20	55.0	57.3	6 positivos	Ninguno >-5	173	-7.87
ZPGqPCR-R2	20	60.0	57.2	-0.41	Ninguno >-5		

Fuente: Elaboración propia

Comparado el diseño de estas dos nuevas parejas de cebadores con los diseñados previamente, se puede diferenciar que estos poseen un porcentaje de GC menor o igual a 60%, por lo que se encuentran dentro del rango aceptable de 35-60%. Por otro lado, la diferencia de T_m entre el “Forward” y “Reverse” no varía más de 1.7°C. Por último, es importante mencionar que la secuencia de cebadores de *zpg* se realizó en regiones semiconservadas con otros dípteros, comparando las distintas *inexinas* con el objetivo de evitar interacción o silenciamiento de otras *inexinas* que puedan afectar en el desarrollo de *A. albimanus* (ver anexos).

Como se puede observar en la siguiente figura, hay una pareja de cebadores para qPCR marcada con puntos discontinuos, esto significa que se diseñó una tercera pareja de cebadores, sin embargo el cebador “Reverse” de la segunda pareja se convierte en el cebador “Forward” de la tercera pareja.

Figura 51. Parejas de cebadores diseñados en la secuencia del gen *fzo* de *A. albimanus*. Los exones están representados por los diferentes colores. La secuencia en la que se une cada uno de los cebadores diseñados está señalizado con una flecha. Las parejas de cebadores para ARNdh están subrayados con una línea negra. La pareja de cebadores para qPCR están subrayados de colores y remarcados en negro.



Fuente: Elaboración propia

En el Cuadro 22 se presentan las secuencias y nombres otorgados a los cebadores diseñados para la amplificación y cuantificación de los genes *fzo* y *gas8*. También se presentan características especiales de cada cebador en el Cuadro 15 (qPCR) y 16 (ARNdh). En los siguientes cuadros se puede observar que las secuencias de todos los cebadores diseñados poseen un tamaño adecuado para que funcione el PCR, ya que no superan los 25pb recomendados (Farrell 2005). Además, las temperaturas de desanillamiento están cercanas para maximizar el rendimiento, lo cual se traduce en el cuadro con el contenido en GC similar, entre 50% y 60%. No fue posible evitar presencia de complementariedad, sin embargo se trató de disminuir la cantidad de “hairpins” y “dímeros”. Se evitó la presencia de más de dos guanidinas o citocinas cercanas al extremo 3’ en la mayoría de los cebadores para evitar la formación de dímeros en dicho extremo. Además, como se puede observar en las Figuras 50 y 51, la región amplificada tanto de los ARNdh como de qPCR no es compartida para el caso de *fzo*, sin embargo, para el gen *gas8* no se logró evitar dicho parámetro ya que la secuencia de exones de su gen es limitada (3 exones), mientras que en *fzo* es todo lo contrario (11 exones).

Cuadro 22. Nombre y secuencia de los cebadores diseñados para amplificar *fzo* y *gas8* de *A. albimanus*

ID del cebador	qRT-PCR primers	dsRNA Primers
<i>gas8</i> qPCR_F1	5’-AGCACCAGTCGCACATTGG-3’	5’-GCGAAAGGAAGCACGGTCA-3’
<i>gas8</i> qPCR_R1	5’-GGCGTTCTCTTCCTTCTCC-3’	5’-CTTCAGCTGCGTCATCATCT-3’
<i>gas8</i> qPCR_F2	5’-GCTCAACAGCACCCAGAAG-3’	5’-CAAATGCGATGCGAGAGGC-3’
<i>gas8</i> qPCR_R2	5’-GAGGATGGCTTCCCGTG-3’	5’-GATACCGTACTTGACCAGCT-3’
<i>gas8</i> qPCR_F3	5’-GCATGAAGGAGGAGATGGAA-3’	
<i>gas8</i> qPCR_R3	5’-CTTCTGGGTGCTGTTGAGC-3’	
<i>fzo</i> qPCR_F1	5’-ATCGGAGCCAGAGTTTCAG-3’	5’-GAGCCAAGAAGAAGATCAAC-3’
<i>fzo</i> qPCR_R1	5’-GCGTTTACGAGCCGACA-3’	5’-TTCATCGCTTCCTCCTTCA-3’
<i>fzo</i> qPCR_F1	5’-CGTATGACGGCTCTGCTG-3’	5’-TCGCCGATGTGTCTTATGC-3’
<i>fzo</i> qPCR_R2	5’-ATCGGA ACTCAAGATCCTCC-3’	5’-CGATCAGCTTCAGTTTGCGA-3’

Fuente: Elaboración propia

En el siguiente cuadro se observa que el tamaño del amplicón sobrepasa las 100pb indicadas para qPCR (Farrell 2005), sin embargo, Whyard, *et al.* 2015, contaba con tamaños de amplicón de 137pb y obtuvo resultados exitosos. Además, se trató de diseñar los cebadores en regiones conservadas para asegurar el funcionamiento de los mismos y es por ello, que el tamaño del amplicón es grande.

Cuadro 23. Características de los cebadores diseñados para amplificar los genes de *fzo* y *gas8* de *A. albimanus* en Reacción de Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)

ID	Tamaño del primer	%GC	Tm °C	Hairpins ΔG (kcal/mol)	Homodímeros ΔG (kcal/mol)	Tamaño de amplicón	Heterodímeros ΔG (kcal/mol)
<i>gas8</i> qPCR_F1	19	57.9	60	-0.61, -0.31, 0.16	10 homodímeros -5.02 a -1.34	146	12 heterodímeros -6.75 a -1.6
<i>gas8</i> qPCR_R1	19	57.9	60	1.05, 1.5, 1.72, 1.97 y 1.98	4 homodímeros -3.61 a -3.07		
<i>gas8</i> qPCR_F2	19	57.9	60	-1.11	6 homodímeros -4.74 a -1.57	217	16 heterodímeros -6.44 a -1.95
<i>gas8</i> qPCR_R2	18	66.7	60	-1.06 y -0.79	11 homodímeros -4.64 a -1.6		
<i>gas8</i> qPCR_F3	20	50.0	60	0.37	4 homodímeros -5.38 a -1.47	209	17 heterodímeros -5.02 a -1.57
<i>gas8</i> qPCR_R3	19	57.9	60	-1.11	6 homodímeros -4.74 a -1.57		
<i>fzo</i> qPCR_F1	19	52.6	58	0.59, 0.87, 0.92, 1.43, 1.44	8 homodímeros -3.61 a -1.47	137	10 heterodímeros -8.26 a -1.34
<i>fzo</i> qPCR_R1	18	61.1	58	-1.72, -1.58	11 homodímeros -4.95 a -1.34		
<i>fzo</i> qPCR_F2	18	61.1	58	-0.6, -0.46 y -0.21	9 homodímeros -4.95 a -0.96	143	14 heterodímeros -3.61 a -1.34
<i>fzo</i> qPCR_R2	20	50.0	60	-0.51	11 homodímeros -4.64 a -1.47		

Fuente: Elaboración propia

De los diseños propuestos para qPCR se considera que la pareja de cebadores que podría funcionar para el gen *gas8* es el set 3: *gas8*qPCR_F3 y *gas8*qPCR_R3 ya que en comparación con los demás, presentan menor ΔG (kcal/mol), menor número de hairpins y un %GC y Tm adecuados. Para el caso de *fzo* se recomienda utilizar el set 2: *fzo*qPCR_F2 y *fzo*qPCR_R2 ya que la energía libre de Gibbs (ΔG) del heterodímero es más positiva comparado con el -8.26 kcal/mol del set 1. Sin embargo, la cantidad de homodímeros y heterodímeros puede provocar pérdida de especificidad del cebador. Sin embargo, no fue posible diseñar estos cebadores con las características ideales para evitar la formación de dímeros debido a que eran las únicas regiones conservadas con otras especies de dípteros que se encontraban.

Cuadro 24. Características de los cebadores diseñados para ARNdh los genes de *fzo* y *gas8* de *A. albimanus*

ID	Tamaño del primer	%GC	Tm °C	Hairpins ΔG (kcal/mol)	Homodímeros ΔG (kcal/mol)	Tamaño de amplicón	Heterodímeros ΔG (kcal/mol)
<i>gas8</i> ARNdh_F1	19	57.9	60	-0.36, -0.08	9 homodímeros -3.61 a -1.34	342	16 heterodímeros -5.12 a 1.57
<i>gas8</i> ARNdh_R1	20	50.0	60	5 hairpins 1.58 a 2.3	10 homodímeros Uno de -10.24 y el resto de -3.61 a -1.47		
<i>gas8</i> ARNdh_F2	19	57.9	60	-0.62, -0.33, 0.34	12 homodímeros -3.61 a -1.47	339	14 heterodímeros -3.9 a -1.47
<i>gas8</i> ARNdh_R2	20	50.0	60	0.56, 0.67, 1.46	9 homodímeros -6.34 a -0.96		
<i>fzo</i> ARNdh_F1	20	45.0	58	0.42, 0.59, 0.87	5 homodímeros -4.62 a -1.57	353	23 heterodímeros -5.12 a -1.57
<i>fzo</i> ARNdh_R1	20	45.0	58	No hay	3 homodímeros -3.61 a -1.47		
<i>fzo</i> ARNdh_F2	19	52.6	58	-0.49	10 homodímeros -5.02 a -0.96	280	18 heterodímeros -3.9 a -1.34
<i>fzo</i> ARNdh_R2	20	50.0	60	0.32, 0.65, 0.96 y 1.1	13 homodímeros -6.34 a -1.57		

Fuente: Elaboración propia

De los diseños propuestos para ARNdh se considera que la pareja de cebadores que podría funcionar para el gen *gas8* es el set 2: *gas8*ARNdh_F2 y *gas8*ARNdh_R2 ya que en comparación con los demás, presentan menor formación de heterodímeros, menor número de hairpins y un %GC y Tm adecuados. Para el caso de *fzo* se recomienda utilizar el set 2: *fzo*ARNdh_F2 y *fzo*ARNdh_R2 ya que la cantidad de heterodímeros formados es menor comparado con el set 1. Sin embargo, aún la cantidad de homodímeros y heterodímeros puede provocar pérdida de especificidad del cebador. No fue posible diseñar estos cebadores con las características ideales para evitar la formación de dímeros debido a que eran las únicas regiones conservadas con otras especies de dípteros que se encontraban. El diseño de los cebadores de ARNdh podrían utilizarse para clonar el gen de interés en los plásmidos de pGEMT-Easy Vector como se realizó con *zpg* y los cebadores de qPCR se utilizarían para evaluar la expresión de *fzo* y *gas8* después de su silenciamiento por ARNi.

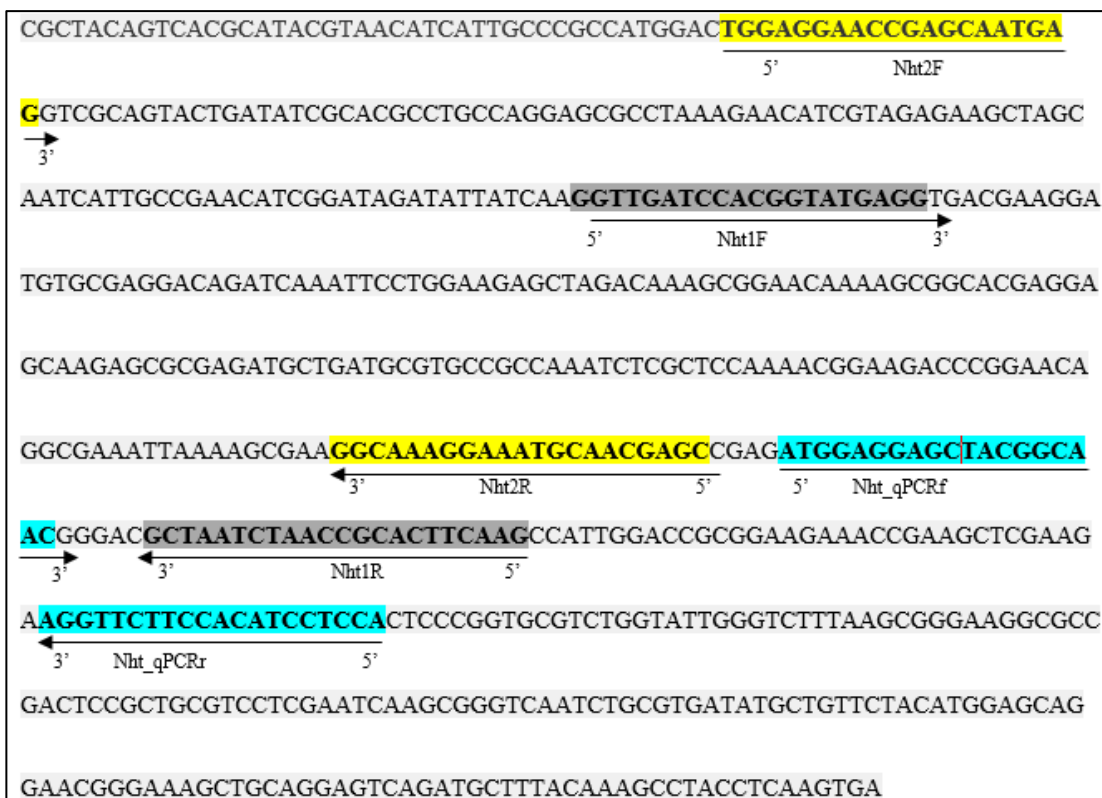
b. Diseño de cebadores para No-hitter (nht). Se decidió diseñar cebadores, u oligos, del gen de espermatogénesis *No-hitter* (*nht*) como otro candidato para silenciamiento por ARNi en pupas de *A.*

albimanus. Este gen ya ha sido reportado por Hiller *et al.*, 2004, como gen exclusivo de testículos en *Drosophila melanogaster*. Además, se ha demostrado que la alimentación de larvas de *Aedes aegypti* con ARNdh de *nht* produjo machos adultos con muy baja fertilidad (Whyard *et al.*, 2015). En la siguiente figura se muestra la ubicación de las parejas de cebadores diseñados en la secuencia de *nht*. Los cebadores se encuentran al final de la secuencia ya que esta es la región que se determinó que es más conservada del gen de *A. albimanus* con *A. aegypti*, *A. gambiae* y *A. darlingi* (anexos). Además, se determinó que esta era la región indicada para asegurar la producción de ARNdh con potencial para silenciamiento, ya que esta fue la amplificada por Whyard *et al* que proveyó fenotipo de esterilidad. Se muestran dos parejas de cebadores para la amplificación del gen, para la clonación en un plásmido y posterior producción del ARNdh. Además, se muestra una pareja diseñada para análisis de expresión del gen por PCR tiempo real.

Figura 52. Ubicación de parejas de cebadores diseñados en la secuencia del gen *nht* de *A. albimanus*. Se muestran las secuencias y códigos de las parejas cebadores diseñados para clonación de *nht* en colores gris y amarillo. Se muestran las secuencias y códigos de la pareja de cebadores para qPCR en celeste.

ATGGCGTCTGCCAACTTTTTGGAAGAGGCTCTGAAATCGGATGTCGATGAGTCTGCGGTGAACGCGAT
 CGTGGGCAGCTCGAAAACAGCTGGATGTCAACACGAACCTAGTGCAACAAGTCGGGAGTGTGGGA
 AATCGGAATCGGGTGAGAGTGCAATAGAGGAGGTGGCAAATGGGGCCACGGCGGTGCGTGTGCCAGCAA
 CGGCCATCTAGCGGCAGTGGCGTGCCCTCAGCAGAAGCGAGATCTTGGCGGTGGCCTCGCGAATGGTGA
 AATAGCGGTGTGGAACAACAATACTATCACGGCAAATAACAACACTCCTGGTAAACCCACGATAGTGA
 CTAGTGCGAACAGCTCGTCCACGTCCACGGTCGTTGCCCGATCCGCGAGTGTGCGGTTGCCAAAGAGT
 GGGCGTCAGCCGAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCGGAGCAATTCGGGCTCGGTGGTATAGCGGGAGG
 AGGTGCGACTCGCGGAGGCGGAACATCAACATAATCAGCCAACAAATCGTGGTGCCTCCTCCGCCGT
 TTAACGTTTCCTTCCAGCACTCAGAAGCAGCAGCAGCAGCAGGCTTGACAACGGCGGGGAACAGCATC
 GATTATCAAAAACCAGCAAACCAACACCGTTATGAACTCCGGCGCGCCGGGAATCGTGACGGTTTTCG
 AAGCCGATGAACAATCAGGCAACACCAACATAGTCGGTTTTACCTGGTGTACAAATTGTAAATGTTA
 GACCTGGCGCACAACCCACACAAGCACAGCAAAAACTGTTGCCGCTGTATCACCTAGAGTTGTCAT
 TGGTAGCCAGCCAATAGTTAGTACTAGACCACCAAACGCAAGCGCTATCACATTAAGTGCCCTTCAA
 GGACAGCAAGGCTCGACGTTACTGCTAAAGAATGAGCAGGGTCAGTTCAGTTGCTCCGGATTGGAC
 CGGCCCGGACCGGGACCCAAATTACGCCCGCAGTCTGACGCCGTCGTCTACGAACCAAACGATACG
 ATTGCAAACAGTACCAGCTACTCATGCGTCTGGTACGGGAGCGATCATTGTGAGTTCCCAATCCGGC
 ACGACGCCACAAACCAGCTATATCTCCACACAACCGACGCCGGTCGTTTCGGTAGCACCGGTGCCAG
 CGCTAGCTGCACAGCAGAATATCACCATCACGCATACATCGGCGTCACCAGCAACAGTGTGAGCAC
 TCAACAACCCCAACAACAACAACAGCAACAGCAACATGGCTCCACAGGGAGTGTGGCTGGTCAGCAG
 ACGTCACAGCAGCAGCAACAGCAACCGACGGTCGTGGTTACAACAACACCTGCCGTCACGCAGCAGC
 GGAACCTCTTAGATAATACCAAAGAAAAGTGCAGCAAGTTTTCTGACGAATCTAATCGAGCTGTCCAA
 GCGAGAACCACCAAGGTGGAACAGAATGTGCGTACGCTGATACAGGAGCTGGTGGATGCAAACGTA
 GATCCGGCGGAATTTTGTGAACGTCTCGAGCGATTACTTAACGCCAGTCCGCAACCATGTTTGATTG
 GTTTTTTAAAGAAAAGTCTACCCTGCTTCGGCAATCGCTAGTAATAAAGAGATAACCATCGAAGG
 TATCAACCCACCCTCTGCCGAGTTGCTTTCCGCCGTACCGCCTTATCCTCCATTCCCGCCAAATT
 CGCCCCGTTGCACCGACGATTGTTTCGCAAGGCAGTATGATCGGCCAAACACAGATCCGCATGTTAA
 CCAACCAATCCGGCGTGACCACACTGCCCCGGATCGGGCAGACCACGATCCGTCCGGCGGCTCCGAT
 ACGAATACAAACACCACTGCAGCAACAGTCGACGGTAACGGCTGGCGGGACGACCATTGTAGGGCAA
 CCGCGTACGACCACGCTCACCGCGCAACAGATACGACCAAACGTGACAACGATCGGTACACGACGTA
 TCGTGCAGACGGCGGGTCAGCAGCTTCCGCAAACCATTTTCGACCACACCTCCCGCACTGCTACCGAT
 TCGCACTCCTTCCGGTACATCGATAACGCGAAGCGGCACCACGCTTCAGATACGCACCCTACACCC
 ATCACGTCGCGCACGTTAACGTCGATCGGTGGGACGACGGTGACAACGACGGGCAAACAGATCCTTC
 AGTCGCAAACAGTCAATCAGATCCGTGGCCAGACGCCGGTCGTTTCGGTAGCGGCCGTGGCTGCAGC
 AGCAGCGGCCGCTGCCTCGGGATCTTCGGCAACGCAGGTTAAGCAAGTGACAGCAATTACCGGCGGT

GGGAATGTAGTCGTCTGTAACCAGAATCCGCCCCGATGCAGCCGGTGTCCGCCCTCAGCGGTGGCGG
 CAGCCAAGGAGGATCGTTGGTGGTCAGTGGGACGCAAGCCATGCCCGCCCTGACACTAACGTCCGCCGCCA
 GTGCCGCCGGTTCCGGTGTGAGCGGTGGCGTTGTCTCCGGCGTCAAGTCGGCACCCGCTGCATCGGCGACG
 ATCGTTCTTAACTCCTCATCCACAGTCTCGACCACGGCAGCGGCAGCTTCGATCGGTAGTGGTACGGCAGT
 ATCCGCCGATTGGCTACTGCTAGCGGGACCACTAGCAACGCCTGGGCTTACGACTATTAATACTATTA
 CCGCTAAATCGCAGAACCTCTCGGGAGCCGCTGCGGCAAGTGCCAAGAAGAAGGCAAGTGCCTCGGCTGCA
 TCGAGCGCTGGAGCGGAGCAGGATGCGAGCAAGCGAGCCGGTGCCTCGGCCAGTCTCAGTTCTACCATCA
 TCATGCGGCCATGTACGGTGAAGACGACATCAACGATGTGGCCGCCATGGGCGGCGTCAATCTGGCGGAAG
 AAACGCAGCGCATTTTAGGATCGACCGAGTTCGTGGAACGCAGATCCGATCGTGAAGGACGAGGTGTTT
 CTCCATCTACCGG



Fuente: Elaboración propia

En los siguientes cuadros se muestran las secuencias y características de los cebadores para clonación de *nht* para producción de ARNdh. La longitud de los cebadores está dentro del rango ideal de 13-30 bases, con el fin de obtener reacciones de PCR específicas. Además, se obtuvo parejas de oligos con temperaturas de anillamiento (T_m) compatibles de no más de 2°C de diferencia. Esto asegura la eficiencia de la reacción (Dieffenbach *et al.*, 1993). Por otro lado, se crearon cebadores con porcentajes de guaninas y citosinas (GC) de aproximadamente %50, esto contribuye a evitar la formación de estructuras secundarias, tales como hairpins, homodímeros y heterodímeros (Apte y Saurabha, 2009). Los cebadores fueron diseñados con una G o C en el extremo 3', con el fin de crear una "pinza GC" que asegure la unión correcta

de los cebadores en dicho extremo a la plantilla de ADN (Apte y Saurabha, 2009). Esto reducirá la posibilidad de formación de bandas secundarias (Kamel, 2003).

Cuadro 25. Secuencias y códigos de los cebadores para clonación de *nht* de *A. albimanus*

Set de primers	Primer	Código	Secuencia	Número de bases	Tamaño amplicón (pb)
1	Forward	Nht1F	5'- GGT TGA TCC ACG GTA TGA GG - 3'	20	245
	Reverse	Nht1R	5'- CTT GAA GTG CGG TTA GAT TAG C - 3'	22	
2	Forward	Nht2F	5'- TGG AGG AAC CGA GCA ATG AG - 3'	20	289
	Reverse	Nht2R	5'- GCT CGT TGC ATT TCC TTT GCC -3'	21	

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 26. Características de los cebadores diseñados para clonar el gen *nht*

Primer	T _m (°C)	%GC	Cantidad de hairpins y rango de ΔG (kcal/mol)	Cantidad de homodímeros y rango de ΔG (kcal/mol)	Cantidad heterodímeros y rango de ΔG (kcal/mol)
Nht1F	62	50.0	3 hairpins ΔG: -0.53 a 0.29	12 homodímeros ΔG: -4.62 a -0.96	11 heterodímeros ΔG: -3.61 a -0.96
Nht1R	64	47.6	1 hairpin ΔG: 0.16	12 homodímeros ΔG: -3.61 a -0.96	
Nht2F	62	55.0	2 hairpins ΔG: -0.38 a 0.4	7 homodímeros ΔG: -3.61 a -1.47	18 heterodímeros
Nht2R	64	52.4	1 hairpin ΔG: -0.95	7 homodímeros ΔG: -7.05 a -3.14	ΔG: -9.92 a -1.57

Fuente: Elaboración propia

En los siguientes cuadros se muestran las secuencias y características de la pareja cebadores para PCR tiempo real. En general en qPCR, un cebador de menos de 18 nucleótidos no será muy específico para una secuencia dada, mientras que uno de más de 25 se tardará más en anillarse a la secuencia y resultará en menor eficacia de la reacción (Life Technologies, 2012). Por esta razón, se diseñó una pareja con 19 y 20 nucleótidos, la cual se espera que alcance la especificidad y eficiencia deseadas en la reacción de PCR. La pareja diseñada provee un amplicón de 98pb, el cual entra en el rango óptimo para qPCR que es de 50-150pb (Life Technologies, 2012). Además, los dos cebadores cuentan con una T_m compatible de 60°C, lo

cual asegura que ambos oligos funcionen correctamente en un mismo programa de PCR. Además, esta temperatura provee una ventana térmica para un anillamiento eficaz, lo cual aumenta la eficiencia de la reacción (Dieffenbach *et al.*, 1993). El primer reverse (Nht_qPCRr) cuenta con un porcentaje de GC de 50%, que es compatible con la T_m . Por otro lado, el primer forward (Nht_qPCRf) tiene 57% de GC, el cual es mayor al porcentaje ideal para una T_m de 60°C. Esto podría provocar pérdida de eficiencia o especificidad del cebador (Dieffenbach *et al.*, 1993). Sin embargo, no fue posible diseñar este cebador con las características ideales debido a que esta era la única región de la secuencia que se encontraba conservada con otras especies de *Anopheles*.

Se determinó que los cebadores diseñados Nht2F y Nht2R para clonación y producción de ARNd_h cuentan con las mejores características, ya que presentan poca probabilidad de formar estructuras secundarias ya que el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG) para la formación de estos eventos tiene valores poco negativos. Por otro lado, los cebadores diseñados para qPCR no presentan las características ideales ya que existe alta probabilidad de formación de heterodímeros. Sin embargo, no fue posible diseñar cebadores con menor valores de ΔG .

Cuadro 27. Secuencias de cebadores para amplificar *nht* de ADNc de *A. albimanus* en PCR tiempo real

Primer	Código	Secuencia	Número de bases	Tamaño amplicón
Forward	Nht_qPCRf	5'- ATG GAG GAG CTA CGG CAA C -3'	19	98
Reverse	Nht_qPCRr	5'- AGG TTC TTC CAC ATC CTC CA -3'	20	

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 28. Características de cebadores diseñados para amplificación de *nht* en PCR tiempo real

Primer	T_m (°C)	%GC	Cantidad de hairpins y rango de ΔG (kcal/mol)	Cantidad de homodímeros y rango de ΔG (kcal/mol)	Cantidad de heterodímeros y rango de ΔG (kcal/mol)
Nht_qPCRf	60	57	1 hairpin ΔG : -1.32	7 homodímeros ΔG : -6.34 a -0.96	13 heterodímeros
Nht_qPCRr	60	50	1 hairpin ΔG : -1.07	6 homodímeros ΔG : -4.67 a -1.34	ΔG : -12.84 a -1.57

Fuente: Elaboración propia

Según los resultados anteriores, se logró llevar a cabo el diseño de cebadores para clonar gen *nht*, con características ideales para la amplificación del gen de *A. albimanus*. Además, se logró diseñar cebadores

para evaluar expresión génica por qPCR del gen *nht* con características óptimas pero alta probabilidad de formación de estructuras secundarias. Para futuras investigaciones es necesario determinar la eficiencia de los cebadores y verificar que los amplicones obtenidos con la reacción sean de los tamaños esperados. Como se ha mencionado, el gen *nht* codifica para un regulador de la transcripción de genes involucrados en espermatogénesis. Se demostró que el silenciamiento del gen por ARNi fue exitoso en adultos de *A. aegypti* (Whyard *et al.*, 2015). Por esta razón, se plantea el uso de los oligos diseñados para estudios de análisis de silenciamiento en *A. albimanus*.

D. Evaluación de expresión génica de los genes de eliminación de hembras *Doublesex* y *Transformer-2* de *Anopheles albimanus*

1. Diseño de cebadores del gen *Doublesex* para evaluar la expresión génica por medio de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Debido a que la secuencia de *Dsx* en *An. albimanus* no se encuentra como una secuencia única, fue necesario el uso de dos secuencias que fueron unidas. Esto se logró por medio de los motivos del alineamiento de las secuencias de proteínas con las secuencias de *Aedes aegypti* y *Anopheles gambiae*. Los cebadores fueron diseñados en una región común para hembras y machos de la secuencia. Se obtuvieron cuatro sets de cebadores para la amplificación de *Dsx*. De los cebadores diseñados se sintetizaron solamente las parejas 1 (qPCR_DSX1F y qPCR_DSX1R) y 2 (qPCR_DSX2F y qPCR_DSX2R). La información de ambas parejas se puede encontrar a continuación.

Cuadro 29. Nombre y secuencia de los cebadores diseñados para amplificación del gen *Dsx*. Los cebadores se presentan en parejas, el primer dato que aparece en la columna nombre representa el cebador “forward” de cada pareja y el segundo dato es el cebador “reverse”

Nombre de Pareja de primer	Secuencia de cebador forward 5'-3'	Secuencia complementaria de Reverse 5'-3'
qPCR_DSX1F qPCR_DSX1R	CAGAGCTGAAAGAGCTGAAG	GTCATCTTAAGGGCGATTC
qPCR_DSX2F qPCR_DSX2R	ACAAGAAGCTCCTGAAGTCG	GTGTCCAGATTGAGCGCTC
qPCR_DSX3F qPCR_DSX3R	GCTTTGGGCTCTTCACTTTC	CGCCTATAAGGTGTGTCTGT
qPCR_DSX4F qPCR_DSX4R	GGTTGGAAGCTGAGGGAAATG	GGGACAACGGCAACATAAAG

Fuente: Elaboración propia

Los cebadores se diseñaron en base a horquillas homodímeros y heterodímeros. Los cuales requieren de valores mínimos requeridos para su buen funcionamiento. La mayoría de cebadores propuestos no

cumplían con los valores requeridos, por lo que se eligieron los cuatro sets (Cuadro 29) que sus valores estuvieran dentro o lo más cercanos al rango aceptado, los detalles de cada set de cebadores se muestran en el Cuadro 30.

Cuadro 30. Características de los cebadores diseñados para la amplificación de *Dsx*

Pareja		Número de bases	Tamaño amplicón	%GC	Tm (°C)	Tm (°C) Manual	ΔG Horquillas (rango ΔG Kcal/mol)	ΔG Homodímeros (rango ΔG Kcal/mol)	ΔG Heterodímeros (rango ΔG Kcal/mol)
1	F	20	213	50	53.2	60	-2.6	-6.34	-1.57
	R	20		50	60.5	60	0.54	-3.14	-1.47
2	F	20	208	50	54.6	60	0.32	-3.61	-1.57
	R	19		57.9	62.5	60	0.07	-1.57	-1.57
3	F	20	95	50	54.3	60	-0.66	-3.14	-3.17
	R	20		50	54.3	60	-0.86	-4.67	
4	F	20	230	50	53.6	60	-0.04	-1.94	-1.94
	R	20		50	54.3	60	1.53	-0.96	

Fuente: Elaboración propia

Los cuadros 29 y 30 se observa que los cebadores diseñados cumplen con el tamaño del cebador y el amplicon, Tm y %GC requerido, esto asegura el correcto funcionamiento del análisis por qPCR (UC Davis, 2016). Los cebadores sintetizados fueron la pareja 1 y 2 (la información completa de sus características se encuentra en la sección de anexos), de las cuales se utilizó la 1, de esta pareja no fue posible utilizar el cebador reverse debido a un error al colocar la secuencia en su síntesis por lo que se utilizó un cebador reverse sintetizado con anterioridad.

2. Extracción de ARN de diferentes estadios de *Anopheles albimanus*. Se realizaron extracciones de ARN de siete estadios de *An. albimanus* (L3, L4 temprano, L4 tardío, pupa hembra, pupa macho, adulto hembra y adulto macho) de tres réplicas biológicas. Los datos del cuadro 6 indican una extracción de ARN bastante exitosa, al cumplir con las concentraciones por encima del mínimo requerido (120 ng/ μ L).

Cuadro 31. Concentraciones obtenidas por estadio en cada réplica biológica

Réplica	Estadio	A260/280	A260/230	Concentración ARN (ng/μL)	μL agregados para 1 μg
1	L3	2.16	1.29	450.4	2.22
	L4 temprano	2.15	2.10	296.4	3.37
	L4 tardío	2.11	2.00	134.9	7.41
	Pupa hembra	2.19	2.50	253.67	3.94
	Pupa macho	2.20	2.21	223.87	4.47
	Adulto hembra	2.17	2.35	593.10	1.69
	Adulto macho	2.10	1.86	144.23	6.93
2	L3	2.14	2.06	210.7	4.75
	L4 temprano	2.13	2.29	264.57	3.77
	L4 tardío	2.15	2.29	373.9	2.67
	Pupa hembra	2.19	1.89	186.6	5.35
	Pupa macho	2.19	1.89	157.1	6.36
	Adulto hembra	2.11	1.73	286.2	3.49
	Adulto macho	2.21	2.44	368.27	2.72
3	L3	2.13	2.25	261.80	3.82
	L4 temprano	2.06	2.37	208.67	4.79
	L4 tardío	2.01	1.18	299.23	3.34
	Pupa hembra	2.10	1.91	148	6.75
	Pupa macho	2.19	2.20	186.60	5.36
	Adulto hembra	2.24	2.20	447.33	2.24
	Adulto macho	2.19	1.57	218	4.59

Fuente:Elaboración propia.

Las mediciones del ratio de ARN A260/A280 se encuentran dentro del rango aceptado para ARN puro (2.0 ± 0.1) a excepción de Pupa macho R1, adulto macho R2 y adulto hembra R3 que se encuentran por encima de dicho rango como se muestra en el Cuadro 31, lo que puede indicar fuentes de contaminación, (Farrell, 2010). A pesar que este valor está por encima del aceptado se decidió trabajar con ellos ya que solamente era una réplica de las tres requeridas se encontraba por debajo del valor y este no se separa extensamente del aceptado.

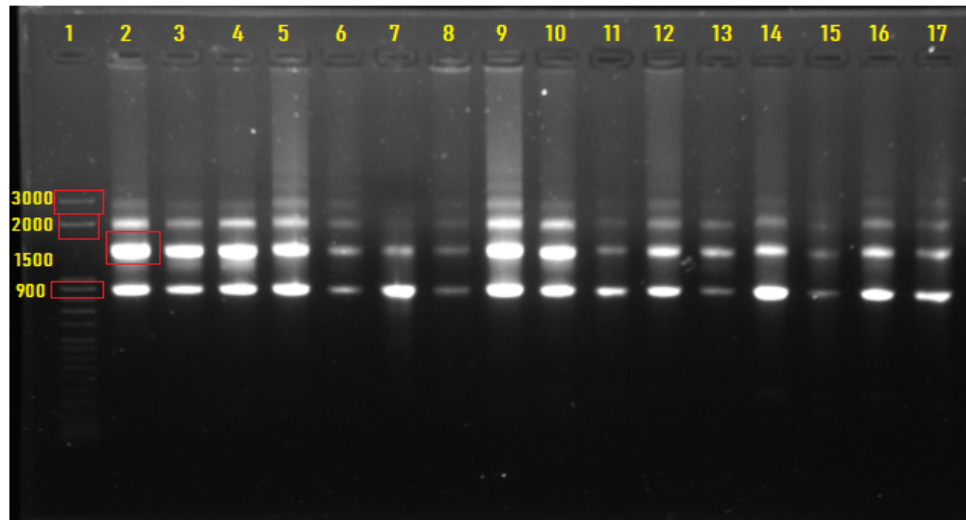
Para las mediciones de A260/A230 también se pueden observar que varias muestras se encuentran debajo del límite aceptable (2 -2.4). Según las indicaciones del fabricante del kit Isolation System Z3100 de Promega las lecturas de ARN a A260/A230 al utilizar el kit se encuentran en un rango de 1.8-2.2 (Promega, 2018). Los datos que se encuentren por debajo de este rango (L3 R1, adulto hembra R2 y adulto macho R3) puede indicar contaminación por guanidina (Farrel, 2010) esto pudo haber sido causado debido a que el kit utilizado para la extracción contiene tiocianato de guanidina y al no ser removido adecuadamente puede causar una lectura con contaminación (Promega, 2018). Por otro lado, se puede notar que existen variaciones en las concentraciones de la muestra incluso entre muestras del mismo estadio. Aunque ninguna se encuentre por debajo de la concentración requerida las diferencias son considerables, siendo las más notables: L4 tardío réplica 1, adulto macho réplica 1, pupa macho réplica 2 y pupa hembra réplica 3. Estas variaciones pueden ser causadas como se ha mencionado con anterioridad por contaminantes y se cree que podría ser ADN genómico el cual es común en este tipo de análisis.

Esta contaminación puede ser comprobada por medio de geles de integridad. En las figuras 53 y 54 se muestran los geles de agarosa resultantes de la electroforesis, en los cuales se puede observar un patrón de bandas característico del ARN biológicamente competente (Farrell, 201), estas bandas intensas corresponden a las subunidades de ARN ribosomal 28S (1500bp) y 18S (900bp) (Farrell, 2010). A pesar de que los geles muestren las dos bandas esperadas en todas las muestras, se puede apreciar una tercera banda arriba de la sub unidad 28S, esta es particular de la contaminación por ADN genómico, lo que indica que este podría ser el agente causal de las diferencias de concentraciones en los diferentes estadios y las discrepancias en los valores obtenidos de la medición del radio A260/280.

Cabe mencionar que los geles no presentan ningún tipo de barrido o difuminación de las bandas lo que indica que las muestras no están degradadas. Pero se puede observar que algunas bandas no se observan tan brillantes como otras, esto puede ser causado por una contaminación parcial, causada también por ADN. Las muestras con concentraciones más bajas coinciden con las bandas menos brillantes lo que indica que son las muestras menos puras.

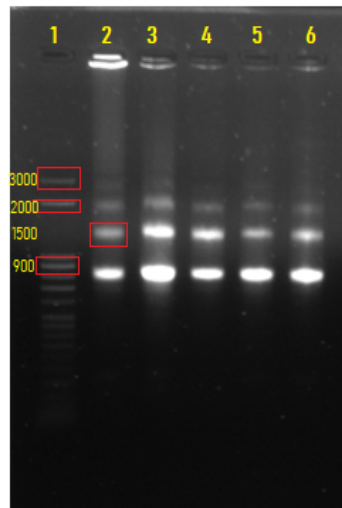
Ya que la integridad del ARN es crítica para la validación de datos de expresión génica (Sandoval, 2017). Todas las muestras fueron tratadas con DNAasa ya que la presencia de ADN tiene repercusiones directas del análisis de PCR debido que puede ser utilizado por los cebadores como plantilla (Farrell, 2010) Aunque en varias muestras no se vio perjudicada su concentración se observó la tercera banda en todas ellas la cual debe ser eliminada para asegurar una correcta síntesis de ADNc.

Figura 53. Gel de integridad de ARN para tres réplicas biológicas de diferentes estadios de *An. albimanus*. Integridad de ARN por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las muestras fueron cargadas de la siguiente manera: (1) Escalera de 50pb de Milipore Novagen (2) Estadio larval L3 réplica 1, (3) Estadio larval L3 réplica 2, (4) Estadio larval L3 réplica 3, (5) Estadio larval L4 temprano réplica 1, (6) Estadio larval L4 temprano réplica 2, (7) Estadio larval L4 temprano réplica 3, (8) Estadio larval L4 tardío réplica 1, (9) Estadio larval L4 tardío réplica 2, (10) Estadio larval L4 tardío réplica 3, (11) pupa hembra réplica 1, (12) pupa hembra réplica 2, (13) pupa hembra réplica 3, (14) pupa macho réplica 1, (15) pupa macho réplica 2, (16) pupa macho réplica 3, (17) adulto macho réplica 1.



Fuente: Elaboración propia

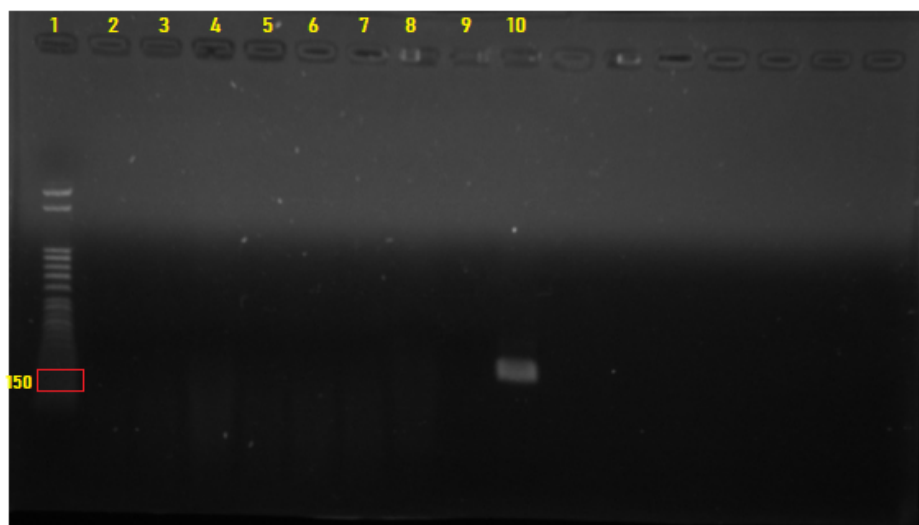
Figura 54. Gel de integridad de ARN para tres réplicas biológicas de diferentes estadios de *An. albimanus*. Integridad de ARN por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, se obtuvieron los tamaños de banda esperados. (1) Escalera de 50pb de Milipore Novagen (2) adulto macho réplica 1, (2) adulto macho réplica 2, (3) adulto macho réplica 3, (4) adulto hembra réplica 1, (5) adulto hembra réplica 2, (6) adulto hembra réplica 3



Fuente: Elaboración propia

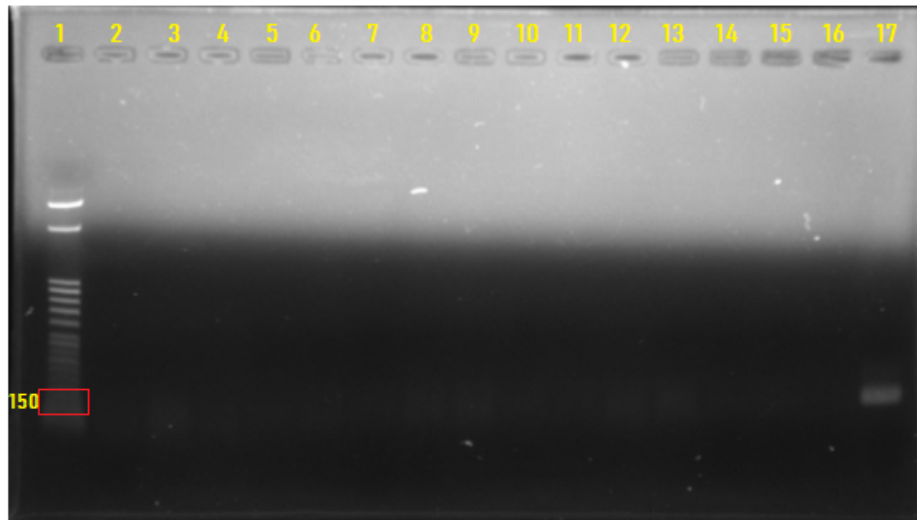
3. Tratamiento con DNAsa del ARN total extraído para la eliminación de ADN genómico. Ya que la integridad del ARN es crítica para la validación de datos de expresión génica (Sandoval, 2017). Todas las muestras fueron tratadas con DNAsa ya que la presencia de ADN tiene repercusiones directas del análisis de PCR debido que puede ser utilizado por los cebadores como plantilla (Farrell, 2010). Los resultados fueron los esperados ya que no se obtuvo ninguna banda amplificada en el gel con la excepción del control positivo como se muestra en las figuras 55 y 56. Esto nos indica que el tratamiento fue exitoso debido a que se eliminó todo rastro de ADN genómico.

Figura 55. Gel de tratamiento con DNAsa para réplica 1 de diferentes estadios de *An. albimanus*. Muestras después de tratamiento con DNAsa por electroforesis en gel de agarosa al 1%. (1). Escalera de 50pb de Milipore Novagen (2) Estado larval L3, (3) Estado larval L4 temprano, (4) Estado larval L4 tardío, (5) pupa hembra, (6) pupa macho, (7) adulto hembra, (8) adulto macho, (9) control negativo, (10) control positivo.



Fuente: Elaboración propia

Figura 56. Gel de tratamiento con DNAsa para réplica 2 y 3 de diferentes estadios de *An. Albimanus*. Muestras después de tratamiento con DNAsa por electroforesis en gel de agarosa al 1%. (1). Escalera de 50pb de Milipore Novagen (2) Estado larval L3 réplica 2, (3) Estado larval L3 réplica 3, (4) Estado larval L4 temprano réplica 2, (5) Estado larval L4 temprano réplica 3, (6) Estado larval L4 tardío réplica 4, (7) Estado larval L4 tardío réplica 5, (8) pupa hembra réplica 2, (9) pupa hembra réplica 3, (10) pupa macho réplica 2, (11) pupa macho réplica 3, (12) adulto hembra réplica 2, (13) adulto hembra réplica 3, (14) adulto macho réplica 2, (15) adulto macho réplica 3, (16) control negativo, (17) control positivo.

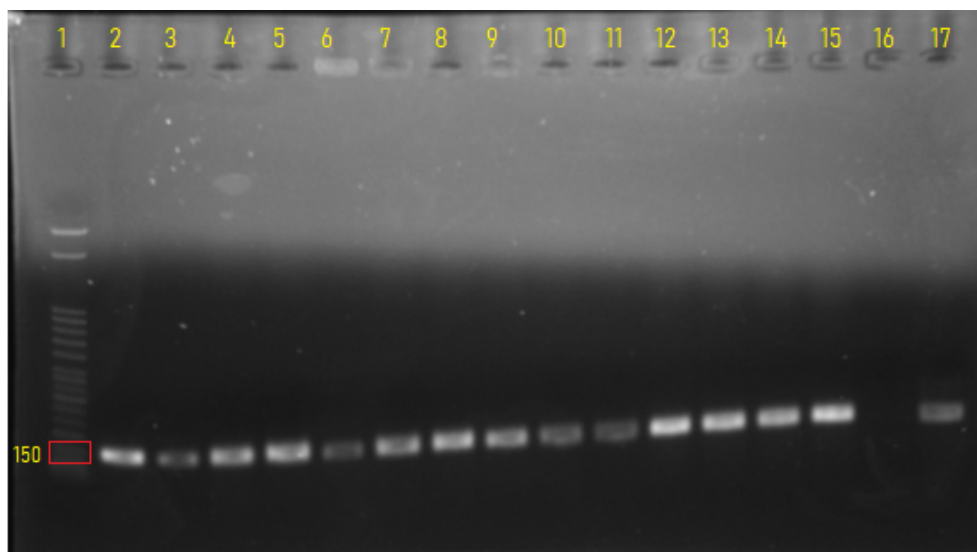


Fuente: Elaboración propia

4. Síntesis de ADNc de diferentes estadios de *An. Albimanus*. La síntesis de ADNc se llevó a cabo al amplificar ARN mediante RT-PCR. La calidad de la síntesis se verificó utilizando un gel de agarosa. El cual confirma que la síntesis se realizó con éxito al presentar una única banda (figura 57 y 58) de 150pb la cual es el tamaño esperado (Zhang, 2011).

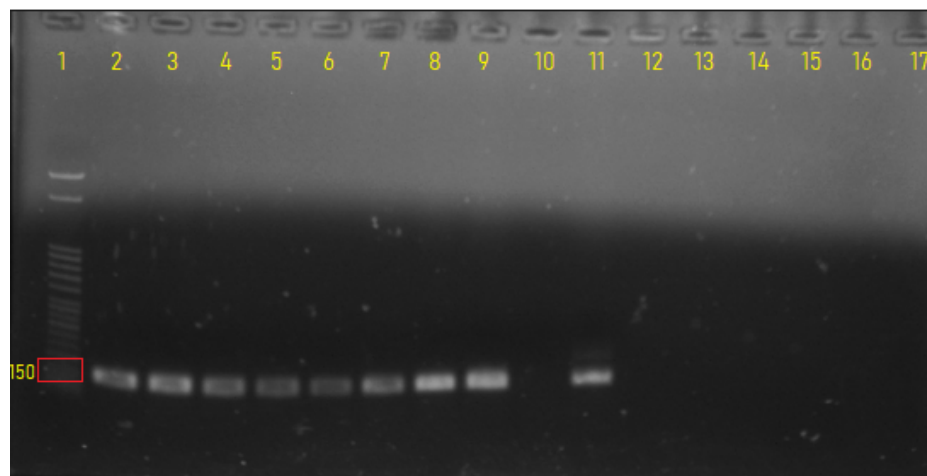
Para la síntesis de ADNc se utilizó una mezcla de cebadores *Oligo dt* que son específicos para las colas poli A por lo que son ideales para la clonación de ADNc de longitud completa y cebadores *Random* los cuales tienen la capacidad de unirse a cualquier tipo de ARN (Thermo Fisher, 2018). Esta mezcla es comúnmente utilizada en RT-PCR con el fin de explotar el beneficio de cada cebador

Figura 57. Gel de síntesis de ADNc a partir de muestras de ARN de diferentes estadios de *An. Albimanus*. Se muestra los productos de la síntesis de ADNc por PCR, analizados con electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las muestras analizadas fueron colocadas de la siguiente manera: (1) Escalera de 50pb de Milipore Novagen (2) Larva L3 réplica 1, (3) larva L3 réplica 2, (4) larva L4 temprano réplica 1, (5) larva L4 temprano réplica 2, (6) larva L4 temprano réplica 2, (7) Larva L4 tardío réplica 1, (8) larva L4 tardío réplica 2, (9) larva L4 tardío réplica 2, (10) larva L4 tardío réplica 3, (11) Pupa hembra réplica 1, (12) pupa hembra réplica 2, (13) pupa hembra réplica 3, (14) pupa macho réplica 1, (15) pupa macho réplica 2, (16) control positivo, (17) control negativo.



Fuente: Elaboración propia

Figura 58. Gel de síntesis de ADNc a partir de muestras de ARN de diferentes estadios de *An. albimanus*. Se muestra los productos de la síntesis de ADNc por PCR, analizados con electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las muestras analizadas fueron colocadas de la siguiente manera: (1) Escalera de 50pb de Milipore Novagen (2) pupa macho réplica 1, (3) adulto hembra réplica 1, (4) adulto hembra réplica 2, (5) adulto hembra réplica 3, (6) adulto macho réplica 1, (7) adulto macho réplica 2, (8) adulto macho réplica 3, (9) NA, (10) control negativo, (11) control 11.



Fuente: Elaboración propia

C. Evaluar la eficiencia de los cebadores para evaluar la expresión genética por medio de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

La reacción en cadena de la polimerasa es un ensayo establecido para cuantificación de ácidos nucleicos, por lo que el cálculo de la eficiencia de la amplificación es crucial y una de las primeras cosas que debe llevarse a cabo antes de un ensayo de qPCR (Svec *et al*, 2015).

La forma en que se realiza es hacer diluciones seriadas del ADNc, de los cuales se obtienen valores Ct por medio de qPCR, estos se grafican en una escala logarítmica y luego se hace una regresión lineal de estos datos. A los cuales se les calcula la eficiencia utilizando su pendiente (Svec *et al*, 2015).

La eficiencia obtenida para el cebador *Dsx* a 0.33uM a una concentración mínima de 1:500 se encuentra dentro del rango aceptable (90%-100%) con 100.94%, por lo que lo hace idóneo para el análisis de expresión relativa. Ya que al tener una eficiencia cercana a 100% indica que el número de moléculas diana se están duplicando en cada ciclo (Schneider *et al*, 2012).

5. Determinación del perfil de expresión relativa del gen *Doublesex* y *Transformer*-

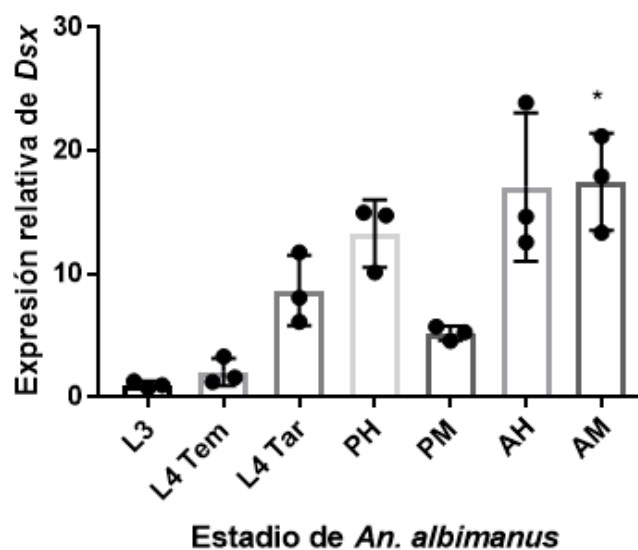
2. A pesar de que se conozca que la expresión del sexo está definida por una cascada conformada por varios genes, en la cual *Doublesex* es el último gen y el responsable de la diferenciación sexual. Dicha cascada se encuentra esclarecida para *Drosophila melanogaster* y algunos dípteros, pero en los mosquitos del género *Anopheles* el único elemento descrito de la cascada es *Doublesex* (Krzywinska *et al*, 2016). El gen se encuentra presente en *Anopheles gambiae* desde estadios muy tempranos, la isoforma femenina del gen se deposita vía materna, pero en embriones machos esta es degradada aproximadamente cuatro horas después de la ovipostura (Krzywinska *et al*, 2016). Por lo que su expresión puede ser detectada desde muy temprano en el desarrollo del mosquito.

La media de expresión relativa del gen *Doublesex* en los diferentes estadios de *Anopheles albimanus* se muestra en la figura 59 donde únicamente adulto macho mostró diferencia estadísticamente significativa con el control (L3). Los demás estadios no presentan diferencia estadísticamente significativa, lo que significa que posiblemente las expresiones relativas de estos sean similares al control. En un estudio de expresión en *Aedes aegypti* realizado por Slvemini *et al*, 2011 se demostró que *Dsx* se encuentra presente desde etapas muy tempranas del desarrollo, pero la regulación de la especificidad del sexo comienza en las etapas larvales tardías. Lo que explicaría el fenómeno observado en la figura 59 donde a pesar de que no sean estadísticamente significativas, existe una expresión mayor del gen en los estadios tardíos (adultos, pupa hembra y L4 tardío).

Para la evaluación de la expresión relativa de *Doublesex* en diferentes estadios se utilizaron los genes de referencia RPL49 y RPS4 ya que el uso de múltiples genes de referencia es un método bien aceptado para la normalización de datos de qPCR (Kozera *et al*, 2013). RPL49 ha sido un gen de referencia que ha

demostrado una alta estabilidad en la evaluación de diferentes etapas de desarrollo de *Cochliomyia hominivorax* Coquerel, *C. macellaria* Fabricius y *C. albiceps* (Wang *et al*, 2015). El gen RPS4 se encuentra altamente expresado en diferentes géneros y muestra una gran estabilidad para análisis de expresión (Infante *et al*, 2008) por lo que lo hace de gran utilidad para la normalización de datos cuando se utilizan cantidades diminutas de tejido (Koči *et al*, 2013). Debido a estas cualidades ambos genes fueron idóneos para llevar a cabo el análisis de expresión relativa de *Doublesex* en diferentes estadios.

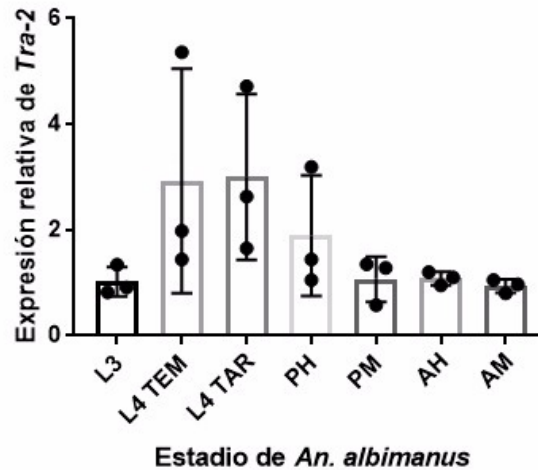
Figura 59. Expresión relativa del gen *Doublesex* con respecto a los genes de referencia RPL49 y RPS4 en diferentes estadios de *An. albimanus*. Se muestra la expresión relativa de los diferentes estadios de *An. albimanus*, donde L3 se refiere estadio larval 3, L4 Tem a estadio larval 4 temprano, L4 Tar a estadio larval 4 tardío, PH a pupa hembra, PM a pupa macho, AH a adulto hembra y AM a adulto macho. * ($P > 0.05$). Cada estadio consta de tres réplicas biológicas, las cuales están representadas por puntos en la gráfica.



Fuente: Elaboración propia

Cabe mencionar que los estudios de expresión relativa del gen *Doublesex* son en otras especies por lo que no se encuentra con algún tipo de información de expresión relativa de *Dsx* de *An. albimanus*. A pesar de que los estudios existentes sean en miembros de la misma familia, estos difieren de gran manera este fenómeno se observó al momento de alinear las secuencias de los genes de *An. gambie* y *An. albimanus* en donde se observó que la región codificante del gen variaba en gran manera. Sin embargo, en un estudio realizado por Mysore *et al*, sugiere silenciar el gen en los estadios de larva ya que ellos observaron reducción en la expresión de gen en adultos luego del tratamiento con ARNi.

Figura 60. Expresión relativa del gen *Transformer-2* con respecto a los genes de referencia *PRL49* y *RPS4*. Se muestran los 7 estadios evaluados. L3: estadio larval L3, L4 TEM: estadio larval L4 temprano, L4 TAR: estadio larval L4 tardío, PH: pupa hembra, PM: pupa macho, AH: adulto hembra, AM: adulto macho. Las barras de error indican la desviación estándar para tres réplicas biológicas.



Fuente: Elaboración propia

En anexos, se muestra el análisis de expresión del gen *Transformer-2* comparado con los genes de referencia *RPL49* y *RPS4*. Se puede observar que la expresión del gen no es homogénea en las tres réplicas biológicas realizadas en los estadios L4 temprano, L4 tardío y pupa hembra, por lo tanto, la desviación estándar entre réplicas es elevada (Figura 60). Sin embargo, esta desviación elevada no se observa en los estadios L3, pupa macho, adulto hembra y adulto macho. Esto puede deberse diversos factores, al principio se pensaba que una de las principales causas de la variabilidad entre réplicas se debía a los cebadores utilizados para realizar el análisis de expresión, el set TRA2C. Porque, cuando se diseñaron los primeros sets de cebadores se identificó que los diseños realizados no contaban con buenas características para ser denominados como buenos cebadores. Sin embargo, a partir de ellos se eligieron los que, comparado entre todos los diseños, fueran los mejores. Esto es debido a que la energía libre de Gibbs (ΔG) para heterodímeros y homodímeros era muy negativa (<-5.0) y para realizar análisis en PCR en tiempo real se recomienda que sea lo más positiva posible (>-3.0) para evitar posibles estructuras secundarias del amplificado (UPV 2012). También es recomendable que los últimos 5 nucleótidos del extremo 3' no deberían tener más de 2 G's y/o C's para evitar la formación de dímeros de cebadores, y este es un requisito que tampoco cumple este set de cebadores. A pesar de estas condiciones mostradas por los cebadores diseñados se decidió realizar el análisis debido a que fue el set de cebadores que presentó mejores características y el set que se logró optimizar para que la eficiencia fuera de 104.50%, que se encuentra dentro del rango aceptable de 90% y 110%.

Sin embargo, a pesar de las condiciones del cebador seleccionado para realizar el análisis de expresión se puede decir que este sí funcionó correctamente y que las desviaciones estándar elevadas no son debido a éste. Se observó en la figura 60 que *Transformer-2* se encuentra más expresado en los estadios larvarios 4 temprano (L4 TEM), 4 tardío (L4 TAR) y pupa hembra (PH), que corresponde a los estadios que presentan alta variabilidad entre réplicas. Este resultado parece tener sentido debido a que la diferenciación sexual morfológica se logra observar hasta pupas, ya que en estadios larvarios antes de pupa (estadios larvarios 1, 2, 3 y 4) no es posible determinar la sexualidad de las larvas morfológicamente. Por lo que se puede inferir que, genéticamente, la cascada de diferenciación sexual puede empezar en el estadio larvario 4 temprano, aunque no se observe morfológicamente puede ser que genéticamente si empieza a suceder la diferenciación sexual en ese punto del ciclo de vida de *A. albimanus*. Entonces, esta puede ser la razón de porqué se observa tanta variabilidad entre réplicas en estos tres estadios porque genéticamente las larvas se empiezan a diferenciar y no hay manera de que morfológicamente se puedan identificar, por lo tanto, al tomar la población para realizar la extracción de ARN puede que a pesar de que sea una toma aleatoria se estuviese seleccionando más larvas hembras o machos.

Además, el que *Transformer-2* esté más expresado en pupas hembras que en pupas machos puede significar que este esté relacionado con la diferenciación sexual en hembras. Debido a que en *D. melanogaster* se ha evidenciado que *Transformer-2* junto con *Transformer* hacen que se genere un splicing para finalizar con la diferenciación sexual en hembras (Yamamoto 2016), por lo que en *A. albimanus* puede estar sucediendo algo similar.

En estadios adultos se ve poca diferencia en cuanto a la expresión de *Tra-2*, se nota ligeramente que se expresa más en hembras que en machos, pero está menos expresado en comparación que en estadio larvario 4 temprano. Esto puede significar que *Tra-2* se expresa solamente cuando se empieza a dar la diferenciación sexual y cuando llegan a su etapa adulta el gen ya no se expresa tanto porque genéticamente los mosquitos ya están diferenciados en hembras y machos.

Debido a que visualmente se puede observar diferencia en la expresión de *Tra-2* a lo largo de los diferentes estadios de *A. albimanus* se realizó un el análisis estadístico, para determinar si existía diferencia significativa en la expresión de los genes. El análisis estadístico que se tenía contemplado era ANOVA de una vía. Sin embargo, no se cumplieron con los supuestos del ANOVA en cuanto a normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia. Por lo que se realizó un análisis estadístico no paramétrico, Kruskal Wallis que es el análogo al ANOVA, pero en pruebas no paramétricas. Se obtuvo que la expresión de *Transformer-2* es diferente estadísticamente ($\alpha=0.05$) en al menos uno de los estadios evaluados de *A. albimanus*. Sin embargo, al realizar las pruebas post hoc para determinar en qué estadios era diferente la expresión no se encontró evidencia de que la expresión en los estadios fuera diferente, por lo que se concluyó que no existe diferencia estadísticamente significativa en los diferentes estadios evaluados de *A. albimanus*, a pesar de que en el primer análisis estadístico se obtuvo que sí había.

Por lo tanto, se recomienda realizar el análisis del perfil de expresión en *Transformer-2*, para obtener mejores resultados, utilizando otros cebadores, los cuales deben ser diseñados y optimizados para PCR en tiempo real. Además, debido a que se pudo observar al realizar la optimización del *Tra-2* que el rango dinámico de *Tra-2* es bajo (se expresa poco) porque solo se pudo obtener amplificación en una dilución de 1:500 y en 1:1000 ya no se lograba amplificar nada, es recomendable también probar realizar el análisis utilizando sondas TaqMan las cuales son más sensibles.

Por otro lado, a pesar de que no se obtuvieron resultados que puedan ser validados estadísticamente este gen puede resultar muy prometedor si se utiliza como gen blanco para ser utilizado para silenciamiento de genes utilizando el método de ARN de interferencia (ARNi). Porque se ha encontrado evidencia de que la interrupción de este gen en estadios tempranos de otras especies conduce a una disminución en la proporción de machos y hembras. En un estudio realizado por Hoang *et al* en 2016 se inyectó embriones de *Drosophila*, *Ceratitis* y *Anastrepha* spp. con ARN de doble hebra (dsRNA) sintético de *Tra-2*, se logró determinar que esto causaba degradación del ARNm de *Tra-2* y el resultado era la conversión de hembras en pseudomachos. Además, también encontraron que al interrumpir la expresión de *Tra-2* se provocaba un sesgo en la proporción de la progenie, ya que hubo mayor proporción de una progenie masculina.

Con base a lo anterior, se puede reforzar la hipótesis de que utilizar ARNi con *Tra-2* en estadios tempranos del ciclo de vida de *A. albimanus* podría distorsionar el sexo de la progenie.

E. Identificación de un gen presuntivo de actina con expresión específica en hembras de *Anopheles albimanus* y evaluación del perfil de expresión del gen

1. Diseño de cebadores. Se diseñaron cebadores a partir de los extremos 3' de regiones codificantes altamente conservadas en genes de actina pertenecientes a *Ae. aegypti* (AY531222) y *An. gambiae* (XM_315270). No fue posible utilizar la única secuencia de ARNm de actina de *An. albimanus* (GQ981444) debido a que se buscaba tener cebadores que se unieran lo más cercano posible a la 3'-UTR, y no se cuenta con una secuencia lo suficientemente larga de *An. albimanus* para cumplir con este requisito. Sin embargo, se pudo suponer que los cebadores también se unirían con el gen de interés porque la región codificante con la que se cuenta era completamente conservada en las tres especies (Anexos). Se eligió el cebador *upstream* (magenta en la figura 61) para tener mejores probabilidades de aislar toda la región 3'-UTR.

Figura 61. Sitio de unión del cebador upstream diseñado

```

GQ981444.1 -----
XM_315270.4 -----
AY531222. -----
CACAAATCGGAT TTTGACGCTCGCTCTGGTACAGTTGATA CGGTCTAGTGAAC CGAGGA

GQ981444.1 -----
XM_315270.4 -----
AY531222. -----
TAACGACGAAGGTTTTTC CCCATTGATCCAGGA CTTAACG GACCTTG AAGCGGC GCCAAA

GQ981444.1 -----
XM_315270.4 -----
AY531222. -----
ATGTGTGATGATGATGCGGGAGCAC TAGTCATC GACCAATG GATCCGG AATGTGC AAGGCC
ATGTGTGACGATGATGCTGGAGCAC TAGTCATT GACCAACG GATCCGG CATGTGT AAGGCC

GQ981444.1 -----
XM_315270.4 -----
AY531222. -----
GGATTCGCTGGCGATGACGCACCCAGTGTGCTTCCCGTCCATTGTGGCCGTCACGCG
GGTTTCGCTGGTGATGATGCCCCAGTGTGCTTCCCGTCCATTGTGGCCGCTCCTCGC

GQ981444.1 -----
XM_315270.4 -----
AY531222. -----
CACCAGGGTG-----
CACCAGGGTGTGATGGTGGTATGGGTCAAAAA GATGCTACGTGGTGATGAA GCCCAA

GQ981444.1 -----
XM_315270.4 -----
AY531222. -----
-----GGTATCCTCACCCCTGAAGTACCCGATCGAGCACGGTATCATCACC AACTGG
-----TGA TGTACCCGATCGAGCACGGTATCATCACC AACTGG
TCGAGCGAGGTATCCTCACCCCTGA AATATCCC ATAGAGCACGGTATCATCACC AACTGG
*** ** * * * * *

GQ981444.1 -----
XM_315270.4 -----
AY531222. -----
GATGATATGGA GAAGATCTGGCACCACACGTTCTACAATGAGCTGCGCGTCCGCGGAG
GATGATATGGA GAAGATCTGGCACCACACGTTCTACAATGAGCTGCGCGTCCGCGGAG
GATGATATGGA GAAGATTGGCACCACACGTTCTACAACGAGTTGCGAGTAGCTCTGGAA
***** ** * * * * *

GQ981444.1 -----
XM_315270.4 -----
AY531222. -----
GAACACCCAGTCTGCTGACAGAGGCCCGCTCAACCCGAGAGGCTAA CCGTGAG AAGATG
GAACATCCGGTCTGCTGACAGAGGCCCGCTCAACCCGAGAGGCTAA CCGTGAG AAGATG
GAACATCCAGTATTGCTGACTGAGGCTCCCTTGAATCCAAAGTCCAA TCCGAG AAGATG
***** ** * * * * *

GQ981444.1 -----
XM_315270.4 -----
AY531222. -----
ACGCAGATCATGTTGAAACGTTCAACTCGCCGCCATGTACGTGCGCATCCAGGCCGTC
ACCCAGATCATGTTGAAACGTTCAACTCGCCGCCATGTACGTGCGCATCCAGGCCGTC
ACTCAGATCATGTTGAAACGTTCAACTCGCCGCCATGTACGTGCGCATCCAA GCTGTT
** * * * * *

GQ981444.1 -----
XM_315270.4 -----
AY531222. -----
CTGTGCTGTA CGTCTCCGGTCGTA CCAACCGGTATGCTGCTGGACTCGCAGATGGTGTG
CTGTGCTGTA CGTCTCCGGTCGTA CCAACCGGTATGCTGCTGGACTCGCAGATGGTGTG
CTGTGCTGTA CGTCTCCGGTCGTA CCAACCGGTATGCTGCTGGACTCGCAGATGGTGTG
**** * * * * *

GQ981444.1 -----
XM_315270.4 -----
AY531222. -----
TCCCACACCGTCCCAATCTACGAAGGTTATGCTCTGCCCTCGCCATCCTCCGTCTGGAT
TCCCACACCGTCCCAATCTACGAAGGTTATGCTCTGCCCTCGCCATCCTCCGTCTGGAT
TCCCACACCGTCCCAATCTACGAAGGTTATGCTCTGCCCTCGCCATCCTCCGTCTGGAT
***** ** * * * * *

GQ981444.1 -----
XM_315270.4 -----
AY531222. -----
CTGGCCGGTCCGATCTGACCGACTACCTGATGAAGATCTTGACCGAGCGCGGCTACTCT
CTGGCCGGTCCGATCTGACCGACTACCTGATGAAGATCTTGACCGAGCGCGGCTACTCT
TTGGCTGGTCCGATCTGACCGACTACCTGATGAAGATCTTGACCGAGCGCGGCTACTCT
**** * * * * *

GQ981444.1 -----
XM_315270.4 -----
AY531222. -----
TTCA CCAACCACGGCCGAGCGTGAATCGCGCGT GACATCAAGGAGAA GCTGTGCTACGTC
TTCA CCAACCACGGCCGAGCGTGAATCGCGCGT GACATCAAGGAGAA GCTGTGCTACGTC
TTCA CCAACCACGGCCGAGCGTGAATCGCGCGT GACATCAAGGAGAA GCTGTGCTACGTC
***** ** * * * * *

GQ981444.1 -----
XM_315270.4 -----
AY531222. -----
GCTCTGGACTT CGAGCAGGAGATGGCCACCGCCGCGGCTCGACTCCTGGAG AAGTCCG
GCTCTGGACTT CGAGCAGGAGATGGCCACCGCCGCGGCTCGACTCCTGGAG AAGTCCG
GCTCTGGACTT CGAGCAGGAGATGGCCACCGCCGCGGCTCGACTCCTGGAG AAGTCCG
***** ** * * * * *

```

Continúa figura 61...

Continuación figura 64:

```

GQ981444.1      TACGAGCTGCCCGACGGACAGGTCA TCACCATC GGCACGAGCGTTT CCGCTGC CCGAG
XM_315270.4    TACGAGCTGCCCGACGGACAGGTCA TCACCATC GGTACCGAGCGCTT CCGTGCA CCGGAG
AY531222.      TATGAACCTCC CGATGGC CAAGTCA TCACAATC GGCACGAAACGTTT CCGTGT CCGAA
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
GQ981444.1      GTCCCTGTTCCA GCCATCG TTCCCTGG GTATGGAA TCGTGCG CTATCCA CGA-----
XM_315270.4    GCTCTGTTCCA GCCGTG TTCCCTGG GCATGGAA TCGACCG GTATCCA TGAGACT GTCTAC
AY531222.      GCCCTTTTCCA GCCATCC TTCCCTGG GAATGGAA TCAACTG GCATTCA TGAACG GTCTAC
* ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * ** ** **
GQ981444.1      -----
XM_315270.4    AATT CCATCAT GCGCTGT GATGTGG ACATCCGT AAGGATC TGTACGC TAACAGT GTCCTG
AY531222.      AACT CGATCAT GCGTTGC GATGTGC ACATCCGC AAGGATC TCTATGC TAACAGC GTCTTG
GQ981444.1      -----
XM_315270.4    TCCG GTGTTAC CACCATG TACCCGG GTATTGCC GATCGTA TGCAGAA GGAATTT ACCTCG
AY531222.      TCTG GTGTTAC CACCATG TACCCAG GTATTGCT GATCGTA TGCAGAA GGAATTC ACTTCC
GQ981444.1      -----
XM_315270.4    CTAG CCCCATC GAGCATCAAGATCAAGATCATT GCGCCGC CGGAGCGTAAGTACTCCGTC
AY531222.      CTGG CTCCATC CACATCAAGATCAAGATCATT GCCCCAC CGGAAACGTAATAC TCCGTC
GQ981444.1      -----
XM_315270.4    TGGATCGGTGG ATCCATC CTGGCCT CGCTGTCC ACCTTCC AGTGGAT GTGGATC TCGAAG
AY531222.      TGGATCGGTGG ATCCATC CTGGCCT CGCTGTCT ACCTTCC AAGCTAT GTGGATC TCCAAG
GQ981444.1      -----
XM_315270.4    CACGAGTACGA TGAGGGT GGCCCGAG GAATGTC CACCGCAAGTGCTT CTA-----
AY531222.2    CAGGAATAOGA OGAAGGT GGCCCGAG GAATTGTC CACCGCAAGTGCTT CTAAGCC GATCCC
GQ981444.1      -----
XM_315270.4    GATT GTACTGA TTACCAT AAGCGAC ATTGCCAG TGAAGC GACAACA GCAGCAT CAAAGT
AY531222.      -----
GQ981444.1      -----
XM_315270.4    ACAT TTGTGAT ACTGATT CCGCTAC TAACACCA TCCGGAA TCAGCTT GCATCGA ACATCA
AY531222.      -----
GQ981444.1      -----
XM_315270.4    AATCACGTTAT TCAATGT ATCTGTC ATCCAGCT CAGACAA GTCCGAG CTTTCC AGTCGC
AY531222.      -----
GQ981444.1      -----
XM_315270.4    GAAAATCTGCGACTCCAG CGGAAAG CACCGAAC CACGAGAGGACTC GTATGAA AGCCAG
AY531222.      -----

```

*Todos los alineamientos fueron realizados en MUSCLE 2018. GQ981444.1 (*An. albimanus*), XM_315270.4 (*An. gambiae*), AY531222 (*Ae. aegypti*)

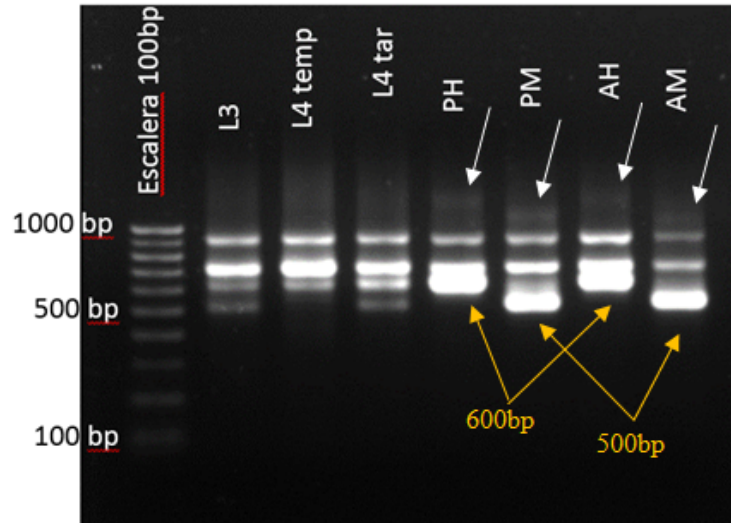
En el Cuadro 32 continuación se muestran las características de los cebadores diseñados. Se buscó que cumplieran con tener la menor capacidad de formar horquillas, homodímeros y heterodímeros, y su temperatura de anillamiento se encontrara entre 50 y 60°C.

Cuadro 32. Características de cebadores diseñados a partir de regiones conservadas de *actina*

Característica	Primer Upstream	Primer Downstream
Secuencia 5'-3'	CSATCAAGATCAAGATCATTGCC	CGTAARTACTCCGTCTGGATCG
Número de bases	22	22
Tm	66°C	68°C
%GC	43.5%	54.5%
Tamaño de amplicón	---	---
Delta G Hairpins	-1.38 kcal/mol	-0.81 kcal/mol
Delta G Homodimers	-6.76 kcal/mol	-6.84 kcal/mol
Delta G Heterodimers	-6.21 kcal/mol	-6.84 kcal/mol
Complementariedad en 3'	Sí, 3	Sí, 3

2. Amplificación de todas las 3'-UTR presentes en diferentes estadios de *An. Albimanus*. La amplificación de los 3'uTRs se realizó utilizando la técnica del 3'RACE utilizando un cebador que se une a la cola poli AAA del ARNm y que además contiene una región adaptadora que se utiliza para la unión de un segundo cebador. Los resultados mostraron dos bandas de alrededor 700 pbs y 900 pbs correspondientes a dos 3'-UTR, que se expresaban en todos los estadios y en ambos sexos. Además, se obtuvieron dos 3'-UTR que parecen pertenecer a genes de actina cuya expresión es sexo-específica (Figura 62). La diferencia en expresión se observa en pupas y adultos, ya que ambas se expresan en L3 y L4 tardío. En hembras se observa una banda con un peso molecular de 634-657 bp, mientras que en machos se observa una con un peso molecular de 520-570 bp (Cuadro 33). También se identificaron dos bandas con presencia generalizada en todos los estadios y sexos, junto con dos bandas que parecen ser sexo-específicas y únicas en pupas y adultos (Figura 62, Cuadro 33). Los resultados parecen concordar con lo establecido en estudios anteriores, que cada isoforma de actina tiene una región 3'-UTR distinta a las otras (Muñoz *et al.*, 2004). Las bandas mayores a 1000 bp concuerdan con la expresión sexo y estadio-específica que se observó en el mismo estudio, mientras que las de 500 bp y 600 bp concuerdan con lo descrito en un estudio realizado en *An. stephensi* (Marinotti *et al.* 2013), en el que se observó la expresión de una actina en larvas L4 y en pupas hembra.

Figura 62. Amplificación de 3'-UTR de genes de actina de *Anopheles albimanus* usando 3'RACE: Muestras corridas en gel de agarosa 1% a 50V por 90 min. Nótese que dos 3'-UTRs están presentes en todos los estadios y en ambos sexos, mientras que se observan dos bandas que son mutuamente excluyentes en cada sexo de pupas y adultos (flechas amarillas). Ambas bandas están presentes en L3 y L4 tardío, a diferencia de L4 temprano, en el que se observa únicamente la banda de tamaño cercano a 600 bp. También se observan dos bandas de tamaño mayor a 1000 bp que sólo se observan en pupas y adultos y que parecen ser sexo-específicas (flechas blancas). No pudo calcularse el tamaño exacto de estas debido a que se encontraban fuera de la escalera. L3 (estadio larval 3), L4 (estadio larval 4), PH (pupa hembra), PM (pupa macho), AH (adulto hembra), AM (adulto macho). Todos los ARN amplificados se agregaron a una concentración de 1 µg por reacción.



Fuente: Elaboración propia

Cuadro 33. Tamaños de bandas obtenidas en cada estadio por amplificación con 3'RACE: Se muestran resaltadas las bandas que parecen ser sexo-específicas. L3: estadio larval 3, L4: estadio larval 4, PH: pupa hembra, PM: pupa macho, AH: adulto hembra, AM: adulto macho.

Estadio	Peso (pb)
L3	921
L3	730
L3	634
L3	520
L4 temprano	921
L4 temprano	741
L4 temprano	634
L4 tardío	921
L4 tardío	741
L4 tardío	646

Continúa cuadro 33...

Continuación cuadro 33:

Estadio	Peso (pb)
L4 tardío	539
PH	921
PH	730
PH	657
PM	921
PM	741
PM	550
AH	937
AH	741
AH	669
AM	953
AM	755
AM	570

**Datos obtenidos con Gel Analyzer 2010*

Los resultados anteriores parecen mostrar dos genes de actina con expresión específica en uno de los sexos en pupas y en adultos, sin embargo, no puede determinarse con certeza que esto sea cierto en los estadios larvales estudiados, ya que ambos genes se ven presentes. Las larvas no pueden ser sexadas con exactitud en la metodología utilizada, por lo que en cada muestra se encontraba una cantidad indefinida de hembras y machos. Se calcularon los volúmenes de cada banda tanto en larvas como en pupas y adultos (Cuadro 34) utilizando Gel Analyzer para tener una mejor aproximación semi cuantitativa de los niveles de expresión de las bandas de interés de 500 y 600pb. Una comparación por ANOVA demostró que existía una diferencia significativa entre los volúmenes calculados en pupas y adultos y en los calculados en larvas (Cuadro 35). Esto permite suponer que la presencia de ambas bandas en larvas se debe a que las muestras contienen especímenes de ambos sexos, por lo que aún es posible que estos sean genes sexo-específicos.

Cuadro 34. Comparación de volúmenes calculados de bandas con aparente sesgo por sexo según cada estadio. L3 (estadio larval 3), L4 (estadio larval 4), PH (pupa hembra), PM (pupa macho), AH (adulto macho), AM (adulto macho).

Estadio	Volumen	Peso molecular (pb)
L3	770	634
L3	485	520
L4 temprano	859	634
L4 tardío	1220	646
L4 tardío	566	539
PH	2381	657
PM	2913	550
AH	2290	669
AM	2422	570

*Datos obtenidos con Gel Analyzer 2010

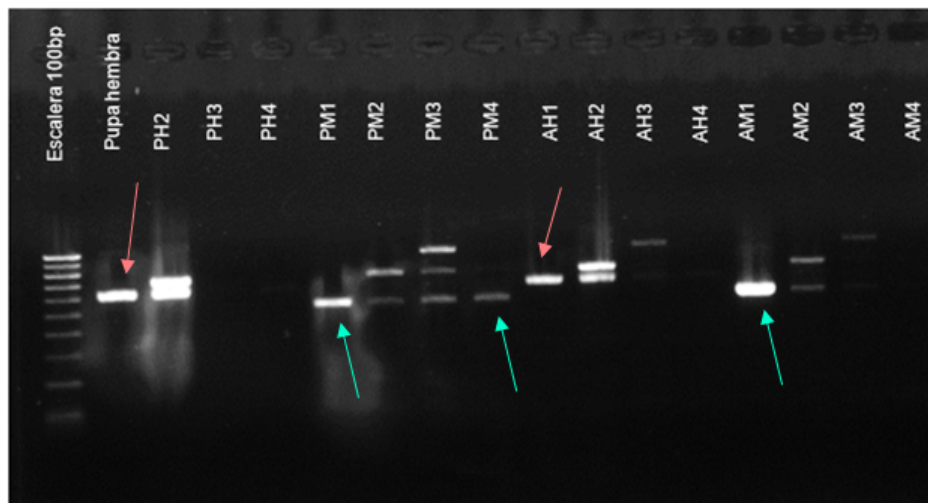
Cuadro 35. ANOVA para comparación de volúmenes calculados

Comparación	Diferencia	Bajo	Alto	p ajustado
larva-adulto	-1576	-2304.3412	-847.659	0.001372
pupa-adulto	291	-579.5342	1161.534	0.589165
pupa-larva	1867	1138.6588	2595.341	0.000548

*Los datos cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad requeridos para realizar una comparación por ANOVA (Anexos)

3. Aislamiento de bandas por corte de gel. Se buscaba aislar cada banda obtenida en la reacción 3'RACE cortándolas de un gel de agarosa. Se realizó PCR de los fragmentos obtenidos, utilizándose el cebador forward usado en RACE y el UAP. Al correr los productos de esta reacción en otro gel de agarosa 1% se observó que sólo se pudieron aislar las bandas de 600/500 bp en pupas y en adultos (Fig. 63). Las bandas mayores a 1000 bp, que eran las de mayor interés, no pudieron aislarse debido a que se encontraban en una concentración muy baja. Las bandas de que se lograron aislar se ligaron en el vector pGEM-T Easy y los plásmidos fueron transformados en la bacteria *E. coli* XL1-1 con la finalidad de amplificar el fragmento y poder obtener la secuencia completa de la región 3'UTR.

Figura 63. Gel de agarosa 1% con productos de PCR de aislamiento de bandas. El corte de gel permitió aislar las bandas de alrededor de 600 bp de pupas y adultos hembra (flechas rosa), además de las de alrededor de 500 bp de pupas y adultos machos (flechas celeste). L3 (estadio larval 3), L4 (estadio larval 4), PH (pupa hembra), PM (pupa macho), AH (adulto macho), AM (adulto macho).



Fuente: Elaboraci3n propia.

4. **Secuenciaci3n.** Se realiz3 la secuenciaci3n de los clones obtenidos luego de la transformaci3n en *E. coli* XL-1 blue con la finalidad de conocer la secuencia espec3fica de cada banda de inter3s. Dichas secuenciaciones se realizaron por el m3todo de Sanger en laboratorios del CCD, Atlanta.

Se obtuvieron secuenciaciones exitosas de las dos 3'-UTR de inter3s en pupas y adultos hembras y machos (Ver Anexos). Una cantidad relevante de clones que hab3an sido seleccionados produjeron secuenciaciones fallidas, posiblemente porque las muestras fueron accidentalmente tomadas de m3s de una colonia. Tambi3n pudo ocurrir que hubiera contaminaci3n con sales o ARN, o que el cebador de secuenciaci3n encontrara m3ltiples sitios de uni3n.

A continuaci3n, se muestran las secuencias conservadas que se obtuvieron a partir de alineamientos de clones de cada estadio y sexo. Se determin3 que las secuencias son lo suficientemente similares para decir que se trata de la misma isoforma de actina en pupas y adultos de cada sexo, mientras que se observ3 suficiente diferencia para determinar que las isoformas eran distintas en cada sexo. Cabe mencionar que, aunque se secuenciaron m3ltiples clones en ambos sentidos, no se pudo aislar ninguna 3'-UTR completa. Se tienen secuencias que contienen el cebador forward, pero no el reverse y viceversa. Esto se puede deber a que las secuenciaciones tuvieron baja definici3n de trazado, posiblemente por contaminaci3n e inespecificidad de los productos de PCR. En las secuencias consenso magenta indica la secuencia de un cebador, celeste indica regi3n codificante conservada y amarillo indica probable regi3n 3'-UTR.

Figura 64. Alineamiento de secuencias obtenidas de adultos hembra

```

FA3R      CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGCCTGAGCGTAAGTACTCCGTCTGGATCGGTGGAT
FA5F      CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGCCTGAGCGTAAGTACTCCGTCTGGATCGGTGGAT
*****

FA3R      CCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGTCGATGTGGATCTCCAAGCACGAATACGATG
FA5F      CCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGTCGATGTGGATCTCCAAGCACGAATACGATG
*****

FA3R      AGGGCGGCCAGGAATCGTCCACCGCAAGTGCTTCTAAGCACTAGGCACAAATGATGGTG
FA5F      AGGGCGGCCAGGAATCGTCCACCGCGAGTGCTTCTAAGCACTAGGCACAAATGATGGTG
*****

FA3R      GCTAAAGCAATTAACAACAACCATGGTACTATAACATCACCATTTACATCTGAGCTAACC
FA5F      GCTAAAGCAATTAACAACAACCATGGTACTATAACATCACCATTTACATCTGAGCTAACC
*****

FA3R      TAGCGAAATCAATCACTACCAGAAGAGCAAACGACAAGCATTATCGTATACCCAAGGCTA
FA5F      TAGCGAAATCAATCACTACCAGAAGAGCAAACGACAAGCATTATCGTATATCCAAGGCTA
*****

FA3R      CACATGGCTCCGGCACGAACAACATGGCATGTGAAGAAGTGCAAGAGAAGAGATTTGAAG
FA5F      CGCATGGCTCCGGCATGAACAACATGGCATGTGAAGAAGTGCAAGAGA-----
* *****

FA3R      GAAATGAAGGCAGACAGGGCACGGTGCTGACCAGTGGAATTTGACATCCAATCACTACAT
FA5F      -----

FA3R      CCTCATTGCGARAGTACCCACGCAAGAGAACGATGATTGGCGCAAAGGCCTAGA
FA5F      -----

```

*Todos los alineamientos fueron realizados en MUSCLE 2018

Consenso adulto hembra

CGATCAAGATCAAGATCATTGCC CCGCCTGAGCGTAAGTACTCCGTCTGGATCGGTGGATCCA
 TCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGTCGATGTGGATCTCCAAGCACGAATACGATGAGGGCG
 GCCCAGGAATCGTCCACCGCRAGTGCTTCTAAG CACTAGGCACAAATGATGGTGGCTAAAGC
 AATTAACAACAACCATGGTACTATAACATCACCATTACATCTGAGCTAACCTAGCGAAATCA
 ATCACTACCAGAAGAGCAAACGACAAGCATTATCGTATAYCCAAGGCTACRCATGGCTCCGG
 CAYGAACAACATGGCATGTGAAGAAGTGCAAGAGAAGAGATTTGAAGGAAATGAAGGCAGA
 CAGGGCACGGTGCTGACCAGTGGAATTTGACATCCAATCACTACATCCTCATTGCGARAGTACC
 CACGCAAGAGAACGATGATTGGCGCAAAGGCCTAGA

No se presenta un alineamiento para secuencias de pupa hembra debido a que sólo una lectura fue exitosa.

Consenso pupa hembra

CGATCAAGATCAAGATCATTGCC CCGCCTGAGCGTAAGTACTCCGTCTGGATCGGTGGATCCA
 TCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGTCGATGTGGATCTCCAAGCACGAATACGATGAGGGCG
 GCCCAGGAATCGTCCACCGCAAGTGCTTCTAAG CACTAGGCACAAATGATGGTGGCTAAAGC
 AATTAACAACAACCATGGTACTATAACATCACCATTACATCTGAGCTAACCTAGCGAAATCA
 ATCACTACCAGAAGAGCAAACGACAAGCATTATCGTATACCCAAGGCTACACATGGCTCCGG
 CATGAACAACATGGCATGTGAAGAAGTGCAAGAGAAGAGATTTGAAGGAAATGAAGGCAGA
 CAGGGCACGGTGCTGACCAGTGGAATTTGACATCCAATCACTACATCCTCATTGAGAGTACC
 CACGCAAGAGAACGATGATTGGCG

Figura 65. Alineamiento de secuencias consenso y adultos hembra: Se observa que las secuencias sólo se diferencian en 4 bases y en su largo. Se puede concluir que se trata de la misma isoforma de actina en ambos estadios.

```

pupahembra      CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGCCTGAGCGTAAGTACTCCGTCTGGATCGGTGGAT
adultohembra    CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGCCTGAGCGTAAGTACTCCGTCTGGATCGGTGGAT
*****

pupahembra      CCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGTCGATGTGGATCTCCAAGCACGAATACGATG
adultohembra    CCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGTCGATGTGGATCTCCAAGCACGAATACGATG
*****

pupahembra      AGGGCGGCCAGGAATCGTCCACCAGTGTCTTAAGCACTAGGCACAAATGATGGTG
adultohembra    AGGGCGGCCAGGAATCGTCCACCAGTGTCTTAAGCACTAGGCACAAATGATGGTG
*****

pupahembra      GCTAAAGCAATTAACAACAACCATGGTACTATAACATCACCATTTACATCTGAGCTAACC
adultohembra    GCTAAAGCAATTAACAACAACCATGGTACTATAACATCACCATTTACATCTGAGCTAACC
*****

pupahembra      TAGCGAAATCAATCACTACCAGAAGAGCAAACGACAAGCATTATCGTATACCAAGGCTA
adultohembra    TAGCGAAATCAATCACTACCAGAAGAGCAAACGACAAGCATTATCGTATAYCCAAGGCTA
*****

pupahembra      CACATGGCTCCGGCATGAACAACATGGCATGTGAAGAAGTGCAAGAGAAGAGATTTGAAG
adultohembra    CRCATGGCTCCGGCAYGAACAACATGGCATGTGAAGAAGTGCAAGAGAAGAGATTTGAAG
* *****

pupahembra      GAAATGAAGGCAGACAGGGCACGGTGCTGACCAGTGGAAATTTGACATCCAATCACTACAT
adultohembra    GAAATGAAGGCAGACAGGGCACGGTGCTGACCAGTGGAAATTTGACATCCAATCACTACAT
*****

pupahembra      CCTCATTGAGAGTACCCACGCAAGAGAACGATGATTGGCG-----
adultohembra    CCTCATTGAGAGTACCCACGCAAGAGAACGATGATTGGCGCAAAGGCCTAGA
*****

```

*Todos los alineamientos fueron realizados en MUSCLE 2018

Figura 66. Alineamiento de secuencias obtenidas de adultos macho

```

MA3F      CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGCCGGAGCGTAAGTACTCGGTCTGGATCGGTGGCT
MA2F      CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGCCGGAGCGTAAGTACTCGGTCTGGATCGGTGGCT
MA5R      CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGCCGGAGCGTAAGTACTCGGTCTGGATTGGTGGCT
*****

MA3F      CCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGACGATGTGGATCTCGAAGCACGAGTACGACG
MA2F      CCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGACGATGTGGATCTCGAAGCACGAGTACGACG
MA5R      CCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGACGATGTGGATCTCGAAGCACGAGTACGACG
*****

MA3F      AGGGCGGCCCGGGCATCGTGCACCGCAAGTGCTTCTAAGGCAACGGCGGACCTCATCCAG
MA2F      AGGGCGGCCCGGGCATCGTGCACCGCAAGTGCTTCTAAGGCATCGGCGGACCTCATCCAG
MA5R      AGGGCGGCCCGGGCATCGTGCACCGCAAGTGCTTCTAAGGCATCGGCGGACCTCATCCAG
*****

MA3F      TCGTCGATCTTGTGCGGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAAACGG
MA2F      TCGTCGATCTTGTGCGGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAAACGG
MA5R      TCGTCGATCTTGTGCGGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAAACGG
*****

MA3F      CAGAAGCAAACCAAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGAGCTCTATTGTGGTGT
MA2F      CAGAAGCAAAGCCAAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGAGCTCTATTGTGGTGA
MA5R      CAGAAGCAAAGCCAAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGAGCTCTATTGTGGTGT
*****

MA3F      CTGTCTCTCGTTCTTTTACCACCAGCATCTTTTCTATGATTCTCTTTTACCATCTCTTT
MA2F      CTGTCTCTCGTTCTTTTACCACCAGCATCTTTTCTATGATTCTCTTTTACCATCTCTTT
MA5R      CTGTCTCTCGTTCTTTTACCACCAGCATCTTTTCTATGATTCTCTTTTACCATCTCTTT
*****

MA3F      TATTTTTGTTGTTTGTGTTTCTGTGCAAATCTTCTTCGACTTGTAACARACAGCGCTTAG
MA2F      TATTTTTGTTGTTTGTGTTTCTGTGCAAATCTTCTTCGACTTGTAACAAAMAGCGCTTAG
MA5R      TATTTTTGTTGT-----
*****

MA3F      GGCGGTGCCTASAGAAGTAAATATATCTTTTTTGATTA-----AAAAAAAAAAAAA
MA2F      GGCGGTGCCTAGAGAAGTAAATATATCWTTTTTGATAACGTTAAARAAAAAAAAAAAAA
MA5R      -----

MA3F      AGTACTAGTCRACSCGTGGCCTAGTAGTAGTAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTG
MA2F      AGTACTARTCGACGCGTGG-----
MA5R      -----

MA3F      CMGGTCGACCATATGGGARAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGC
MA2F      -----
MA5R      -----

```

*Todos los alineamientos fueron realizados en MUSCLE 2018

Secuencia consenso adulto macho

CGATCAAGATCAAGATCATTGCC CCGCCGGAGCGTAAGTACTCGGTCTGGATcGGTGGCTCCA
 TCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGACGATGTGGATCTCGAAGCACGAGTACGACGAGGGC
 GGCCCGGGCATCGTGCACCGCAAGTGCTTCTAAG GCATCGGCGGACCTCATCCAGTCGTCGA
 TCTTGTCCGGTAAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAAACGGCAGAAGCAA
 GCCAAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGAGCTCTATTGTGGTGTCTGTCTCTCGTT
 CTTTACCACCAGCATCTTTTCTATGATTTCTCTTTTACCATCTCTTTATTTTTTGTGTTTTGT
 TTCTGTGCAAATCTTCTTCGACTTGTAACAAACAGCGCTTAGGGCGGTGCCTAGAGAAGTAAA
 TATATCTTTTTTGATTAAAAAAGTACTAGTCRACSCGTGGCCTAGTAGTAGTA
 GAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCMGGTCGACCATATGGGARAGCTCCCAACGCGTT
 GGATGCATAGC

Figura 67. Alineamiento de secuencias obtenidas de adultos macho cerca de cola poliA: Las secuencias que se obtuvieron son muy cortas y tienen baja definición. Nótese que las secuenciaciones que se muestran son forward, a pesar de que sólo copiaron la parte final de las secuencias.

```

MA5F      ATTWAMMSGCCM--GTGAAWTGTAATACS-ACT-CCTATARGGCGAATTGGGCCCGASG
MA4F      CTTYMMRMSGSSMMSKTGAAWTGTAATACCGACTMACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACG
          .*: * **..*  *****. *** .***** *****.*

MA5F      TC-CATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCMATTCTACTACTACTAGGCCAC
MA4F      TCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTCTACTACTACTAGGCCAC
          ** *****

MA5F      GCGTCGACTAGTRCTTTTTTTTTTTTTTTT--
MA4F      GCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTT
          *****
    
```

*Todos los alineamientos fueron realizados en MUSCLE 2018

Figura 68. Alineamiento de secuencias obtenidas de pupas macho

```

MP1R      CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCCGCCGAGCGTAATACTCCGTCTGGATCGGTGGAT
MP2F      CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCCGCCGAGCGTAAGTACTCGGTCTGGATCGGTGGCT
MP4R      CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCCGCCGAGCGTAAGTACTCGGTCTGGATCGGTGGCT
*****
MP1R      CCATCCTGGCTTCCCTGTCTACCTTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGGAGGAGTACSACG
MP2F      CCATCCTGGCTTCCCTGTCTACCTTCCAGCAGATGTGGATCTCGAAGCACGAGTACGACG
MP4R      CCATCCTGGCTTCCCTGTCTACCTTCCAGCAGATGTGGATCTCGAASCACGAGTACGACG
*****
MP1R      AGTCCGGCCCGGGCATTGTTACCAGCAAGTGCTTCTAAGGCATCGGCGGACCTCATCCAG
MP2F      AGGGCGGCCCGGGCATTGTTACCAGCAAGTGCTTCTAAGGCATCGGCGGACCTCATCCAG
MP4R      AGGGCGGCCCGGGCATTGTTACCAGCAAGTGCTTCTAAGGCATSGGCGGACCTCATCCAS
**
MP1R      TCGTCGATCTTGTGCGGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAAACGG
MP2F      TCGTCGATCTTGTGCGGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAAACGG
MP4R      TCGTCGATCTTGTGCGGGTTAACCAACATCAA-----
*****
MP1R      CAGAAGCAAGCCAAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGARCTCTATTG-----
MP2F      CAGAAGCAAGCCAAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGAGCTCTATTGTGGTGT
MP4R      -----
MP1R      -----
MP2F      CTGTCTCTSGTTCCTTTACCACCAGSATCTTTTCTATGATTCCCTTTTACCATCTCTTT
MP4R      -----
MP1R      -----
MP2F      TATTTTTTGTGTTTGTGTTTCWGTGCAAATMT
MP4R      -----

```

*Todos los alineamientos fueron realizados en MUSCLE 2018

Consenso pupa macho

```

CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCCGCCGAGCGTAARTACTCSGTCTGGATCGGTGG
MTCCATCCTGGCYTCSCTGTCTYACCTTCCAGMMGATGTGGATCTCSAAGSASGAGTAC
GACGAGKSCGGCCCGGGCATSGTKACCAGCAAGTGCTTCTAAGGCATCGGCGGACCT
CATCCAGTCGTCGATCTTGTGCGGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAAC
ACCAAACGGCAGAAGCAAGCCAAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGAGCT
CTATTGTGGTGTCTGTCTCTSGTTCCTTTTACCACCAGSATCTTTTCTATGATTCCCTTTT
ACCATCTCTTTTATTTTTTGTGTTTGTGTTTCWGTGCAAATMT

```

Figura 69. Alineamiento de secuencias consenso y adultos macho: Se observa que las secuencias sólo se diferencian en algunas bases degeneradas y en su largo. Se puede concluir que se trata de la misma isoforma de actina en ambos estadios.

```

adultomacho      CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGCCGGAGCGTAAGTACTCGGTCTGGATCGGTGGCT
pupamacho        CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGCCGGAGCGTAARTACTCSGTCTGGATCGGTGGMI
*****

adultomacho      CCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGACGATGTGGATCTCGAAGCACGAGTACGACG
pupamacho        CCATCCTGGCYTCSCTGTCTYACCTTCCAGMMGATGTGGATCTCSAAGSASGAGTACGACG
*****

adultomacho      AGGCGGCCCGGGCATCGTGCACCGCAAGTGCTTCTAAGGCATCGGCGGACCTCATCCAG
pupamacho        AGKSCGGCCCGGGCATSGTKCACCGCAAGTGCTTCTAAGGCATCGGCGGACCTCATCCAG
**

adultomacho      TCGTCGATCTTGTCTGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAAACGG
pupamacho        TCGTCGATCTTGTCTGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAAACGG
*****

adultomacho      CAGAAGCAAGCCAAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGAGCTCTATTGTGGTGT
pupamacho        CAGAAGCAAGCCAAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGAGCTCTATTGTGGTGT
*****

adultomacho      CTGTCTCTCGTTCTTTACCACCAGCATCTTTTCTATGATTCTCTTTACCATCTCTTT
pupamacho        CTGTCTCTSGTTCTTTACCACCAGSATCTTTTCTATGATTCCCTTTTACCATCTCTTT
*****

adultomacho      TATTTTTGTGTTTTGTTTTCTGTGCAAATCTTCTTCGACTTGTAACAAACAGCGCTTAG
pupamacho        TATTTTTGTGTTTTGTTTTCTGTGCAAATMT-----
*****

adultomacho      GCGGGTGCCTAGAGAAGTAAATATATCTTTTTTGATTAAGTACTAG
pupamacho        -----

adultomacho      TCRACSCGTGGCCTAGTAGTAGTAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCMGGTCGA
pupamacho        -----

adultomacho      CCATATGGGARAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGC
pupamacho        -----

```

*Todos los alineamientos fueron realizados en MUSCLE 2018

Figura 70. Alineamiento de secuencias obtenidas de macho cercanas a cola poliA

```

MA3R      -AGWYMS SMMRSTWW-TTAGGTGAMACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTT
MP2R      -TKTYCGCMAG-CW-TTTAGGT GACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATC CAACGCGTT
MA2R      -GKWIMSCMAR-CWTTTITAGGT GACACTATAGAATACTMAAGCTATGCATC CAACGCGTT
MP3R      TCKMYSSCMARCCWTTTITAGGT GACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATC CAACGCGTT
..*      * ***** *****

MA3R      GGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTCTACTAC
MP2R      GGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTCTACTAC
MA2R      GGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTCTACTAC
MP3R      GGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTCTACTAC
*****

MA3R      TACTAGGC CACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTT TTTT-----
MP2R      TACTAGGC CACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTT TTTT-----
MA2R      TACTAGGC CACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTT TTTT-----
MP3R      TACTAGGC CACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTT TTT-----
*****

MA3R      -----
MP2R      TTTTTTTTTTTT
MA2R      -----
MP3R      -----
    
```

*Todos los alineamientos fueron realizados en MUSCLE 2018

Figura 71. Alineamiento de secuencias consenso de hembras y machos: Se observa que la similitud termina en la región codificante (rojo), la misma que se había visto conservada entre *An. gambiae*, *Ae. aegypti*. A la secuencia de hembra le faltan regiones que sí se ven en la de macho, posiblemente debido a corte y empalme.

```

hembra    CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGCCTGAGCGTAAGTACTCCGCTCGGATCGGTGGAT
macho     CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGCGGGAGCGTAAGTACTCCGCTCGGATCGGTGGCT
*****

hembra    CCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGTCGATGTGGATCTCCAAGCACGAATACGATG
macho     CCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGACGATGTGGATCTCGAAGCACGAGTACGACG
*****

hembra    AGGGCGGC CCGGAATCGTCCACCGCRAGTGCTTCTAAG-----CA-CTAG
macho     AGGGCGGC CCGGGCATCGTGCA CCGCAAGTGCTTCTAAGGCATCGGCGGACCTCATCCAG
*****

hembra    GCACAATGATGGTGGCTAAAGCA--ATTAACAACAACCATGGTACTATAACATCACCAT
macho     TCGTCGATCTGTGCGGTAAACAACATCAACACCAACT----TCCCTTCCCAACACCA-
*      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

hembra    TTACATCTGAGCTAACCTAGCGAAATCAAT-CACTACCAGAAGAGCAAACGA-CAAGCAT
macho     -AACGGCAG----AAGCAAGCCAAGCAACATACTATCA-AACAGCAGCCGATTGAGCTC
*      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

hembra    TATCGTA-----TAYCCAAGGCTACRCAT--
macho     TAITGTGGTGTCTGTCTCTCGTCTTTTACCACCAGCAICTTTTCTATGATTTCTCTTTT
*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

hembra    -----GGCTCCGGCAYGAACAAC
macho     ACCATCTCTTTTATTTTTTGTITGTTTTGTTTCTGTGCAAAATCTTCTTCGACTTGTAAACA
*      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

hembra    ATGGCAITGTGAAGAAGTGCA-AGAGAAG-----AGATTGAAGGAAATGA
macho     ACAGCGCTTAGGGCGGTGCCTAGAGAAGTAAATATATCTTTTTTGATTAATAAAAAAAAA
*      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

hembra    AGGCAGACAGGGCACGGTGTGACCAAGTGGAAITTGACATCCAATCACTA---CATCCTC
macho     AAAAGTACTAGTCRACSCGTGGCCTAGTAGTAGTAG-----AATCACTAGTGAATTCGC
*      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

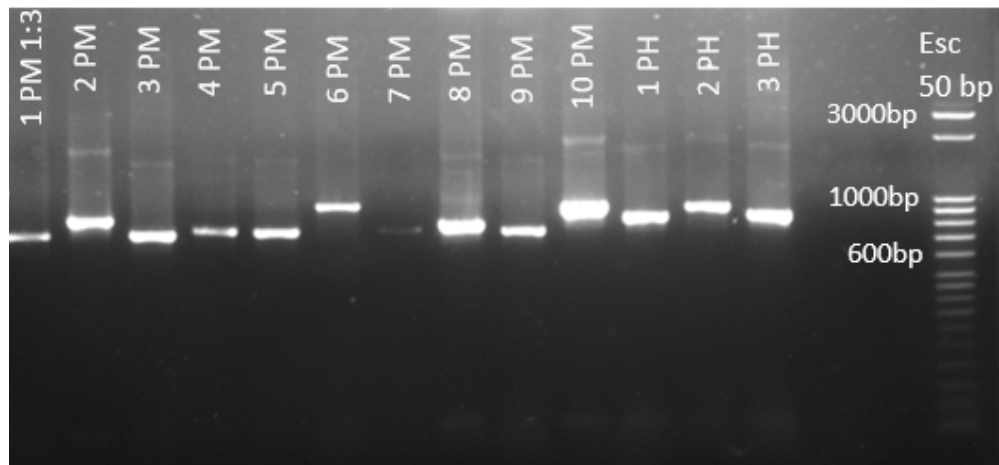
hembra    ATTCGARAG----TACCCACGCAAGAGAACGATGAT TGGCGCAAAGGCCTAGA
macho     GGCCGCTGCMGGTCGACCATATGGGARAGCTCCCAAC-GCGTTGGATGCATAGC
*      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

*Todos los alineamientos fueron realizados en MUSCLE 2018

Debido a que las secuencias de las 3'-UTR encontradas en machos y en hembras es distinta, se puede suponer que se trata de dos isoformas de actina que se expresan únicamente o con mayor intensidad en cada sexo. Esto hace que la actina expresada en hembras sea un buen candidato para pruebas de silenciamiento, ya que su eliminación podría tener efectos únicamente en hembras y por lo tanto se podría utilizar para sexar grandes cantidades de mosquitos.

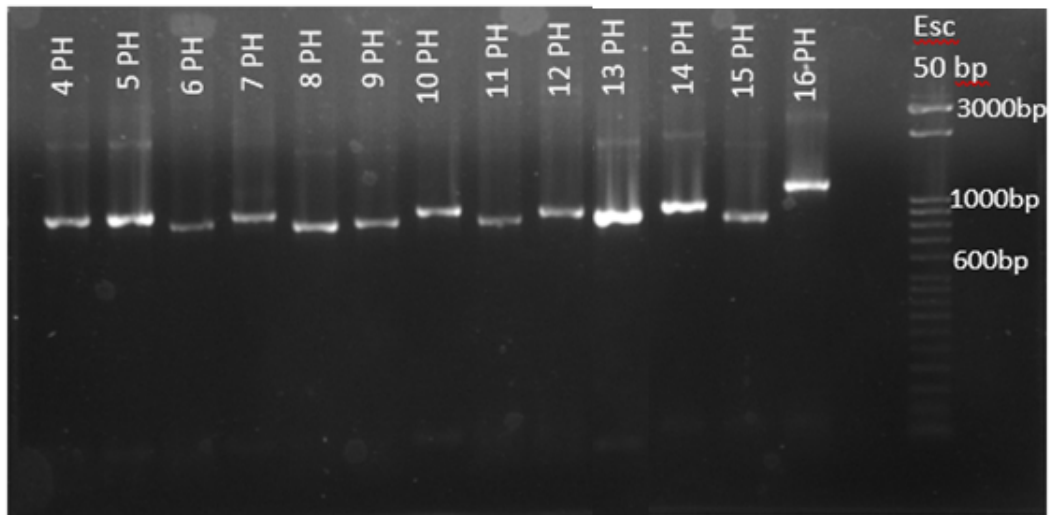
5. Aislamiento de bandas que no se obtuvieron con cortes de gel. A causa de que no fue posible aislar ninguna de las bandas con expresión generalizada ni de las sexo y estadio-específicas, se repitió el procedimiento de corte de gel, PCR y ligación en pupas de ambos sexos. Una vez identificados los clones viables por medio de *Blue White screening*, se realizó PCR con cebadores M13 de Thermo Fisher Scientific (Forward: 5'd [GTAAAACGACGGCCAG] 3' Reverse: 5'd [CAGGAAACAGCTATGAC] 3) y se corrieron los productos en gel de agarosa 1%. A continuación, se muestran los insertos aislados exitosamente. Se seleccionaron aquellos que tuvieran pesos moleculares que concordaran con bandas de interés (Cuadro 36 y 37). Estos fueron clonados una vez más (Cuadro 37).

Figura 72. Productos de PCR amplificados de ligaciones para el aislamiento de bandas mayores a 1000 bp gel 1



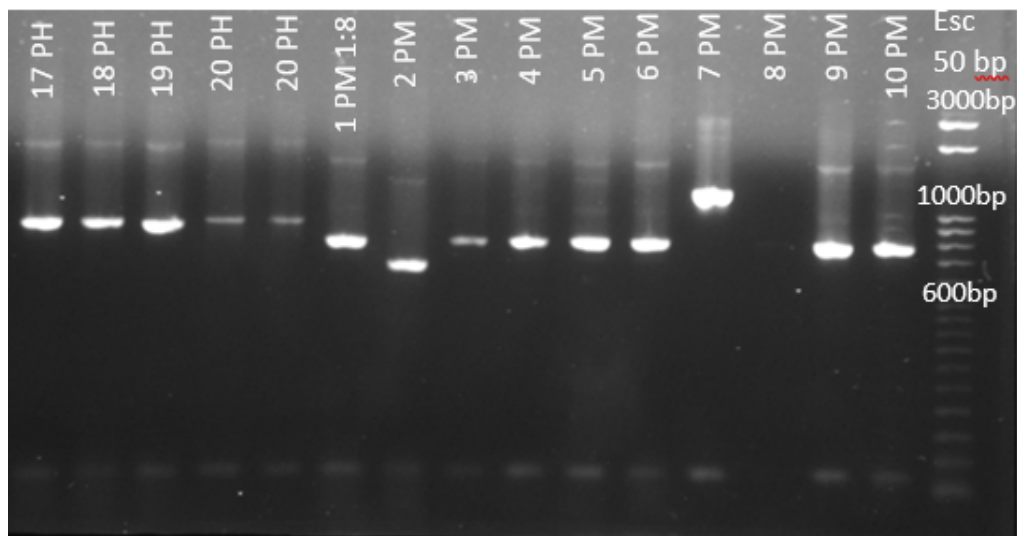
Fuente: Elaboración propia.

Figura 73. Productos de PCR amplificados de ligaciones para el aislamiento de bandas mayores a 1000 bp gel 2



Fuente: Elaboración propia.

Figura 74. Productos de PCR amplificados de ligaciones para el aislamiento de bandas mayores a 1000 bp gel 3



Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 36. Pesos moleculares obtenidos en productos de PCR de ligaciones

Muestra	Tamaño en gel	Tamaño real
1 PM 1:3	701	465
2 PM 1:3	818	582
3 PM 1:3	711	475
4 PM 1:3	746	510
5 PM 1:3	735	499
6 PM 1:3	975	739
7 PM 1:3	753	517
8 PM 1:3	790	554
9 PM 1:3	764	528
10 PM 1:3	951	715
1 PH	872	636
2 PH	985	749
3 PH	894	658
4 PH	824	588
5 PH	844	608
6 PH	778	542
7 PH	860	624
8 PH	778	542
9 PH	804	568
10 PH	912	676
11 PH	860	624
12 PH	912	676
13 PH	926	690
14 PH	959	723
15 PH	844	608
16 PH	1187	951
17 PH	910	674
18 PH	921	685
19 PH	921	685
20 PH	964	728
1 PM 1:8	808	572
2 PM 1:8	647	411
3 PM 1:8	799	563
4 PM 1:8	813	577
5 PM 1:8	822	586
6 PM 1:8	836	600
7 PM 1:8	1339	1103
8 PM 1:8	813	577
9 PM 1:8	768	532
10 PM 1:8	755	519

Fuente: Elaboración propia.

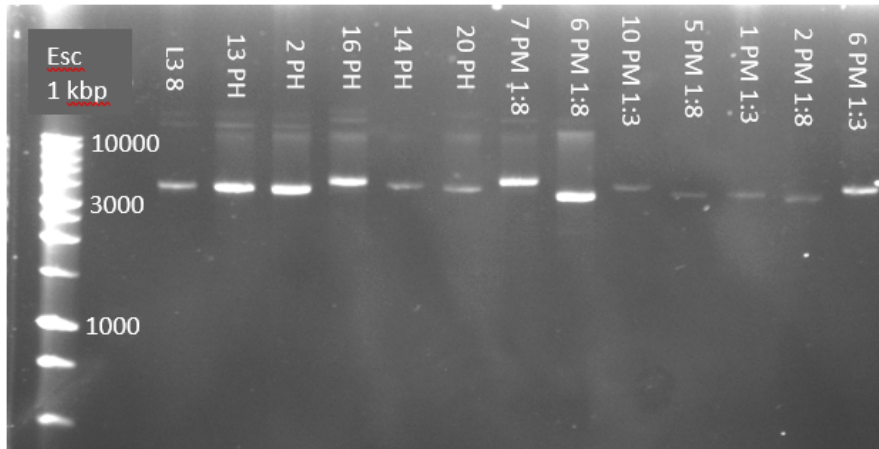
Cuadro 37. Colonias seleccionadas para segunda ligación y clonación. Se seleccionaron colonias con tamaños de interés y aquellas con tamaños que no eran explicables. La diferencia entre el tamaño en gel y el del inserto se debe a que los cebadores utilizados (M13) se unen varios pares de base antes y después del inserto.

Muestra	Tamaño en gel (pb)	Tamaño de inserto (pb)
1 PM 1:3	701	465
6 PM 1:3	975	739
10 PM 1:3	951	715
2 PH	985	749
13 PH	926	690
14 PH	959	723
16 PH	1187	951
20 PH	964	728
2 PM 1:8	647	411
5 PM 1:8	822	586
6 PM 1:8	836	600
7 PM 1:8	1339	1103

Fuente: Elaboración propia.

Se seleccionaron colonias que contenían insertos de tamaños de interés por medio de PCR de colonia. Las secuencias amplificadas se volvieron a ligar en plásmidos pGEM-T y se clonaron en *E. coli* XL1 Blue. La Figura 75 muestra los tamaños de plásmidos que fueron exitosamente extraídos de *E. coli* XL1 Blue. El Cuadro 38 muestra los tamaños de inserto calculados al restar el tamaño del plásmido pGEM-T (3000 bp), y en el cuadro 39 se observan los tamaños que concuerdan con las bandas de interés. De principal importancia es la banda de la colonia 7 PM 1:8, que tiene un tamaño concordante con las bandas sexo y estadio-específicas. No fue posible aislar estas bandas para pupa hembra, por lo que se debe repetir el procedimiento si se quiere secuenciar ambas variedades. Lo mismo ocurre con la banda de 900 bp presente en todos los estadios, a que esta sólo se aisló en L3.

Figura 75. Plásmidos extraídos de colonias tamizadas con Blue White screening para el aislamiento de bandas de pupas: Gel de agarosa 1% corrida a 100V por 30 min.



Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 38. Tamaños de bandas observadas en el gel anterior.

Muestra	Peso molecular	Peso de inserto	Peso esperado
L3 8	3962	962	---
13 PH	3829	829	690
2 PH	3701	701	749
16 PH	4282	1282	951
14 PH	3701	701	723
20 PH	3609	609	728
7 PM 1:8	4172	1172	1103
6 PM 1:8	3109	109	600
10 PM 1:3	3639	639	715
5 PM 1:8	3109	109	586
1 PM 1:3	3348	348	465
2 PM 1:8	3034	34	411
6 PM 1:3	3609	609	739

Fuente: Elaboración propia.

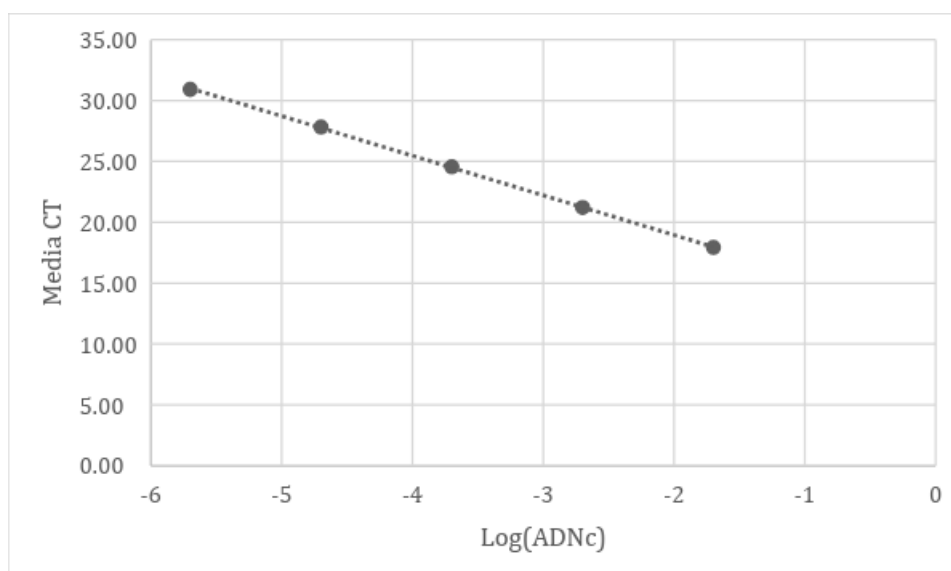
Cuadro 39. Tamaños de bandas de interés

Muestra	Peso molecular	Peso del inserto	Inserto esperado
L3 8	3962	962	----
2 PH	3701	701	749
14 PH	3701	701	723
7 PM 1:8	4172	1172	1103
1 PM 1:3	3348	348	465
6 PM 1:3	3609	609	739

**Todos los pesos moleculares fueron calculados con Gel Analyzer 2010*

Debido a que la expresión de un gen no puede determinarse de forma cuantitativa, fue necesario utilizar qPCR para confirmar que los genes encontrados fueran verdaderamente sexo-específicos. En el cuadro 38 se muestran los valores C_T usados para determinar que dilución se debía utilizar del gen de actina estudiado en el análisis de qPCR. El Valor C_T cuando es alto indica que la concentración de ADN amplificado es baja. A partir de estos datos se decidió utilizar la dilución 1/500 ya que el valor C_T quedaba dentro de un rango óptimo (entre 10 y 40) y esto permitiría optimizar el uso del ADNc generado. En la Figura 76 se puede observar la eficiencia de amplificación obtenida de los cebadores utilizados, con un total de: 102.69%, el cual se encuentra dentro del rango deseado (90%-110%).

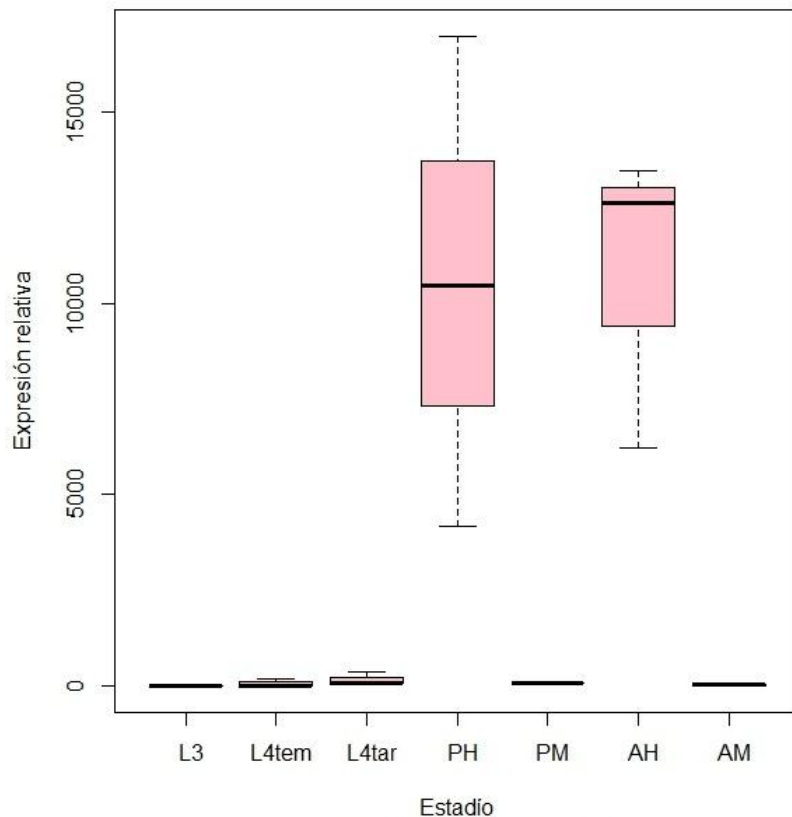
Figura 76. Gráfico de eficiencia de los cebadores qPCRfemaleUTR_2F y qPCRfemaleUTR_2R en diferentes diluciones utilizando pupa hembra como estadio de prueba. Se utilizaron las diluciones 1/50, 1/500, 1/5,000, 1/50,000 y 1/500,000. En el eje X se despliega el logaritmo de cada dilución de ADNc utilizada y en el eje Y la media de los valores C_T obtenidos.



En la siguiente figura se demuestra la expresión relativa de los estadios evaluados. En este caso se utilizó un promedio de los genes de referencia RPL49 y RPS4 para el análisis utilizando el método 2-

$\Delta\Delta CT$. Los genes de referencia son un control interno con secuencias diferentes a la secuencia de interés (Kozera y Rapacz, 2013). En este caso se utilizó el promedio de ambos genes de referencia. En la figura 77 parece haber una mayor distribución de la expresión relativa en los estadios de pupa y adulto hembra con una mediana de 10453.3 y 12604.6, respectivamente. A simple vista se podría decir que si existe una diferencia ya que al comparar con los demás estadios: L4 temprano posee una mediana de 1.2, L4 tardío de 50.3, pupa macho de 82.5 y adulto macho de 21.0 (ver anexos).

Figura 77. Diagrama de caja y bigotes de la expresión relativa obtenida a partir de qPCR en los diferentes estadios usando una dilución 1/500 del gen de actina presuntivo. Estadio: L3. L4tem: L4 temprano. L4Tar: L4 tardío. PH: pupa hembra. PM: pupa macho. AH: adulto hembra. AM: adulto macho. La línea horizontal dentro de cada caja representa la mediana de cada estadio. Las líneas horizontales limitando cada caja representan el primer cuartil (abajo) y el tercer cuartil (arriba). Las líneas horizontales limitando los “bigotes” son los valores mínimos o máximos no atípicos. No hay datos atípicos.



Fuente: Elaboración propia

Al obtener que los datos no poseían normalidad (Valor $P < 0.05$) ni homogeneidad de varianza (Valor $P < 0.05$) se optó por utilizar la prueba de Kruskal-Wallis, que se utiliza cuando no hay normalidad en los datos. Se realizó tanto para la diferencia entre estadios como entre réplicas biológicas. En el caso de la prueba de Kruskal-Wallis con las réplicas biológicas (Valor $P > 0.05$) no había suficiente evidencia para indicar que la mediana de las muestras es estadísticamente diferente, lo más probable es que sean datos

muy similares entre sí. Para esta prueba, entre los estadios, se obtuvo que al menos una de las medianas era diferente. A partir de esto se realizó la prueba de Dunn ya que esta se realiza como un análisis Post Hoc para analizar que estadios son los que difieren. Se utilizó junto con esta prueba el método de Bonferroni para asegurar que todas las comparaciones cumplieran con un intervalo de confianza del 95%. Este análisis mostró que únicamente la expresión relativa del gen de actina (presuntivo de hembra de músculo de vuelo) en adulto hembra y pupa hembra son estadísticamente diferentes del control (L3). Para los otros estadios, no se demostró el rechazo de la hipótesis nula, por lo que es posible que la expresión de estos con el control sea similar.

Estudios anteriores con *An gambiae* mencionan la diferencia global en la expresión de los genes entre machos y hembras. Una de las principales diferencias radica en que las hembras, al ser el vector de la malaria, debe confrontar varias tareas que el macho nunca hará. Entre estas diferencias se encuentra la alimentación de la sangre y la defensa contra la infección de *Plasmodium sp.* En este estudio mencionan que 118 de 167 de los genes (71%) están más expresados en hembras y que las diferencias aumentan cuando hay mayor diferenciación sexual. Al menos 22 genes de los 118 están relacionados con defensa relacionada al antígeno, alimentación de sangre o expresadas en las glándulas salivares. En esta especie, muchos de los procesos biológicos asignados a los genes con mayor tendencia a hembras, también se encuentran en la hembra de *D. melanogaster*. El exceso de genes que muestran una alta expresión relativa en hembras se encuentra distribuido igualmente en todo el genoma del mosquito (Hahn y Lanzaro, 2005). Es posible que *An. albimanus*, al ser tan cercano filogenéticamente a *An. gambiae*, pueda tener un genoma con un comportamiento muy similar a este.

Como se había mencionado anteriormente en este trabajo, los estadios de *An. Albimanus* son escasos y no existe algún estadio en el que se haya analizado la expresión relativa del gen de actina, principalmente porque solo existe una secuencia parcial de actina-1 en la base de datos. El gen estudiado se presumía que fuera un gen expresado principalmente en hembras, lo cual se pudo comprobar mediante la expresión relativa realizada en qPCR con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Sin embargo, no se conoce todavía si esta actina es propiamente del músculo de vuelo, por lo que es necesario realizar futuros estudios donde se evalúe la expresión relativa de la actina en diferentes partes del cuerpo de *An. Albimanus*. En este caso, al determinar que la actina se expresa únicamente en tórax y no en las demás partes, se podrá utilizar esta actina en futuros estudios de silenciamiento para eliminar específicamente a hembras en una producción de machos estériles. Estos estudios de silenciamiento podrán ser analizados usando otras técnicas moleculares como ARN de interferencia.

VIII. CONCLUSIONES

A. Esterilización de *Anastrepha ludens* por dosis parciales de radiación gamma

1. No se observó una diferencia significativa en los porcentajes de emergencia obtenidos de las pruebas de control de calidad.
2. EL porcentaje de adultos muertos en ausencia de luz, agua y alimentos fue significativamente menor a las 72 horas para el tratamiento en el que se irradiaron a las moscas de *Anastrepha ludens* en etapa adulta.
3. En las pruebas de fertilidad las hembras colocaron huevos, sin embargo, todos los tratamientos obtuvieron una fecundidad menor al 1% por lo que se considera que inducen la esterilidad de forma completa.
4. Las pruebas de campo no apuntan a que alguno de los tratamientos estériles familia 10 sea mejor al tratamiento tradicional en cuanto a la competencia con machos silvestres por hembras silvestres.
5. En las pruebas de campo se observó una inducción de esterilidad menor en el tratamiento de dosis con 6 horas comparado con los demás tratamientos

B. Evaluación de expresión de genes de referencia en diferentes estadios de *Anopheles albimanus*

1. La combinación de los genes Rps4 y RpL49 permitieron normalizar robusta para el estudio de niveles expresión de genes de *Anopheles albimanus*.
2. La estabilidad del gen RpS4 fue óptima para utilizarlo como gen de referencia en los estudios de expresión genética de *Anopheles albimanus*

C. Esterilización de *Anopheles albimanus* por silenciamiento de *Boule* y *ZPG* mediado por ARNi y diseño de cebadores de genes de espermatogénesis candidatos de silenciamiento

1. Se optimizó el método de inactivación de bacterias de *E. coli* HT115(DE3) para producción de ARNdH del gen *zero population growth (zpg)* mediante lisis celular por ebullición de 15 minutos con una concentración de 760.53 ± 321.71 ng/uL.
2. Se logró producir hasta 270 ± 134 ng/ μ l de ARNdH mediante inactivación por ebullición 15 minutos.
3. Se logró una transformación exitosa de las cepas *E. coli* HT115 (DE3) con los plásmidos pGEM-T-Easy-Vector con insertos de los genes *Boule* y *ZPG*.

4. Las cepas *E. coli* HT115(DE3) pGEM-T-*Amp^R-Boule* y *E. coli* HT115(DE3) pGEM-T-*Amp^R-ZPG* retuvieron los insertos de los genes de *Boule* y de *ZPG*.
5. Se determinó que la expresión relativa de *Boule* se redujo 23.4% mediante la alimentación con ARNdh combinado de 100µl *Boule*+100µl *ZPG*, en comparación al control (ARNdh de ANT).
6. Se determinó que la alimentación ARNdh de 200µl *Boule* mostró una reducción de expresión relativa del gen de 14.6%.
7. Se demostró que existe una tendencia a una menor expresión relativa del gen *Boule* mediante ambos tratamientos de alimentación con ARNdh
8. La alimentación de las larvas de *Anopheles albimanus* con ARNdh de *Boule* o *Boule*+*ZPG* no demostró tener un efecto estadísticamente significativo (valor-p de 0.079) en el silenciamiento del gen *Boule* en pupas macho.
9. Se logró el diseño de cebadores para la clonación y evaluación de expresión génica por qPCR del gen *nht* de *A. albimanus* como potencial gen de espermatogénesis
10. Se diseñaron dos parejas de cebadores para genes candidatos de espermatogénesis de *A. albimanus* (*fuzzy onios* y *growth arrest specific protein 8*), los cuales cumplen con la mayoría de los requisitos para amplificar en una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), tanto para ARNdh como qPCR.
11. La eficiencia de la pareja de cebadores utilizadas para el análisis del gen *zero population growth (zpg)* fue de 118.91-191.5%. Por lo que no se rechaza H_0 y se concluye que los cebadores no poseen una eficiencia óptima para el análisis de expresión del gen *zpg* en *A. albimanus*.
12. Se propusieron dos parejas alternativas de cebadores que podrían funcionar adecuadamente para evaluar el silenciamiento de *zpg* en *A. albimanus*.

D. Evaluación de la expresión de los genes *Transformer -2*, *Doublesex* y Actina de músculo de vuelo

1. Las concentraciones de ARN se realizaron con éxito ya que los siete estadios examinados se obtuvieron por encima del límite requerido (120ng/mL) para los genes *Transformer- 2*, *Doublesex* y Actina de músculo de vuelo
2. Fue posible la síntesis de ADNc íntegro a partir de los estadios L3, L4 temprano, L4 tardío, pupa y adulto de *An. Albimanus*. para los genes *Transformer- 2*, *Doublesex* y Actina de músculo de vuelo
3. Se logró determinar la expresión relativa en los diferentes estadios evaluados de *An. Albimanus*: L3, L4 temprano y tardío, pupa y adulto de los genes *Transformer- 2*, *Doublesex* y Actina de músculo de vuelo
4. Se diseñaron con éxito 2 sets de cebadores para amplificar una región del gen *Transformer-2* por medio de PCR en tiempo real, sin embargo, no funcionaron correctamente al realizar en análisis experimental.

5. El rango dinámico del gen *Transformer-2* es bajo debido a que se obtuvo amplificación de este en diluciones de ADNc de 1:5, 1:50 y 1:500.
6. Se optimizó el del set de cebadores TRA2C para ser utilizado en PCR en tiempo real, con una eficiencia de 104.5%.
7. No hay diferencia estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$) en la expresión de *Transformer-2* en los diferentes estadios evaluados de *A. albimanus*. Sin embargo, se observó una mayor expresión de este en los estadios larvarios 4 temprano, 4 tardío y pupa hembra.
8. El set de cebadores diseñado para *Doublesex* (qPCR-DXS1F y qPCR_DSX_1R) son idóneos para amplificación del gen por medio de qPCR. Por presentar eficiencias de 100.94%
9. La extracción de ARN se realizó con éxito, ya que las muestras no presentaron ningún tipo de degradación del material extraído.
10. No se encontró diferencia estadísticamente significativa para el gen *Doublesex* en los estadios de L3, L4 tem, L4 Tar, pupa hembra, pupa macho y adulto hembra. Sin embargo, sí se encontró diferencia significativita entre adulto macho y el control (L3).
11. A pesar que no hubiese diferencia significativa en más estadios se puede observar que la expresión del gen *Doublesex* es alta en pupa y adulto hembra.
12. El gen *Doublesex* se encuentra más expresado en los estadios adultos.
13. Se comprobó que el cebador diseñado era capaz de amplificar regiones 3'-UTR de actina de *A. albimanus*, aunque las secuenciaciones no produjeron secuencias completas. Se aislaron dos genes de actina con posible expresión sexo-específica, una de aproximadamente 600 bp en hembras y una de aproximadamente 500 bp en machos. Ambas estaban presentes en todos los estadios a partir del tercer estadio larval. Las secuencias de sus 3'-UTR demostraron que se trataba de dos isoformas de actina diferentes. También se detectaron dos posibles actinas con expresión sexo y estadio-específica, ya que sólo se observaron en pupas y en adultos. Estos cuatro genes son candidatos prometedores para pruebas de silenciamiento con el propósito de producir mortalidad exclusiva en hembras.
14. La expresión del gen presuntivo de actina de vuelo en pupas y adultos hembra es 10453.3 y 12604.6 veces más alta, respectivamente.

IX. RECOMENDACIONES

1. Considerar la combinación de los genes *RPL49* y *RPS4* con un tercer gen de referencia en el análisis de expresión relativa, para aumentar la estabilidad en los niveles de expresión de los genes.
2. Analizar la expresión relativa de *ZPG* y genes candidatos (*fzo*, *gas8*) en qPCR y ARNdh, utilizando los cebadores propuestos en este estudio.
3. Utilizar el método de microinyección *in vitro* de ARNdh para verificar cuanto se necesita para silenciar el gen y si este podría funcionar en el mecanismo de ARNi.
4. Dar seguimiento al silenciamiento del gen *Boule* mediante el análisis de expresión relativa en distintos tiempos de alimentación con ARNdh y entre distintos estadios.
5. Buscar una alimentación, con contenido de ARNdh constante, a las larvas de *An. Albimanus* para que este sea distribuido equitativamente en todo el contenido del cultivo.
6. Administrar diferentes concentraciones de ARNdh de los genes de *Boule* y *ZPG*.
7. Realizar ensayos de fertilidad de los adultos machos, para determinar si la administración del ARNdh confiere el fenotipo de esterilidad deseado.
8. Probar y diseñar nuevos cebadores para asegurar que estos codifiquen en la región esperada.
9. Realizar disecciones de glándulas salivares, ovarios y testículos para verificar el tejido con la mayor expresión de *double.sex* y *Transformer 2*.
10. Realizar disecciones de ovarios y testículos para verificar el tejido con mayor expresión en los genes *zpg* y *boule*, para determinar si la técnica de ARNi funcionaría mejor en hembras o en machos.
11. Realizar disecciones de cabeza, cuerpo, tórax y abdomen para verificar el tejido con la mayor expresión en los genes presuntivos de musculo de vuelo.
12. Iniciar tratamientos de silenciamiento con los genes *doublesex* y *actina* presuntiva de vuelo con el diseño de ARNi específico.

13. Realizar los tratamientos de radiación gamma cuando las pupas tengan la misma madurez. excepto en el tratamiento con adultos.
14. Cuantificar la dosis de radiación absorbida por el método de Fricke.
15. Monitorear el estado de las moscas que son transportadas a las pruebas de campo y colocar fruta y sujetar la fruta firmemente en las jaulas para evitar pérdidas en las pupas colectadas.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Adelman, Z. y Z. Tu. 2016. Control of Mosquito-Borne Infectious Diseases: Sex and Gene Drive. *Trends in Parasitology*, 32(3): 219-229.
- Agrawal, Neema, *et al.* (2003). RNA Interference: Biology , Mechanism , and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67 (4): 657–685.
- Alphy, L. *et al.* (2010). Sterile-insects Methods for control of mosquito-borne diseases: An analysis. *Journal of Vector borne and zoonotics diseases*. 10(3):295-311.
- Ali, M. W., Zheng, W., Soha, S., Li, Q., & Zheng, W. (2017). A genetically enhanced sterile insect technique against the fruit fly , *Bactrocera dorsalis* (Hendl) by feeding adult double-stranded RNAs, (May), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04431-z>
- Andreassi, C., & Riccio, A. (2009). To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.06.001>
- Applied Biosystems. (2010). Guide to Performing Relative Quantification of Gene Expression using Real Time Quantitive PCR. Disponible en: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf [Con acceso el 06/10/18].
- Applied Biosystems. (2010). Real Time PCR: Understanding C_T. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html> [Con acceso el 05/10/18]
- Arbeitman, M. N., Furlong, E. E. M., Imam, F., Johnson, E., Null, B. H., Baker, B. S., ... White, K. P. (2002). Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science* (New York, N.Y.), 297(5590), 2270–5. <https://doi.org/10.1126/science.1072152>
- Araújo, H. *et al.* (2015). *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the persistence of dengue epidemics. *Journal of insects*. 6(2):576-594.
- Arévalo Castillo, M. A., Cortes Matute, Y., Escobar Martínez, Y. M., Jiménez Polo, M. A., Padilla Wong, Y. D. C., & Hernández Álvarez, G. T. (2015). Comportamiento de la malaria en el departamento de Bolívar durante el periodo 2007-2013 (Doctoral dissertation, Universidad de Cartagena).
- Bauer, R. B. Loer, K. Ostrowski, J. Martini, A. Weimbs, H. Lechner & M. Hoch. (2005). Intercellular Communication: the *Drosophila* Innexin Multiprotein Family of Gap Junction Proteins. *Chemistry & Biology* 12: 515-526Pp.
- Bayoh, M. N., & Lindsay, S. W. (2004). Temperature-related duration of aquatic stages of the Afrotropical malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* in the laboratory. *Medical and veterinary entomology*, 18(2), 174-179.
- Becker, N., Dahl, C., Bryant, B., Blair, C. D., Olson, K. E., Clem, R. J., ... Kaslow, D. C. (2013). *Mosquitoes and their control. Insect Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 33).

<https://doi.org/10.1101/gad.1827009>

- Becker, N., D. Petric., C. Boase. M. Madon. M. Zgomba., C. Dahl & A. Kaiser. (2010) Mosquitos and their control. Editorial Springer. 2da. Edición. Alemania/USA. 594Pp.
- Bhatt, S., Weiss, D. J., Cameron, E., Bisanzio, D., Mappin, B., Dalrymple, U., ... & Wenger, E. A. (2015). The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*, 526(7572), 207.
- Bejarano, E. E. (2003). Occurrence of the Malaria Vector *Anopheles albimanus* Wiedemman (Diptera : Culicidae) in Isla Fuerte, Colombia. *Neotropical Entomology*, 32(3), 517–518. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2003000300025>
- Benelli, G. (2015). Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. *Parasitology research*, 114(8), 2801-2805.
- Biocompare. (2010). Quantitative PCR (qPCR). Disponible en: <https://www.biocompare.com/PCR-Real-Time-PCR/7217-Real-Time-PCR/> [Con acceso el 22/03/18].
- Bledsoe, G. (2005). Malaria primer for clinicians in the United States. *Southern Medical Journal*, 98(12), 1197–1204.
- Bousema, T., & Drakeley, C. (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.
- Busula, A. O., Verhulst, N. O., Bousema, T., Takken, W., & de Boer, J. G. (2017). Mechanisms of Plasmodium-Enhanced Attraction of Mosquito Vectors. *Trends in Parasitology*, 33(12), 961–973. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.010>
- Calkins, T. M. Woods, O. Hildebrands, P. Piermarini. (2015). The molecular and immunochemical expression of inextrins in yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: Insights into putative life stage-and tissue-specific functions of gap junctions. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 183: 11-21Pp.
- Cao, F. R. Eckebert C. Elfgang, J. Nitsche, S. Snyder & B. Nicholson. 1998. A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa Transfectants and *Xenopus* oocytes. *J. Cell Science* 111 (Part 1): 31-43Pp.
- Carabello, H. (2014). Emergency department management of mosquito-borne illness: Malaria, dengue, and west nile virus. *Emergency Medicine Practice*, 16(5).
- Castrillon, D. H., Gonczy, P., Alexander, S., Rawson, R., Eberhart, C. G., Viswanathan, S., ... Wasserman, S. A. (1993). Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: Characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics*, 135(2), 489–505. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.05.069>
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2015). Malaria Disease. <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html> [Consultado el 18/11/17].
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2016). Malaria . <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html> [Consultado el 18/11/17].
- Chávez, E. (2017). Malaria primer trimestre (semana epidemiológica 13), 13–16. Retrieved from

- [http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones 2017/Malaria/malaria-1ert-2017.pdf](http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%202017/Malaria/malaria-1ert-2017.pdf)
- Cheng, M. H., Maines, J. Z., & Wasserman, S. A. (1998). Biphasic Subcellular Localization of the DAZL-Related Protein Boule in *Drosophila* Spermatogenesis. *Developmental Biology*, 204(2), 567–576. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9098>
- Chen, L., Zhong, H. Y., Kuang, J. F., Li, J. G., Lu, W. J., & Chen, J. Y. (2011). Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta*, 234(2), 377.
- Coetzee M, Koekemoer LL. 2013. Molecular systematics and insecticide resistance in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. *Annu. Rev. Entomol.* 58:393–412
- Correa, M., H. Adjounian, S. Adjounian. 2008. Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia. Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. *Archivos venezolanos de Farmacología y Terapéutica.* 27(1): 22-25.
- Criscione, F., Qi, Y., & Tu, Z. (2016). GUY1 confers complete female lethality and is a strong candidate for a male-determining factor in *Anopheles stephensi*. *eLife*, 5(September2016), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.19281>
- Curtin, K. Z. Zhang & R. Wyman. (2002). Gap junction proteins expressed during development are required for adult neural function in the *Drosophila* optic lamina. *Plos One* 8: 11Pp.
- De Gier, B., Suryapranata, F. S. T., Croughs, M., Van Genderen, P. J. J., Keuter, M., Visser, L. G., ... Sonder, G. J. B. (2017). Increase in imported malaria in the Netherlands in asylum seekers and VFR travellers. *Malaria Journal*, 16(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1711-5>
- Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin Structure and Function. *Annual Review of Biophysics*, 40(1), 169–186. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-15535>
- Dong, Y. *et al.* (2016). *Bactrocera dorsalis* male sterilization by targeted RNA interference of spermatogenesis: empowering sterile insect technique programs. *Wuhan: Nature.* 6:35750. 9 págs.
- Downey, N. (2017). Interpreting melt curves: An indicator, not a diagnosis. Disponible en: <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis> [Con acceso el 06/10/18].
- Dzaki, N., Ramli, K. N., Azlan, A., Ishak, I. H., & Azzam, G. (2017). Evaluation of reference genes at different developmental stages for quantitative real-time PCR in *Aedes aegypti*. *Scientific reports*, 7, 43618.
- Ejecutivo, C. (2011). Paludismo: prevención y control: mantener los logros alcanzados y reducir la transmisión: informe de la Secretaría.
- Ericka, L., & Vásquez, C. (2015). Situación Epidemiológica :
- Farrell, R. (2010). RNA methodologies. 4ªed. Ed. ELSEVIER. Pennsylvania State University York, PA.
- Flores, D. P., Flores, M. N., Franco, L. A., & Valey, M. (2016). *Bacterias transgénicas para el control de enfermedades transmitidas por vectores (trabajo de graduación).*
- Foss DL, Baarsch MJ, Murtaugh MP (1998) Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune

- cells and tissues. *Anim. Biotechnol.* 9: 67–78.
- Franz, A. W., Sanchez-Vargas, I., Adelman, Z. N., Blair, C. D., Beaty, B. J., James, A. A., & Olson, K. E. (2006). Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), 4198-4203.
- Gao, Z. H., Wei, J. H., Yang, Y., Zhang, Z., & Zhao, W. T. (2012). Selection and validation of reference genes for studying stress-related agarwood formation of *Aquilaria sinensis*. *Plant cell reports*, 31(9), 1759-1768.
- GeneCards. 2008. “RPL49 gene (Protein coding)”. En: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RPL19>. (Con acceso el 4 de abril de 2018)
- Gething PW, Van Boeckel TP, Smith DL, Guerra CA, Patil AP, Snow RW *et al.* Modelling the global constraints of temperature on transmission of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Parasites & Vectors*. 2011;4(1):92
- GeNorm. (2017). “GeNorm Software”. En: <https://genorm.cmgg.be/>. (Consultado el 8 de abril 2018)
- Gier, B. *et al.* (2017). Increase in imported malaria in the Netherlands in asylum seekers and VFR travellers. *Malaria Journal. Netherlands: BioMed Central*. 16:60. 8 págs.
- Giuliani, F. G. Giuliani, R. Bauer & C. Rabouille. (2013). Innexin 3, a new gene required for Dorsal Closure in *Drosophila Embryo*. *PLOS*. 8(7):16
- Gonzalez-Ceron, L., Rodriguez, M. H., Santillan, F. V., Hernandez, J. E., & Wirtz, R. A. (2000). Susceptibility of three laboratory strains of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein phenotypes in southern Mexico. *Journal of medical entomology*, 37(3), 331-334.
- Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH *et al.* The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010;4(8):e774 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2914753/pdf/pntd.0000774.pdf>, consultado el 8 de marzo de 2018).
- Grieco, J. P., Achee, N. L., Roberts, D. R., & Andre, R. G. (2005). Comparative susceptibility of three species of *Anopheles* from Belize, Central America, to *Plasmodium falciparum* (NF-54). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(3), 279-290.
- Grieco, J. P., Johnson, S., Achee, N. L., Masuoka, P., Pope, K., Rejmankova, E., ... & Roberts, D. (2006). Distribution of *Anopheles albimanus*, *Anopheles vestitipennis*, and *Anopheles crucians* associated with land use in northern Belize. *Journal of medical entomology*, 43(3), 614-622.
- Grillet, María-Eugenia, Martínez, Juan Eudes, & Barrera, Roberto. (2009). Focos calientes de transmisión de malaria: Implicaciones para un control orientado y efectivo en Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 49(2), 193-208. Recuperado en 05 de marzo de 2018, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482009000200003&lng=es&tlng=es.
- Hall, A. B., Qi, Y., Timoshevskiy, V., Sharakhova, M. V., Sharakhov, I. V., & Tu, Z. (2013). Six novel Y chromosome genes in *Anopheles* mosquitoes discovered by independently sequencing males and

- females. *BMC genomics*, 14(1), 273.
- Hay, S. I., Sinka, M. E., Okara, R. M., Kabaria, C. W., Mbithi, P. M., Tago, C. C., ... & Temperley, W. H. (2010). Developing global maps of the dominant Anopheles vectors of human malaria. *PLoS medicine*, 7(2), e1000209.
- Hemingway, J. *et al.* (2016). Tools and strategies for Malaria control and Elimination. What do we need to achieve a grand convergence in Malaria? *PLOS Biology*.
- Heinrichs, V., Ryner, L. C. & Baker, B. S. 1998. Regulation of Sex-Specific Selection of fruitless 5' Splice Sites by transformer and transformer-2. *Mol. Cell. Biol.* 18, 450–458.
- Hernández-García, J. L. (2005). ARN de interferencia y su importancia en la biomedicina molecular. *Bioquímica*, 30(4), 118-127.
- Hindson, C. M., Chevillet, J. R., Briggs, H. A., Gallichotte, E. N., Ruf, I. K., Hindson, B. J., ... & Tewari, M. (2013). Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature methods*, 10(10), 1003.
- Hoang, K., T. Min, T. Xuan, V. Le. Mechanisms of sex determination and transmission ratio distortion in *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*: 9: 49.
- Hoffmann, A.A., Montgomery, B.L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P.H., Muzzi, F., Greenfield, M., Durkan, M., Leong, Y.S., Dong, Y., Cook, H., Axford, J., Callahan, A.G., Kenny, N., Omodei, C., McGraw, E.A., Ryan, P.A., Ritchie, S.A., Turelli, M., O'Neill, S.L., 2011. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature* 476, 454–457.
- Howell, Paul I. y B. Knols. (2009). Male mating biology. *Malaria Journal*. 8 Suppl 2: S8.
- Huggett J, Bustin S (2011) Standardisation and reporting for nucleic acid quantification. *Accred Qual Assur* 16:399–405.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6:279–284
- Hughes, J. F., Skaletsky, H., Koutseva, N., Pyntikova, T., & Page, D. C. (2015). Sex chromosome-to-autosome transposition events counter Y-chromosome gene loss in mammals. *Genome biology*, 16(1), 104.
- Hume, J. C., Tunnicliff, M., Ranford-Cartwright, L. C., & Day, K. P. (2007). Susceptibility of *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* to tropical isolates of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 6(1), 139.
- Hwa, J. *et al.* (2002). Differential expression of the *Drosophila mitofusin (dmfn)* y *fuzzy onions (fzo)* genes. *Journal of Mechanisms of Development*. 116(2):213-216.
- International Atomic Energy Agency (IAEA). (2017). Sterile insect technique. Retrieved from <https://www.iaea.org/topics/sterile-insect-technique>
- Jardines, I. Q. (2001). *Malária: características generales y situación actual en Cuba y las Américas*. Cuba: Ministerio de Salud Pública de Cuba.
- Joiner, M. L. A., & Wu, C. F. (2004). Nervous system function for the testis RNA-binding protein boule in *Drosophila*. *Journal of Neurogenetics*, 18(1), 341–363. <https://doi.org/10.1080/01677060490477435>

- Joy, D. A., Gonzalez-Ceron, L., Carlton, J. M., Gueye, A., Fay, M., McCutchan, T. F., & Su, X. Z. (2008). Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. *Molecular biology and evolution*, 25(6), 1245-1252.
- Kemphues, K., Kaufman, T., Raff, R., & Raff, E. (1982). The testis-specific β -tubulin subunit in *Drosophila melanogaster* has multiple functions in spermatogenesis. *Cell*, 31(3), 655–670. Retrieved from [http://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(82\)90321-X.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286748290321X%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(82)90321-X.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286748290321X%3Fshowall%3Dtrue)
- Kiszewski, A., Mellinger, A., Spielman, A., Malaney, P., Sachs, S. E., & Sachs, J. (2004). A global index representing the stability of malaria transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(5), 486–498. <https://doi.org/70/5/486> [pii]
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of applied genetics*, 54(4), 391-406.
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of invertebrate pathology*, 132, 1-41.
- Lebbé, G. *et al.* (2012). Female specific Flightless (fsRIDL) Phenotype for Control of *Aedes albopictus*. *Oxford: PLoS Neglected Tropical Diseases*. 6(7):8 págs.
- Lees, R. S., Gilles, J. R., Hendrichs, J., Vreysen, M. J., & Bourtzis, K. (2015). Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 156-162.
- Liu, N. (2015). Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annual review of entomology*, 60, 537-559.
- Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Rudicell, R. S., Robertson, J. D., Keele, B. F., ... & Gonder, M. K. (2010). Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*, 467(7314), 420.
- Luzzatto, L. *et al.* (1968). Mechanism of action of streptomycin in *E. coli*: Interruption of the ribosome cycle at the initiation of protein synthesis. Department of Microbiology, Washington University. 873-880.
- Mallona I, Lischewski S, Weiss J, Hause B, Egea-Cortines M (2010) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biol* 10:4
- Mallona González, I. (2008). Selección de genes de normalización para RT-PCR cuantitativa en *Petunia Hybrida*.
- Mandal, F. B. (2015). *Human Parasitology*. PHI Learning Pvt. Ltd.
- Martínez, A. *et al.* (2010). Construcción de bibliotecas de ADNc y análisis de expresión génica por RT-PCR en agaves. *Revista Latinoamérica de Química*. 38(1):21-44.
- Martinsen, E.S., Paperna, I., Schall, J.J., 2006. Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: an exploration of three species concepts. *Parasitology* 133, 279–288
- Martinsen, E. S., Perkins, S. L., & Schall, J. J. (2008). A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Molecular*

- phylogenetics and evolution, 47(1), 261-273.
- McGlinchy, N. J., & Smith, C. W. (2008). Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense?. *Trends in biochemical sciences*, 33(8), 385-393.
- Melo, Virginia y O. Cuamatzi. (2007). *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Barcelona: Reverté. 406 págs.
- Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G., Pyke, A.T., Hedges, L.M., Rocha, B.C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., Hugo, L.E., Johnson, K.N., Kay, B.H., McGraw, E.A., van den Hurk, A.F., Ryan, P.A., O'Neill, S.L., 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139, 1268–1278.
- Moussa, A. *et al.* (2013). Environmental characteristics of anopheline mosquito larval habitats in a malaria endemic area in Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 6(7):510-515.
- Nadjm, B., & Behrens, R. (2012). Malaria: An update for physicians. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.010>
- Nakamura, A. M., Chahad-Ehlers, S., Lima, A. L. A., Taniguti, C. H., Sobrinho Jr, I., Torres, F. R., & De Brito, R. A. (2016). Reference genes for accessing differential expression among developmental stages and analysis of differential expression of OBP genes in *Anastrepha obliqua*. *Scientific reports*, 6, 17480.
- National Human Genome Research Institute. (2010). ARN (ácido ribonucleico). En: <https://www.genome.gov/glossary/index.cfm?id=180> [Consultado el 14/04/18].
- Noguez, R., I. Fernández, J. Cime-Castillo, E. Merino, R. Conde, S. Cabrera y H. Lanz. 2017. Nuevas estrategias de control vectorial: mosquitos transgénicos. *Sociedad Mexicana de entomología*. 3(3): 114-138.
- Noriega, D. *et al.* (2016). ARN de interferencia (ARNi): una tecnología novedosa con potencial para el control de insectos de plaga. *Journal of U.D.C.A. Act&Div. Cient.* 191(4):25-35.
- Ongvarrasopone, C., Roshorm, Y., & Panyim, S. (2007). A simple and cost effective method to generate dsRNA for RNAi studies in invertebrates. *ScienceAsia*, 33(1), 35–39.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). *World Malaria Report 2016*. Ginebra. Retrieved from <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/252038/1/9789241511711-eng.pdf?ua=1>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). *World Malaria Report 2017*. <https://doi.org/http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/en/>
- Papic, L. *et al.* (2015). Avances y limitaciones en el uso de los dsRNA como estrategias de control y prevención de enfermedades virales en sistemas acuícolas. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-560X2015000300001. [15/01/18].
- Passarge, E. (2009). *Genética: Texto y Atlas*. 3ªed. Ed. Médica Panamericana. Madrid. 486pp.
- Pfaffl MW, Hageleit M (2001) Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnol. Lett.* 23: 275–282.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 26(6), 509-515.

- Park, Y., Diez-Silva, M., Popescu, G., Lykotrafitis, G., Choi, W., Feld, M. S., & Suresh, S. (2008). Refractive index maps and membrane dynamics of human red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), 13730-13735.4
- Pinault, L. L., & Hunter, F. F. (2012). Characterization of larval habitats of *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles punctimacula*, and *Anopheles oswaldoi* s.l. populations in lowland and highland Ecuador. *Journal of Vector Ecology*, 37(1), 124–136. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2012.00209.x>
- Plachetka-Bożek, A., & Augustyniak, M. (2017). Evaluation of Candidate Reference Genes for Quantitative Gene Expression Analysis in *Spodoptera exigua* after Long-time Exposure to Cadmium. *Scientific Reports*, 7(1), 8338.
- Promega (2018). Rnasin Ribonuclease Inhibitors. Disponible en: https://worldwide.promega.com/products/rna-purification-and-analysis/rna-protection/rnasin-ribonuclease-inhibitor/?_ga=2.11853175.291670304.1538869738-912333160.1534702047&catNum=N2111 [Con acceso el 06/10/18].
- Promega. (2016). SV Total RNA Isolation System for Z3105, Z3100 y Z3101. Disponible en: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/sv-total-rna-isolation-system-protocol.pdf>. [Con acceso el 16/01/18].
- Promega. (2018). Technique Manual: GoScript Reverse Transcription System. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/goscript-reverse-transcription-system-protocol.pdf?la=en> [Con acceso el 06/10/18].
- Promega. (2018). SV Total RNA Isolation System. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/products/rna-purification-and-analysis/rna-purification/sv-total-rna-isolation-system/?catNum=Z3101> [Con acceso el 06/10/18].
- Qiao, L., Du, M., Liang, X., Hao, Y., He, X., Si, F., ... & Chen, B. (2016). Tyrosine hydroxylase is crucial for maintaining pupal tanning and immunity in *Anopheles sinensis*. *Scientific reports*, 6, 29835.
- Ramos, A. (2018). Determinación de perfil de expresión de genes homólogos de *bol* y *zpg* a lo largo del desarrollo de *Anopheles albimanus* (Wied), principal vector de malaria en Guatemala.
- Rey, J. R. (2006). The Mosquito. *Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, ENY-727*.
- Roca, W. & L. Mroginiski. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura. 1ªed. Ed. CIAT. Colombia. 969pp.
- Romero, R. 2007. Microbiología y parasitología humana. 3ªed. México: Médica Panamericana. 1802págs.
- Sagastume, M., Gobern, L., & Chávez, E. (2018). Semana epidemiológica 2018 Departamento de Epidemiología Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 1–13. Retrieved from [http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones 2016/SEMEPI/SEMEPI_42_2016.pdf](http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%2016/SEMEPI/SEMEPI_42_2016.pdf)
- Sánchez, I. 2010. El gen "Transformer-2" de *Sciara* (díptera, nematocera, sciaridae). Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 115.
- Salvemini, M., Mauro, U., Lombardo, F., Milano, A., Zazzaro, V., Arcà, B., ... Saccone, G. (2011). Genomic organization and splicing evolution of the doublesex gene, a *Drosophila* regulator of sexual

- differentiation, in the dengue and yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 41. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-41>
- Scali, C., Catteruccia, F., Li, Q., & Crisanti, A. (2005). Identification of sex-specific transcripts of the *Anopheles gambiae* doublesex gene. *The Journal of Experimental Biology*, 208(Pt 19), 3701–3709. <https://doi.org/10.1242/jeb.01819>
- Scharlaken, B., de Graaf, D. C., Goossens, K., Brunain, M., Peelman, L. J., & Jacobs, F. J. (2008). Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. *Journal of Insect Science*, 8(33), 1-10.
- Schmittgen, T., Zakrajsek, B., Mills, A., Gorn, V., Singer, M. & Reed, M. (2000). *Analytical Biochemistry* 285, 194204.
- Sinka, M. E., Rubio-Palis, Y., Manguin, S., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., ... & Hay, S. I. (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vectors*, 3(1), 72.
- Sinkins, S. 2016. Yob makes mosquitoes male: a gender-switch gene opens avenues to malaria control. *Science*, 353(6294): 33-34.
- Sino Biological. (2007). Vector pGEM-T: Sugerencia de información y uso (mapa del plásmido). Disponible en: <http://www.sinobiological.com/Vector-pGEM-T-a-1636.html> [Con acceso el 22/03/18]
- Smenziuk, C. *et al.* (2015). Bi-directional gap junction-mediated soma-germline communication is essential for spermatogenesis. *The Company of Biologist*. 142:2598-2609.
- Smith, R., Walter, M., Hice, R., O'Brochta, D., & Atkinson, P. (2007). Testis-specific expression of the beta2 tubulin promoter of *Aedes aegypti* and its application as a genetic sex-separation marker. *Insect Mol Biol.*, 16(1), 61–71. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17257209>
- Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y., & Hay, S. I. (2005). The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 434(7030), 214–217. <https://doi.org/10.1038/nature03342>
- Svec, D. *et al.* (2015). How good is a qPCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR. *Biomolecular Detection and Quantification* 3(205)9-16.
- Speranc, a, M.A., Capurro, M.L., 2007. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era – a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 425–433.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR (2000) Control selection for RNA quantitation. *BioTechniques* 29: 332–337.
- Sudhamalla, B., Kumar, M., Kumar, R. S., Sashi, P., Yasin, U. M., Ramakrishna, D., ... & Bhuyan, A. K. (2013). Enzyme dimension of the ribosomal protein S4 across plant and animal kingdoms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(11), 5335-5341.
- Thakore, Y., 2006. The biopesticides market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology* 2, 194-208.
- Tazuke, S. *et al.* (2002). A germline-specific gap junction protein required for survival of differentiating early germ cells. *New York:Development*. 129:2529-2539.

- Than, A. (2011). Effect of temperature on the Growth of *Escherichia coli* from water. Universities Research Journal. 4(2):163-171.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., ... & Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. Journal of biotechnology, 75(2), 291-295.
- Thermo Fisher Scientific. (2015). Poor Efficiency of PCR. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html> [Con acceso el 06/10/18].
- Thermo Fisher Scientific. (2015). What is UNG/UDG? Disponible en: <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/what-is-ung-udg.html> [Con acceso el 06/10/18].
- Thermo Fisher Scientific. (2016). PowerUp SYBR Green Master Mix. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-reagents/sybr-green-real-time-master-mixes/powerup-sybr-green-master-mix.html> [Con acceso el 05/10/18].
- Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RH. The genetics of RNA silencing. Annu Rev Genet 2002; 36: 489-512.
- Timmons, Lisa y A. Fire. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*. 395 (Octubre): 854.
- Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T. RNA interference in protozoan parasites. Cell Microbiol 2004; 6: 509-519.
- Universidad de Granada. (2005). Manipulación de la expresión. Disponible en: <https://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/expresion.htm> [Con acceso el 22/03/18].
- Universidad de Salamanca. 2010. Control de calidad de muestras de ADN y ARN. Disponible en: <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf> [Con acceso el 06/10/18]
- University of Minnesota. (2013). Strain information of *E. coli* HT115(DE3). Disponible en: [https://cgc.umn.edu/strain/HT115\(DE3\)](https://cgc.umn.edu/strain/HT115(DE3)). [15/01/18].
- Van Lijsebettens, M., Vanderhaeghen, R., De Block, M., Bauw, G., Villarroel, R., & Van Montagu, M. (1994). An S18 ribosomal protein gene copy at the Arabidopsis PFL locus affects plant development by its specific expression in meristems. The EMBO Journal, 13(14), 3378–3388.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome biology, 3(7), research0034-1.
- Verhulst, E., L. Zande, L. Beukeboom. 2010. Insect sex determination: it all evolves around transformer. Science direct, 20: 376-383.
- Vinueza-Burgos, C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria, 10(2), 1-13.
- Wang, Q., Ishikawa, T., Michiue, T., Zhu, B. L., Guan, D. W., & Maeda, H. (2012). Stability of endogenous reference genes in postmortem human brains for normalization of quantitative real-time PCR data: comprehensive evaluation using geNorm, NormFinder, and BestKeeper. International

- journal of legal medicine, 126(6), 943-952.
- Waterhouse PM, Wong MB, Lough T. Gene silencing as an adaptative defence against viruses. *Nature* 2001; 411: 834-842
- Whyard, S. *et al.* (2015). Silencing the buzz: a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs. *Parasites & Vectors* 8(96): 1-11. DOI: 10.1186/s13071-015-0716-6.
- Wilk, A. & Marelli, M. (2012). Genetic Control of Mosquitoes: population suppression strategies. *Rev. do Institute de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 54(5):287-92.
- Wilke, A., & Mt, M. (2011). *TRANSGENIC MOSQUITOES*.
- World Health Organ. (WHO). 2013. Malaria: core vector control methods. WHO, Geneva. http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/core_methods/en/
- World Health Organ. (WHO). 2013. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. WHO, Geneva. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80139/1/9789241505154_eng.pdf
- Woldearegai, T. G., Kremsner, P. G., Kun, J. F., & Mordmüller, B. (2013). Plasmodium vivax malaria in Duffy-negative individuals from Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(5), 328-331.
- Yamamoto, D. y M. Koganezawa. 2013. Genes and circuits of courtship behavior in Drosophila males. *Nature reviews*, 14: 681-692.
- ZGene Biotech. Inc. (2010). Principio de ARNi. Disponible en: <http://www.zgenebio.com.tw/sirna-21512251042638121209.html> [Con acceso el 22/03/18].
- Zhou, J., Sackton, T. B., Martinsen, L., Lemos, B., Eickbush, T. H., & Hartl, D. L. (2012). Y chromosome mediates ribosomal DNA silencing and modulates the chromatin state in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25), 9941–9946. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207367109>
- Zupancic, L. (2017). Understanding qPCR Efficiency and Why it can exceed 100%. Disponible en: <https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/> [Con acceso el 5/10/18].

XI. ANEXOS

Cuadro 40. Valores Ct de gen candidato *GAPDH*

Estadio	Cq Mean	Cq Error	Promedio réplicas	Desv. Est. Réplicas
L3R1	24.73	0.19	24.41	0.45
L3R2	24.09	0.11		
L3R3	25.31	0.09		
L4TempR1	23.29	0.25	23.14	0.21
L4TempR2	24.2	0.12		
L4TempR3	22.99	0.42		
L4TarR1	23.83	0.15	23.86	0.04
L4TarR2	22.68	0.18		
L4TarR3	23.88	0.1		
PHR1	24.73	0.15	23.99	0.21
PHR2	23.84	0.47		
PHR3	24.14	0.3		
PMR1	22.73	0.19	22.98	0.35
PMR2	23.23	0.18		
PMR3	24.13	0.76		
AHR1	24.3	0.12	24.43	0.18
AHR2	24.56	0.15		
AHR3	23.81	0.1		
AMR1	22.61	0.02	22.38	0.33
AMR2	24.14	0.06		
AMR3	22.15	0.25		

*Values in red we excluded from analysis of mean and standard deviation.

Cuadro 41. Valores Ct de gen candidato *RpS4*

Estadio	Cq Mean	Cq Error	Promedio réplicas	Desv. Est. Réplicas
L3R1	23.62	0.07	23.72	0.14
L3R2	23.82	0.15		
L3R3	25.11	0.13		
L4TempR1	23.71	0.08	23.43	0.40
L4TempR2	24.34	0.04		
L4TempR3	23.15	0.18		
L4TarR1	24.04	0.05	24.26	0.30
L4TarR2	22.96	0.08		
L4TarR3	24.47	0.13		
PHR1	24.82	0.09	23.75	0.16
PHR2	23.86	0.14		
PHR3	23.63	0.05		
PMR1	23.58	0.03	23.71	0.18
PMR2	23.84	0.15		
PMR3	24.62	0.09		
AHR1	24.9	0.15	25.15	0.35
AHR2	25.39	0.08		
AHR3	23.96	0.05		
AMR1	24.64	0.06	24.82	0.25
AMR2	26.33	0.08		
AMR3	24.99	0.1		

*Values in red we excluded from analysis of mean and standard deviation.

Cuadro 42. Valores Ct de gen candidato RpL49

Estadio	Cq Mean	Cq Error	Promedio réplicas	Desv. Est. Réplicas
L3R1	30.61	0.07	30.41	0.26
L3R2	30.12	0.13		
L3R3	30.49	0.29		
L4TempR1	29.92	0.1	30.24	0.45
L4TempR2	30.56	0.11		
L4TempR3	28.69	0.26		
L4TarR1	29.19	0.01	29.44	0.33
L4TarR2	29.31	0.3		
L4TarR3	29.81	0.16		
PHR1	29.42	0.29	29.38	0.06
PHR2	28.7	0.19		
PHR3	29.34	0.22		
PMR1	28.1	0.16	28.95	0.06
PMR2	28.91	0.23		
PMR3	28.99	0.02		
AHR1	29.48	0.28	29.65	0.24
AHR2	29.82	0.32		
AHR3	28.77	0.09		
AMR1	29.75	0.33	29.97	0.31
AMR2	31.7	0.01		
AMR3	30.19	0.35		

*Values in red we excluded from analisis of mean and standard deviation.

Cuadro 43. Valores Ct sin procesar de genes candidatos de todos los estadios de *A. albimanus*

RPL49 HKG 1	RpS4 HKG 2	GADPH HKG 3
30,61	23,62	24,73
30,12	23,82	24,09
30,49	25,11	25,31
29,92	23,71	23,29
30,56	24,34	24,2
28,69	23,15	22,99
29,19	24,04	23,83
29,31	22,96	22,68
29,81	24,47	23,88
29,42	24,82	24,73
28,7	23,86	23,84
29,34	23,63	24,14
28,1	23,58	22,73
28,91	23,84	23,23
28,99	24,62	24,13
29,48	24,9	24,3
29,82	25,39	24,56
28,77	23,96	23,81
29,75	24,64	22,61
31,7	26,33	24,14
30,19	24,99	22,15

Figura 78. Señalización del sitio de unión de los cebadores en la secuencia codificante de proteína ribosomal S4 (RpS4)

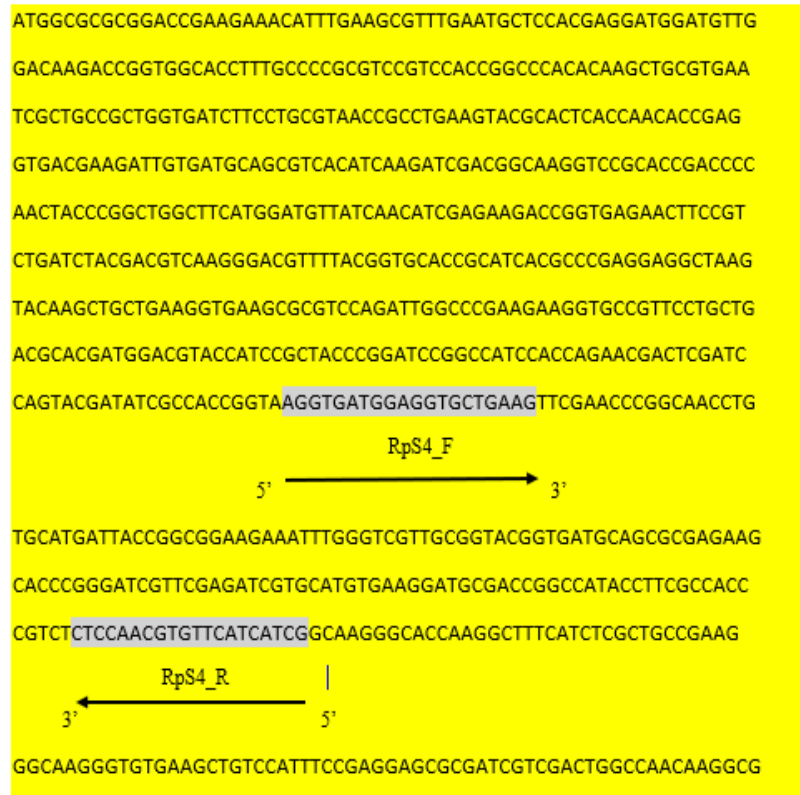


Figura 79. Señalización del sitio de unión de los cebadores en la secuencia codificante de proteína ribosomal L49 (RpL49)

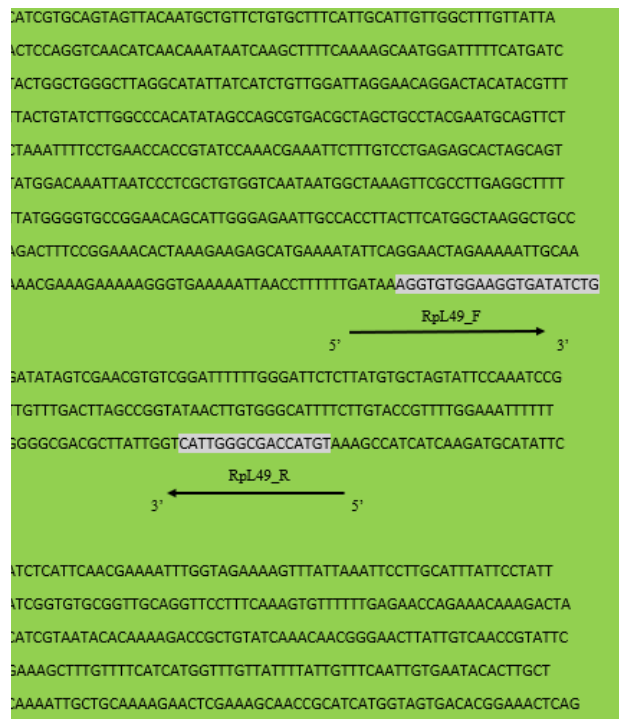
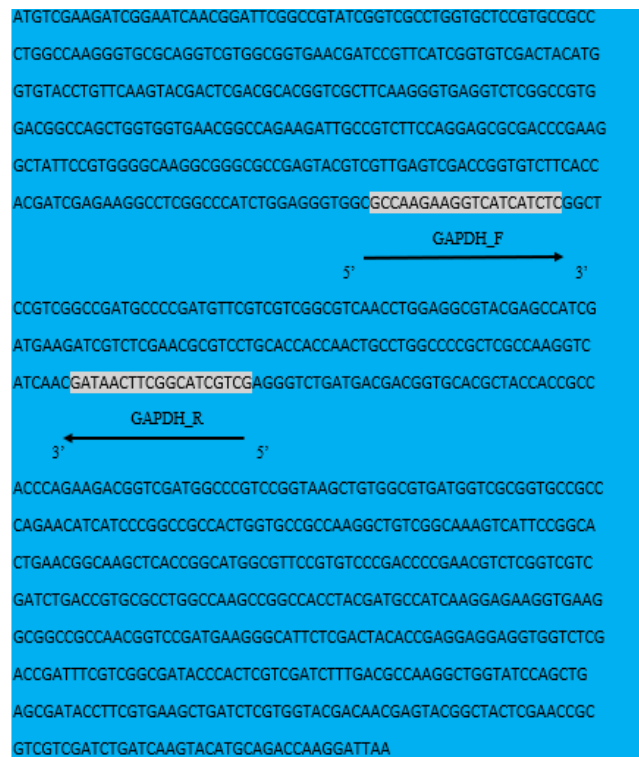


Figura 80. Señalización del sitio de unión de los cebadores en la secuencia codificante de proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)



Cuadro 44. Extracción de ARN de *Anopheles albimanus*. Se realizó la extracción de ARN de los estadios L3, L4 temprano, L4 tardío, pupa hembra, pupa macho, adulto hembra y adulto macho de *Anopheles albimanus*. Se realizaron 3 extracciones por réplica biológica para cada estadio, los resultados se muestran en el cuadro No 1.

Réplica	Estadio	A260/280	A260/230	Concentración ARN (ng/μL)	μL agregados para 1 μg
1	L3	2.16	1.29	450.4	2.22
	L4 temprano	2.15	2.10	296.4	3.37
	L4 tardío	2.11	2.00	134.9	7.41
	Pupa hembra	2.19	2.50	253.67	3.94
	Pupa macho	2.20	2.21	223.87	4.47
	Adulto hembra	2.17	2.35	593.10	1.69
	Adulto macho	2.10	1.86	144.23	6.93
2	L3	2.14	2.06	210.7	4.75
	L4 temprano	2.13	2.29	264.57	3.77
	L4 tardío	2.15	2.29	373.9	2.67
	Pupa hembra	2.19	1.89	186.6	5.35
	Pupa macho	2.19	1.89	157.1	6.36
	Adulto hembra	2.11	1.73	286.2	3.49
	Adulto macho	2.21	2.44	368.27	2.72
3	L3	2.13	2.25	261.80	3.82
	L4 temprano	2.06	2.37	208.67	4.79
	L4 tardío	2.01	1.18	299.23	3.34
	Pupa hembra	2.10	1.91	148	6.75
	Pupa macho	2.19	2.20	186.60	5.36
	Adulto hembra	2.24	2.20	447.33	2.24
	Adulto macho	2.19	1.57	218	4.59

La integridad del ARN extraído se evaluó mediante electroforesis, en un gel de agarosa al 1% (Figura 19 y 20).

Figura 81. Gel de agarosa al 1% de extracciones de ARN de *A. albimanus*. Se observan 4 bandas, correspondientes a los pesos moleculares 3000, 2000, 1500 y 900 pb. Los pozos del gel, a partir del 2, corresponden a cada réplica biológica realizada de cada estadio (L3, L4 temprano, L4 tardío, pupa hembra, pupa macho, adulto hembra y adulto macho).

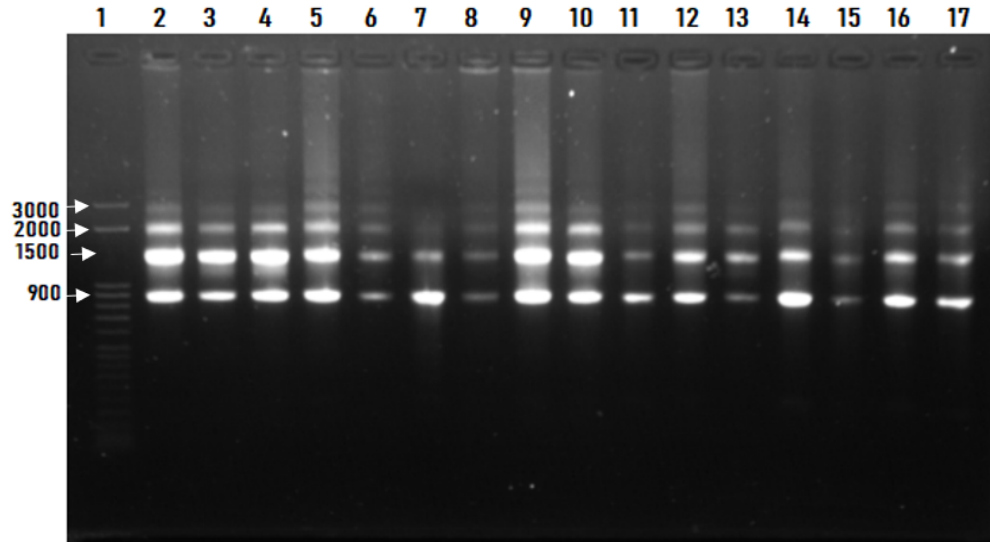


Figura 82. Gel de agarosa al 1% de extracciones de ARN de *A. albimanus*. Se observan 4 bandas, correspondientes a los pesos moleculares 3000, 2000, 1500 y 900 pb. Los pozos del gel, a partir del 2, corresponde a cada réplica biológica realizada de cada estadio (L3, L4 temprano, L4 tardío, pupa hembra, pupa macho, adulto hembra y adulto macho)

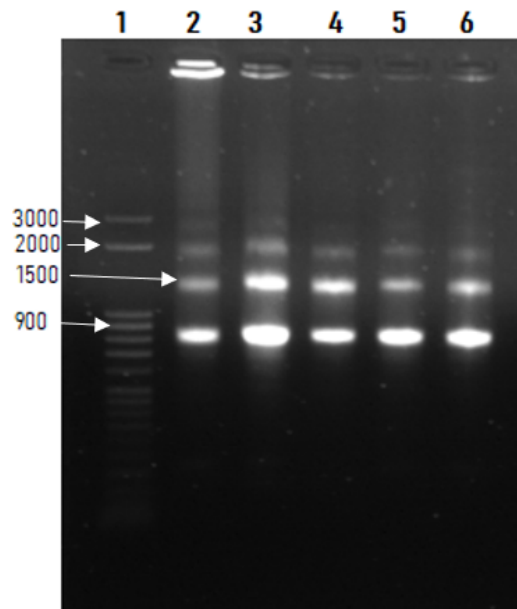


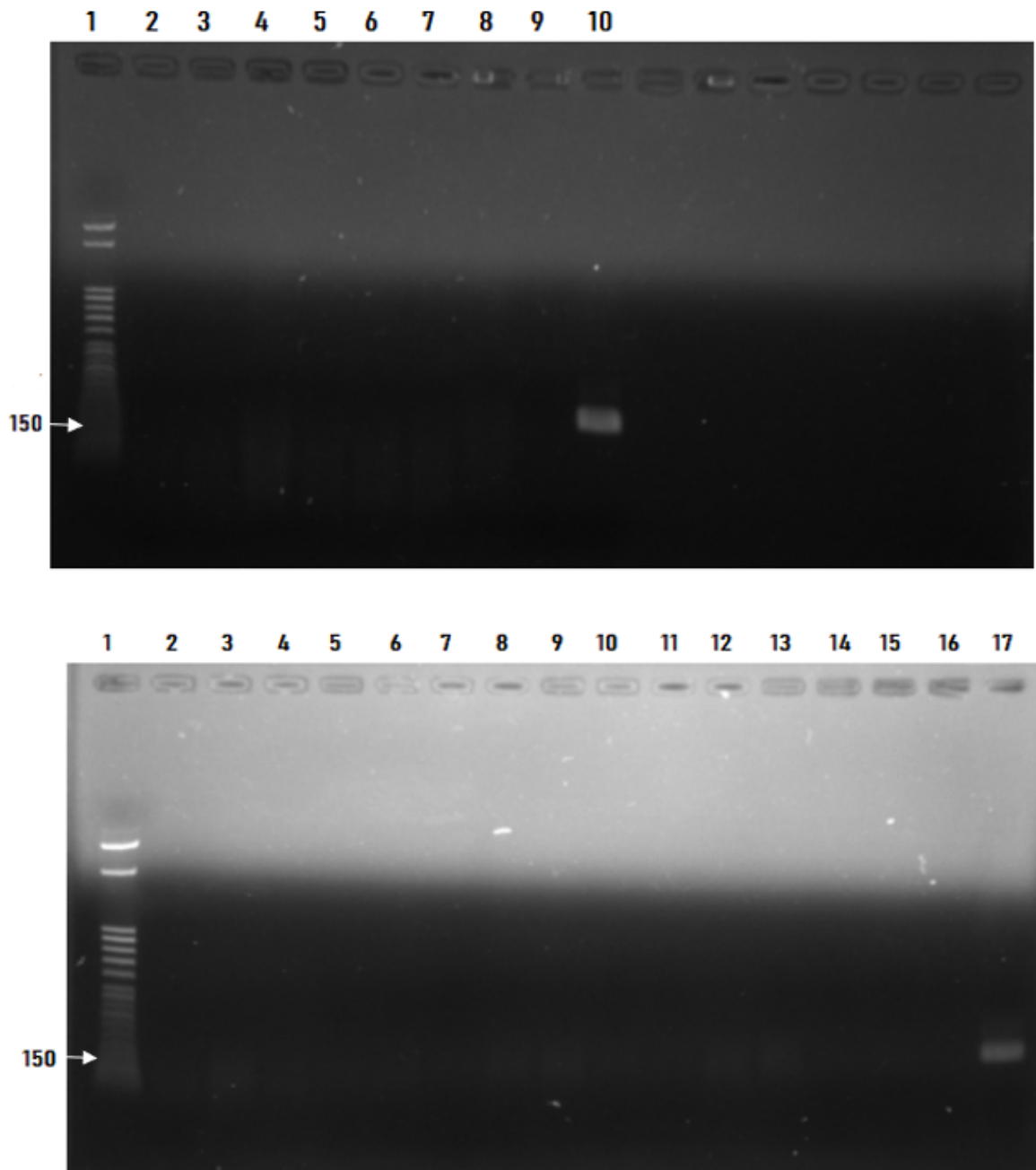
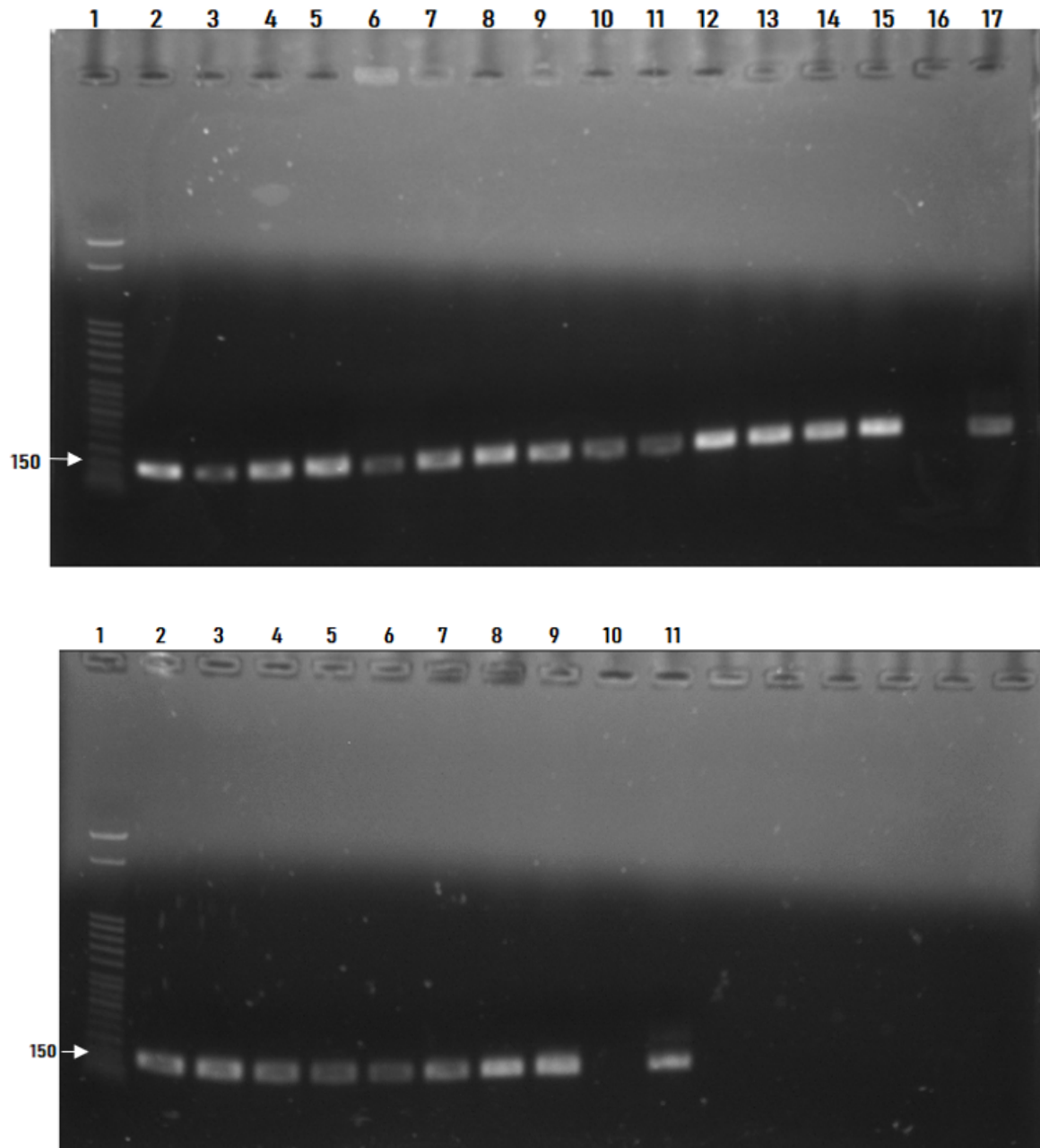
Figura 83. Tratamiento con ADNasas de muestras de ARN de los siete estadios del ciclo de vida de *A. albimanus*

Figura 84. Síntesis de ADNc de muestras con ARN libre de ADNAsas de los siete estadios del ciclo de vida de *A. albimanus*



POE Instalación y uso de Software NormFinder

Universidad del Valle de Guatemala. Laboratorio de Bioquímica & Microbiología	Procedimiento de operaciones estándar (POE)	POE: 1 Versión: Primera Fecha: 12/03/2018 Páginas Totales: 3
	Instalación y uso de Software NormFinder	Autores: María Elena Ortiz Osejo Preparado por: María Elena Ortiz Osejo

1. Propósito:

- 1.1 Identificar el mejor gen de referencia utilizando el software NormFinder
- 1.2 Aprender a interpretar los resultados del software NormFinder para elegir el mejor gen de referencia.

2. Aplicación

NormFinder es un algoritmo para la identificación del gen de referencia más óptimo entre un conjunto de candidatos. La clasificación del conjunto de genes de referencia depende de la estabilidad de expresión, debido a que, el algoritmo está arraigado a un modelo matemático de expresión genética y utiliza una estadística sólida para estimar la variación de la expresión de los genes de referencia, también, la variación de la expresión entre los subgrupos de muestras.

El software NormFinder es capaz de analizar datos de expresión genética obtenidos a través de cualquier método cuantitativo, por ejemplo, RT PCR en tiempo real y análisis de expresión basados en microarreglos. Los valores Ct de una prueba de RT PCR en tiempo real no se utilizan directamente, puesto que se usa una curva estándar o ΔCt , este método es para transformar los valores de Ct en cantidades de expresión genética en una escala lineal.

3. Referencias

- 3.1 Documentation for NormFinder. Version 20. May 2010. En: <https://moma.dk/files/Normfinder%20documentation-v20.pdf>

4. Terminología y abreviaciones

- 4.1 RT-PCR: Retro transcripción de reacción en cadena de polimerasa
- 4.2 Ct: cycle threshold

5. Principio

- 5.1 Es un algoritmo estadístico que se ha desarrollado para evaluar la idoneidad de los genes de referencia. NormFinder es una aplicación visual básica, que también asigna un valor de estabilidad que clasifica los genes usando un enfoque basado en modelos. En lugar de analizar la expresión de todo el conjunto de datos, como es el caso de GeNorm (otro software para el análisis de genes de referencia), este programa se centra en la expresión inter e intragrupo de los genes de referencia candidatos mediante el cálculo de la variación de los valores de Ct

6. Documentos asociados:

- 6.1 Nakamura, A. M., Chahad-Ehlers, S., Lima, A. L. A., Taniguti, C. H., Sobrinho Jr, I., Torres, F. R., & De Brito, R. A. (2016). Reference genes for accessing differential expression among developmental stages and analysis of differential expression of OBP genes in *Anastrepha obliqua*. *Scientific reports*, 6, 17480.

7. Seguridad:

N.A

8. Equipos, materiales y reactivos:

8.1 Equipos

8.1.1 Computadora

8.2 Materiales

8.2.1 Software NormFinder instalado

8.3 Reactivos

N.A

9. Procedimiento

- 9.1 Instalación de Software NormFinder: Abrir Excel y Seleccione el archivo "NormFinder_0953.xla" que descargó de mdl.dk. Haga doble clic para agregar NormFinder a la pestaña Complementos en Excel. Dependiendo de su configuración de seguridad, es posible que deba permitir el complemento en la Configuración de seguridad (configuración de Inicio - Excel). Comience NormFinder y acepte descargar el software de responsabilidad para usarlo.
- 9.2 El método matemático aplicado en NormFinder requiere el análisis de un mínimo de 3 genes y un mínimo de 2 muestras por grupo. En general, recomendamos el análisis de 5-10 genes candidatos y al menos 8 muestras por grupo.

- 9.3 Para evaluar la estabilidad de expresión de los genes de normalización candidatos, abra el archivo con su entrada datos. Los datos de entrada deben organizarse con la primera columna que contiene los nombres de los genes, y la primera fila que contiene los nombres de muestra. Si es apropiado, la última fila debe contener el grupo de muestra identificadores, que se supone que son enteros.
 - 9.4 Luego seleccione "NormFinder" en la barra de menú. Use el cuadro de diálogo para seleccionar los datos de entrada. A continuación, compruebe los campos "Nombres de muestra", "Nombres de genes", "Identificador de grupo", "datos de transformación de registro" y "Salida simple solamente" según corresponda. Se supone que los datos están en una escala lineal. Si sus datos ya están logarítmicamente transformados (base natural (e) logaritmo) esto también es aceptable, si desmarca el campo "registrar datos transformados". Finalmente, indique si se desea una salida simple o extendida.
 - 9.5 La salida simple proporciona al usuario: Un valor de estabilidad para cada gen candidato. El mejor gen con el menor valor de estabilidad es resaltado. MDL, NormFinder Documentación. La mejor combinación de dos genes para un factor de normalización de dos genes (solo si los identificadores de grupo se incluyeron).
 - 9.6 Un valor de estabilidad para la mejor combinación de dos genes (solo si se incluyeron los identificadores de grupo).
 - 9.7 La salida extendida proporciona el error estándar del valor de estabilidad (solo si no se incluyeron los identificadores de grupo). Las variaciones intragrupalas estimadas para cada gen y para cada grupo (solo si se identificaron los grupos incluido). Las variaciones intergrupales estimadas para cada gen (solo si se incluyeron los identificadores de grupo).
10. **Cálculos:**
N.A
 11. **Control de calidad:**
N.A
 12. **Reporte de datos y documentos utilizados**
 13. **Reporte**

Datos crudos de la optimización del método de producción de ARNdh en *A. albimanus*

Cuadro 45. Concentraciones de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de incubación a 100°C por 1 hora

Método	Muestra	Concentración (ng/uL)	A60/280	A260/230	Concentración de ARNdh a alimentar (ng)
Después de 2h de inducir con IPTG	ANT 1	255.10	1.93	1.51	4081.6
	ANT 1.1	746.80	1.99	2.02	11948.8
	BOULE 1	909.00	2.01	1.61	14544
	BOULE 1.1	519.30	1.93	1.51	8308.8
	ZPG 1	971.00	2.00	1.93	15536
	ZPG 1.1	333.30	2.02	1.84	5332.8
Después de segundo lavado con PBS	ANT 2	597.50	1.97	1.65	9560
	ANT 2.2	371.50	1.97	1.74	5944
	BOULE 2	1538.80	1.99	1.96	24620.8
	BOULE 2.2	730.40	1.93	0.89	11686.4
	ZPG 2	1491.70	2.05	1.70	23867.2
	ZPG 2.2	982.00	2.03	1.61	15712
Después de tercer lavado con PBS	ANT 3	895.20	1.95	0.96	14323.2
	ANT 3.3	1094.50	1.99	1.31	17512
	BOULE 3	1041.40	2.03	1.86	16662.4
	BOULE 3.3	411.50	2.02	1.41	6584
	ZPG 3	356.40	1.99	0.63	5702.4
	ZPG 3.3	1253.20	1.84	1.83	20051.2
Después de inactivar 250uL de medio + 125uL de TRIzol	ANT 4	161.90	1.54	0.64	2590.4
	ANT 4.4	11.80	1.49	0.48	188.8
	BOULE 4	59.70	1.47	0.45	955.2
	BOULE 4.4	110.20	1.49	0.38	1763.2
	ZPG 4	88.00	1.47	0.42	1408
	ZPG 4.4	45.70	1.44	0.48	731.2

Continúa cuadro 45...

Continuación cuadro 45:

Método	Muestra	Concentración (ng/uL)	A60/280	A260/230	Concentración de ARNdh a alimentar (ng)
Después de inactivar 250uL de medio + 750uL de TRIzol	ANT 5	29.10	1.44	0.68	465.6
	ANT 5.5	19.60	1.41	0.45	313.6
	BOULE 5	36.60	1.46	0.23	585.6
	BOULE 5.5	21.30	1.42	0.40	340.8
	ZPG 5	39.50	1.42	0.35	632
	ZPG 5.5	39.50	1.43	0.37	632
Después de inactivar 250uL de medio + 750uL de TRIzol y centrifugar	ANT 6	28.50	1.42	0.61	456
	ANT 6.6	19.50	1.41	0.56	312
	BOULE 6	22.70	1.42	0.66	363.2
	BOULE 6.6	18.00	1.41	0.39	288
	ZPG 6	16.50	1.41	0.64	264
	ZPG 6.6	31.40	1.41	0.64	502.4

Cuadro 46. Concentraciones de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de incubación a 70°C por 1 hora y 30 minutos, incubación con estreptomycin y ebullición por 5 minutos.

Método utilizado	Muestra	Concentración (ng/uL)	A260/280	A260/230	Concentración de ARNdh a alimentar	Promedio	DES V
Después de inducir 2h	1A	522.1	2.04	0.68	8353.6	6874.4	2091.90
	1B	337.2	2.04	0.72	5395.2		
Después de lavados	2A	231.7	1.97	0.48	3707.2	5160	2054.56
	2B	413.3	2.07	1.28	6612.8		
70°C x 30 min	3A	40.6	1.49	0.14	649.6	792	201.38
	3B	58.4	1.47	0.18	934.4		
70°C x 1h	4A	91.2	1.52	0.11	1459.2	819.2	905.09
	4B	11.2	1.5	0.05	179.2		
Heat shock	5A	376.6	1.96	0.52	6025.6	3536	3520.82
	5B	65.4	1.79	0.21	1046.4		
Strep pellet	6A	159.3	1.77	0.16	2548.8	4240	2391.71
	6B	370.7	2.19	1.29	5931.2		
Strep sobrenadante	7A	26.9	1.52	0.12	430.4	1098.4	944.69
	7B	110.4	1.54	0.16	1766.4		
Strep después de lavados	8A	290.2	1.98	0.66	4643.2	5444.8	1133.63
	8B	390.4	1.96	0.75	6246.4		

Cuadro 47. Concentraciones de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de ebullición a 10 minutos con diferentes tiempos de centrifuga.

Muestra	Concentración (ng/ul)	A260/280	A260/230	Concentración de ARNdh en 200uL(ng)
---------	-----------------------	----------	----------	-------------------------------------

Después de inducir	186.8	2.04	1.96	2988.8
Después de inducir	244.5	2.05	2.39	3912
Después de inducir	125.2	2.01	2.12	2003.2
Después de lavados (centrifugación 10min)	254.3	2.04	2.2	4068.8
Después de lavados (centrifugación 10min)	488.9	2.03	2.29	7822.4
Después de lavados (centrifugación 10min)	376.5	2	2.33	6024
Después de lavados (centrifugación 5 min)	226.3	2.03	1.98	3620.8
Después de lavados (centrifugación 5 min)	443.1	2.02	2.1	7089.6
Después de lavados (centrifugación 5 min)	322.7	2.01	1.71	5163.2
Inactivación por ebullición 10 min (centrifugación de 10 min)	206	1.95	1.32	3296
Inactivación por ebullición 10 min (centrifugación de 10 min)	135.1	2.01	1.31	2161.6
Inactivación por ebullición 10 min (centrifugación de 10 min)	165.4	1.99	2.22	2646.4
Inactivación por ebullición 10 min (centrifugación de 5 min)	153.1	1.94	2.1	2449.6
Inactivación por ebullición 10 min (centrifugación de 5 min)	160.3	2.01	1.62	2564.8
Inactivación por ebullición 10 min (centrifugación de 5 min)	259.9	2.04	1.86	4158.4

Cuadro 48. Concentración de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de ebullición a 15 minutos con freidora

Muestra	Concentración (ng/uL)	A260/280	A260/230	Concentración de ARNdh a alimentar (ng)	Promedio	DESV
Después de inducir 2h con IPTG						
Boule 1A	426.8	2.04	2.47	6828.8	6326.93	1074.98
Boule 1B	441.2	2.08	2.11	7059.2		
Boule 1C	318.3	2.05	2.3	5092.8		
ZPG 1A	230.5	2.01	2.55	3688.0	3674.66	156.42
ZPG 1B	239	2.03	1.85	3824.0		
ZPG 1C	219.5	2.02	2.26	3512.0		
ANT 1A	109.0	1.99	0.84	1744.0	4172.80	2147.30
ANT 1B	309.7	2.02	1.55	4955.2		
ANT 1C	363.7	2.03	2.4	5819.2		
ANT 2B	113.8	1.91	2.12	1820.8		
ANT 2C	376	2.02	2.07	6016.0		

Boule 2A	214.3	2	2.33	3428.8	4319.46	2142.09
Boule 2B	422.7	2.07	1.75	6763.2		
Boule 2C	172.9	1.98	2.43	2766.4		
ZPG 2A	314	2.05	1.52	5024	4180.80	1258.35
ZPG 2B	299	2.04	2.11	4784		
ZPG 2C	170.9	2	2.29	2734.4		
ANT 2A	422.2	2.08	2.09	6755.2	4864.00	2661.27

Cuadro 49. Concentración de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de ebullición a 15 minutos con freidora y concentrando más el ARNdh, suspendiendo a la mitad del volumen inicial con agua ultrapura (Fue el alimento que se utilizó para alimentar a las larvas de *A. albimanus*)

Tratamiento	No. muestra	Concentración ng/uL	A 260/280	A 260/230	Promedio [ng/uL]	A dar en 200uL (ng)
HT115	A1	354.10	2.05	1.67	404.43	6470.93
HT115	A2	453.20	2.08	1.82		
HT115	A3	406.00	2.05	1.75		
HT115	B1	336.10	2.05	1.20	388.47	6215.47
HT115	B2	550.90	2.04	1.85		
HT115	B3	278.40	2.05	1.92		
ANT	A1	377.40	2.01	1.15	296.40	4742.40
ANT	A2	311.70	2.01	1.44		
ANT	A3	200.10	1.97	1.79		
ANT	B1	456.30	2.08	2.18	544.03	8704.53
ANT	B2	402.80	2.10	1.79		
ANT	B3	773.00	2.02	1.88		
BOULE	A1	134.80	1.98	1.81	181.63	2906.13
BOULE	A2	217.00	2.04	1.42		
BOULE	A3	193.10	1.92	1.36		
BOULE	B1	776.00	2.10	1.46	635.00	10160.00
BOULE	B2	389.60	2.09	1.85		
BOULE	B3	739.40	2.07	2.06		
ZPG	A1	193.10	1.98	2.03	192.30	3076.80
ZPG	A2	141.80	2.00	1.43		
ZPG	A3	242.00	2.01	1.78		
ZPG	B1	407.00	2.08	2.10	760.53	12168.53
ZPG	B2	838.50	2.04	1.76		
ZPG	B3	1036.10	2.05	1.60		

Figura 85. Estadística descriptiva sobre los diferentes métodos utilizados para la inactivación de la bacteria productora de ARNd_h en BOULE (Realizado con R versión 3.3.2)

```
> arndh <- read.table(pipe("pbpaste"), sep="\t", header=TRUE)
> bartlett.test(Concentracion~Metodo,data=arndh)

Bartlett test of homogeneity of variances

data:  Concentracion by Metodo
Bartlett's K-squared = 10.202, df = 7, p-value = 0.1774

> shapiro.test(arndh$Concentracion)

Shapiro-Wilk normality test

data:  arndh$Concentracion
W = 0.91036, p-value = 0.07515

> aov_arndh <- aov(Concentracion~Metodo, data=arndh)
> summary(aov_arndh)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Metodo     7 151004   21572   1.982  0.149
Residuals 11 119749   10886
```

La prueba de homogeneidad de varianzas (Bartlett) demostró una significancia mayor a 0.05 por lo que no se rechaza la hipótesis nula y se demuestra que los datos son homogéneos. La prueba de distribución normal mostró una significancia mayor a 0.05, por lo que no se rechaza la hipótesis nula y se demuestra que los datos vienen de poblaciones normalmente distribuidas. El ANOVA de un factor demuestra que no hubo una diferencia significativa entre los distintos, ya que el valor de p fue mayor a 0.05, por lo que no se rechaza la hipótesis nula.

Figura 86. Estadística descriptiva sobre la concentración de ARNd_h antes y después de la inactivación de la bacteria por ebullición por 15 min y concentrando el ARNd_h de los distintos tratamientos (Realizado en Excel 2017)

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	6	2378.7	396.45	9307.603
Fila 2	6	2521.3	420.216667	37624.38167
Fila 3	6	2449.9	408.316667	80577.83367
Fila 4	6	2858.5	476.416667	139271.2537

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variacna de cuadrac	Grados de libertad	Suma de los cuac	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3	7519	0.112736634	0.95163337	3.098391212
Dentro de los	20	66695.268			
Total		1356462.36	23		

Debido a que el $F <$ valor crítico, no se rechaza H_0 , por lo que no hay diferencia significativa entre tratamiento antes y después de inducir.

A. Evaluación de cebadores de *zpg* de *A. albimanus* mediante qPCR

Cuadro 50. Concentración de ARN total extraído de la primera réplica biológica de un grupo de 5 pupas macho.

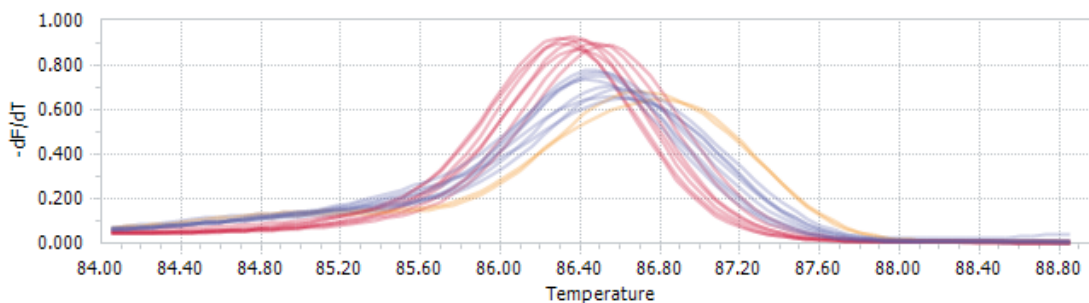
Muestra	Concentración ARN (ng/ul)	A 260/280	A 260/230
ZPG 1	223.1	2.19	2.14
	267.5	2.19	2.02
	264.6	2.20	2.16
ZPG 2	197.0	2.20	2.20
	189.3	2.19	2.09
	198.1	2.19	2.18
Boule 1	211.2	2.19	2.12
	207.9	2.2	2.14
	193.9	2.19	1.90
Boule 2	234.3	2.19	1.90
	209.4	2.18	1.91
	231.3	2.19	1.95
BZ 1	218.4	2.19	2.20
	231.6	2.19	2.18
	233.2	2.18	2.18
BZ 2	180.7	2.17	2.17
	205.2	2.18	2.20
	185.2	2.18	2.18
ANT 1	243.7	2.19	2.19
	247.0	2.18	2.13
	245.9	2.18	2.07
ANT 2	209.0	2.18	1.68
	217.3	2.18	1.66
	220.0	2.17	1.64
HT115 1	89.2	2.16	1.43
	91.2	2.13	1.32
	94.5	2.14	1.43
HT115 2	264.0	2.19	1.97
	260.8	2.19	1.87
	271.3	2.20	1.98
ABC 1	223.4	2.18	2.02
	212.4	2.18	2.28
	185.4	2.18	2.27
ABC 2	164.1	2.26	2.01
	178.9	2.16	2.05
	174.0	2.16	2.10
Cereal 1	190.9	2.18	1.68
	159.9	2.18	2.00
	153.8	2.19	1.68
Cereal 2	217.5	2.18	2.07
	228.1	2.18	2.10
	232.6	2.20	2.10

*Para cada réplica biológica se realizó un duplicado, sin embargo para el presente módulo sólo se utilizó el duplicado 1, a excepción de la muestra HT115, que se utilizó el duplicado 2.

Cuadro 51. Datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de ZPG 0.4uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.

Muestra	Gen	Cq	Promedio Cq	Error Cq
PM 1:10	ZPG	30.52	30.83	0.51
PM 1:10	ZPG	31.42	30.83	0.51
PM 1:10	ZPG	30.54	30.83	0.51
PM 1:25	ZPG	31.49	31.55	0.2
PM 1:25	ZPG	31.39	31.55	0.2
PM 1:25	ZPG	31.77	31.55	0.2
PM 1:50	ZPG	32.22	32.18	0.06
PM 1:50	ZPG	32.12	32.18	0.06
PM 1:50	ZPG	32.21	32.18	0.06
PM 1:100	ZPG	32.74	32.98	0.44
PM 1:100	ZPG	32.71	32.98	0.44
PM 1:100	ZPG	33.48	32.98	0.44
PM 1:250	ZPG	33.29	33.58	1
PM 1:250	ZPG	32.76	33.58	1
PM 1:250	ZPG	34.7	33.58	1
PM 1:500	ZPG	34.92	34.86	0.09
PM 1:500	ZPG	-	-	-
PM 1:500	ZPG	34.79	34.86	0.09

Figura 87. Curva de fusión de los cebadores de zpg a una concentración de 0.4uM



Cuadro 52. Datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de zpg 0.3uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.

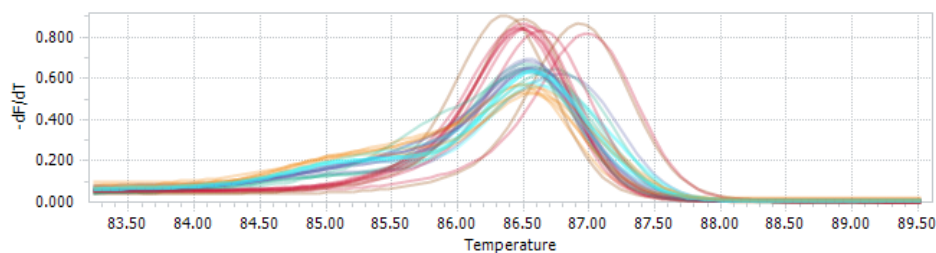
Muestra	Gen	Cq	Promedio Cq	Error Cq
PM 1:10 0.3uM	ZPG	32.63	31.88	0.65
PM 1:10 0.3uM	ZPG	31.52	31.88	0.65
PM 1:10 0.3uM	ZPG	31.48	31.88	0.65
PM 1:25 0.3uM	ZPG	32.48	32.49	0.11
PM 1:25 0.3uM	ZPG	32.61	32.49	0.11

PM 1:25 0.3uM	ZPG	32.39	32.49	0.11
PM 1:50 0.3uM	ZPG	32.9	33.06	0.25
PM 1:50 0.3uM	ZPG	33.35	33.06	0.25
PM 1:50 0.3uM	ZPG	32.93	33.06	0.25
PM 1:100 0.3uM	ZPG	33.86	34.4	0.83
PM 1:100 0.3uM	ZPG	35.35	34.4	0.83
PM 1:100 0.3uM	ZPG	33.98	34.4	0.83
PM 1:250 0.3uM	ZPG	35.27	35.29	0.02
PM 1:250 0.3uM	ZPG	35.3	35.29	0.02
PM 1:250 0.3uM	ZPG	-	-	-
PM 1:500 0.3uM	ZPG	-	-	-
PM 1:500 0.3uM	ZPG	35.22	35.22	0
PM 1:500 0.3uM	ZPG	-	-	-

Cuadro 53. Datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de *zpg* 0.6uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.

Muestra	Gen	Cq	Promedio Cq	Error Cq
PM 1:10 0.6uM	ZPG	34.25	33.37	0.82
PM 1:10 0.6uM	ZPG	32.62	33.37	0.82
PM 1:25 0.6uM	ZPG	33.25	33.06	0.57
PM 1:25 0.6uM	ZPG	32.42	33.06	0.57
PM 1:25 0.6uM	ZPG	33.51	33.06	0.57
PM 1:50 0.6uM	ZPG	34.06	33.08	0.86
PM 1:50 0.6uM	ZPG	32.43	33.08	0.86
PM 1:50 0.6uM	ZPG	32.76	33.08	0.86
PM 1:100 0.6uM	ZPG	35.26	34.21	1.05
PM 1:100 0.6uM	ZPG	34.21	34.21	1.05
PM 1:100 0.6uM	ZPG	33.17	34.21	1.05
PM 1:250 0.6uM	ZPG	33.28	33.49	0.2
PM 1:250 0.6uM	ZPG	33.51	33.49	0.2
PM 1:250 0.6uM	ZPG	33.68	33.49	0.2
PM 1:500 0.6uM	ZPG	-	-	-
PM 1:500 0.6uM	ZPG	-	-	-
PM 1:500 0.6uM	ZPG	34.9	34.9	0

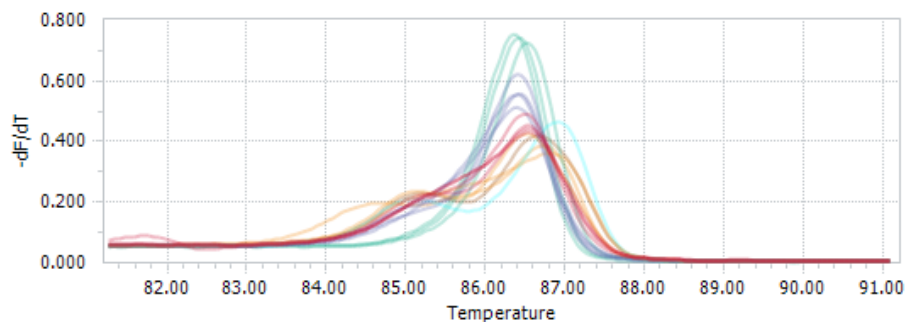
Figura 88. Curva de fusión de los cebadores de *zpg* a una concentración de 0.6 y 0.3uM



Cuadro 54. Datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de *zpg* 0.2uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.

Muestra	Gen	Cq	Promedio Cq	Cq Error
1:10	ZPG	31.78	31.42	0.47
1:10	ZPG	31.59	31.42	0.47
1:10	ZPG	30.88	31.42	0.47
1:25	ZPG	31.93	31.94	0.01
1:25	ZPG	31.95	31.94	0.01
1:25	ZPG	31.94	31.94	0.01
1:50	ZPG	32.16	32.12	0.45
1:50	ZPG	31.65	32.12	0.45
1:50	ZPG	32.55	32.12	0.45
1,100	ZPG	33.6	33.67	0.48
1,100	ZPG	33.23	33.67	0.48
1,100	ZPG	34.19	33.67	0.48
1,250	ZPG	35.06	34.56	0.45
1,250	ZPG	34.19	34.56	0.45
1,250	ZPG	34.42	34.56	0.45
1,500	ZPG	-	-	-
1,500	ZPG	35.13	35.13	0
1,500	ZPG	-	-	-

Figura 89. Curva de fusión de los cebadores de *zpg* a una concentración de 0.2uM

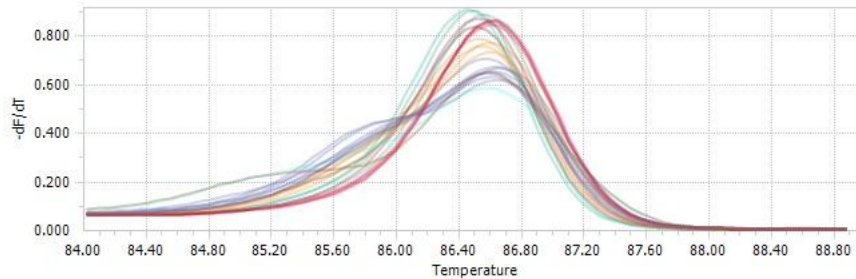


Cuadro 55. Resumen de los datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de *zpg* 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante, usando dilución 1:25, 1:50, 1:100, 1:2

Resumen	Cebador					
	ZPG		RPL49		RpS4	
	Mean	Des.Est.	Mean	Des.Est.	Mean	Des.Est.
ZPG 1.1	32.975	0.275772	26.44	0.14	20.94	0.2
BZ 1.1	32.9	0.31	26.07	0.09	21.54	0.05
ANT 1.1	32.34	0.15	25.97	0.11	20.44	0.09

HT 1.1	33.46	0.480833	25.93	0.09	21.52	0.09
ABC 1:25	33	0.41	26.12	0.04	20.65	0.16
ABC 1:50	33.125	0.091924	26.52	0.12	21.34	0.04
ABC 1:100	33.65	0.39	27.27	0.06	22.08	0.08
ABC 1:250	34.4	0	28.48	0.18	23.43	0.06
ABC 1:500	0	0	29.46	0.26	24.32	0.07

Figura 90. Curva de fusión de los cebadores de *zpg* a una concentración de 0.3 μ M con el método de Curva Estándar Relativa



Cuadro 56. Resumen de los datos crudos del C_q obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de *zpg* 0.3 μ M con el método de Curva Estándar Relativa bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante, usando dilución 1:10, 1:25, 1

Resumen	Primer					
	ZPG		RPL49		RpS4	
	Mean	Des.Est.	Mean	Des.Est.	Mean	Des.Est.
ZPG 1.1	33.240	0.250	26.600	0.050	20.890	0.030
BZ 1.1	32.460	0.580	26.180	0.050	21.610	0.030
ANT 1.1	32.790	0.320	25.830	0.060	20.460	0.060
HT 1.1	33.415	0.262	25.670	0.030	21.250	0.110
ABC 1:10	31.490	0.190	25.190	0.070	19.885	0.092
ABC 1:25	32.770	0.350	26.180	0.040	21.010	0.240
ABC 1:50	32.905	0.007	26.630	0.110	21.490	0.150
ABC 1:75	34.740	1.470	27.040	0.010	21.790	0.110
ABC 1:100	33.645	0.516	27.320	0.060	22.270	0.080

Figura 91. Curva de fusión de los cebadores de *zpg* a una concentración de 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa de una dilución de 1:25 a 1:250

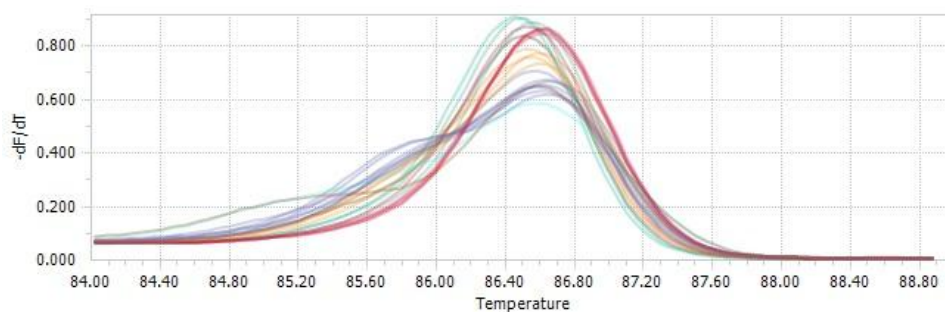
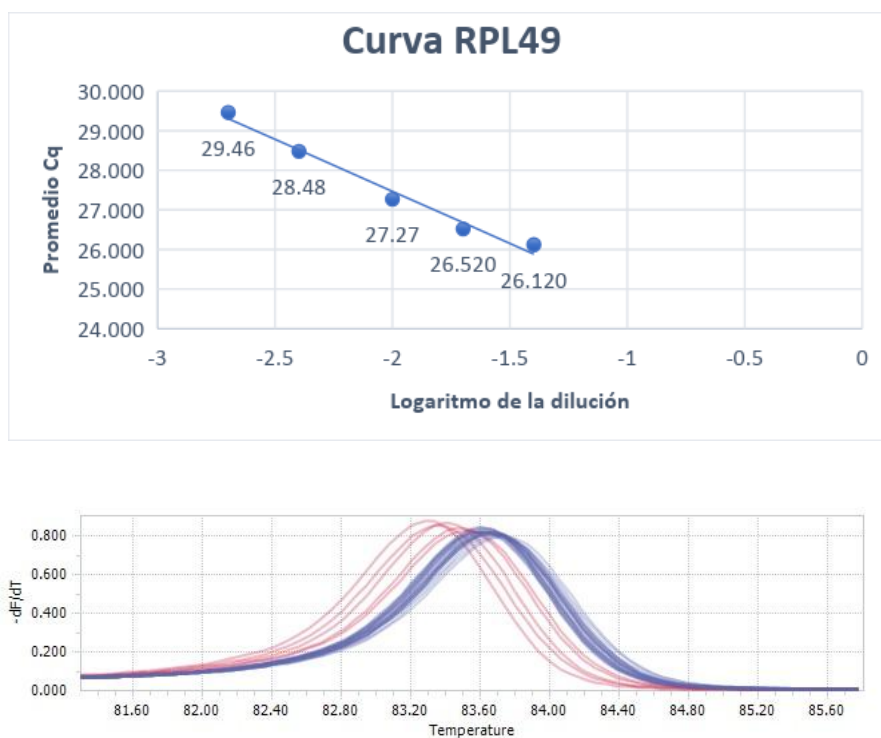


Figura 92. Curva estándar y de fusión de cebadores de genes de referencia (*RpS4* y *RpL49*) a una concentración de 0.33uM



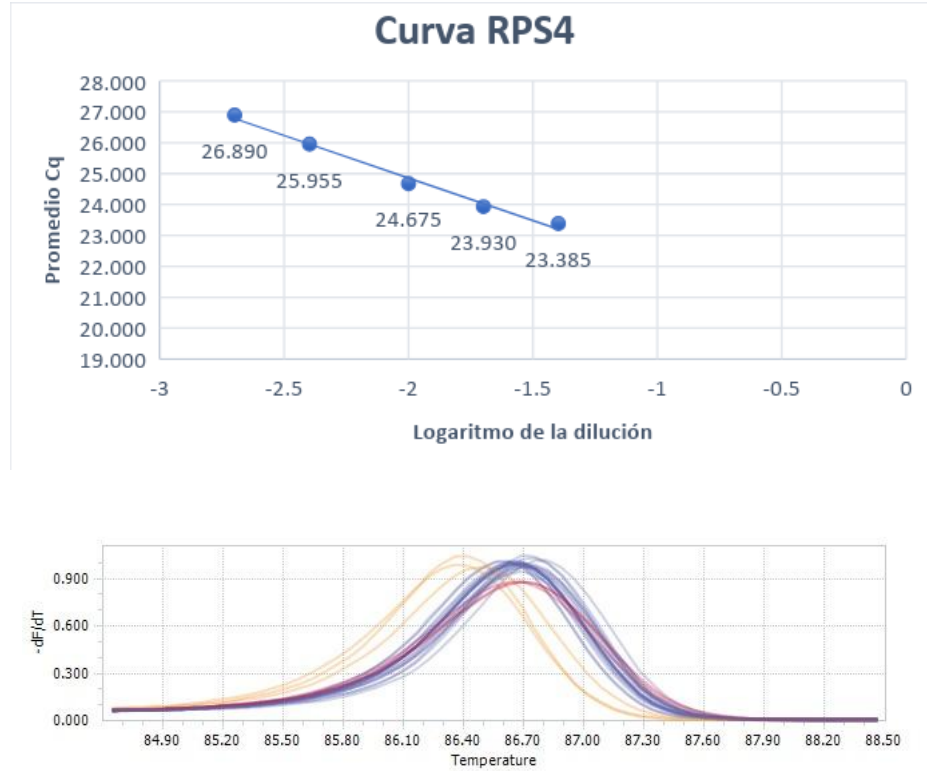


Figura 93. Curva de fusión de los cebadores de *ZPG* a una concentración de 0.3 μ M con el método de Curva Estándar Relativa de una dilución de 1:10 a 1:150

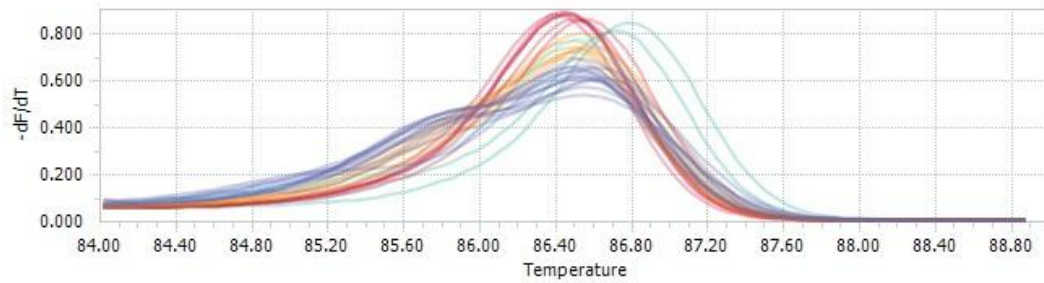
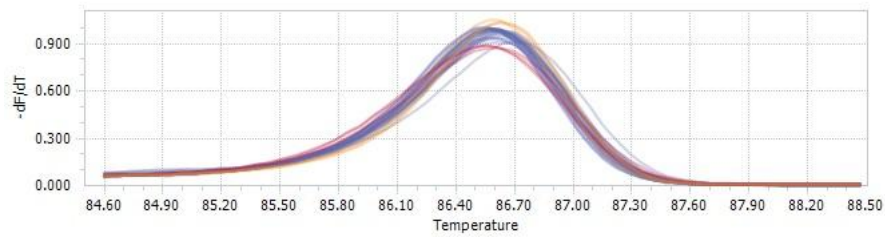
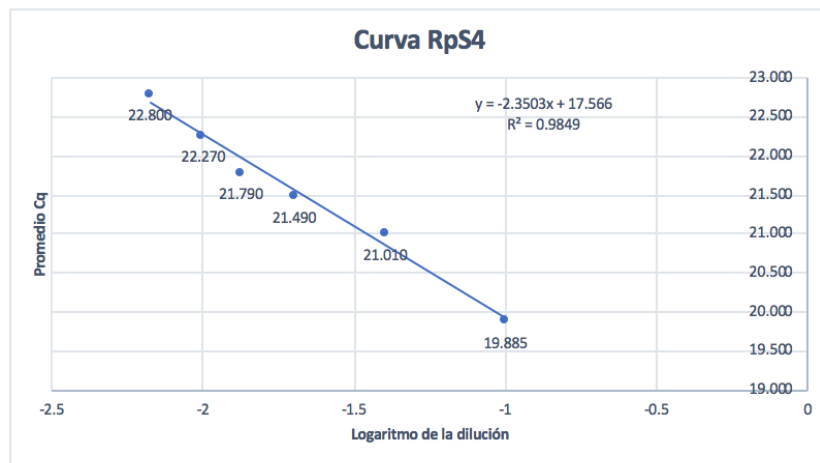
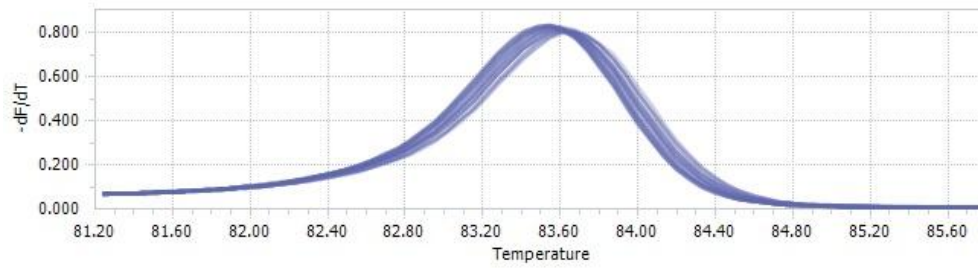
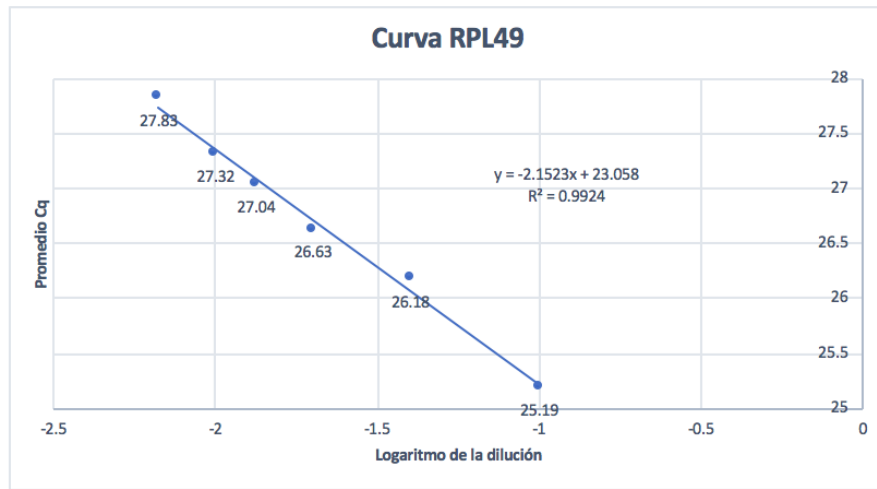


Figura 94. Curva estándar y de fusión de cebadores de genes de referencia (*RpS4* y *RpL49*) a una concentración de 0.33uM



Expresión de *zpg* al momento de realizar la Curva Estándar RelativaCuadro 57. Expresión de *zpg* en dilución 1:25-1:250

Muestra	Fold Difference Target		Fold Difference Target	
	Calibrador		Calibrador	
	RPL49		RpS4	
	ANT	HT	ANT	HT
ZPG	0.998	0.782	1.268	0.994
BZ	0.987	0.802	1.219	0.990

Fuente: Elaboración propia *Con eficiencia de 389.34% y R^2 0.9475Cuadro 58. Expresión de *ZPG* en dilución 1:10-1:150

Muestra	Diferencia de expresión con el blanco		Diferencia de expresión con el blanco	
	Calibrador		Calibrador	
	<i>RpL49</i>		<i>RpS4</i>	
	<i>ANT</i>	<i>HT</i>	<i>ANT</i>	<i>HT</i>
<i>zpg</i>	0.990	0.757	1.302	0.995
<i>zpg+boule</i>	0.964	0.761	1.223	0.965

Fuente: Elaboración propia *Con eficiencia de 105.15% y R^2 de 0.8427

A. albimanusgas8 AAGCTGTTCGAACAGCGGCTCGCTAGCTACAAGGAGGAAGCGGAGGTACGGCACGAGATG
 A. darlingigas8 AAGCTGTTCGAGCAGCGGCTCGCTAGCTACAAGGAGGAAGCCGAGGTACGGCACGAGATG
 A. gambiaegas8 AAGCTGTTCGAGCAGCGGCTCGCCAGCTACAAGGAGGAGCGGAGGTGCGCCACGAGATG
 Ae. aegyptigas8 AAATTGTTTGAACAGCCCTACAGAGCTATAAAGAAGAAGCTGAAGTGCGCCACGAAATG
 ** **** * ***** * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A. albimanusgas8 GAGCTGTTCGGAGGTGGAGGAGCGGAAGAACGGCCAGATCGCGGAGCTGATCAACACGAAC
 A. darlingigas8 GAACTGTTCGGAGGTGGAGGAGCGCAAGAACGGCCAGATCGCGGAGCTGATCAACACGAAC
 A. gambiaegas8 GAGCTGTTCGGAGGTGGAGGAGCGCAAGAACGGCCAGATAGCGGAGCTGATCAGCACGAAC
 Ae. aegyptigas8 GAATTGTTCAGAGGTGGAAGAACGAAAGAACGGCCAAATTTCCGAACTGATCCAAACCAAT
 ** **** ***** * * * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A. albimanusgas8 GAGCAGGCGTACCGGGAGATGAAGAGCTACTACAATGCCATCACGCAGAACAATCTGGCC
 A. darlingigas8 GAGCAGGCGTACCGGGAGATGAAGAGCTACTACAATGCAATCACGCAGAACAATCTCGCC
 A. gambiaegas8 GAGCAAGCGTACCGGGAGATGAAGAGCTACTACAACGCCATCACGCAGAACAATCTCGCG
 Ae. aegyptigas8 GAAAACGCCCTACAAGGAAATGAAGGTTACTACAACGACATTACCCGTAACAACCTTTGGCA
 ** *

A. albimanusgas8 CTCATCAACA **GCATGAAGGAGGAGATGGA** GAGATGAGGCTCCAGTCGGACAAGGACCTA
 A. darlingigas8 CTCATCAACAGCATGAAGGAGGAGATGGAAGAGATGCGGCTCCAGTCGGACAAGGATCTG
 A. gambiaegas8 CTGATCAACAGCATGAAGGAGGAGATGGAGGAGATGCGCCTGCAGTCGGACAAGGATCTG
 Ae. aegyptigas8 CTCATCAACAGTATGAAGAACAGATGGAAGAGTTGCGTATTCAATCAGACAAGGACCTG
 ** ***** *

A. albimanusgas8 AAGAGCTTACGGAGGTGATGGCCGAAAACAAGCGGCTCACCGAACCGCTCAAGAGCGCC
 A. darlingigas8 AAGAGCTTACGGAGGTGATGGCCGAGAACAAGCGGCTAACCGAACCGCTCAAGAGCGCT
 A. gambiaegas8 AAGTCC TTCAGCGAGGTGATGGCCGAGAACAAGCGCTAACCGAGCCGCTCAAGAGCTCG
 Ae. aegyptigas8 AAGAACCATTCCGAAGTATGGCCGAGAACAAGACTCGTTGAACCGTTGAGCAGTCC
 *** *

A. albimanusgas8 CAGGCCGAGCTTGTGGAGTGC GCAAGAAGCTACAGTACTACGATCGCGATAAGGCCACA
 A. darlingigas8 CAGGCCGAGCTGCTCGAGTGC GCAAAAACTGCAGTACTACGATCGCGACAAGGCCACA
 A. gambiaegas8 CAGGCCGAGCTGGTGGAGTGC GCAAGAAGCTGCAGTACTACGACCGCGACAAGGCCACC
 Ae. aegyptigas8 CAATCAGAGTTGGTCGAGTTGC GCAAAAAAGTTGCAATACTACGATCGCGACAAGGCTACG
 ** *

A. albimanusgas8 CTGAACCGGTTAAAGACCG **GCTCAACAGCACCCAGAAG** CAGCTGTCCAGCCTGAAGCTC
 A. darlingigas8 CTGAACCGGTTAAAGACCGGCTCAACAGCACCCAGAAGCAGCTGTCCAGCCTGAAGCTC
 A. gambiaegas8 CTGAACCGGTTAAAGACCGCCTGAACAGTACGCAGAAGCAGCTGGCCAGCCTGAAGCTC
 Ae. aegyptigas8 CTCAATCGAGTGAAGAATCGGCTCGCTTCGACGCAGAACAAGCTCAGTACGTTGAAGCTC
 ** *

A. albimanusgas8 GAGCAGGACGTGCAAC **CAATGCGATGCGAGAGGCT** TGGTTCGAGGAGCGGATCAGCTGAAG
 A. darlingigas8 GAGCAGGACGTGCTGCAGATGCGCTGCGAGAAGCTGGTTCGAGGAGCGGACAGCTGAAG
 A. gambiaegas8 GAGCAGGACGTGCTGCAGATGCGGTGCGAGAAGCTGGTGGAGGAGCGGATCAGCTCAAG
 Ae. aegyptigas8 GAATCGGACGTCTGCAGATGCGCTGCGAGAAGCTGGTTCGAAGAACCGGATCAGCTGAAG
 ** *

A. albimanusgas8 CGCCTGTTTGAGAAGTCGATGCTGGAGTTGCAGCAAAAGTCGGGCCGTAAGAACTCGCTG
 A. darlingigas8 CGTCTGTTTCGAGAAGTCGATGCTGGAGTTGCAGCAAAAGTCGGGCCGTAAGAACTCGCTG
 A. gambiaegas8 CGGCTGTTTCGAAAAGTCGATGCTGGAGTGCAGCAAAAGTCGGGCCGTAAGAATTCGCTG
 Ae. aegyptigas8 AATATGTTTCGAGAAGTCTATACTGGAGCTGCAACGAAAGTCAGGTTTGAAAATTCCTTA
 **** *

A. albimanusgas8 CTCGAGCGGAAGCTCGAGTACATAGAGAAGCAGACGGAA **CAGCGGGAAGCCATCCT** GGC
 A. darlingigas8 CTCGAACGGAAGCTCGAGTACATCGAGAAGCAAACGAGCAGCGGGAAGCCATCCTTGGG
 A. gambiaegas8 CTCGAGCGCAAGCTGGAGTACATCGAGAAGCAGACGAGCAGCGGGAAGCCATCCTTGGG
 Ae. aegyptigas8 TTGGAGCGAAAAGTGAATAACATCGAGAAGCAAACGGAACAACGGAAGCCATTTTAGGG
 *

A. albimanusgas8 GAGGTGCTTTCGTTGGCCGGCATCGAACCGCAATCGCTGAGCGTTCCGATCGAGAAGCTG
 A. darlingigas8 GAGGTGCTGCTACTGGCCGGCATCGAACCCAGTCGCTGAGTTCGCGATCGAGAAGCTG
 A. gambiaegas8 GAGGTGTTGCTGTTGGCTGGGATAGAGCCCTCAGTCGCTGAGCGTCCGATCGAGAAGCTG
 Ae. aegyptigas8 GAGGTGCTATCGTTGCCGGAATCGAACCGCAGTCGTTGAGTATCCGAATGAAAACTT
 ***** *

A. albimanusgas8 CTGGTGCAGAAGAACGACAAGATACAGGCACTGCGGTATGATCTGGCGGCTGTCAGCAAG

A. albimanusfzo AATATGAAGGTAGCCTTCTTCGGCCGTACCTCGAACGGCAAGAGCTCGGTCATCAATGCG
A. darlingifzo AATATGAAGGTAGCCTTCTTCGGCCGTACCTCGAATGGCAAGAGCTCGGTTATCAATGCG
A. gambiaefzo AACATGAAGGTGGCATTCTTCGGCCGCACCTCGAACGGCAAAAGCTCCGTAATCAATGCG
Ae. aegyptifzo CACATGAAGGTGGCCTTCTTTGGGGCCACCTCCAACGGGAAAAGTTTCAGTGATCAACGCT
* * * * *

A. albimanusfzo ATGCTGCGTGACAAGATTCTGCCAGTGGTATCGGCCACACCACCAACTGTTTCTGCCAG
A. darlingifzo ATGTTGCGTGATAAAGATTCTGCCAGTGGTATCGGTCACACCCTAACTGTTTCTGCCAG
A. gambiaefzo ATGCTGCGTGATAAAAATCTTCAGCGGTATCGGCCACACGACCAACTGCTTCTGCCAG
Ae. aegyptifzo ATGCTGCGGGACAAAATCTACCGAGTGGTATCGGCCACACCACCCATTGCTTCTGCCAG
* * * * *

A. albimanusfzo GTGGAGGGTATCGATGGTCAAGAAGCGTACCTCGTGAAGGAAGGAAGCGATGAAAAGCTT
A. darlingifzo GTCGAGGGTATCGATGGCCAAGAAGCGTACCTCGTCAAGGAAGGAAGTATGAGAAGCTT
A. gambiaefzo GTGGAAGGCATCGATGGTCAAGAACCGTACCTGGTGAAGGAGGGAAGCGATGAAAAGCTC
Ae. aegyptifzo GTGGAGGGCATCGATGGCGACGAGGCATACCTAGTCAAGGAAGGTTGTGATGAGAAGCTG
* * * * *

A. albimanusfzo AACGTTACATCCGTC AAGCAGCTAGCGAATGCGCTGTGCCAGGAGAAGCTATGTGAAAGC
A. darlingifzo AACGTTACCTCCGTCAAGCAGCTAGCGAATGCACCTGTGCCAGGAGAACTGTGTGAAAGC
A. gambiaefzo AACGTGACCTCCGTGAAACAGCTGGCCAACGCACCTGTGCCAGGAGAAGCTGTGCGAAAGC
Ae. aegyptifzo AATGTAACGTCGATTAACAACCTGCGCAATGCGCTATGCCAGGATAAACTCTCGGAAAGC
* * * * *

A. albimanusfzo TCCTTGGTGCGAATATTTGCCACGTGAACGGTGCAGCCTCTGCGCGATGATGTTGTG
A. darlingifzo TCCTTGGTGCGAATATTTGGCCTCGTGAACGCTGCAGCCTTCTGCGCGATGATGTCGTG
A. gambiaefzo TCGCTGGTGCGAATATTTGCCCGCGCAACGGTGCAGCCTGTGCGCGATGACGTCGTG
Ae. aegyptifzo TCATTGATCAGGATATTTGCCACGTAAACGATGTAACCTGCTAAGGGATGATGTAGTT
* * * * *

A. albimanusfzo TTCGTCGACTCGCCGGGTGGACGTTTACCCAATTTGGACGATTGGATCGATAACCAT
A. darlingifzo TTCGTTGGACTCGCCGGTGTGGATGTTTACCCGAACCTGGACGATTGGATCGATAACCAT
A. gambiaefzo TTTGTGCGACTCGCCGGTGTGGACGTTGTCGCCGAACCTGGACGACTGGATCGACAACCAT
Ae. aegyptifzo TTCGTTGATTGCGCCGGAGTCGATGTGTACCTAATTTGAACGATTGGATAGACAATTTTC
* * * * *

A. albimanusfzo TGTCTAAATGCGGATGTCTTTGTGCTGGTGCTTAACGCGGAATCGACGATGACCCTTGCG
A. darlingifzo TGTCTAAATGCGGACGTGTTTGTGCTGGTGCTTAACGCGGAATCAACTATGACACTTGCG
A. gambiaefzo TGCTGAAATGCGGACGTGTCGTGCTGGTGCTAAACGCGGAATCTACCATGACGCTGGCG
Ae. aegyptifzo TGCTTAAATGCTGACGTTTTCGTGTTGTTCTCAATGCTGAATCCACTATGACCTTGCGG
* * * * *

A. albimanusfzo GAAAAATCTTTCTTCACGAAGTGTCCACTCGACTCTCGAAACCGAACATCTTCGTGCTG
A. darlingifzo GAAAAATCTTTCTTCACGAAGTGTCCACTCGACTCTCGAAACCGAACATCTTCGTGCTG
A. gambiaefzo GAAAAATCATTTCTTCACGAAGTGTCCACCCGCTATCGAAGCCGAACATTTTGTGCTG
Ae. aegyptifzo GAAAAACACTTTCTTCACGAAGTGTCAACCCGGTTCGAAACCGAACATTTTGTGCTG
* * * * *

A. albimanusfzo AACACCAGGTTGGATGCATCGGCATCGGAGCCAGAATTTTCAGGAATCTGTCAAAGCGCAG
A. darlingifzo AACACCAGGTTGGATGCATCGGCATCGGAGCCAGAATTTTCAGGAATCTGTCAAAGCGCAG
A. gambiaefzo AACACCAGCTGGGATGCGTCAGCGTCCGAGCCGAGTTTCAAGAATCGGTGAAAGCTCAA
Ae. aegyptifzo AACACCAGTGGGATGCATCGGCCTCAGAGCCGGAGTTCCAGGAATCGGTCAAAGCACAA
* * * * *

A. albimanusfzo CACCAAGAGCGTTGCATCGACTTTTGGTGAAAGAGCTAAAGGTAGCCACACCGAAGGAA
A. darlingifzo CATCAGGAGCGGTTGCATCGATTTTGGTGAAAGAGCTAAAGGTGGCCACACCGAAGGAA
A. gambiaefzo CACCAGGAGCGGTCATAGATTTCTGTTGTAAGGAACCTGAAGGTGCGCCACACCGAAGGAA
Ae. aegyptifzo CACCAGGAACGATGCGTCGATTTCTCGTGAAGGAGTTGAAGGTTGCATCGGAAAGGAG
* * * * *

A. albimanusfzo GCGGAGGAGCGAGTTTCTTCGTCGCTCGTGAACCGCTGCAAGCGCGGCTGAAGGAA
A. darlingifzo GCAGAGGAGCGAGTTTCTTCGTCGCTCGTGAACCGCTGCAGGCGCGGCTGAAGGAA
A. gambiaefzo GCGGAGGAGCGTGTCTTCGTTTCGTCGACGCGAAGCGCTGCAGGACCGCTAAAGGAG
Ae. aegyptifzo GCAGAGGAACCGCTTCTTCGTCGTCAGCGGCTGAACACTGCAGGCGCGATTGAAGGAA
* * * * *

A. albimanusfzo CAGGAAGGCCTTCGGGCCATTGCCGGTCTGCGGGATGGTTTCAAATCGGTACTTT
 A. darlingifzo CAGGAGGTCTGCCGGCCATTGCCGGTCCCTGGCGGATGGTTTCAAATCGGTACTTT
 A. gambiaefzo CAGGAAGGCCTCCAGCGATAGCGGGCGCGCTGGCCGACGGCTTCCGAACCGCTACTTC
 Ae. aegyptifzo GCCGAAGTCTGCCAGCGATTGCCGGCCTTTGGCTGATGGTTCCAGAACCAGTACTTT
 * * * * *

A. albimanusfzo GAGTTTCAAGATTTTCGAGCGCAAGTTCGAGGAGTGCATTTCAAGAGTGGCGTCAAGACC
 A. darlingifzo GAGTTTCAAGATTTTGAACGCAAAATTCGAGGAGTGCATTTCAAGAGTGGCGTCAAGACC
 A. gambiaefzo GAGTTTCAAGATTTTGAACGCAAAATTCGAGGAGTGCATTTCAAGAGTGGCGTCAAGACC
 Ae. aegyptifzo GAGTTTCAAGATTTTGAACGCAAAATTCGAGGAGTGCATTTCAAGAGTGGCGTCAAGACC
 * * * * *

A. albimanusfzo AAGTTTCAAGATTTTCGAGCGCAAGTTCGAGGAGTGCATTTCAAGAGTGGCGTCAAGACC
 A. darlingifzo AAGTTTCAAGATTTTGAACGCAAAATTCGAGGAGTGCATTTCAAGAGTGGCGTCAAGACC
 A. gambiaefzo AAGTTTCAAGATTTTGAACGCAAAATTCGAGGAGTGCATTTCAAGAGTGGCGTCAAGACC
 Ae. aegyptifzo AAGTTTCAAGATTTTGAACGCAAAATTCGAGGAGTGCATTTCAAGAGTGGCGTCAAGACC
 * * * * *

A. albimanusfzo GACAGTATCTTTGAGCGGGCGAACACGCTGCGCAATCAGAAGCTGGAACAAAAGAAGCGT
 A. darlingifzo GATAGTATCTTCGAGCGGGCGACCGTGTGCGTAATCAGAAGCTGGAGCAAAAAGAACGT
 A. gambiaefzo GACAGTATCTTTGAGCGGGCGAACACGCTGCGCAATCAGAAGCTGGAACAAAAGAAGCGT
 Ae. aegyptifzo GACAGTATCTTTGAGCGGGCGAACACGCTGCGCAATCAGAAGCTGGAACAAAAGAAGCGT
 * * * * *

A. albimanusfzo CTTACGGATCGTATTGCGAACACCGGAAACGTCGCTGATGCAGGTAACGCGGAGATGAAA
 A. darlingifzo CTTACGGATCGTATTGCGAACACCGGAGACGTCGCTGATGCAGGTAACGCGGAGATGAAA
 A. gambiaefzo CTTACGGATCGTATTGCGAACACCGGAGACGTCGCTGATGCAGGTAACGCGGAGATGAAA
 Ae. aegyptifzo CTTACGGATCGTATTGCGAACACCGGAAACGTCGCTGATGCAGGTAACGCGGAGATGAAA
 * * * * *

A. albimanusfzo CTCAAGATCCATACCATGGTAGAGGAGTTCGAGCAGAAGTGGCGAAGGCACTGAATGAG
 A. darlingifzo CTTAAGATCCACACCATGGTAGAGGAGTTCGAGCAGAAGTGGCGAAGGCACTGAATGAG
 A. gambiaefzo ATGAAGATCCATACCATGGTAGAGGAGTTCGAGCAGAAGTGGCGAAGGCACTGAATGAG
 Ae. aegyptifzo ATGAAGATCCACAACTGGTAGAGGAGTTCGAGCAGAAGTGGCGAAGGCACTGAATGAG
 * * * * *

A. albimanusfzo GAAATTTGGCGGCTGAACGTACTGGTGGACGAATTCATCTACCGTTCCACACCGATCCG
 A. darlingifzo GAAATTTGGAGGCTGAACGTGCTGGTGGACGAATTCATCTACCGTTCCACACCGATCCG
 A. gambiaefzo GAAATTTGGCGGCTGAACGTGCTGGTGGACGAATTCATCTACCGTTCCACACCGATCCG
 Ae. aegyptifzo GAAATTTGGCGGCTGAACGTGCTGGTGGACGAATTCATCTACCGTTCCACACCGATCCG
 * * * * *

A. albimanusfzo CTCGTGCTGAACGTGTACAAGAAGGAAATTAATGCTCAGTTCGAGAATGGGCTCGGGTCCG
 A. darlingifzo CTCGTGCTGAACGTGTACAAGAAGGAAATTAATGCTCAGTTCGAGAATGGGCTCGGGTCCG
 A. gambiaefzo CTCGTGCTGAACGTGTACAAGAAGGAAATTAATGCTCAGTTCGAGAATGGGCTCGGGTCCG
 Ae. aegyptifzo TTGGTCTGAACGTTTACAAGAAGGAAATTAATGCTCAGTTCGAGAATGGGCTCGGGTCCG
 * * * * *

A. albimanusfzo AACTTACGCGCTCGCCTCAGTACCGCACTGGCCATGAACGTGGAGACGGCTCAGCGTGAA
 A. darlingifzo AACTTACGCGCTCGCCTCAGCACCAGCACTGGCCATGAACGTGGAGACGGCTCAGCGTGAA
 A. gambiaefzo AACCTGCGCGCCCGGCTCAGCACCAGCACTGGCCATGAACGTGGAGACGGCTCAGCGTGAA
 Ae. aegyptifzo AACTTACGCGCTCGCCTCAGCACCAGCACTGGCCATGAACGTGGAGACGGCTCAGCGTGAA
 * * * * *

A. albimanusfzo ATGACGGCCCGTATGACGGCTCTGCTGCCTTCGGAGAAGATGCTCACCAGCAGCATCAG
 A. darlingifzo ATGACACCCCGTATGACGGCTCTGCTGCCTTCGGAGAAGATGCTCACCAGCAGCATCAG
 A. gambiaefzo ATGACGACCCCGTATGACGGCTCTGCTGCCTTCGGAGAAGATGCTCACCAGCAGCATCAG
 Ae. aegyptifzo ATGACCGACCCGATGACTGCGTGCATCCCGTCGAAAAGATCATCACCACACGCATCAG
 * * * * *

A. albimanusfzo GTGGTAGCCCGTACGCAACCGTTCGAGATGCTGTACACGCTCAACTGTCAGAATCTGTGC
 A. darlingifzo GTGGTAGCCCGTACGCAACCGTTCGAGATGCTGTACACTCTCAATGTCAGAATCTGTGC
 A. gambiaefzo GTGGTCTGCGCACGCAACCGTTCGAGATGCTGTACACGCTCAACTGTCAGAATCTGTGC
 Ae. aegyptifzo GTGGTAGCCCGTACGCAACCGTTCGAGATGCTGTACACGCTCAACTGTCAGAATCTGTGC
 * * * * *

* * * * * * * *

An.albimanuszpg CAATCAAGCAAGAAAAAGCTGATCCGCTACCTGACGACGGAGTGTAGAACGCACCATCGA
 An.darlingiinx CAATCGAGCAAGAAAAAGCTGATCCGCTACCTCAGCAGGAGTGTAGAACGCACCATCGG
 Ae.aegyptizpg CGGAAGCGTAAAGCCTTAACCTACTTTATTTGACCCAAGAGAGCCGCAAGGGACACAAC
 An.gambieinx2 AAGACGCGCAAGAAGCAGCTGATCACTTACCTGTGCGCCGATTTCCCCCGCTGCACCGC
 D.melanogasterzpg AGGACCCATTTGCGCGTACTAGTCAACTACTTCTCCAGCGATTACAAAGAGACCCACTTC
* ** * * **
**

An.albimanuszpg GGTTACATGTACCGCTACTGCTTCTGCATGATCCTCAACTTTGCCAACGTGCTGGCAAAC
 An.darlingiinx GGTTACATGTACCGCTACTGCTTCTGCATGATGCTCAACTTTGCGAATGTACTGGCAAAC
 Ae.aegyptizpg AAATACGCATGATTTTTATCGGATGTGAGATTCTCAACTTTTTCATAGTCTCCTGAAC
 An.gambieinx2 ACGTACCTGCTGCGTATTGCTTCTGCACGCTGCTCAACTTCTGCAACGTGCTGCTGAAC
 D.melanogasterzpg CGCTACTTCGTTAGTACGCTTCTTTCGCAAATACTCAATTTGAGCATCAGTATTCTAAAC
*** * * ** * ** * * ** * * **
*** **

An.albimanuszpg ATCCTGCTGATGAATACGCTCTTCTCCGGCTTCTGGATGAACTACCATCCGGCCATGATG
 An.darlingiinx ATCCTGCTGATGAATACGCTGTTCTCCGGCTTCTGGATGAACTACCATCCTGCCATGATG
 Ae.aegyptizpg ATGTTCTTGTATGAACTTCTTGTTCGGAGGTTTTTGGGCCAGTTACCAACCGCCATTGAG
 An.gambieinx2 ATCTTCTCGTGAACGTGATCTTTTCCGGCTTCTGGTCAACTACCATCCCGCCGTCGAA
 D.melanogasterzpg TTCTTCTGTTGGACGATTTTTTCCGGAGGTTTTTGGGGCCGCTACCATAATGCCTTGGCTG
* * * ** *

An.albimanuszpg GCGCTGCTGTCGTTTCGATTTTCCCTCCTGGAACCGCTACAAC-T-CGCAAGTATTTCCCAA
 An.darlingiinx GCGCTGCTGTCGTTTTCGACTTCCCTCCTGGAATCGCTACAAC-T-CGCAAGTATTTCCCAA
 Ae.aegyptizpg GCACTGCTTTCGACTGGACATGAACGCTGCACTTCTGATAAATT-CTCTGGTCTTTCCGAA
 An.gambieinx2 GCACTGCTGTCGTTTCGATTTTCCCTCCTGGAACCGGTACAAC-T-CGCAAGTATTTCCCAA
 D.melanogasterzpg TCCCTTACAAATGGCGACTATAACCAAGTGGAA-CATTATAACCATGGCAGTCTTCCCAA
* ** *

An.albimanuszpg GCTGGCCAAATGCGACTTCCATTTTCGTTGGACCGAGCGGTTCAAGCAGAACCAGCGATGG
 An.darlingiinx GCTTGCCAAAGTGCAGCTTTCATTTTCGTTGGACCGAGCGGTTCAAGCAGAATCGAGATGG
 Ae.aegyptizpg GCTGGCCAAATGTCGACTTTCAGCTATATTGGCCAAAGTGGATCCAAGCAAACTTTGATGC
 An.gambieinx2 AATTGCCAAGTGTGATTTTCACTTCGTCGGGCGAGCGGTTCAAGCAGAAACCAGGACGG
 D.melanogasterzpg GTGTGCCAAGTGCAGATGTACAAGGGCGGCCAGCGGTTCTTCCAACATATACGACTA
***** ** *

An.albimanuszpg GCTGTGCCTGTTGCCGTTGAACGTGGTGAACGAGAAGATATTTGCATTCCTGTGGCTGTG
 An.darlingiinx GCTGTGCCTGTTGCCGCTGAACGTGGTGAACGAGAAGATATTTGCCTTCTGTGGCTGTG
 Ae.aegyptizpg CCTGTGCCTTCTGCCGAGAACATCGTCAACGAGAAAATCTTCGCTTCTGTGGCTTTG
 An.gambieinx2 ACTGTGCCTGCTGCCGCTGAACGTGGTCAACGAGAAGATCTTTGCCTTCATCTGGCTGTG
 D.melanogasterzpg CCTTTGCCTGCTGCCCTGAATATACTGAACGAGAAAATCTTCGCTTCTGTGGATATG
** *

An.albimanuszpg GTTCGGGATTC TTGGCGTCATTTCCGCCATTAATCTGCTCTTCTGGTGTGCCCTGCTCTG
 An.darlingiinx GTTTGGTATTCTTGGCGTCATTTCCGCCCTTAATCTGCTCTTCTGGTGTGCCCTGCTCTG
 Ae.aegyptizpg GTTCATTGTGCTGGCCGCTGATCCGGTGTGCAACTGTGCTACAGGCTGGCGAGCTTTC
 An.gambieinx2 GTTCTGGGCTACTGGTGTATCGATGCTGAATCTACTTCTGGATAGTGGTCTGTG
 D.melanogasterzpg GTTTATACTAGTGGCTATGCTCATTTCCCTCAAGTTTCTGTACCCTGGCCACCGTTTTT
*** *

An.albimanuszpg CAGCAAGGGCATCCGCGCTGGTTGCTGCGCCAGCAAATGCAACCGATCCGTT--CGGTG
 An.darlingiinx CAGCAAGGGTATCCGCGCTGGTTGCTGCGCCTACAAATGCAACCGATCCGTT--CGGTG
 Ae.aegyptizpg CTGCCGAGCGTTCCGTTCCAACCTGTTGTTTCAGCTTGTGGACCAATACAGTACCATCG
 An.gambieinx2 CAGCAAGGCTTTCGCTTTGGCTGCTTACCGCTCCACTGTACCCGATTCGTA--CGTCC
 D.melanogasterzpg GTATCCCGAATGCTTTCAGTTGCTTCTGTCAGGGCACGTTTCATGCCCAAGAAGCA
* *

An.albimanuszpg GTTGTCACAATGCCTACCGCGAATGTATCGGCAAAATGGTTCTGCTGTTGACGCTG
 An.darlingiinx GTCGTCAGCAATGCCTGCGCGCAATGTATCGGCAAAATGGTTTCTGCTGTTGACGCTG
 Ae.aegyptizpg TTTGAAGCGAGTTGTCGGGAAGCCAA--CATCGGATACTGGTTTCTACTGTACCAAATG
 An.gambieinx2 TACGTCGCACGTGCGCTGGACGGTCAGGGCGTCGGACAGTGGTTCTGCTCTATCAGCTG
 D.melanogasterzpg CTTGACAGTGG--CATTGCGCAATTGCAGTTTGGCGACTGGTTCTGCTGATGCGCGTG
* *

An.albimanuszpg TGCCGCAATCTGAACCCGCTGGTACGCCGATATATGCTCTGATCTGGAAGA--AAC

```

An.darlingiinx      TGCCGCAATCTGAACCCACTGGTTAGCCGTGACATTATGTTTTGCATCTCGAAGA--AAC
Ae.aegyptizpg      GCTCGCAACATCAATAAGGGTGTGATGAGGGAAATCATCCGGGATCTGTCCAGAATCGAT
An.gambieinx2      TGTGCAATCTGAACCCGATCGTCCGGCCGAGAGCTGGTCCAGAGTGTGTGCGAA----GGC
D.melanogasterzpg  GGCAACAACATCAGCCCCGAGCTATTCCGTAAGTTGCTGGAGGAGCTGTACGAAGCTCAG
                    ***  *  *          *      *  *  *  *      *  *

An.albimanuszpg    GACCACCGACAGTCTTTACGCTAAACCAAAGAGCATGATGAT-GACCGCCGATTTCTAC
An.darlingiinx     GACACCCCGAGAGTCTTTACTCCAAACCAAAGAGCATGATGAT-GACCGCCGATTTCTAT
Ae.aegyptizpg      CAAGAGCTAAACATGTCGAAATCGAACGTAATGAGCTGCAATTGGAGGTCGAGGCCGAG
An.gambieinx2      GAAGGGACACAATGGTCACAA---AACGTTC-CGAATGCCGAAGGGTGGT-GAACCGGAC
D.melanogasterzpg  TCCTTGATCAAATACCGCCAG-GAGCGGACAAGATC-----
                    *  *          *

An.albimanuszpg    CAGGACCAAGATGGCGATCTAGAGATAGGCGAGGTTAATGTTTGA
An.darlingiinx     CAGGACCAAGATGGAGATCTAGAGATAGGCGAGGTTAATGTTTGA
Ae.aegyptizpg      GATGAATTGGA-GGAGAT-TGAAGAT-GACGAGGCAACGGTGTGA
An.gambieinx2      TTTTACACCGA-TCCGGA-AGGATAC-GATGAGGAAGGCGTGTGA
D.melanogasterzpg  -----

```

Alineamiento de ZPG de *A. albimanus* con otras inexas de *A. aegypti*

Únicamente se muestran los dos pares de cebadores diseñados en este estudio (coloreados en turquesa) para el gen de ZPG de *A. albimanus*.

```

AALB006050ZPG      -----ATGCT-----GGAACT----CGTGC---GTCCATTGCGGGGCATTCTACAGATA
42
AAEL006726Innecin4 -----ATGCT-----GGAAAT----CACCA---AGTCCTTGCGGGATATTCTCGTGCCC
42
AAEL008588Innecin7 -----ATGTT-----GAATACATT-TTCGGTACTCTCTCCTCATCTGAAATTCAGAAT
48
AAEL011248Innecin3 ATGGCTGTGTTCCGACTGGTCTCGTCCGGTGGCCGGCTTCATCAAGGTCGGTACCTGATC
60
AAEL014846Innecin1 -----ATGTA-----TAAGTCTCTGGGAGG----ATT---GAAGGATTATTTCAAAGG
42
AAEL014227Innecin2 -----ATGTT-----GGATATATTTCTGG----ATT---GAAAACTTAGTCAAATTT
42
AAEL014227Innecin8 -----ATGTT-----GGATATATTTCTGG----ATT---GAAAACTTAGTCAAATTT
42
                    **

AALB006050ZPG      AAAGCGGTCAACACGACCGATCTCGTCTGGCGTTTGCCTGCCGGGTACCCTTTATCTG
102
AAEL006726Innecin4 AAATCATTCGACTCGACCAACACGGTTTGGCGCCTCCACAGCCGGATCACCGTGTACATG
102
AAEL008588Innecin7 AAATTTGTATCCATTGATAATGTTGCATTTAAATTTCACTATCGAGCTACCTTACCATT
108
AAEL011248Innecin3 GATAAGGCCATCATCGATAATATGGTGTCCGGTGTCAATTACCGGTTAACCAGCGCTGTG
120
AAEL014846Innecin1 CAAGATATATACACCGATAGTGCCGTATTCCGCCTTCACAATAGTTTTACAACGGCATTG
102
AAEL014227Innecin2 AGCCATGTAATAACCGATTACCTGTATTTGCACTGCCTACTCAATCACCGTGTGATGATC
102
AAEL014227Innecin8 AGCCATGTAATAACCGATTACCTGTATTTGCACTGCCTACTCAATCACCGTGTGATGATC
102
                    *  *          **          **          *

AALB006050ZPG      TTGCTGTTCCGGCCCTTGCTACTTTCCGCACGCCAATACTTTGGCAATCCGATCGACTGC
162
AAEL006726Innecin4 TTGGTCTTTTTTACCATCCTGCTGTCGGCCCGGTCTTATTTTGGGAACCGATCGAATGC
162
AAEL008588Innecin7 CTGCTTGATGTACTTCTTGTAACATCCAGGCAATACATAGGAGAGCATATACGATGC
168
AAEL011248Innecin3 CTCTTCTATGCTGCGTGCTCGTGACAGCCAACAATCTAATTGGTGATCCCATTTCCTGC
180
AAEL014846Innecin1 TTGCTGGCTGTAGTTAATAATAAAGTCCACACAATATGTCGGACAGCCAATTAGTTGC
162
AAEL014227Innecin2 TTGATGGCATTTTCACTTATTGTAACGACGAAGCAATATGTCGGTAATCCCATTGACTGC
162
AAEL014227Innecin8 TTGATGGCATTTTCACTTATTGTAACGACGAAGCAATATGTCGGTAATCCCATTGACTGC
162

```



```

AAEL006726Innexin4      CGATTTTGGGAACGCGGTCTGCTTGAACGTTGTGTACAATCTGACTTCTATCCTTTCA
    456
AAEL008588Innexin7      CGTAATATGGAAGGAGGAAAAATTAACGTCTTGTGGATGGTCTTCGTATGTTGAAGTT
    462
AAEL011248Innexin3      AAGAACTGGGAAGAGGGCAGGATGCGCATGATCTCCGACGGATTGCGTGCCAACATGATC
    465
AAEL014846Innexin1      GATGCAACGGAAGGAGGATTAATGCGTACTATTGTTATGGGACTAAACATCGGAATAT--
    448
AAEL014227Innexin2      AAGTCTTGGGAAGGAGGCAAATAACGCAATTAATGATGGACCTTGACATAGGCATTT--
    451
AAEL014227Innexin8      AAGTCTTGGGAAGGAGGCAAATAACGCAATTAATGATGGACCTTGACATAGGCATTT--
    451
                        * * * * *

AALB006050ZPG           CCGGAGCAGTGGAAGC-----AATCAAGCAAGAAAAGCTGAT-----
    494
AAEL006726Innexin4      CCTGGTGCGTGGACTC-----GGAAGCGTAAAGCCTTAACTCT-----
    494
AAEL008588Innexin7      TCAAGATACTACAAACAAAACAAAGTTGTAACATTTGACAGCAAATACACACTATATCCC
    522
AAEL011248Innexin3      ATCAGCCCAGG-----TGAGCGCAAAGGGCGCCAAAGTCGGCT-----
    503
AAEL014846Innexin1      -GTCGAGAAGA-----TGAAAAATGTGCCAAAAAACAAGCCCT-----
    485
AAEL014227Innexin2      -GTTCCGAAAT-----AGAAAAGAAGCAGAAGAAAAAATTGCT-----
    488
AAEL014227Innexin8      -GTTCCGAAAT-----AGAAAAGAAGCAGAAGAAAAAATTGCT-----
    488

AALB006050ZPG           -----CGCTACCTGACGACGGAGTGTAGAACG
    522
AAEL006726Innexin4      -----ACTTTATTTGACCCAAGAGAGCCGCAAG
    522
AAEL008588Innexin7      AAATCGGAACTTGACAAAAAATGAAATTCATGTGAAGCTTTTCACAAGCACATAATT
    582
AAEL011248Innexin3      -----CGCTAAGTACCTCTACGATTCACTCAAT
    531
AAEL014846Innexin1      -----TATAGAATACGTTTTGAAACGATTAAGA
    513
AAEL014227Innexin2      -----TCTTGATTATTTGTGGGATAAATTAAGG
    516
AAEL014227Innexin8      -----TCTTGATTATTTGTGGGATAAATTAAGG
    516
                        * * *

AALB006050ZPG           CACCATCGAGGTTACATGTACCGCTACTGCTTCTGCATGATCCTCAACTTTGCCAACGTG
    582
AAEL006726Innexin4      GGACACAACAAATACGCATTGATTTTTATCGGATGTGAGATTCTCAACTTTTTCATAGTC
    582
AAEL008588Innexin7      TTGAATCATATGTGGGCCTCGAAACACGTA CTCTGCGAACTTTAAATTTGGTAAATGTA
    642
9AAEL011248Innexin3      ACGCACACACAGCTACTCGTTCGGTTACTTCATCTGCGAAGCACTGAATTCGTCACGTT
    591
AAEL014846Innexin1      CGGCACAAATTATATGTACTGCGTACTTCGCATGTGAAGCACTTTGTTTTGTGAACATC
    573
AAEL014227Innexin2      TATCATAACTGGTGGGCGTATAGTACTATATATGTGAATTTTTATCACTAGTGAATGTG
    576
AAEL014227Innexin8      TATCATAACTGGTGGGCGTATAGTACTATATATGTGAATTTTTATCACTAGTGAATGTG
    576
                        * * ** * * * *

AALB006050ZPG           CTGGCAAACATCCTGCTGATGAATACGCTCTTCTCCGGCTTCTGGATGAACTACCATCCG
    642
AAEL006726Innexin4      CTCCTGAACATGTTCTTGATGAACTTCTTGTTCGGAGGTTTTTGGGCCAGTTACCAACCG
    642
AAEL008588Innexin7      TTAGCGCAAGTATGGTTTACAAATAAGTTTCTAGGAGGACGGTTCTATAGGCTTGGTTTG
    702

```

AAEL011248Innexin3 651 ATTGGCAACATCTTCTTCGTGGACAAGTTCCCTCGGCGGTGCTTTCCTCACCTACGGTTCC
 AAEL014846Innexin1 633 TTAGTGCAACTGTGGATGATGAATCGTTTTTTCGATGGCGAATTCTATTTCATATGGATGG
 AAEL014227Innexin2 636 ATAGGCCAAATGTTTCTAATGAACCGGTTTTTTGACGGTGAATTTATGACGTTTGGATTA
 AAEL014227Innexin8 636 ATAGGCCAAATGTTTCTAATGAACCGGTTTTTTGACGGTGAATTTATGACGTTTGGATTA

* * * * *

AAELB006050ZPG 702 GCCATGATGGCGCTGCTGTGCTTCGATTTTCCCTCCTGGAACCGCTACAACCTCGCAAGTA
 AAEL006726Innexin4 702 GCCATTGAGGCACTGCTTTCCTGACTGACATGAACGCCTGGACTTCGTATAAATTCCTGGTC
 AAEL008588Innexin7 753 GATTT-----CATTGAGGAGGACTTTTCAGGATCAATGGATGTGTGGATACTATA
 AAEL011248Innexin3 711 GAAGTGCTCAAGTTCAGCGACATGGATCAGGAGAATCGCTCGGATCCCATGATCGAGATC
 AAEL014846Innexin1 693 AAGTACTGAAATTTTCGGAAGTCCACAAGATCAACGCTTAGATCCGATGGTTTACGTA
 AAEL014227Innexin2 696 GACGTGATAACGCATATGGAAGCGGATCAAGAAGATCGCATGGATCCAATGATCTACATA
 AAEL014227Innexin8 696 GACGTGATAACGCATATGGAAGCGGATCAAGAAGATCGCATGGATCCAATGATCTACATA

* *

AAELB006050ZPG 762 TTCCCAAGCTGGCCAAATGCGACTTCCATTTTCGTGGGACCGAGCGGTTGGAAGCAGAAC
 AAEL006726Innexin4 762 TTTCCGAAGCTGGCCAAATGTGACTTCAGCTATATTGGCCCAAGTGGATCCAAGCAAAC
 AAEL008588Innexin7 813 TTTCCAAAGATTACAAAATGCCATTTCCATAAATATGGCCCATCAGGGACAATCCAAAAG
 AAEL011248Innexin3 771 TTCCCTCGCGTGACGAAGTGTACATTTCCACAATACGGAGCTTCCGGCAGTATCCAGAAG
 AAEL014846Innexin1 753 TTCCACGAGTTACAAAATGCATTTTCTACAATACGGAGCATCAGGAACAATCAAAAA
 AAEL014227Innexin2 756 TTCCGAGAATGACCAAATGTACTTTCTACAAGTATGGTGTGTCAGCGGTGAAGTCGAACGA
 AAEL014227Innexin8 756 TTCCGAGAATGACCAAATGTACTTTCTACAAGTATGGTGTGTCAGCGGTGAAGTCGAACGA

** ** * * * * * ** ** *

AAELB006050ZPG 822 CGCGATGGGCTGTGCCTGTGCGGTTGAACGTGGTGAACGAGAAGATATTTGCATTCCCTG
 AAEL006726Innexin4 822 TTTGATGCCTGTGCCTTCTGCCGCGAGAACATCGTCAACGAGAAAATCTTCGCCTTCCTG
 AAEL008588Innexin7 873 CATGATGCTCTCTGTGTAATGGCACTGAATGTGATAAATGAGAAAATATTCACATTCCTC
 AAEL011248Innexin3 831 CACGATGCCTTTGCGTCTGGCGTTGAACATCCTGAACGAAAAGATCTACATCTTCCTG
 AAEL014846Innexin1 813 CACGATTCCTTTGTGATACTTCCACTAAATATTGTGAATGAGAAGACTTACATCTTCATT
 AAEL014227Innexin2 816 CATGATGCCATATGTATTCTACCCTAAACGTAGTCAACGAGAAAATTTATATTTTCTG
 AAEL014227Innexin8 816 CATGATGCCATATGTATTCTACCCTAAACGTAGTCAACGAGAAAATTTATATTTTCTG

*** * * * * ** * * * * * ** *

AAELB006050ZPG 882 TGGCTGTGGTTCGGGATTCTGGCGTCATTTCCGCCATTAATCTGCTCTTCTGGTGTGCC

```

AAEL006726Innexin4      TGGCTTTGGTTCATTGTGCTGGCCGTCGTATCCGGTGTGCAACTGTGCTACAGGCTGGCG
      882
AAEL008588Innexin7      TGGTTCGGTATGCAGTACTTATTTTTGTATCAATAAGCGCACTTGTATGGAGAATAACC
      933
AAEL011248Innexin3      TGGTTCGGTTCATCCTGTGTCCATCCTCTCTGGACTGGCCATTCTGTACTCGGCGGC
      891
AAEL014846Innexin1      TGGTTCGGTTTATTATATTAGCCACAATGTTATTCTGCTTGTGTATATACAGGCTATG
      873
AAEL014227Innexin2      TGGTTTTGGTTTATTATTCTGACGATACTGACGACGTTAACGATATTTTATAGAATAAAT
      876
AAEL014227Innexin8      TGGTTTTGGTTTATTATTCTGACGATACTGACGACGTTAACGATATTTTATAGAATAAAT
      876
      *** * ****      * *      *      * *
AAELB006050ZPG          CTGCTCTGCAGCAAGGGCATCCGCGCCTGGTTGCTGCGCCAGCAAATGCAACCGATCCGT
      942
AAEL006726Innexin4      CAGCTTTCCTGCCGAGCGTTCGGTTCCAACCTGTGTTGAGCTTGTGGACCCAATCAGC
      942
AAEL008588Innexin7      ACACTCACTTGTATGCAAGATCGGTCAAATTTAACAGCTTCGTTTTCTGCAAGGTTAGT
      993
AAEL011248Innexin3      ATTGTCATGATGCCGACAACGCGGAGGCCGCCCTCAAGCGTCGCTTCCGACGCCCCG
      951
AAEL014846Innexin1      ATAGTATTTATGCCTTCATTTCTGATCCGTTTGGTGAATACAATCAACAGAATGGTGCCG
      933
AAEL014227Innexin2      ATTATTTTTTCGCCTCGAATGCGAGTGTATTTATTAAGACTAAGGTTTAGGTTAGTTCGT
      936
AAEL014227Innexin8      ATTATTTTTTCGCCTCGAATGCGAGTGTATTTATTAAGACTAAGGTTTAGGTTAGTTCGT
      936
      *
AAELB006050ZPG          -----TCGGTGGTTGTCAACAATGCGCTACGCGGCGAATGTATCGGCAAA
      987
AAEL006726Innexin4      -----TACCATCGTTTGAAGCGAGTTGTCCGGGAAGCCAACATCGGATAC
      987
AAEL008588Innexin7      CCTGGAATGCTGAACTCATATGATCTGGATTTTCATAACGGAGAGCCTTTCATTTTCGGAC
      1053
AAEL011248Innexin3      -----GCAAATCAGATCGAGAACCTGGTCCGCCGGATCCAGATCGGTGAC
      996
AAEL014846Innexin1      -----CGCGAAGCTGCAGAAGCTATTGGTCAGAAAACCTGATTTAGGTGAT
      978
AAEL014227Innexin2      -----CGCGACGCTATAGAGATTATAGTAAGACGTTTCGAAAATGGGCGAT
      981
AAEL014227Innexin8      -----CGCGACGCTATAGAGATTATAGTAAGACGTTTCGAAAATGGGCGAT
      981
      *      *      *
AAELB006050ZPG          TGGTTTCTGCTGTTGCAGCTGTGCCGAATCTGAACCCGCTGGTCAGCCGTGATATTATG
      1047
AAEL006726Innexin4      TGGTTTCTACTGTACCAAATGGCTCGCAACATCAATAAGGGTGTGATGAGGGAAATCATC
      1047
AAEL008588Innexin7      TGGATGTTTTTATATTATTTAGGAAGAAATATAGACAGTCATCTTTTCAAGGCTCTGTTT
      1113
AAEL011248Innexin3      TTCTCATGATTCACCTCCTGGGACAGAACATCAACGTGACGTCCTACAGCGAGGTGCTG
      1056
AAEL014846Innexin1      TGGTGGATAAATATACATGTAGGAGGGAACCTGGATCCTCCCATTTTCAAGGATGTTGTA
      1038
AAEL014227Innexin2      TGGTTTTTATTATATAGATTAGGTGAAAATTTAGATAGTATTATATTTTCGTGATGTTATG
      1041
AAEL014227Innexin8      TGGTTTTTATTATATAGATTAGGTGAAAATTTAGATAGTATTATATTTTCGTGATGTTATG
      1041
      *      * *      *      ** * *      * * *
AAELB006050ZPG          TCCTGTATCTCGAAGAAACGACCCACCGACAGTCTTTACGCTAAACCAAAGAGCATGATG
      1107
AAEL006726Innexin4      CGGGATCTGTCCAGAATC-GATCAAGAGCTAAACAT-----GTCGAAATCGAACGTAA
      1099
AAEL008588Innexin7      AGAGGTATTATTCAAAGGTTCAATGGAACCTCGACATGAATCG-----
      1155

```

```

AAEL011248Innexin3      CACTCGCTGATGAACCGCCTAAACGAGGACAGAACTCGCGATACGCCTTCGGCGCCGTCC
      1116
AAEL014846Innexin1      GCGGAACTCGCCAAGCAGATAGAACC GCCACATAAAAAATGGAAAACAAAGAC-----
      1090
AAEL014227Innexin2      CAAGATTTAGCGAATCGTCTACATAATAATCAACACCATCGTGTACCTGGTATG-----A
      1096
AAEL014227Innexin8      CAAGATTTAGCGAATCGTCTACATAATAATCAACACCATCGTGTACCTGGTATG-----A
      1096

```

*

```

AALB006050ZPG           ATGACCGCCGATTTCTA--CCAGGACCAAGATG-----GCGATCTAGAGATAGGCGAGG
      1159
AAEL006726Innexin4      ATGAGCTGCAATTGGAGGTCGAGGCCGAGGATGAATTGGAGGAGATTGAAGATGACGAGG
      1159
AAEL008588Innexin7      -----AGTAAAAAAATCAGTAAAAATCAGAACGATGAGGCTGACGAAACTGAACTTA
      1207
AAEL011248Innexin3      ACCC----TGGAGATGGCTCCCATCTATCCGAAATTGGAAAATACGGTAAAGATACTGC
      1172
AAEL014846Innexin1      -----
      1090
AAEL014227Innexin2      A-----AGGTG-----AAATACAG-----GA
      1112
AAEL014227Innexin8      A-----AGGTG-----AAATACAG-----GA
      1112

```

```

AALB006050ZPG           TTAATG-----TTTAG      1170
AAEL006726Innexin4      CAACGG-----TGTGA      1170
AAEL008588Innexin7      TAAGTGAAAAACATTGA      1224
AAEL011248Innexin3      TATCTGA-----      1179
AAEL014846Innexin1      --TCTGA-----      1095
AAEL014227Innexin2      TGCATGA-----      1119
AAEL014227Innexin8      TGCATGA-----      1119

```

*

POE 2 Transformación de *E. coli* HT115(DE3) con ADN plasmídico del clon 2 de *ZPG* y clon 3 de *Boule* por choque térmico.

Código del SOP	1
Área	Ingeniería genética
Versión	Primera
Idioma	Español
Título	Transformación de <i>E. coli</i> HT115(DE3) con ADN plasmídico del clon 2 de <i>ZPG</i> y clon 3 de <i>Boule</i> por choque térmico.
Escrito por Fecha y firma	Paula Villatoro y Ana Gabriela Lara 28 de mayo de 2018
Revisado por Fecha y firma	
Aprobado por Fecha y firma	

1. Propósito

1.1. Transformar bacteria *Escherichia coli* HT115 (DE3) con plásmido pGEM-T Easy con inserto de gen *Boule* / *ZPG*.

2. Aplicación

La cepa de *E. coli* HT115 (DE3) cuenta con expresión de la ARN polimerasa T7 controlada por un promotor *lac* modificado. La transformación de esta cepa con ADN plasmídico con el inserto del gen de interés (*Boule* o *ZPG*) permite la producción de ARNdh del gen respectivo de manera controlada.

3. Referencias

3.1 Thermo Fisher Scientific. (2018a). Bacterial Transformation Workflow–4 Main Steps. Encontrado en: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/bacterial-transformation-workflow.html>.

3.2 Promega Corporation. (2015). pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual. Encontrado en: <https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360#protocols>

4. Terminología y abreviaciones

4.1. ARNdh: Ácido ribonucleico de doble hebra.

4.2. *ZPG*: *zero population growth*, gen identificado en *Drosophila melanogaster* que está implicado en espermatogénesis.

4.3. *Boule*: gen identificado en *Drosophila melanogaster* que está implicado en formación de espermatozoides.

4.4. *E. coli* HT115(DE3): Cepa transgénica de *Escherichia coli*, que posee una mutación en el gen que codifica para la Rnasa III, lo que evita la hidrólisis enzimática del material genético acumulado.

4.5 Tet: Tetraciclina

4.6 Carb: Carbenicilina

4.7 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

5. Principio

El método de choque térmico consiste en incubar las células en solución con cationes divalentes y a un cambio drástico de temperatura, esto provoca que la membrana se rompa y entre el plásmido (Thermo Fisher Scientific, 2018a).

6. Documentos asociados

Promega Corporation. (2015). pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual. Encontrado en: <https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360#protocols>

7. Seguridad

Usar guantes y bata de laboratorio.

8. Equipos materiales y reactivos

8.1 Equipo y materiales

- Campana de flujo laminar
- Baño de agua
- Cubeta con hielo
- Micropipetas de 10, 100 y 1000 µl
- Puntas para micropipeta de 10, 100 y 1000 µl
- Shaker
- Termómetro
- Centrifuga
- Placas petri de agar LB con tetraciclina y carbenicilina

8.2 Reactivos

- ADN plasmídico de los genes
- Células *E. coli* HT115 (DE3) competentes
- Medio SOC (20 g/L Triptone, 5 g/L extracto de levadura, 4.8 g/L MgSO₄, 3.603 g/L dextrosa, 0.5g/L NaCl y 0.186 g/L KCl)
- Agar LB (10 g/L Peptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl y 12 g/L Agar).
- Tetraciclina 500X (6.25 mg/ml)
- Carbenicilina 1000X (100 mg/ml)

9. Procedimiento

9.1 Agregar 1 µl de dilución 1:5 de ADN plasmídico a 50 µl de células *E. coli* HT115 (DE3) competentes.

Usar los siguientes productos de ligación: clon 2 de plásmido con inserto de ZPG y clon 3 de plásmido con inserto de Boule.

9.2 Colocar la mezcla de células y plásmido en hielo por 30 minutos

9.3 Colocar en baño de agua a 45°C por 45-60 segundos.

9.4 Colocar en hielo por 2 minutos

9.5 Añadir 900 µl de SOC

9.6 Incubar por 1 hora y media con agitación a 130 rpm en shaker

La agitación no debe subir de 155 rpm.

9.7 Centrifugar por 3 minutos a 12,000 rpm.

9.8 Sembrar en placas de LB con Tet (12.5 µg/ml) y Carb (100 µg/ml).

10. Cálculos

Cálculo para determinar de dilución y antibióticos

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Donde:

C_1 concentración/dilución inicial
 V_1 volumen a determinar
 C_2 concentración/dilución a la que se quiere llegar
 V_2 volumen que se quiere utilizar

11. Control de calidad

Para confirmar la estabilidad de los insertos en la cepa de *E. coli* HT115 (DE3) se realizará un PCR de colonias, con los plásmidos como control positivo (ver POE 2).

12. Reporte de datos y documentos utilizados

Anotar datos de temperaturas y revoluciones por minuto de incubación.

13. Reporte N/A

POE 3. PCR de colonias de cepa transformada con inserto de *Boule* y *ZPG*

Código del SOP	2
Área	Ingeniería genética
Versión	Primera
Idioma	Español
Título	PCR de colonias de cepa transformada con inserto de <i>Boule</i> y <i>ZPG</i>
Escrito por Fecha y firma	Paula Villatoro y Ana Gabriela Lara 28 de mayo de 2018
Revisado por Fecha y firma	
Aprobado por Fecha y firma	

1. Propósito

1.1. Confirmar la presencia del inserto de *Boule* / *ZPG* en las cepas de *E. coli* HT115 (DE3) transformadas.

2. Aplicación

El PCR de colonias permite seleccionar a las colonias de *E. coli* HT115 (DE3) que fueron transformadas de manera exitosa. Es decir, verificar que colonias cuentan con el constructo plasmídico con el inserto del gen (*Boule* o *ZPG*). Esto permite identificar las colonias de interés para hacer stocks de glicerol de las mismas.

3. Referencias

Promega Corporation. (2009). Recombinant Clone Screening Using the GoTaq® Hot Start

Green Master Mix. Encontrado en: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/promega-notes/101/recombinant-clone-screening-using-the-gotaq-hot-start-green-master-mix.pdf?la=en>

4. Terminología y abreviaciones

4.2. *zero population growth*, gen identificado en *Drosophila melanogaster* que está implicado en espermatogénesis.

4.3. *Boule*: gen identificado en *Drosophila melanogaster* que está implicado en formación de espermatozoides.

4.4. ANT: proteína de codificación en la especie de *Arabidopsis thaliana*.

4.5. *E. coli* HT115(DE3): Cepa transgénica de *Escherichia coli*, que posee una mutación en el gen que codifica para la Rnasa III, lo que evita la hidrólisis enzimática del material genético acumulado.

4.6 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

5. Principio

El PCR se basa en múltiples ciclos de temperatura que permiten la síntesis y amplificación de un fragmento específico de ADN. El PCR de colonias utiliza cebadores específicos para amplificar la porción del plásmido que cuenta con el inserto del gen. La presencia o ausencia del inserto se verifica por medio de bandas del tamaño esperado para el gen con electroforesis en gel de agarosa.

6. Documentos asociados

Promega Corporation. (2009). Recombinant Clone Screening Using the GoTaq® Hot Start Green Master Mix. Encontrado en:

<https://www.promega.com/-/media/files/resources/promega-notes/101/recombinant-clone-screening-using-the-gotaq-hot-start-green-master-mix.pdf?la=en>

7. Seguridad

Usar doble guantes y bata de laboratorio especial para trabajar con bromuro de etidio.

8. Equipos materiales y reactivos

8.1 Equipo y materiales

- Micropipetas de 10 y 100 µl
- Puntas para micropipetas de 10 y 100 µl
- Tubos eppendorf para PCR
- Termociclador
- Cámara de electroforesis
- Transiluminador UV

8.2 Reactivos

- ADN plasmídico usado en transformación
- Go Taq Hot Start Master Mix
- Cebadores M13 forward y reverse
- Colonias de bacterias transformadas
- Loading buffer
- Escalera 100pb Novagen
- Buffer TBE
- Agarosa
- Bromuro de etidio

9. Procedimiento

9.1 Reacción de PCR de colonias

9.1.1 Preparar el *Master mix* en un tubo eppendorf de 600 µl (cuadro 1).

9.1.2 Traspasar 14µl de *master mix* a 7 tubos eppendorf de 200 µl (uno para cada reacción)

9.1.3 Con ayuda de una micropipeta picar una colonia de *E. coli* HT115 (DE3) transformada con inserto de *Boule* / *ZPG* y resuspender la colonia en la mezcla de reacción de tubo.

9.1.4 A tres tubos diferentes con 14 µl del *master mix* cada uno, agregar 1 µl del ADN plasmídico con inserto del gen *Boule*, *ZPG* y *ANT* respectivamente para cada tubo. Estos serán los controles positivos del PCR.

Usar el clon 2 de plásmido de ZPG y clon 3 de plásmido de Boule (plásmidos utilizados para la transformación).

9.1.5 Dejar un tubo con 14µl del *master mix* sin plásmido ni colonia, como control negativo del PCR.

9.1.6 Correr en termociclador en programa de Colony PCR

Cuadro 59. Reacción de PCR de colonias

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	1 reacción	8 reacciones
Go Taq Hot Start Master Mix	2X	1X	7.5 µl	60 µl
Cebador M13F	10 µM	0.5 µM	0.75 µl	6 µl
Cebador M13R	10 µM	0.5 µM	0.75 µl	6 µl
Agua			5 µl	50 µl
Colonia/plásmido			1 µl	N/A

9.2 Electroforesis en gel de agarosa

9.2.1 Preparar gel de agarosa 0.8% en buffer TBE. Colocar mezcla en erlenmeyer y calentar en microondas hasta que esté cristalino.

Es importante que esté completamente transparente, de lo contrario el gel no se podrá visualizar bien.

9.2.2 Esperar a que la temperatura disminuya y agregar 2 µl de bromuro de etidio y colocar gel sobre la canasta con el peine. Dejar polimerizar el tiempo que sea necesario.

9.2.3 Pasar el gel a la cámara de electroforesis y llenar la cámara con buffer TBE.

Asegurarse que esté colocado en dirección de negativo a positivo.

9.2.4 Cargar 7µl de escalera de 100pb en el primer pozo.

9.2.5 En los demás pozos cargar 6µl de los productos de PCR y de los controles

9.2.6 Correr a 100V por 30 minutos.

Estar atento para que la corrida no se salga del gel, de ser necesario apagar la cámara antes de que transcurran los 30 minutos.

10. Cálculos

Gel de agarosa 0.8% en buffer TBE

$$C1V1=C2V2$$

$$100\%V1=0.8\%(45 \text{ TBE})$$

$$V1=0.36g \text{ de agarosa}$$

11. Control de calidad

Se esperan bandas de 440 pb para el gen *Boule* y de 412 pb para *ZPG*.

12. Reporte de datos y documentos utilizados

Anotar el mapa de carga del gel y anotar los tamaños obtenidos de los fragmentos.

13. Reporte

N/A

POE 4. Optimización de la producción de ARNdh en bacterias transgénicas de *E. coli* HT115(DE3) para alimentar *Anopheles albimanus*

Código del SOP	3
Área	Ingeniería genética
Versión	Primera
Idioma	Español
Título	Optimización de la producción de ARNdh en bacterias transgénicas de <i>E. coli</i> HT115(DE3) para alimentar <i>Anopheles albimanus</i>
Escrito por Fecha y firma	Paula Villatoro y Ana Gabriela Lara 28 de mayo de 2018
Revisado por Fecha y firma	
Aprobado por Fecha y firma	

1. Propósito

- 1.1. Producir una concentración de ARNdh mayor a 100 ng/uL de los genes *ZPG*, *Boule* y *ANT* por bacterias de *E. coli* HT115(DE3) transgénicas para su posterior evaluación de silenciamiento en *An. albimanus*.

2. Aplicación

El ARNdh producido por las bacterias de *E. coli* HT115(DE3) se usará para la alimentación de larvas de *An. albimanus*. Esto producirá silenciamiento en los genes de espermatogénesis utilizados (*ZPG* y *Boule*) mediante el mecanismo de ARNi en los mosquitos de *An. albimanus*.

3. Referencias

- 3.1. Whyard, S. et al. 2015. Silencing the buzz: a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs. *Parasites & Vectors* 8(96): 1-11. DOI: 10.1186/s13071-015-0716-6
- 3.2. Ongvarrasopone, C. et al. 2007. A simple and cost effective method to generate dsRNA for RNAi studies in invertebrates. *Science Asia* 33(2007):35-39.

4. Terminología y abreviaciones

- 4.1. ARNdh: Ácido ribonucleico de doble hebra.
- 4.2. *An. albimanus*: *Anopheles albimanus*
- 4.3. *zero population growth*, gen identificado en *Drosophila melanogaster* que está implicado en espermatogénesis.
- 4.3. *Boule*: gen identificado en *Drosophila melanogaster* que está implicado en formación de espermatozoides.
- 4.4. ANT: proteína de codificación en la especie de *Arabidopsis thaliana*.
- 4.5. ARNi: ARN de interferencia
- 4.6. *E. coli* HT115(DE3): Cepa transgénica de *Escherichia coli*, que posee una mutación en el gen que codifica para la Rnasa III, lo que evita la hidrólisis enzimática del material genético acumulado.
- 4.7. IPGT: Isopropil-B-D-1-tiogalactopiranosido.

5. Principio

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo biológico, ampliamente distribuido en eucariotas, por el cual, se consigue silenciar genes, mediante moléculas de ARN de doble hebra (ARNdh). El descubrimiento de este mecanismo, se llevó a cabo hace 15 años y, desde entonces se han realizado diferentes investigaciones enfocadas, principalmente, a comprender mejor cómo funciona, su función en diferentes organismos, su uso para describir funciones de genes específicos y las potenciales aplicaciones que tendría en el desarrollo tecnológico, en otras áreas de la ciencia (Noriega, *et al.* 2016).

El silenciamiento de genes comienza con la separación del ARNdh en fragmentos pequeños (21 a 15 pares de bases) (Agrawal, *et al.* 2003), por la interacción de complejos enzimáticos del citoplasma con pequeñas moléculas de ARN (siRNA), las cuales actúan sobre el ARN mensajero (ARNm) endógeno, impidiendo que sea traducido a proteína. Por lo tanto, es un hecho que el ARNi puede ser una tecnología alternativa en el control de plagas, a través del silenciamiento selectivo de genes (Noriega, *et al.* 2016).

6. Documentos asociados

- 6.1. Noriega, D. *et al.* 2016. ARN de interferencia (ARNi): una tecnología novedosa con potencial para el control de insectos de plaga. *Journal of U.D.C.A. Act&Div. Cient.* 191(4):25-35.
- 6.2. Agrawal, Neema, *et al.* 2003. «RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications». *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 67 (4): 657–685.

7. Seguridad

- 7.1. Usar guantes y bata en todo momento.

8. Equipos materiales y reactivos

- 8.1.1. Shaker (Incubadora a 37°C con agitación)
- 8.1.2. Freidora
- 8.1.3. Lonchera con hielo y agua
- 8.1.4. Campana de Flujo laminar
- 8.1.5. Espectrofotómetro UV-VIS
- 8.1.6. Centrífuga con rotor de tubos falcon
- 8.1.7. Horno
- 8.2. Materiales
 - 8.2.1. Micropipetas de 1000 uL, 100/200 uL, 10 uL con sus respectivas puntas.
 - 8.2.2. Beaker con bolsa roja de desechos.
 - 8.2.3. Tubos eppendorf libres de nucleasas/estériles de 1.5mL y de 0.5 mL
 - 8.2.4. Gradilla de tubos eppendorf de 0.5 mL y 0.5 mL
 - 8.2.5. Tubos falcon estériles de 50 mL
 - 8.2.6. Erlenmeyers estériles de 125mL
 - 8.2.7. Cubetas de vidrio para espectrofotómetro
 - 8.2.8. Guantes
 - 8.2.9. Parafilm
 - 8.2.10. Frascos de vidrio con rosca
- 8.3. Reactivos
 - 8.3.1. Tetraciclina 500 x (concentración final de 1X o 6,260ug/mL)
 - 8.3.2. Carbenicilina 1000x (concentración final de 1X o 100ug/mL)
 - 8.3.3. Placas LB+Carbenicilina+tetraciclina
 - 8.3.4. LB Broth (atemperado)
 - 8.3.5. 2XYT Broth (atemperado)
 - 8.3.6. IPTG 800mM
 - 8.3.7. PBS 1X ((137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 10 mM Na₂ HPO₄, 1.8mM KH₂ PO₄, 1 mM, CaCl₂ •2H₂ O, 0.5mM MgCl₂ •6H₂ O) pH 7.4)
 - 8.3.8. Estreptomomicina 50 ug/uL

9. Procedimiento

9.1. Sembrar en placas de LB+Tetraciclina+Carbenicilina las bacterias *E. coli* HT115(DE3) transformada con el plásmido pGEMT-ZPG

Para ello, rápidamente y en bloque congelado sacar una pequeña porción de hielo del stock de glicerol y plaquear en toda la placa (con la misma asa). Guardar el stock de glicerol a -70°C inmediatamente.

9.2. Incubar las placas por aproximadamente 18h a 37°C.

9.3. Picar una colonia aislada en medio LB+Tetraciclina+Carbenicilina. Crecer el cultivo toda la noche O/N a 37°C con agitación moderada (aproximadamente 170-180 rpm).

La cantidad de LB a utilizar puede variar dependiendo de la cantidad de cultivo inducido que se necesitará, normalmente se realiza una dilución 6.66X.

9.4. Al día siguiente, realizar una dilución 6.66X de dicho cultivo en 2XYT + antibióticos, en el cuadro siguiente se presentan las cantidades para un cultivo de 50 mL.

Cuadro 60. Volúmen de medios y antibióticos a agregar

Antibiótico (concentración inicial)	LB (cultivo O/N)	2XYT
	7.50 mL	50 mL
Tetraciclina 500 X (6,260mg/mL)	15 uL	100 uL
Carbenicilina a 1000 X (100mg/mL)	7.50 uL	50 uL

9.5. Incubar el nuevo cultivo en 2XYT a 37°C con agitación moderada (170-180 rpm) por aproximadamente 20-30 minutos hasta alcanzar un $OD_{600} = 0.4$

Es necesario ser preciso ya que si el cultivo se pasa mucho más allá de 0.4 no es válido realizar diluciones ya que las bacterias se encuentran ya en otra fase de crecimiento. Por lo regular el tiempo que hemos utilizado son 25 minutos para el volumen que estamos utilizando.

9.6. Una vez alcanzado el $OD_{600} = 0.4$ se procede a realizar la inducción con IPTG 0.4mM.

El Stock de IPTG se encuentra a 800mM. Por lo que se agrega la mitad del volumen del medio en total.

9.7. Incubar a 37°C con agitación 180-190 rpm durante 2h exactas.

Posteriormente registrar el OD_{600} a la cual llegaron los cultivos. Por lo regular se encuentran en 1.20

9.8. Alícuotar 250 uL en tubos eppendorf de 1.5mL estériles. Hacer esto en triplicado y etiquetar correctamente.

Es importante que estas alícuotas se centrifuguen a 3700 g por 10 minutos a 4°C (paso 9.2 de POE 3.0) y se almacene en frío rápidamente a -70°C.

9.8.1 Para inactivar con estreptomycinina 50 ug/uL: Separar ¼ del cultivo y agregar 50 uL para un volumen de 25mL.

Si el volumen no es 25mL se debe de considerar que se agrega siempre el doble de antibiótico que el volumen del cultivo. Es decir, si tengo 125 mL de cultivo agrego 250 mL de antibiótico.

9.8.2. Incubar 1h en incubadora a 37°C con agitación (shaker)

9.8.3. Alícuotar 250uL en tubos de 1.5mL del cultivo incubado (duplicado).

9.8.4. Centrifugar a 3700 g por 10 minutos a 4°C (paso 9.2 de POE 3.0).

9.8.5. Traspasar sobrenadante a un nuevo tubo y almacenar pellet también.

9.8.6. Almacenar a -70°C

9.9. Proceder a realizar lavados para eliminar residuos de antibióticos e IPTG, para ello:

- Trasladar cultivos a tubos cónicos del tamaño apropiado.
- Centrifugar a 4,000g por 10 minutos
- Descartar sobrenadante
- Lavar el pellet con PBS 1X estéril a la mitad del volumen inicial del cultivo (si se desea concentrar). *Ejemplo: Si tengo 50 mL de cultivo agregó 25 mL de PBS 1X estéril, con el fin de concentrar aún más el ARNdh.*
- Centrifugar a 4,000g por 10 minutos

- f. Descartar sobrenadante
- g. Lavar el pellet con PBS 1X estéril (igual que paso d)
- h. Centrifugar a 4,000g por 10 minutos
- i. Descartar sobrenadante
- j. Resuspender el pellet en el mismo volumen de PBS 1X estéril que agregue en pasos d.

9.10. Inactivar las bacterias:

9.10.1. Ebullición en tubos falcon a 100°C por 15 minutos (últimamente usamos una freidora) y meter inmediatamente en agua con hielo por 8 minutos (Heat shock). Para este método de inactivación se resuspendió el pellet (paso 9.9 j) en la mitad de PBS 1X, para concentrar el cultivo a 2X.

9.10.2. Traspasar el cultivo en frascos de vidrio con tapadera de rosa e incubar a las bacterias durante **1 hora a 100°C en horno** de secado de cristalería previamente llevado a 100°C.

9.10.3. Traspasar el cultivo en frascos de vidrio con tapadera de rosa e incubar a las bacterias durante **1 hora a 70°C en horno** de secado de cristalería previamente llevado a 70°C.

9.10.4. Traspasar el cultivo en frascos de vidrio con tapadera de rosa e incubar a las bacterias durante **30 minutos a 70°C** en horno de secado de cristalería previamente llevado a 70°C.

9.10.4.1. Enfriar en hielo

9.11 En placa de LB+tet+carb plaquear 200uL, para verificar muerte de bacterias.

9.12. Alícuotar de 250 uL en tubos de 1.5mL del cultivo inducido e inactivado (cultivo obtenido del paso 9.9). Hacer estas alícuotas en triplicado/duplicado como se desee.

9.13. Almacenar a -70°C

10. Cálculos

Preparación de medio 2XYT

16g/L de triptona

10g/L de extracto de levadura

5g/L de NaCl

Diluir en 1L de agua destilada.

Hervir hasta disolver y medir pH.

Autoclavear 15-20min a 121°C.

Preparación de medio LB

Pesar 5g de triptona + 5g NaCl + 2.5g de extracto de levadura.

Diluir en 500mL de agua destilada y agitar hasta homogenizar la solución.

Medir pH 6.5 y autoclavear 15-20min a 121°C.

Preparación de antibióticos

a. Carbenicilina 100X

C1V1=C2V2

Disolver 500mg en 5mL de agua destilada. Esterilizar por filtración con filtro de 0.22um y hacer alícuotas de 1.6mL en tubos estériles. Almacenar a 4°C.

b. Tetraciclina 500X

C1V1=C2V2

500X (6.25mg/mL), Vf de 10mL. Pesar 62.5mg y disolver 10mL en etanol absoluto. Vortexear hasta que se homogenizar la muestra y almacenar a -20°C.

c. IPTG

C1V1=C2V2

Pesar 2g de IPTG y disolver en 10mL de agua destilada. Filtrar en filtro de 0.22um. Hacer alícuotas de 1.6mL y almacenar a 4°C.

Dilución 6.66x para el medio LB O/N
mL de LB = 50mL 2XYT/6.66X

Concentración de estreptomina 50 ug/uL
 250uL 50ug1uL=12500ug=12.5mg de estreptomina sulfate marca Gibco

11. Control de calidad

11.1. Usar guantes en todo el procedimiento

11.2. Verificación del crecimiento de bacterias en los erlenmeyers antes de iniciar el proceso mediante turbidez en el medio.

11.3. Verificación de OD600 antes de inducir y después de inducir.

12. Reporte de datos y documentos utilizados

Anotar absorbancias de los OD600 antes de inducir y después de inducir.

13. Reporte N/A

POE 5. Extracción de ARNdh mediante TRizol LS Reagent

Código del SOP	3.0
Área	Ingeniería genética
Versión	Primera
Idioma	Español
Título	Extracción de ARNdh mediante TRizol LS Reagent
Escrito por Fecha y firma	Paula Villatoro y Ana Gabriela Lara 28 de mayo de 2018
Revisado por Fecha y firma	
Aprobado por Fecha y firma	

1. Propósito

1.1. Extraer ARNdh de los genes *zpg*, *boule* y *ANT* producido por bacterias de *E. coli* HT115(DE3) mediante TRizol LS Reagent.

1.2. Verificar la integridad de ARNdh por medio de un gel de agarosa 1%.

2. Aplicación

El ARNdh extraído se puede utilizar para determinar si la concentración e integridad del mismo es la adecuada para alimentar a las larvas en sus estadios L2, L3 y L4 de *Anopheles albimanus* para generar un silenciamiento específico de los genes *zpg*, *boule* y *ANT*, aplicando el mecanismo de ARNi.

3. Referencias

Invitrogen, Thermo Fisher Scientific. TRizol LS Reagent: Experimental protocol for RNA isolation. En: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_ls_reagent.pdf.

4. Terminología y abreviaciones

4.1. ARNdh: Ácido ribonucleico de doble hebra.

4.2. *zero population growth*, gen identificado en *Drosophila melanogaster* que está implicado en espermatogénesis.

4.3. *boule*: gen identificado en *Drosophila melanogaster* que está implicado en formación de espermatozoides.

4.4. ANT: proteína de codificación en la especie de *Arabidopsis thaliana*.

4.5. ARNi: ARN de interferencia

5. Principio

El procedimiento se basa en usar el reactivo de TRIzol LS para aislar ARN total de buena calidad (así como ADN y proteínas) de la célula y muestras de tejido humano, animal, vegetal, de levadura o bacteriano en el menor tiempo posible. TRIzol LS es una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros componentes patentados que facilitan el aislamiento de una variedad de especies de ARN de gran o menor tamaño molecular. Así mismo este reactivo mantiene la integridad del ARN debido a la inhibición altamente efectiva de la actividad de la RNasa.

6. Documentos asociados

Invitrogen, Thermo Fisher Scientific. TRIzol LS Reagent: Experimental protocol for RNA isolation. En: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_ls_reagent.pdf.

7. Seguridad

Utilizar siempre guantes, bata y zapatos cerrados.

Es importante que al momento de realizar este procedimiento no se esté hablando ya que la inhalación de los reactivos puede causar irritación de las fosas nasales.

8. Equipos materiales y reactivos

8.1. Equipos

8.1.1. Centrifuga en frío

8.1.2. Heat block

8.1.3. Nano-Drop

8.1.4. Cámara de electroforesis

8.1.5. Microondas

8.2. Materiales

8.2.1. Micropipetas de 1000 uL, 100/200 uL, 10 uL con sus respectivas puntas.

8.2.2. Beaker con bolsa roja de desechos.

8.2.3. Tubos eppendorf libres de nucleasas/estériles de 1.5mL

8.2.4. Gradilla de tubos falcon y gradilla de tubos eppendorf de 1.5 mL

8.2.5. Beaker de 500 mL

8.2.6. Estufa

8.2.7. Guantes

8.3. Reactivos

8.3.1. SDS 1%

8.3.2. Buffer RNase A

8.3.3. ARNasa

8.3.4. TRIzol LS

8.3.5. Cloroformo absoluto

8.3.6. Isopropanol absoluto

8.3.7. Etanol al 75%

8.3.8. Agua libre de RNasas (DEPC)

8.3.9. Agarosa

8.3.10. Buffer TAE

9. Procedimiento

9.1. Alicuotar 250uL del cultivo inducido

Únicamente en los pasos siguientes: después de inducir con IPTG 2h y después de inactivar bacteria con método de ebullición, ya que con estos pasos se realiza una comparación entre

concentración inicial vs. final y se determina cuánto concentración de ARNdh se dará alimentar en 200 uL de cultivo.

9.2. Centrifugar a 3700g x 10 minutos a 4°C

Únicamente se centrifugan las alícuotas después de inducir con IPTG 2h, las inactivados no porque ya están lisadas las células, por lo que el ARNdh está en todas partes.

9.3 Resuspender pellets en 50 uL de SDS 1% y lisar hirviendo por 2 minutos en beaker con agua. Dejar reposar por 5-10 minutos.

9.4 Añadir 64 uL de buffer RNase A.

Dicho buffer contiene 30 mM sodium acetate, 10 mM Tris-HCl pH 7.5 y 5 mM EDTA.

9.5. Hacer una dilución 1:10 de la ARNasa (Stock ARNasa A=20 ug/uL). Añadir 1uL de RNase A a los tubos (2ug añadidos).

Realizar este paso cuando ya se vaya a utilizar para mantener la estabilidad de la ARNasa.

9.6. Incubar a 37°C en heat block por 5 minutos.

9.7. Agregar 750 uL TRIZol LS y pipetear para homogeneizar bien.

9.8. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

9.9. Agregar 200uL cloroformo y mezclar vigorosamente a mano por 15 segundos.

9.10. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

9.11. Centrifugar 12,000g 15 minutos a 4°C

9.12. Remover fase superior transparente en ángulo de 45° y colocar en nuevo tubo.

La fase transparente es la acuosa, que es lo que nos interesa. Es importante que no se toque la interfase para no contaminar nuestro ARNdh.

9.13. Agregar 500uL isopropanol, mezclar por inversión vigorosamente.

9.14. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

9.15. Centrifugar 12,000g por 10 minutos a 4°C

9.16. Remover sobrenadante

9.17. Agregar 1 mL de ETOH 75% y mezclar.

9.18. Centrifugar a 7,500g por 5 minutos a 4°C y descartar sobrenadante.

9.19. Remover etanol y dejar secar

Se ha dejado secando aproximadamente por 20 minutos, sin embargo este paso puede variar según la presencia de restos de etanol.

9.20. Resuspender en 20 uL de H:O libre de RNasas

Para ello se coloca el tubo en 45°C y se deja caer el agua sobre el pellet invisible.

9.21. Incubar a 56°C por 10 minutos.

9.22. Cuantificar en NanoDrop y hacer gel de integridad (1% de agarosa)

9.23. Almacenar a -70°C

10. Cálculos

Determinación de la concentración de ARNdh en 200 uL de cultivo

$[\text{ARNdh}]_{\text{en 200uL}} = \text{ARNdhobtenido del Nano-Drop} * 20\text{uL de agua libre de RNasas} / 250\text{uL alícuota de cultivo inducido} * 200\text{uL}$

11. Control de calidad

11.1. Usar guantes en todo momento.

11.2. Tener un área restringida únicamente para trabajo de ARNdh que contenga todo el material necesario desinfectado con etanol y RNase away.

12. Reporte de datos y documentos utilizados

Para presentar los resultados se utilizará un cuadro donde se indique el nombre de la muestra, fecha de extracción, número de réplicas, valor de concentración obtenido por el Nano-Drop (ng/uL), absorbancia a 260/280 y 260/230 y concentración a dar a las larvas de *An. albimanus* en 200 uL de cultivo.

13. Reporte N/A

POE 6. Extracción de ARN de *Anopheles albimanus* (larva y pupa) con kit SV total RNA Isolation System Z3100 de Promega

Codigo del SOP	5
Área	Ingeniería genética
Version	Tercera
Idioma	Español
Título	Extracción de ARN de <i>Anopheles albimanus</i> (larva y pupa) con kit SV total RNA Isolation System Z3100 de Promega
Escrito por	Andrea Ramos Nufio; 12027
Fecha y firma	03 de febrero de 2018
Revisado por	
Fecha y firma	
Aprobado por	
Fecha y firma	

1. Propósito:

1. Aprender a extraer ARN de *Anopheles albimanus* adulto con el uso del kit SV total RNA Isolation System Z3100 de Promega.
2. Extraer ARN de buena calidad, sin contaminantes y a concentraciones adecuadas para ser utilizado en la síntesis de ADN complementario (cDNA).

2. **Aplicación:** El ARN extraído de este mosquito servirá para hacer síntesis de ADN copia y poder analizar la expresión de los genes ortólogos de *boule* y *zpg* en *An albimanus*. Esto se logrará mediante RT-PCR y análisis de expresión relativa mediante PCR en tiempo real con Sybr Green.

3. Referencias:

1. Promega. SV Total RNA Isolation System Technical Manual TM048 Z3100. <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/sv-total-rna-isolation-system-protocol.pdf>
2. Farrell, R. (2010). *RNA Methodologies: a laboratory Guide for Isolation and Characterization*. 4ta. Ed. Editorial Elsevier. 742Pp.

4. Terminología y abreviaciones:

1. BME: β -mercaptoetanol
2. GTG: Tiocianato de guanidina

5. Principio:

El procedimiento se basa en la homogenización de tejido de *An. albimanus* (larva y pupa) para la extracción de ARN mediante la combinación de tiocianato de guanidina (GTG) y β -mercaptoetanol para inactivar las ribonucleasas presentes en el tejido. El GTG junto con

dodecilsulfato sódico (SDS) actúan como disruptor de complejos nucleoprotéicos, permitiendo que el ARN liberado a la solución sea extraído libre de proteínas.

La dilución de extractos celulares en presencia de altas concentraciones de GTG causa precipitación selectiva de proteínas celulares, mientras que el ARN se mantiene en la solución. Luego de la centrifugación hecha para aclarar el lisado de las proteínas precipitadas y debris celular, el ARN es selectivamente precipitado con etanol y se une a la superficie en la columna utilizada (Spin Basket). La ADnasa del kit es aplicada a la membrana para digerir el ADN genómico. El ARN total luego es purificado de sales contaminantes, proteínas e impurezas celulares. Posteriormente es alicuotado, cuantificado y se analiza mediante PCR para saber si tiene contaminación de ADN genómico

6. Documentos asociados:

1. Promega. SV Total RNA Isolation System Technical Manual TM048 Z3100.
<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/sv-total-rna-isolation-system-protocol.pdf>

7. Seguridad:

1. El tiocianato de guanidina es un reactivo irritante por lo que si es inhalado, ingerido o absorbido causa quemaduras. Siempre utilizar guantes, bata y zapatos cerrados. Este reactivo rápidamente inhibe la actividad de RNAsas.
2. El β -mercaptoetanol es una solución igual de toxica que causa irritaciones en la piel y en el tracto respiratorio, usar guantes y trabajar bajo campana.
3. El SDS es un reactivo ligeramente irritante y causa dermatitis, por lo cual se recomienda de igual manera utilizar guantes, bata y zapatos cerrados.

8. Equipos, materiales y reactivos:

1. Equipos

1. Centrifuga
2. Macerador eléctrico

2. Materiales

1. Micropipetas: 1000uL, 200uL y 10uL.
2. Puntas: 1000uL, 200uL y 10uL.
3. Beaker de desechos.
4. Beaker para colocar maceradores o pistilos usados con cloro.
5. Tubos eppendorff 1.6mL libre de nucleasas (6 por duplicado).
6. Tubos eppendorff de 0.9 mL (6 por duplicado).
7. Tubos de 0.2 MI (2 por duplicado).
8. Pistilos libres de nucleasas (ver anexo).

3. Reactivos

1. Etanol al 95%

9. Procedimiento:

<p>9.1</p> <p>9.2</p> <p>9.3</p>	<p>Limpiar campana de ARN y dejarla bajo luz UV 15 minutos.</p> <p>Preparar el lisado de tejido de <i>Anopheles albimanus</i> a partir de muestras menores o iguales a 30mg.</p> <p>El número de individuos a utilizar por extracción es el siguiente:</p> <p style="text-align: center;">Cuadro 61. Individuos por extracción</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Estadios</th> <th>Peso por individuo (mg)</th> <th>Individuos por pool</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Larva L1</td> <td>0.20</td> <td>150</td> </tr> <tr> <td>Larva L2</td> <td>0.25</td> <td>120</td> </tr> <tr> <td>Larva L3</td> <td>0.70</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>Larva L4</td> <td>4.3</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>Pupa</td> <td>6.7</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table> <p><i>Las pupas deben de ser sexadas. Se hace duplicado por macho y duplicado por hembra.</i></p>	Estadios	Peso por individuo (mg)	Individuos por pool	Larva L1	0.20	150	Larva L2	0.25	120	Larva L3	0.70	40	Larva L4	4.3	7	Pupa	6.7	5
Estadios	Peso por individuo (mg)	Individuos por pool																	
Larva L1	0.20	150																	
Larva L2	0.25	120																	
Larva L3	0.70	40																	
Larva L4	4.3	7																	
Pupa	6.7	5																	
<p>9.4</p>	<p>Etiquetar todos los tubos de 1.6mL que se van a usar, identificando el estadio al que pertenecen, si son machos o hembras, fecha, número de duplica e iniciales de la(s) persona(s) que está haciendo la extracción para futuras identificaciones.</p>																		
<p>9.5</p> <p>9.6</p> <p>9.7</p> <p>9.8</p>	<p>Utilizar filtro de 53 um para trasladar las larvas en los tubos cuando estén en los estadios de L1, L2 y L3. Tratar de hacer este paso tratando de que no quede ninguna larva en el filtro y que todas sean colocadas en los tubos.</p> <p>Colocar las larvas, pupas en tubos de 1.6mL.</p> <p>Extraer toda el agua de los tubos colocándolos en el bloque frío alrededor de 40 segundos- 1 minuto para que las larvas y pupas bajen al fondo del tubo, de esta manera será más fácil extraer el agua del tubo con pipeta de 1000uL o 200uL.</p> <p>No hay necesidad de usar filtro con las larvas L4 ni pupas para introducirlas en el tubo de 1.6mL. Para esto se usa una pipeta pasteur y se introducen en el tubo. Se coloca en bloque frío y se extrae el agua.</p> <p>IMPORTANTE:</p> <p>Modificaciones (RNA later): En caso de muestras preservadas en RNA later, remover el RNA later utilizando una micropipeta. OJO: cuando el ARN later se descongela queda un sedimento blanco al final del tubo, entonces previo a removerlo se debe de pipetear para solubilizarlo nuevamente.</p>																		
<p>9.9</p> <p>9.10</p>	<p>Agregar a cada tubo, 175uL de RNA Lysis buffer (+ BME).</p> <p>Macerar con el macerador eléctrico y con los pistilos previamente tratados con 2.5% SDS y NaOH 5N. Todas las maceraciones deben de realizarse en frío, es decir utilizando el bloque frío.</p> <p>Realizar la lisis durante aprox. 15-20 min</p> <p><i>Macerar hasta que no se vea fragmentos de larva o pupa. La maceración permite homogeneizar el tejido.</i></p> <p><i>El β-mercaptoetanol y los pistilos tratados con SDS y NaOH inhiben la contaminación por nucleasas. Posterior a la maceración, los pistilos deben de dejarse en romojo con cloro, luego tratarlos nuevamente si es necesario.</i></p>																		

10.1	Añadir 350uL de RNA Dilution Buffer.												
10.11	Mezclar por inversión de 3-4 veces.												
9.7	Centrifugar por 10 minutos a 13,000 rpm a temperatura ambiente.												
9.8	<p>Si usted todavía observa partículas en el lisado a transferir, centrifugar nuevamente por 5 minutos más. Solamente si considera necesario, repetir 5 minutos si todavía se observan partículas en el sobrenadante (pocas veces fue necesario repetir la centrifugación de 5 minutos dos veces).</p> <p>Transferir alrededor de 475uL del lisado a un tubo de 1.6uL libre de nucleasas, nuevo y previamente etiquetado según las muestras, fecha, número de dúplica, sexo e iniciales de la persona que está realizando el proceso para evitar confusiones. ¡CUIDADO! NO TRANSFERIR PARTÍCULAS DEL PELLETT FORMADO, EVITAR PASAR ESTAS PARTÍCULAS EL SOBRENADANTE AL NUEVO TUBO.</p> <p><i>Este buffer contiene tiocianato de guanidina que actúa como disruptor de complejos de nucleoproteínas, permitiendo que el ARN sea liberado a la solución. Los desechos celulares se descartan mediante centrifugación. *En este paso NO se incuba a 70°C por 3 minutos debido a que al hacerlo el ARN sale en poca concentración y de baja integridad.</i></p>												
9.9	Agregar 200uL de etanol al 95% a cada tubo, mezclar por pipeteo y transferir a la Spin Basket o columna.												
9.10	Centrifugar por 1 minuto a 13,000 rpm a temperatura ambiente. Descartar el eluido (lo que paso a través de la columna)												
9.11	Agregar 600uL de RNA Wash Solution.												
9.12	Centrifugar por 1 minuto a 13,000 rpm a temperatura ambiente. Ya no es necesario usar el bloque frío.												
	<i>El ARN es selectivamente precipitado con etanol. Luego de que se eliminó el débris celular y los desechos proteicos mediante la centrifugación, el ARN se une a la superficie de la columna. La reacción de unión a la columna ocurre rápidamente debido a la ruptura de las moléculas de agua por las sales caotrópicas, lo que permite la adsorción de los ácidos nucleicos en la sílica.</i>												
9.13	Preparar la mezcla de incubación de ADnasa mezclando a temperatura ambiente los siguientes reactivos incluido en el kit:												
	Cuadro 62. Mezcla de reactivos												
9.14	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th></th> <th>Yelow Core Buffer</th> <th>MnCl2 0.09M</th> <th>DNase I</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>N =1</td> <td>40ul</td> <td>5ul</td> <td>5ul</td> </tr> <tr> <td>9.15</td> <td>N=</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Yelow Core Buffer	MnCl2 0.09M	DNase I	N =1	40ul	5ul	5ul	9.15	N=		
	Yelow Core Buffer	MnCl2 0.09M	DNase I										
N =1	40ul	5ul	5ul										
9.15	N=												
9.16	Estos son los volúmenes usados para 1 tubo o una columna de extracción de ARN. Se deben de aumentar las cantidades dos o cuatro veces, ya que se trabaja en duplicado (o en el caso de adultos y pupas, se debe de aumentar cuatro veces dicha cantidad).												
9.17	<p>Añadir 50 uL de la mezcla de ADnasa directamente a la membrana de cada columna.</p> <p>Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.</p> <p><i>La ADnasa es aplicada directamente a la membrana para digerir todo el ADN genómico. El tiempo de incubación se aumentó 15 minutos más de los establecido por el protocolo del kit de extracción, porque al dejar solamente incubando por 15 minutos todavía se encontraba presencia de ADN genómico al hacer PCR convencional. Al dejarla por 30 minutos, se obtuvo una banda de</i></p>												

	<p><i>amplificación menos fuerte luego de hacer PCR que en las muestras que se incubaron solamente por 15 minutos.</i></p> <p>NO OLVIDAR: Agregar 200uL de DNase STOP SOLUTION a la spin basket.</p> <p>Centrifugar 1 minuto a 13,000 × g.</p>
9.18	Añadir 600 uL de RNA Wash Solution.
9.19	Centrifugar por 1 minuto y vaciar lo eluido.
9.20	Añadir 250uL de RNA Wash Solution,
9.21	Centrifugar por 2 minutos
9.22	Transferir la columna a un nuevo tubo de 1.6mL libre de nucleasas.
9.23	Añadir 100uL de agua libre de nucleasas a la membrana y centrifugar por 1 minuto. <i>El ARN extraído total es eluido con el agua libre de nucleasas al tubo de 1.6mL.</i>
9.24	<p>Transferir el volumen obtenido de esta última centrifugación al tubo de 1.6ml el cual debe de estar correctamente etiquetado con:</p> <ul style="list-style-type: none"> • fecha de extracción • especie • estadio • género • número de réplica (R1, R2, etc) . • Cantidad de ARN (ej. 1ug) <p>Colocar nuevamente en bloque frío.</p> <p><i>No se transfiere directamente la columna de extracción de ARN a este tubo de elución, ya que al momento de centrifugar la tapadera del tubo que trae el kit se rompe, pero no se rompe en otros tubos libres de nucleasas comprados aparte.</i></p>
9.25	Cuantificar rápidamente las muestras en nanodrop (mantener en bloque frío) (En triplicado). Sacar el promedio y usar este valor para estimar la cantidad necesaria para hacer alícuotas de 1ug de ARN.
9.26	Hacer alícuotas de 1ug de ARN.
9.27	<p>Etiquetar de la misma manera los tubos de alícuotas.</p> <p>Guardar todas las muestras incluyendo el stock a -70°C, menos la alícuota de 2.5uL ya que se usa para cuantificar el ARN en Nanodrop, saber si la concentración es suficiente y si la extracción fue exitosa. Anotar las razones A260/280 y A260/230.</p> <p><i>Si se necesita verificar integridad se recomienda hacer gel de agarosa 1.5%, se dejan correr las muestras de 5uL de ARN y 1uL de loading buffer a 100V por 35 minutos.</i></p> <p><i>Si se quiere saber si hay contaminación por ADN genómico, realizar PCR convencional utilizando cebadores o iniciadores de Actina 10uM y 1uL de muestra de ARN extraído. Correr dichas muestras en gel de agarosa al 1.5% utilizando un marcador molecular de 50bp. Se puede observar que sí hay presencia de ADN genómico, por lo tanto se debe de hacer un tratamiento con ADnasa antes de realizar la reacción de transcriptasa reversa.</i></p>

10. **Cálculos:**
N/A

11. **Control de calidad:**

1. Usar guantes en todo momento.

2. Tener un área restringida únicamente para trabajo con ARN que contenga todo el material necesario tratado adecuadamente. Es decir, trabajar bajo campana de ARN, utilizando pipetas y puntas únicamente usadas para la extracción de ARN.
3. Limpiar pipetas, caja de puntas y bloque frío con RNase Away. Dejar en campana de flujo laminar de ARN con luz UV por 15 minutos antes de realizar la extracción de ARN.
4. Al mover reactivos, tocar espátulas para realizar mediciones de reactivos y tocar papel para pesar.
5. En cualquier momento posible utilizar material plástico desechable para manipular ARN.
6. Política de resolución de conflictos.

1.

12. Reporte de datos y documentos utilizados:

Se debe de anotar si no se llevaron a cabo todos los pasos que manda este protocolo, por si no se obtuvo la concentración adecuada. Si hizo o no un paso de este protocolo que lo llevo a tener una mayor concentración de ARN, añadirlo al mismo.

Las concentraciones de ARN y las absorbancias deben de anotarse en el cuadernito de manera ordenada para evitar confusiones y tener listos los datos para calcular la cantidad de ARN a utilizar en la reacción de transcripción reversa. Se pueden reportar las concentraciones de la siguiente manera:

Cuadro 63. Muestra registro de datos

Estadio	Género	Replica	Fecha extracción ARN	Conc. ng/ul	Conc. ng/ul	Conc. ng/ul	Promedio ng/ul	260/280	260/230	Cantidad para 1 ug
										=1000ng/ promedio

13. Reporte:

N/A

ANEXO

- Pistilos tratados NaOH 5N y SDS 0.5%.
 1. Dejar overnight los pistilos usados en un beaker de 600mL con 250mL de NaOH 5N y 250mL de SDS 0.5%.
 2. Enjuagar los pistilos con agua ultrapura autoclaveada.
 3. Colocarlos en aluminio o bolsas de papel manila.
 4. Autoclavear y secar.
 5. Guardar en gaveta de ARN y no abrir hasta su uso y bajo campana.

POE 7. Tratamiento de ARN de *Anopheles albimanus* con ADNasa y reacción de transcripción reversa

Codigo del SOP	6
Área	Ingeniería genética
Version	Segunda
Idioma	Español
Título	tratamiento de ARN de <i>Anopheles albimanus</i> con ADNasa y reacción de transcripción reversa

Escrito por	Andrea Ramos Nufio; 12027
Fecha y firma	02 de Febrero de 2018
Revisado por	
Fecha y firma	
Aprobado por	
Fecha y firma	

14. Propósito:

1. Realizar tratamiento con ADnasa con el kit RQ1 RNase-free DNase (Cat#M6101), para eliminar contaminación por ADN genómico de las muestras de ARN extraídas de los distintos estadios de *Anopheles albimanus*.
2. Verificar que el ARN esté libre de ADN genómico mediante PCR convencional con iniciadores de Actina.
3. Hacer ADN copia a partir del ARN mensajero extraído usando el kit Go Script Reverse Transcription System (Promega A5000-A50001).
4. Verificar la presencia ADN copia hecho mediante PCR convencional.

15. Aplicación:

Entre las aplicaciones de la reacción de transcripción reversa se encuentran:

- Amplificación del ADN copia hecho a partir de transcritos de ARNm de genes específicos para caracterizar la expresión del gen a lo largo del ciclo de vida de una especie.
- Generación de bibliotecas de ADN copia.

16. Referencias:

1. Promega. GoScript Reverse Transcription System Technical Manual. TM316. Consultado en: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/goscript-reverse-transcription-system-protocol.pdf>
2. Promega. RQ1 RNase-Free DNase. Part#9PIM610. Consultado en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/rq1-rnase-free-dnase-protocol.pdf?la=en>
3. Farrell, R. (2010). *RNA Methodologies: a laboratory Guide for Isolation and Characterization*. 4ta. Ed. Editorial Elsevier. 742Pp.

17. Terminología y abreviaciones:

1. cDNA: ADN copia
2. PCR: reacción en cadena de la polimerasa
3. Iniciadores: cebadores
4. CEB: Centro de Estudios en Biotecnología

18. Principio:

La reacción de transcripción reversa es utilizada para sintetizar de manera enzimática ADN copia (cDNA) *in vitro* a partir de una hebra plantilla de ARN. Para esta reacción es crítica la integridad del ARN y que no haya otros ácidos nucleicos como ADN genómico en el tubo de reacción. Por lo tanto, es necesario hacer tratamiento con la enzima DNasa I para degradar todas las plantillas de ADN genómico en el ARN extraído. El tratamiento con DNasa se realiza por medio del kit RQ1 RNase-free DNase (Promega, Cat#M6101) y para la reacción de transcripción reversa se utiliza el kit Go Script Reverse Transcription System (Promega, A5000 y A5001).

19. Documentos asociados:

1. Promega. GoScript Reverse Transcription System Technical Manual. TM316. Consultado en: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/goscript-reverse-transcription-system-protocol.pdf>
2. Promega. RQ1 RNase-Free DNase. Part#9PIM610. Consultado en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/rq1-rnase-free-dnase-protocol.pdf?la=en>
3. Ausubel, F., R. Brent., R. Kingston, D., Moore., J.G. Seidman, J. Smith y K. Stuhl. 2003. Current Protocol in Molecular Biology. John Wiley & Sons. Consultado en: http://www.aun.edu.eg/molecular_biology/Proceeding_Dec2011/Current%20Protocols%20in%20Mol.%20Biol..pdf
4. Fichas internacionales de seguridad. 2007. Bromuro de etidio. IPCS. Consultado en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/1605a1679/1676.pdf>

20. Seguridad:

1. Bromuro de etidio: causa irritación ocular, dolor de garganta, toz. Se descompone al calentarla intensamente produciendo gases tóxicos, incluyendo bromuro de hidrógeno y óxidos fuertes. Utilizar doble guante al trabajar con esta sustancia.

21. Equipos, materiales y reactivos:

1. Equipos

1. Termociclador (Marca DEL CEB).
2. Minicentrífuga (para hacer spin down).

2. Materiales

1. Bloque frío
2. Micropipetas: 20, 100 y 10uL.
3. Puntas: 20, 100 y 10uL.
4. Beaker de desechos con cloro
5. Tubos ependorff 0.9mL
IMPORTANTE: asegurarse de que estos tubos quepan o casen completamente en las entradas del termociclador y no tener que cambiar los tubos a última hora cuando ya tengan el ARN.
6. Tubos ependorff 0.2mL

3. Reactivos

1. Kit RQ1 RNase-free Cat #M6101
2. Kit Go Script Reverse Transcription System

22. Tratamiento con RQ1 RNase-free DNase (Cat #M6101).

9.0 Hacer los cálculos correspondientes, como se muestra a continuación, antes de empezar a trabajar. Cada reacción debe de tener un volumen de ARN previamente extraído que corresponda a **1ug** de ARN; **1uL** de RQ1 RNase-free DNase **10x Reaction Buffer**, **1uL** de RQ1 RNase-free **DNase** y agregar H₂O libre de nucleasa para llevar a un volumen final de 10uL. **Hacer los cálculos en Excel e imprimir la hoja con el cuadro que contenga los volúmenes específicos de ARN y agua a agregar según corresponda.**

PUEDEN COPIAR ESTE CUADRO EN EL EXCEL E IMPRIMIR CUANDO ESTE PREPARANDO CADA REACCIÓN:

Cuadro 64. Muestras de ARN

No. mx (ID)	Nombre de mx	[ARN] ng/uL	Volumen de ARN tener 1ug de ARN.	Volumen de H2O.	DNasa	Buffer de DNasa	Volu men total	OBSER VACIONES
1							10	
2							10	
3							10	
4							10	

En esta tabla agregué el “ID” de la muestra para que sea fácil identificar los tubos que contienen ARN extraído de distintos estadios de *An. albimanus*. Esto es opcional, usted los puede identificar como usted quiera, pero DEBEN de estar CORRECTAMENTE identificados durante todo el proceso hasta llegar a hacer qPCR.

NOTA:

- Es obligatorio que la cantidad de ARN este estandarizada a 1ug para poder usar el kit de ADNasa como el protocolo señala y que la reacción sea eficiente.
- El volumen de ARN extraído para tratar con DNasa no debe de ser mayor a 8uL porque se quiere tener un volumen final por reacción de 10uL.
- Si el ARN extraído tiene una concentración muy alta y se necesita utilizar un volumen menor al que la pipeta puede medir de ARN para tener 1ug, entonces HAGA CÁLCULOS para utilizar un volumen de ARN de una dilución de 1:10 o 1:5.
- Si sucede todo lo contrario y tiene muestras con baja concentración de ARN y debe de utilizar más de 8uL de volumen de ARN para llegar a tener 1ug en la reacción, tiene dos opciones: precipitar con etanol o volver a extraer ARN si considera que la extracción no se hizo correctamente. Se precipita el ARN únicamente cuando es de larva L1 y/o L2.

NO SE PREOCUPE si tiene que volver a extraer, ya que es preferible volver a extraer que tener resultados alterados debido una mala extracción.

9.1 Después de hacer los cálculos e imprimir la hoja, limpie el área donde va a trabajar y cada uno de los instrumentos con Rnase away y etanol.

9.2 Etiquetar tubos de 0.9uL con un nombre, número o letra que corresponda a la muestra de ARN a tratar. Agregar de primero el volumen de agua correspondiente a cada tubo. Mantener en frío y agregar 1ul de RQ1 RNase-free DNase 10x **Reaction Buffer** y 1uL de RQ1 RNase-free **DNase** a cada tubo.

Por ejemplo, si usted tratará 15 muestras de ARN, se debe de hacer la solución de 15uL de RQ1 RNase-free DNase 10x Reaction Buffer y 15uL de RQ1 RNase-free DNase. Agregar en cada tubo de 0.9uL 2uL de esta solución y mantener en bloque frío.

IMPORTANTE:

- **PONGA ATENCIÓN y TRATE DE NO CONFUNDIRSE** al agregar los volúmenes de H₂O libre de nucleasas y/o ARN, ya que todas las muestras suelen tener concentraciones de ARN distintas, por lo tanto, volúmenes a agregar diferentes. Al hacer esta reacción se pretende estandarizar que todas las muestras tengan 1ug de ARN para que la reacción se eficiente.
- Se debe de agregar la mezcla de 2uL de RQ1 RNase-free DNase 10x **Reaction Buffer** y de RQ1 RNase-free DNase antes de preparar y agregar los volúmenes de ARN. El ARN se debe de sacar de -70°C hasta que se vaya a utilizar para que no se degrade. Por esto, es necesario hacer alícuotas de 5-10uL cuando se hace la extracción de ARN, para no sacar el stock sino una alícuota.
- Nuevamente, **SI SE CONFUNDE**, puede tomar otra alícuota de ARN y hacer de nuevo la reacción. No es lo recomendable, pero es preferible esto a tener resultados alterados.

9.3 Agregar el volumen de ARN correspondiente a cada muestra según sus cálculos hechos. Hacer un breve spin down y colocar nuevamente las muestras en frío.

9.4	<p>Incubar a 37°C por 1 hora en el termociclador. El programa en el termociclador que se encuentra en el CEB (marca) se llama: Tratamiento de DNASA I.</p> <p>Durante este tiempo, usted debe de etiquetar nuevos tubos de 0.9uL (el número de tubos depende del número de muestras a tratar) a los cuales se les agregará 1uL de ARN tratado de cada muestra para hacer PCR y confirmar que ya no hay ADN genómico.</p>																					
9.5	<p>Terminado el tiempo de incubación agregar 1uL de RQ1 DNase Stop Solution a cada tubo e incubar a 65°C por 10 minutos. El programa en el termociclador que se encuentra en el CEB (marca) se llama: Tratamiento de DNASA II.</p> <p><i>Se agrega DNase Stop Solution para inactivar DNasa. Se debe de confirmar mediante PCR que no hay ADN genómico en la muestra, porque esto interfiere en la reacción de transcripción reversa.</i></p>																					
9.6	<p>Luego de inactivar la DNasa, agregar a tubos de 0.9uL 1uL de las muestras tratadas para hacer PCR. Las muestras del ARN tratado (stock y alícuotas de 1uL) se guardan a 4°C mientras se confirma cuáles son las muestras que están libres de ADN genómico.</p> <p style="text-align: center;">Cuadro 65. Volúmenes utilizados para hacer PCR</p> <table border="1" data-bbox="362 1104 1174 1453"> <thead> <tr> <th>Reactivo</th> <th>Volumen (n=1)</th> <th>Volumen (n= X muestras)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x</td> <td>7.5uL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Cebador Forward Actina 10uM</td> <td>1uL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Cebador Reverse Actina 10uM</td> <td>1 uL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Agua libre de nucleasas</td> <td>5.5 uL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Plantilla de ARN</td> <td>1 uL</td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>Volumen total por reacción</td> <td>15 uL</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p><i>NOTA: Limpiar la campana de área blanca previamente con etanol y cada instrumento a utilizar. Dejar bajo UV durante 15 minutos antes y después de hacer el PCR. NO OLVIDAR agregar al PCR la reacción de control negativo (agua) y control positivo (ADN genómico de <i>An. albimanus</i>).</i></p>	Reactivo	Volumen (n=1)	Volumen (n= X muestras)	Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x	7.5uL		Cebador Forward Actina 10uM	1uL		Cebador Reverse Actina 10uM	1 uL		Agua libre de nucleasas	5.5 uL		Plantilla de ARN	1 uL	-----	Volumen total por reacción	15 uL	
Reactivo	Volumen (n=1)	Volumen (n= X muestras)																				
Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x	7.5uL																					
Cebador Forward Actina 10uM	1uL																					
Cebador Reverse Actina 10uM	1 uL																					
Agua libre de nucleasas	5.5 uL																					
Plantilla de ARN	1 uL	-----																				
Volumen total por reacción	15 uL																					
9.7	<p>Colocar el PCR en termociclador con las siguientes condiciones:</p> <p style="text-align: center;">Cuadro 66. Condiciones de termociclador</p> <table border="1" data-bbox="362 1703 1125 1875"> <thead> <tr> <th>Paso</th> <th>Temperatura</th> <th>Tiempo</th> <th>Número de ciclos</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Desnaturalización inicial</td> <td>95°C</td> <td>2 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Desnaturalización</td> <td>95°C</td> <td>30seg</td> <td rowspan="2">35</td> </tr> <tr> <td>Anillamiento</td> <td>56°C</td> <td>30seg</td> </tr> </tbody> </table>	Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos	Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1	Desnaturalización	95°C	30seg	35	Anillamiento	56°C	30seg						
Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos																			
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1																			
Desnaturalización	95°C	30seg	35																			
Anillamiento	56°C	30seg																				

	Extensión	72°C	30seg																																	
	Extensión final	72°C	5min	1																																
	Hold	4°C	Indefinido	1																																
9.8	<p>Mientras ocurre el PCR. Hacer gel de agarosa al 1.5% y el mapa de las muestras que se colocaran en cada pozo del gel. Al finalizar el PCR, correr 7uL de cada una de las muestras con una escalera de 50pb a 100V. Este pendiente del gel. Revíselo cada cierto tiempo para evitar que se salgan las muestras. Si se salen debe repetirlo. Si hay contaminación se observarán dos bandas: una en 150pb y otra en ~300pb.</p> <p>NOTA: Si no hubo amplificación de ADN genómico, entonces proseguir con la transcripción reversa. Si hubo amplificación, tratar nuevamente la(s) muestra(s) por media hora más agregando nuevamente Dnasa y Buffer de Dnasa.</p>																																			
23.	Reacción de Transcriptasa Reversa con Kit GoScript Reverse Transcription System, A5000-A5001																																			
10.1	<p>A cada muestra de ARN tratado Agregar 1uL de cebadores Oligo (dT) y 1uL de random cebadores del kit GoScript Reverse Transcription System A5000-A5001 para tener un volumen total de 11uL. Calentar en el termociclador a 70°C por cinco minutos.</p> <p><i>La temperatura permite que los cebadores se anillen a la plantilla de ARN. Se usan estos dos tipos de cebadores para tener rendimientos altos de ADN copia.</i></p>																																			
10.2	<p>Luego de incubar por cinco minutos, colocar todos los tubos en frío (en hielo) hasta que la mezcla de Transcriptasa Reversa esté lista. Asegurarse de que todos los tubos estén cerrados y en buen estado. Preparar la mezcla de transcriptasa reversa en un tubo de 0.2mL identificado y libre de nucleasas. Agregar los componentes en el orden del cuadro 3.</p> <p>Cuadro 67. Preparación de reacción de Transcriptasa Reversa (vortexear cada componente antes de usar).</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th># de Reactivo</th> <th>Componente</th> <th>n=1 (uL)</th> <th>Volumen n= __</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>Nuclease-free water (a un volumen final de 15uL)</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>GoScript™ 5X Reaction Buffer</td> <td>4.0</td> <td></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>MgCl₂ (1.5-5.0 mM)</td> <td>2.0</td> <td></td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>e Mix (concentración final de 0.5mM cada dNTP)</td> <td>1.0</td> <td></td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>Recombinant RNasin Ribonucleasa Inhibitor</td> <td>1.0</td> <td></td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>GoScript™ Reverse Transcriptase</td> <td>1.0</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Volumen final</td> <td>9</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p><i>IMPORTANTE: Se recomienda agregar una reacción más, por error de pipeteo.</i></p>				# de Reactivo	Componente	n=1 (uL)	Volumen n= __	1	Nuclease-free water (a un volumen final de 15uL)	-	-	2	GoScript™ 5X Reaction Buffer	4.0		3	MgCl ₂ (1.5-5.0 mM)	2.0		4	e Mix (concentración final de 0.5mM cada dNTP)	1.0		5	Recombinant RNasin Ribonucleasa Inhibitor	1.0		6	GoScript™ Reverse Transcriptase	1.0			Volumen final	9	
# de Reactivo	Componente	n=1 (uL)	Volumen n= __																																	
1	Nuclease-free water (a un volumen final de 15uL)	-	-																																	
2	GoScript™ 5X Reaction Buffer	4.0																																		
3	MgCl ₂ (1.5-5.0 mM)	2.0																																		
4	e Mix (concentración final de 0.5mM cada dNTP)	1.0																																		
5	Recombinant RNasin Ribonucleasa Inhibitor	1.0																																		
6	GoScript™ Reverse Transcriptase	1.0																																		
	Volumen final	9																																		
10.3	<p>Combinar 9 uL de la mezcla de Transcriptasa reversa con cada tubo de 11 uL del RNA que se dejó en hielo. Realizar el anillamiento en el termociclador a 25°C por 5 minutos. Extensión en el a 42°C por 1 ½ hora y, por último, inactivar la transcriptasa reversa a 70°C por 15 minutos. El programa utilizado del termociclador del CEB se llama: “”.</p>																																			
10.4	<p>Mientras esto ocurre, etiquetar nuevamente 3 tubos por cada muestra. Agregar a uno de estos tubos 1uL de cDNA hecho y hacer 2 alícuotas de 2uL. Guardar el stock de cDNA y las dos alícuotas a 2uL a -70°C.</p> <p><i>Es necesario hacer la alícuota de 1uL para verificar la presencia del cDNA. Las alícuotas de 2uL se utilizan posteriormente para hacer PCR tiempo real o hacer PCR nuevamente.</i></p>																																			
10.5	<p>Preparar la campana de área blanca para hacer PCR. Limpiarla con etanol. Dejar en UV por 15</p>																																			

	minutos.																																															
10.6	<p>Hacer nuevamente PCR convencional para confirmar presencia de cDNA de la siguiente manera:</p> <p style="text-align: center;">Cuadro 68. Volúmenes utilizados para hacer PCR</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Reactivo</th> <th>Volumen (n=1)</th> <th>Volumen (n=_____)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x</td> <td>7.5uL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Cebador Forward Actina 10uM</td> <td>1uL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Cebador Reverse Actina 10uM</td> <td>1 uL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Agua libre de nucleasas</td> <td>4.5 uL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Plantilla de cDNA</td> <td>1 uL</td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>Volumen total por reacción</td> <td>15 uL</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>NOTA: NO OLVIDAR agregar al PCR la reacción de control negativo y control positivo (ADN genómico de <i>An. albimanus</i>).</p> <p>Utilizar el siguiente programa:</p> <p style="text-align: center;">Cuadro 69. Programa termociclador</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Paso</th> <th>Temperatura</th> <th>Tiempo</th> <th>Número de ciclos</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Desnaturalización inicial</td> <td>95°C</td> <td>2 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Desnaturalización</td> <td>95°C</td> <td>30seg</td> <td rowspan="3">35</td> </tr> <tr> <td>Anillamiento</td> <td>56°C</td> <td>30seg</td> </tr> <tr> <td>Extensión</td> <td>72°C</td> <td>30seg</td> </tr> <tr> <td>Extensión final</td> <td>72°C</td> <td>5min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Hold</td> <td>4°C</td> <td>Indefinido</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Reactivo	Volumen (n=1)	Volumen (n=_____)	Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x	7.5uL		Cebador Forward Actina 10uM	1uL		Cebador Reverse Actina 10uM	1 uL		Agua libre de nucleasas	4.5 uL		Plantilla de cDNA	1 uL	-----	Volumen total por reacción	15 uL		Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos	Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1	Desnaturalización	95°C	30seg	35	Anillamiento	56°C	30seg	Extensión	72°C	30seg	Extensión final	72°C	5min	1	Hold	4°C	Indefinido	1
Reactivo	Volumen (n=1)	Volumen (n=_____)																																														
Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x	7.5uL																																															
Cebador Forward Actina 10uM	1uL																																															
Cebador Reverse Actina 10uM	1 uL																																															
Agua libre de nucleasas	4.5 uL																																															
Plantilla de cDNA	1 uL	-----																																														
Volumen total por reacción	15 uL																																															
Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos																																													
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1																																													
Desnaturalización	95°C	30seg	35																																													
Anillamiento	56°C	30seg																																														
Extensión	72°C	30seg																																														
Extensión final	72°C	5min	1																																													
Hold	4°C	Indefinido	1																																													
10.7	Hacer gel de agarosa al 1.5% mientras se hace el PCR. Hacer mapa de las muestras que se correrán en cada pozo del gel. Correr 7uL de muestra con 5uL de escalera de 50pb a 100V. Debe de haber amplificación en 150bp.																																															

24. Cálculos:
N/A

25. Control de calidad:

1. Usar guantes en todo momento.
2. Tener un área restringida únicamente para trabajo con ARN que contenga todo el material necesario tratado adecuadamente.
3. Limpiar el área de trabajo con RNase away.
4. Realizar PCR en área blanca limpia.

ANEXO: Copiar esto y pegar en cuadernito.

1. **PCR para verificar contaminación por ADN genómico y presencia de cDNA.**
 - Verificar si hay cDNA en las muestras de ARN tratadas con el kit de Reverse Transcription System haciendo un PCR con cebadores de Actina 10uM.

Cuadro 70. Master mix

Reactivo	Volumen n=1 (uL)	Volumen n=
Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x	7.5	
Cebador forward ACT 10 uM	1	
Cebador reverse ACT 10 uM	1	
RNA template/cDNA template	1	--
Nuclease free water	4.5	
Volumen total	15	

Cuadro 71. Programa de PCR para verificar presencia de ADN genómico y cDNA

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Dasnaturalización	95°C	30 seg	35
Anillamiento	56°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Extension final	72°C	5 min	1
Hold	4°C	indefinido	1

2. Gel de agarosa 1.5%

- Agregar 0.46g de agarosa en 30ml de buffer TBE 1x.
- Agregar 2-3uL de bromuro de etidio al gel antes de que se enfríe. Dejar solidificar por 20 minutos con el peine puesto.

POE 8. PCR tiempo real de ADNc de *A. albimanus*

Codigo del SOP	7
Área	Ingeniería genética
Version	Tercera
Idioma	Español
Título	PCR tiempo real de cDNA de pupas macho de <i>An. albimanus</i> para evaluación de expresión relativa de <i>Boule</i>
Escrito por	Andrea Ramos Nufio; 12027
Fecha y firma	02 de Febrero de 2018
Modificado por	Paula Villatoro; 14107
Fecha y firma	20 de agosto de 2018
Aprobado por	
Fecha y firma	

26. Propósito:

1. Realizar PCR tiempo real utilizando de cDNA de *An. albimanus*.
2. Analizar los datos obtenidos de Ct, gráficas de amplificación y de fusión.

3. Calcular la expresión relativa de los genes objetivo mediante la ecuación $\Delta\Delta Ct$.

27. Aplicación:

El PCR tiempo real es una técnica eficiente que ha permitido la cuantificación de ácidos nucleicos de manera más específica y sensitiva. Se aplica en diagnósticos moleculares, cuantificación relativa de la expresión de genes, obtención de eficiencia de cebadores, detección de fitopatógenos, detección de organismos genéticamente modificados, así como en seguridad y control de calidad alimentaria.

1. Identificación de agentes infecciosos y su cuantificación.

28. Referencias

1. Roche. 2013. LightCycler 96 System Guides. Consultado en: https://lifescience.roche.com/documents/LightCycler96_Manual_Version2016.pdf
2. Mendoza, D., H. Arbelaez y N. Contreras. 2010. Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: Su aplicación en genética básica. Colección Lecciones. Escuela de la Salud y ciencias de la vida. Editorial Universidad del Rosario. Colombia. 69Pp.
3. Farrell, R. 2010. RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and Characterization. 3ra. Edición. Elsevier Academic Press. UK. 767Pp.

29. Terminología y abreviaciones:

1. qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativo

30. Principio:

Es una técnica que permite conocer y registrar la cinética de amplificación de ADN mediante la fluorescencia producida en la reacción proporcional a la cantidad de ADN sintetizado. Esta técnica ofrece muchas ventajas sobre un PCR convencional porque es más rápido, tiene un amplio rango dinámico y puede cuantificar abundancia de un transcrito en muestras (Farrell, 2010).

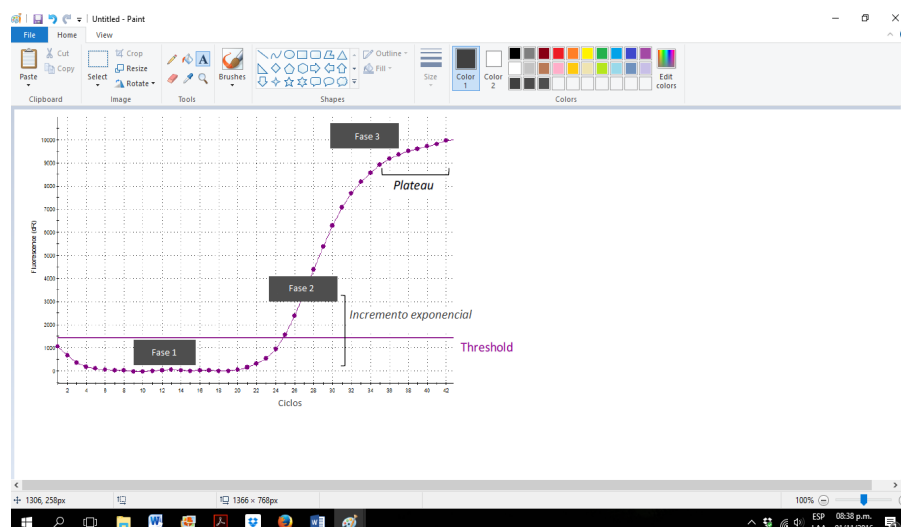
La cinética de la amplificación de ADN en PCR tiempo real se divide en tres frases:

1. Fase de crecimiento lineal.
2. Exponencial.
3. Fase de finalización o *plateau*.

El reactivo usado, en este protocolo, para realizar qPCR es SYBR Green, el cual produce fluorescencia al estar unido al ADN doble hebra. La fluorescencia es evaluada durante la fase de crecimiento exponencial temprana, y el ciclo de PCR en el que se produce la fluorescencia se llama C_t (Curve Threshold). Este valor está relacionado con el número de copias que posee la muestra analizada.

En la siguiente gráfica se muestra la fase inicial en donde la producción de fluorescencia está por debajo de la detección del termociclador. En la segunda fase se observa una forma exponencial debido a que hay un incremento en la fluorescencia. Por último, se observa una tercera fase (*plateau*) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia.

Figura 95. Análisis de gráfico de amplificación de PCR en tiempo real



31. Documentos asociados:

1. Mendoza, D., H. Arbelaez y N. Contreras. 2010. Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: Su aplicación en genética básica. Colección Lecciones. Escuela de la Salud y ciencias de la vida. Editorial Universidad del Rosario. Colombia. 69Pp.
2. Farrell, R. 2005. RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and Characterization. 3ra. Edición. Elsevier Academic Press. UK. 767Pp.
3. Life Technologies. 2012. Hoja de datos de la seguridad. SYBR Green.
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/msds/2012/4304889_MTR-NALT_MS.pdf

32. Seguridad:

1. SYBR Green: ocasiona corrosión e irritación cutánea. Provoca lesiones oculares graves. A pesar de que se use guates y se trabaja en área blanca, lavarse las manos luego de la manipulación.

33. Equipos, materiales y reactivos:

1. Equipos

1. Termociclador LighCycler 96 Roche

2. Materiales

1. Micropipetas: 1000, 20 y 10 uL
2. Puntas: 1000uL, 20 y 10uL
3. Placa de multipozos y sellador de plástico.

3. Reactivos

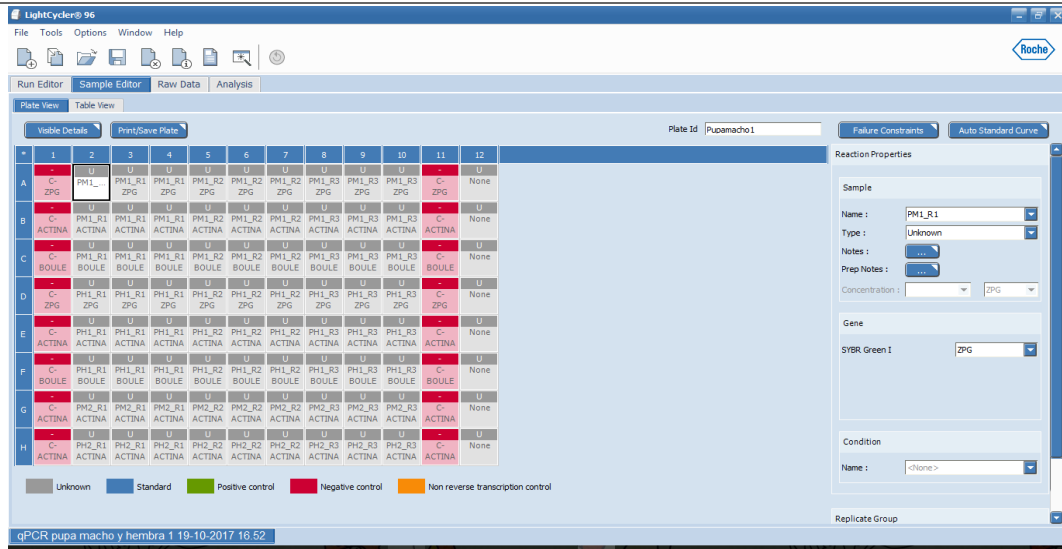
1. Fast Start SYBR Green Master Version 09 Roche
2. Agua libre de nucleasas
3. Cebadores de qPCR de *Boule, RPL49 RpS4*

34. Procedimiento:

IMPORTANTE: Antes de realizar PCR tiempo real, haga todos los cálculos y mapas de carga. Es necesario sentarse y analizar cuidadosamente lo que se hará ya que los reactivos utilizados **son caros**.

- | | |
|------------|---|
| 9.1 | Realizar un mapa de carga. Introducir el mapa de carga al programa de Light Cycler 96. Como se muestra a continuación. Este programa se encuentra en el termociclador de Light Cycler 96. |
|------------|---|

Figura 96. Mapa de carga



Puede tomar de ejemplo los siguientes mapas (Anexos). Los puede copiar e imprimir. Estos mapas fueron utilizados para hacer PCR tiempo real utilizando ADN copia de pupas y adultos de *An. albimanus*.

9.2 Preparar tres diferentes SYBR Green Master Mix en tres tubos de 1.6mL etiquetando con cada uno con los cebadores estipulados (*boule*, *RPL49*, *RpS4*) con los siguientes volúmenes:

Cuadro 72. Master mix para qPCR

Reactivo	Volumen n=1	Volumen n=
Power up SYBR Green Thermo Fisher	5 ul	
Agua libre de nucleasas	1.7 uL	
Cebador Forward (<i>Boule</i>, <i>RPL49</i> o <i>RpS4</i>) 0.4uM	0.4 uL <i>Boule</i> 0.33uL <i>RPL49</i> y <i>RpS4</i>	
Cebador Reverse (<i>Boule</i>, <i>RPL49</i> o <i>RpS4</i>) 0.4uM	0.4 uL <i>Boule</i> 0.33uL <i>RPL49</i> y <i>RpS4</i>	
Plantilla de cDNA diluída 1:10	2.5ul	
Volumen total	10 ul	

Hacer los cálculos necesarios para saber cuántas reacciones por pareja de cebadores que se van a utilizar (Por ejemplo: 25 reacciones). Mantener los volúmenes iniciales en las reacciones.

9.3 Hacer placa de PCR tiempo real en área blanca según el mapa que usted realizó.

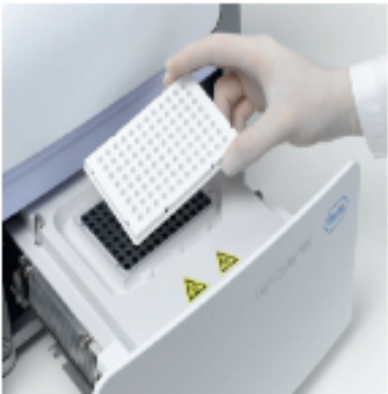
9.4 Mantener la placa de PCR tiempo real con el Master Mix **en frío y tapado** mientras se preparan las diluciones 1:10 de todos los stocks de ADN complementario.

Por ejemplo, si usted hará 30 reacciones, puede preparar una dilución de 27uL de agua libre de nucleasas y 3uL de cada stock de cDNA, o 36uL de agua libre de nucleasas y 4uL de cada stock de cDNA. El Máster Mix debe de hacerse de primero ya que el ADN complementario es inestable y se degrada fácilmente.

Realizar el mismo procedimiento y análisis con la placa no. 2, después de hacer el análisis de PCR tiempo real con la placa 1.

9.4 Agregar el volumen de la dilución 1:10 de ADN complementario de cada individuo en triplicado. Guiarse por el mapa de carga. Coloquelo en un lugar en donde pueda verlo cuando este planqueando. Sellar la placa y tratar de que no quede burbuja de aire al colocar el plástico sellador. Repasar la parte superior con un papel limpio para que quede sellado cada pozo.

9.5 Al momento de cargar en la placa, no crear burbuja, ya que esto interferiría en los resultados obtenidos. Para evitar contaminación de productos no deseados en el qPCR, Cargar placa y cerrarla dentro de campana.

	<p><i>Este pasó es muy importante, al cargar NO SE DESCONCENTRE!!</i> TIP: Al cargar el ADN, no pipeteé hasta descargar completamente el volumen de ADNc sino hasta el segundo tope para evitar burbujas y que el ADN salpique el pozo.</p>																		
9.5	<p>Centrifugar en la centrifugadora de placas de PCR tiempo real. <i>Esto permitirá que el volumen que se haya quedado en las paredes de los pozos baje al fondo y elimina las burbujas que se pudieron haber creado al cargar la placa.</i></p>																		
9.6	<p>Colocar placa en el termociclador LightCycler 96 de Roche como se muestra en la siguiente imagen:</p> <p style="text-align: center;">Figura 97. Forma de colocar placa de LightCycler 96</p> 																		
9.7	<p>Correr el programa de qPCR el cual tiene el siguiente perfil:</p> <p style="text-align: center;">Cuadro 73. Programa para qPCR</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Programa</th> <th>Ciclo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Preincubación (50°C por 60 segundos)</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Preincubación (95°C por 120 segundos)</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2 pasos de amplificación (95°C por 15 segundos, y 60°C por 60 segundos)</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>3 pasos de Melting</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table> <p>Los tres pasos de melting son:</p> <p style="text-align: center;">Cuadro 74. Temperatura melting para qPCR</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Temperatura</th> <th>Tiempo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>95°C</td> <td>15 segundos</td> </tr> <tr> <td>60°C</td> <td>60 segundos</td> </tr> <tr> <td>95°C</td> <td>15 segundos, modo de adquisición continuo</td> </tr> </tbody> </table> <p><i>Seleccionar el volumen de reacción de 10uL</i></p>	Programa	Ciclo	Preincubación (50°C por 60 segundos)	1	Preincubación (95°C por 120 segundos)	1	2 pasos de amplificación (95°C por 15 segundos, y 60°C por 60 segundos)	50	3 pasos de Melting	1	Temperatura	Tiempo	95°C	15 segundos	60°C	60 segundos	95°C	15 segundos, modo de adquisición continuo
Programa	Ciclo																		
Preincubación (50°C por 60 segundos)	1																		
Preincubación (95°C por 120 segundos)	1																		
2 pasos de amplificación (95°C por 15 segundos, y 60°C por 60 segundos)	50																		
3 pasos de Melting	1																		
Temperatura	Tiempo																		
95°C	15 segundos																		
60°C	60 segundos																		
95°C	15 segundos, modo de adquisición continuo																		
9.8	<p>Finalizada la reacción, trasladar los datos del LightCycler 96 al USB del mismo y analizarlos en el programa LightCycler 96, de donde se puede obtener los valores Ct y las curvas de fusión o melting.</p>																		

35. Cálculos:

1. Cálculos de cebadores ZPG forward:

$$C1V1=C2V2 \quad 2522.58 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{L} = 100 \mu\text{M} \times 19.13 \mu\text{L} \quad \text{stock de primer forward} + 80.87 \mu\text{L Agua libre de nucleasas}$$

Hacer una dilución 1:10 de la solución de 100uM para tener una solución final de 10uM.

$$C1V1=C2V2 \quad 210 \mu\text{M} \times 10 \mu\text{L} = 0.4 \mu\text{M} \times 0.4 \mu\text{L} \quad \text{primer forward } 10 \mu\text{M}$$

2. Cálculos de cebadores ZPG reverse

$$C1V1=C2V2 \quad 2484.59 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{L} = 100 \mu\text{M} \times 20.63 \mu\text{L} \quad \text{stock de primer reverse} + 79.36 \mu\text{L Agua libre de nucleasas}$$

Hacer una dilución 1:10 de la solución de 100uM para tener una solución final de 10uM.

$$C1V1=C2V2 \quad 10\mu\text{M} \times 10\mu\text{L} = 0.4\mu\text{M} \times 0.4\mu\text{L} \quad \text{primer reverse } 10\mu\text{M}$$

3. Cálculos de cebadores BOULE forward y reverse
Ambos stocks se encuentran a una concentración de **100uM**. Se deben de hacer dos diluciones 1:10 de la solución de 100uM para tener una solución final de 1uM.
 $C1V1=C2V2$ $10\mu\text{M} \times 10\mu\text{L} = 0.4\mu\text{M} \times 0.4\mu\text{L}$ primer reverse 10uM
- Se realizó el mismo procedimiento para el cebador forward.
4. Cálculos de cebadores ACTINA forward y reverse
Ambos stocks se encuentran a una concentración de 1000uM. Se deben de hacer tres diluciones 1:10 de la solución de 1000uM para tener una solución final de 1uM.
 $C1V1=C2V2$ $10\mu\text{M} \times 10\mu\text{L} = 100\mu\text{M} \times 0.4\mu\text{L}$ primer reverse 1uM+60 uL Agua libre de nucleasas
- Se realizó el mismo procedimiento para el cebador forward.
36. **Control de calidad:**
1. Usar guantes en todo momento. Trabajar en campana de área blanca para hacer el SYBR Green Master Mix.
 2. Utilizar únicamente agua desionizada y libre de nucleasas.
 3. Tener un área restringida y limpiada con etanol y cloro, que haya sido expuesta a UV para cargar el SYBR Green y el cDNA para evitar contaminación.
 4. Las diluciones 1:10 de cDNA hechas deben hacerse rápido y con mucho cuidado se de mantener en bloque frío y se hacen hasta que el Master Mix este hecho.
37. **Reporte de datos y documentos utilizados:**
N/A
38. **Reporte:**
N/A

H. Datos de concentración de ARNdh en el cultivo bacteriano de *E. coli* HT115(DE3) inducida

Cuadro 75. Concentraciones de ARNdh de *Boule* en el cultivo bacteriano justo después de inducir y después del primer lavado

Muestra	Concentración de ARNdh (ng/ul)	Promedio de concentración de ARNdh (\pm desviación estándar) (ngul)
Cultivo recién inducido	186.8	185.5 (\pm 59.66)
	244.5	
	125.2	
Cultivo después del primer lavado y centrifugación	254.3	373.2 (\pm 117.3)
	488.9	
	376.5	

I. Análisis de expresión de *Boule* en pupas macho *A. albimanus* por qPCR

1. **Datos de PCR tiempo real ADNc de pupas macho de la evaluación de eficiencia de los cebadores de *Boule* a diferentes concentraciones**

Cuadro 76. Datos crudos de PCR tiempo real de *Boule* para evaluación de eficiencia de cebadores

Nombre de muestra	Nombre del gen	Cq	Media de Cq	Error de desviación estándar de Cq
PM 1:10 0.4uM	Boule	25.54	25.42	0.14
PM 1:10 0.4uM	Boule	25.27	25.42	0.14
PM 1:10 0.4uM	Boule	25.44	25.42	0.14
PM 1:25 0.4uM	Boule	26.21	26.17	0.14
PM 1:25 0.4uM	Boule	26.01	26.17	0.14
PM 1:25 0.4uM	Boule	26.29	26.17	0.14
PM 1:50 0.4uM	Boule	26.86	26.8	0.08
PM 1:50 0.4uM	Boule	26.71	26.8	0.08
PM 1:50 0.4uM	Boule	26.82	26.8	0.08
PM 1:100 0.4uM	Boule	27.65	27.8	0.15
PM 1:100 0.4uM	Boule	27.81	27.8	0.15
PM 1:100 0.4uM	Boule	27.95	27.8	0.15
PM 1:250 0.4uM	Boule	29.05	29.24	0.17
PM 1:250 0.4uM	Boule	29.31	29.24	0.17
PM 1:250 0.4uM	Boule	29.37	29.24	0.17
PM 1:500 0.4uM	Boule	30.01	30.14	0.41
PM 1:500 0.4uM	Boule	29.82	30.14	0.41
PM 1:500 0.4uM	Boule	30.6	30.14	0.41
PM 1:10 0.6uM	Boule	25.79	25.8	0.21

Continúa cuadro 76...

Continuación cuadro 76:

Nombre de muestra	Nombre del gen	Cq	Media de Cq	Error de desviación estándar de Cq
PM 1:10 0.6uM	Boule	26.01	25.8	0.21
PM 1:10 0.6uM	Boule	25.59	25.8	0.21
PM 1:25 0.6uM	Boule	26.03	26.05	0.07
PM 1:25 0.6uM	Boule	26.13	26.05	0.07
PM 1:25 0.6uM	Boule	25.99	26.05	0.07
PM 1:50 0.6uM	Boule	26.61	26.57	0.06
PM 1:50 0.6uM	Boule	26.6	26.57	0.06
PM 1:50 0.6uM	Boule	26.51	26.57	0.06
PM 1:100 0.6uM	Boule	27.58	27.6	0.03
PM 1:100 0.6uM	Boule	27.64	27.6	0.03
PM 1:100 0.6uM	Boule	27.59	27.6	0.03
PM 1:250 0.6uM	Boule	28.55	28.56	0.14
PM 1:250 0.6uM	Boule	28.42	28.56	0.14
PM 1:250 0.6uM	Boule	28.7	28.56	0.14
PM 1:500 0.6uM	Boule	29.51	29.94	0.7
PM 1:500 0.6uM	Boule	29.57	29.94	0.7

PM 1:500 0.6uM	Boule	30.75	29.94	0.7
C-	Boule	41.82	41.82	0
C-	Boule	-	-	-
C-	Boule	-	-	-

2. **Datos de PCR tiempo real de ADN complementario de pupa macho de los genes *Boule*, *RPL49* y *RpS4***

Cuadro 77. Datos crudos de PCR tiempo real de genes *Boule*, *RPL49* y *RpS4*

Nombre de muestra	Nombre de gen	Cq	Media de Cq	Error de desviación estándar de Cq
Bol 1.1	Boule	27.53	27.52	0.13
Bol 1.1	Boule	27.39	27.52	0.13
Bol 1.1	Boule	27.64	27.52	0.13
B+Z 1.1	Boule	29.25	29.08	0.21
B+Z 1.1	Boule	28.85	29.08	0.21
B+Z 1.1	Boule	29.15	29.08	0.21
ANT 1.1	Boule	27.31	27.43	0.29
ANT 1.1	Boule	27.22	27.43	0.29
ANT 1.1	Boule	27.76	27.43	0.29
Bol 1.2	Boule	30.19	29.9	0.26
Bol 1.2	Boule	29.69	29.9	0.26
Bol 1.2	Boule	29.82	29.9	0.26
Nombre de muestra	Nombre de gen	Cq	Media de Cq	Error de desviación estándar de Cq
B+Z 1.2	Boule	27.56	27.74	0.17
B+Z 1.2	Boule	27.89	27.74	0.17
B+Z 1.2	Boule	27.78	27.74	0.17
ANT 1.2	Boule	27.95	27.82	0.17
ANT 1.2	Boule	27.63	27.82	0.17
ANT 1.2	Boule	27.87	27.82	0.17
Bol 1.3	Boule	27.43	27.36	0.1
Bol 1.3	Boule	27.25	27.36	0.1
Bol 1.3	Boule	27.4	27.36	0.1
B+Z 1.3	Boule	29.52	29.67	0.15
B+Z 1.3	Boule	29.67	29.67	0.15
B+Z 1.3	Boule	29.82	29.67	0.15
ANT 1.3	Boule	27.78	27.95	0.16
ANT 1.3	Boule	27.97	27.95	0.16
ANT 1.3	Boule	28.1	27.95	0.16
C -	Boule	-	-	-
C -	Boule	-	-	-
C -	Boule	-	-	-

Bol 1.1	RPL49	25.68	25.98	0.33
Bol 1.1	RPL49	25.93	25.98	0.33
Bol 1.1	RPL49	26.34	25.98	0.33
B+Z 1.1	RPL49	26.67	26.85	0.16
B+Z 1.1	RPL49	26.95	26.85	0.16
B+Z 1.1	RPL49	26.94	26.85	0.16
ANT 1.1	RPL49	26.21	26.24	0.03
ANT 1.1	RPL49	26.26	26.24	0.03
ANT 1.1	RPL49	26.25	26.24	0.03
Bol 1.2	RPL49	28.98	28.95	0.03
Bol 1.2	RPL49	28.93	28.95	0.03
Bol 1.2	RPL49	28.94	28.95	0.03
B+Z 1.2	RPL49	25.95	26.24	0.25
B+Z 1.2	RPL49	26.4	26.24	0.25
B+Z 1.2	RPL49	26.38	26.24	0.25
ANT 1.2	RPL49	26.61	26.7	0.1
ANT 1.2	RPL49	26.69	26.7	0.1
ANT 1.2	RPL49	26.8	26.7	0.1
Bol 1.3	RPL49	26.3	26.18	0.1
Bol 1.3	RPL49	26.13	26.18	0.1
Bol 1.3	RPL49	26.11	26.18	0.1
B+Z 1.3	RPL49	27.13	26.91	0.22
Nombre de muestra	Nombre de gen	Cq	Media de Cq	Error de desviación estándar de Cq
B+Z 1.3	RPL49	26.69	26.91	0.22
B+Z 1.3	RPL49	26.9	26.91	0.22
ANT 1.3	RPL49	26.66	26.71	0.06
ANT 1.3	RPL49	26.69	26.71	0.06
ANT 1.3	RPL49	26.77	26.71	0.06
C -	RPL49	-	-	-
C -	RPL49	-	-	-
C -	RPL49	-	-	-
Bol 1.1	RpS4	20.8	20.71	0.12
Bol 1.1	RpS4	20.57	20.71	0.12
Bol 1.1	RpS4	20.76	20.71	0.12
B+Z 1.1	RpS4	22.25	22.32	0.08
B+Z 1.1	RpS4	22.31	22.32	0.08
B+Z 1.1	RpS4	22.4	22.32	0.08
ANT 1.1	RpS4	20.71	20.79	0.08
ANT 1.1	RpS4	20.86	20.79	0.08
ANT 1.1	RpS4	20.79	20.79	0.08
Bol 1.2	RpS4	22.79	22.69	0.14

Bol 1.2	RpS4	22.53	22.69	0.14
Bol 1.2	RpS4	22.76	22.69	0.14
B+Z 1.2	RpS4	20.61	20.76	0.13
B+Z 1.2	RpS4	20.81	20.76	0.13
B+Z 1.2	RpS4	20.85	20.76	0.13
ANT 1.2	RpS4	21.03	20.94	0.23
ANT 1.2	RpS4	20.68	20.94	0.23
ANT 1.2	RpS4	21.11	20.94	0.23
Bol 1.3	RpS4	20.75	20.72	0.03
Bol 1.3	RpS4	20.72	20.72	0.03
Bol 1.3	RpS4	20.69	20.72	0.03
B+Z 1.3	RpS4	22.5	22.34	0.17
B+Z 1.3	RpS4	22.36	22.34	0.17
B+Z 1.3	RpS4	22.17	22.34	0.17
ANT 1.3	RpS4	21.18	21.1	0.07
ANT 1.3	RpS4	21.07	21.1	0.07
ANT 1.3	RpS4	21.06	21.1	0.07
C -	RpS4	-	-	-
C -	RpS4	-	-	-
C -	RpS4	-	-	-
Bol 2.1	Boule	28.12	28.07	0.05
Bol 2.1	Boule	28.07	28.07	0.05
Nombre de muestra	Nombre de gen	Cq	Media de Cq	Error de desviación estándar de Cq
Bol 2.1	Boule	28.02	28.07	0.05
B+Z 2.1	Boule	-	-	-
B+Z 2.1	Boule	37.96	41.8	5.43
B+Z 2.1	Boule	45.64	41.8	5.43
ANT 2.1	Boule	27.52	27.47	0.12
ANT 2.1	Boule	27.33	27.47	0.12
ANT 2.1	Boule	27.56	27.47	0.12
Bol 2.2	Boule	28.56	28.57	0.03
Bol 2.2	Boule	28.61	28.57	0.03
Bol 2.2	Boule	28.55	28.57	0.03
B+Z 2.2	Boule	28.1	28.18	0.1
B+Z 2.2	Boule	28.15	28.18	0.1
B+Z 2.2	Boule	28.29	28.18	0.1
ANT 2.2	Boule	27.86	27.88	0.17
ANT 2.2	Boule	28.05	27.88	0.17
ANT 2.2	Boule	27.72	27.88	0.17
Bol 2.3	Boule	27.9	27.94	0.05
Bol 2.3	Boule	27.92	27.94	0.05

Bol 2.3	Boule	28	27.94	0.05
B+Z 2.3	Boule	27.85	27.95	0.15
B+Z 2.3	Boule	27.87	27.95	0.15
B+Z 2.3	Boule	28.12	27.95	0.15
ANT 2.3	Boule	29.55	29.72	0.14
ANT 2.3	Boule	29.79	29.72	0.14
ANT 2.3	Boule	29.81	29.72	0.14
C -	Boule	-	-	-
C -	Boule	-	-	-
C -	Boule	-	-	-
Bol 2.1	RPL49	26.6	26.56	0.28
Bol 2.1	RPL49	26.27	26.56	0.28
Bol 2.1	RPL49	26.82	26.56	0.28
B+Z 2.1	RPL49	36.18	36.18	0
B+Z 2.1	RPL49	-	-	-
B+Z 2.1	RPL49	-	-	-
ANT 2.1	RPL49	25.49	25.75	0.32
ANT 2.1	RPL49	25.64	25.75	0.32
ANT 2.1	RPL49	26.11	25.75	0.32
Bol 2.2	RPL49	26.72	26.7	0.13
Bol 2.2	RPL49	26.82	26.7	0.13
Bol 2.2	RPL49	26.57	26.7	0.13
Nombre de muestra	Nombre de gen	Cq	Media de Cq	Error de desviación estándar de Cq
B+Z 2.2	RPL49	27.02	27.15	0.14
B+Z 2.2	RPL49	27.29	27.15	0.14
B+Z 2.2	RPL49	27.14	27.15	0.14
ANT 2.2	RPL49	27.16	27.18	0.11
ANT 2.2	RPL49	27.09	27.18	0.11
ANT 2.2	RPL49	27.3	27.18	0.11
Bol 2.3	RPL49	26.35	26.45	0.13
Bol 2.3	RPL49	26.6	26.45	0.13
Bol 2.3	RPL49	26.4	26.45	0.13
B+Z 2.3	RPL49	26.85	26.82	0.05
B+Z 2.3	RPL49	26.76	26.82	0.05
B+Z 2.3	RPL49	26.85	26.82	0.05
ANT 2.3	RPL49	27.8	27.81	0.03
ANT 2.3	RPL49	27.84	27.81	0.03
ANT 2.3	RPL49	27.79	27.81	0.03
C -	RPL49	-	-	-
C -	RPL49	-	-	-
C -	RPL49	-	-	-

Bol 2.1	RpS4	21.11	21.27	0.14
Bol 2.1	RpS4	21.37	21.27	0.14
Bol 2.1	RpS4	21.33	21.27	0.14
B+Z 2.1	RpS4	-	-	-
B+Z 2.1	RpS4	-	-	-
B+Z 2.1	RpS4	34.57	34.57	0
ANT 2.1	RpS4	21.07	21.07	0.02
ANT 2.1	RpS4	21.05	21.07	0.02
ANT 2.1	RpS4	21.09	21.07	0.02
Bol 2.2	RpS4	21.85	21.75	0.15
Bol 2.2	RpS4	21.83	21.75	0.15
Bol 2.2	RpS4	21.58	21.75	0.15
B+Z 2.2	RpS4	21.11	21.23	0.11
B+Z 2.2	RpS4	21.26	21.23	0.11
B+Z 2.2	RpS4	21.33	21.23	0.11
ANT 2.2	RpS4	21.63	21.71	0.07
ANT 2.2	RpS4	21.75	21.71	0.07
ANT 2.2	RpS4	21.76	21.71	0.07
Bol 2.3	RpS4	21.19	21.13	0.1
Bol 2.3	RpS4	21.02	21.13	0.1
Bol 2.3	RpS4	21.19	21.13	0.1
B+Z 2.3	RpS4	21.6	21.5	0.09
Nombre de muestra	Nombre de gen	Cq	Media de Cq	Error de desviación estándar de Cq
B+Z 2.3	RpS4	21.43	21.5	0.09
B+Z 2.3	RpS4	21.46	21.5	0.09
ANT 2.3	RpS4	23.44	23.53	0.08
ANT 2.3	RpS4	23.55	23.53	0.08
ANT 2.3	RpS4	23.6	23.53	0.08
C -	RpS4	-	-	-
C -	RpS4	-	-	-
C -	RpS4	-	-	-

3. Análisis de datos crudos de Cq del PCR tiempo real

Se presentan los resultados obtenidos mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, de la expresión relativa de *Boule* en las muestras de pupa analizadas por PCR tiempo real. En el cuadro 15 se muestran todos los valores obtenidos de los cálculos realizados para el método de análisis. En el cuadro 16 se muestran la media de los valores de expresión relativa obtenidos, según cada tratamiento de alimentación de ARNdh.

Cuadro 78. Análisis de cuantificación relativa de *Boule* en muestras de pupas macho de *A. albimanus*. Se obtuvieron los valores mediante las fórmulas presentadas en la sección VI.I de análisis de datos en el capítulo metodología, a partir de los datos del cuadro 14.

Réplica	Cebadores: <i>Boule</i>		RPL49 y RpS4		<i>Boule</i> (mx ANT)		RPL49 y RpS4		$\Delta\Delta Ct$	Fold ($2^{\Delta\Delta Ct}$)
	Gen analizado	Gen exp	Gen referencia	Gen exp	Gene analizado	Gen control	Gen referencia	Gen control		
	Average exp Ct value	Average exp Ct value	Average control Ct value	Average control Ct value	ΔCt Value exp ($\Delta Ct E$)	ΔCt Value control ($\Delta Ct C$)				
1.1	<i>Boule</i>	27.52	23.345	27.43	23.515	4.175	3.915	0.2575	0.837	
	B+Z	29.08	24.585	27.43	23.515	4.495	3.915	0.5775	0.670	
	ANT	27.43	23.515	27.43	23.515	3.915	3.915	-0.0025	1.002	
1.2	<i>Boule</i>	29.9	25.82	27.82	23.82	4.08	4	0.1625	0.893	
	B+Z	27.74	23.5	27.82	23.82	4.24	4	0.3225	0.800	
	ANT	27.82	23.82	27.82	23.82	4	4	0.0825	0.944	
1.3	<i>Boule</i>	27.36	23.45	27.95	23.905	3.91	4.045	-0.0075	1.005	
	B+Z	29.67	24.625	27.95	23.905	5.045	4.045	1.1275	0.458	
	ANT	27.95	23.905	27.95	23.905	4.045	4.045	0.1275	0.915	
2.1	<i>Boule</i>	28.07	23.915	27.47	23.41	4.155	4.06	0.2375	0.848	
	B+Z	0	0	27.47	23.41	0	0	0	0.000	
	ANT	27.47	23.41	27.47	23.41	4.06	4.06	0.1425	0.906	
2.2	<i>Boule</i>	28.57	24.225	27.88	24.445	4.345	3.435	0.4275	0.744	
	B+Z	28.18	24.19	27.88	24.445	3.99	3.435	0.0725	0.951	
	ANT	27.88	24.445	27.88	24.445	3.435	3.435	-0.4825	1.397	
2.3	<i>Boule</i>	27.94	23.79	29.72	25.67	4.15	4.05	0.2325	0.851	
	B+Z	27.95	24.16	29.72	25.67	3.79	4.05	-0.1275	1.092	
	ANT	29.72	25.67	29.72	25.67	4.05	4.05	0.1325	0.912	
Avg. ΔCt control									3.9175	

Cuadro 79. Promedio de la expresión relativa de *Boule* en las seis réplicas analizadas de pupas macho de *A. albimanus* para cada tratamiento.

Tratamiento de ARNdH de gen	Expresión relativa de <i>Boule</i>	Desviación estándar
Boule	0.863	0.05768
Boule+ZPG	0.774	0.1026
ANT	1.013	0.1383

Análisis estadístico de ANOVA de expresión relativa de *Boule*

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de un factor para determinar si existía diferencia significativa entre las medias de expresión relativa de *Boule* debida a los tratamientos de alimentación de larvas. Previamente se realizó la validación de los supuestos del modelo, con el fin de determinar si era adecuado realizar la prueba paramétrica de ANOVA.

1. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk

Se planteó las hipótesis:

H₀: Los datos proceden de una distribución normal (F(x) es normal).

H₁: Los datos no proceden de una distribución normal (F(x) no es normal).

Posteriormente se ingresó los siguientes comandos al programa R para determinar si los datos de expresión relativa contaban con distribución normal.

Figura 98. Captura de pantalla de los comandos ingresados en el programa de R para introducir los datos y para la prueba Shapiro-Wilk. Se muestran los resultados de la prueba.

```
> data=read.table('clipboard', header=T)
> data
  tratamiento expression
1         boule 0.8423751
2         boule 0.8185123
3         boule 0.9281854
4          bz 0.6701240
5          bz 0.8753358
6          bz 0.7750536
7          ant 0.9538411
8          ant 1.1707912
9          ant 0.9138328
> z <- data$expression
> shapiro.test(z)

      Shapiro-Wilk normality test

data:  z
W = 0.94578, p-value = 0.6438
```

Se determinó un valor-p de 0.6438 que era mayor al valor de significancia ($\alpha=0.05$), por lo que la hipótesis nula no se rechazó, lo cual indica que la población de datos está distribuida normalmente.

2. Prueba de homogeneidad de varianzas Bartlett

Se pretendió probar la hipótesis de igualdad de varianzas dada por:

$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2$

$H_A: \sigma_i^2 \neq \sigma_j^2$ para algún $i \neq j$

Se ingresaron los siguientes comandos a R para determinar si las varianzas mostraban homogeneidad.

Figura 99. Captura de pantalla del comando ingresados en R para la prueba de Bartlett y los resultados

```
> bartlett.test(expression~tratamiento, data=data)

      Bartlett test of homogeneity of variances

data:  expression by tratamiento
Bartlett's K-squared = 1.12, df = 2, p-value = 0.5712
```

Se obtuvo un valor-p de 0.5712 mayor al valor de significancia de 0.05, por lo que no se rechazó la hipótesis nula. Por lo tanto, se concluyó que las varianzas de los tratamientos son iguales.

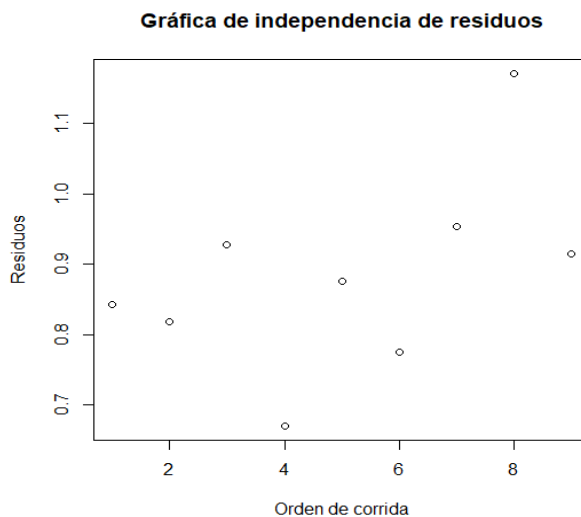
3. Prueba de independencia de residuos

Se pretendió verificar la suposición de independencia de los residuos. Para ello se utilizó los siguientes comandos en el programa de R y se obtuvo la siguiente gráfica (Fig. 34).

Figura 100. Captura de pantalla de los comandos ingresados en R para verificar la independencia

```
> plots(data$expression)
Error in plots(data$expression) : no se pudo encontrar la función "plots"
> plot(data$expression)
> |
```

Figura 101. Gráfica de independencia de los residuos



Fuente: Elaboración propia

Se determinó que los valores de los residuos graficados no mostraron ninguna tendencia o patrón no aleatorio, por lo cual se concluyó que el supuesto se cumple y hay independencia.

4. Análisis de varianza de un factor

Debido a que se cumplieron todos los supuestos del modelo (normalidad, varianza constante e independencia) fue posible realizar una prueba paramétrica para determinar diferencia significativa de las medias. Se llevó a cabo un ANOVA de un factor en el programa R mediante los siguientes comandos.

Figura 102. Captura de pantalla de los comandos ingresados para la prueba de ANOVA

```
> aov_exp <- aov(expresion ~ tratamiento, data=data)

> summary(aov_exp)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
tratamiento  2  0.08773  0.04386   3.991  0.079 .
Residuals    6  0.06595  0.01099
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> |
```

Debido a que se obtuvo un valor p de 0.079, que es mayor al nivel de significancia de 0.05 no fue posible rechazar la hipótesis nula. Por lo tanto, no existe evidencia estadística de que haya diferencia significativa de las medias de expresión del gen *Boule* entre los tratamientos de alimentación con ARNdh.

Alineamientos y secuencias para el diseño de cebadores de gen *nht*

Figura 103. Alineamiento de las secuencias del gen nht en diferentes especies de dípteros

```

Aedesaegypti -----
Anophelesgambiae -----
Anophelesalbimanus -MASANFLEEAALKSDVDESAVNAIVGTLENQLDVNTNLVQVGVSGKSESGESAIEEVAN
Anophelesdarlingi MASANNFLEEAALKSAVDESAVNAIVGTLENQLDVNTNLVQVGVSGKSETGAGTGES---

Aedesaegypti -----
Anophelesgambiae -----
Anophelesalbimanus GATAVVCQQRPSGSGVPPQQRDLGGGLANGEI-AVSNNTITANNNTPGKPTIVTSANS
Anophelesdarlingi ---GVKIQSSAKHETAASPKRDLVGLANGEKIVVSNNTITANNNTASKSVLP-----

Aedesaegypti -----
Anophelesgambiae -----
Anophelesalbimanus SSTSIVVARSAVALPKSGGPPQQQQQQRSNSGVSIVIAGGGATRGGANINIIISQQIVVP
Anophelesdarlingi -----KPPPRNNSGVSIVIAGGG-ARGGGNINIIISQQIVVP

Aedesaegypti -----
Anophelesgambiae -----
Anophelesalbimanus PPPFNVPSSSTQKQQQQALTTAGNSIVLSNHQLQTSNMPKNEPVKLVYPAGGQQTAAVL
Anophelesdarlingi PPPFNVPPTSQK-----QLQTSNMPKNEPVKLVYPA-----

Aedesaegypti -----
Anophelesgambiae -----
Anophelesalbimanus NMNNNRVILTPSGLSNGTITMSQQPQLIQTANLVGKATTTSTVQQQQQQQQQQQQQAGSG
Anophelesdarlingi NMNNNRVILTP-GLSNGTITVSQ-----PQPQSGNG

Aedesaegypti -----
Anophelesgambiae -----
Anophelesalbimanus GVSGQPTPTLI IKNQQTNTVMNSGAPGIVTVSKPMNQATPNIVGLPGVQIVNVRPGAQP
Anophelesdarlingi GVSGPPTPTLI IKNQQTNAVMPGTPGIVTVSKPMNQATPNIVGLPGVQIVNVRPGAQP

Aedesaegypti -----
Anophelesgambiae -----MHRQPGSTLLKNEQGQFQLLRI
Anophelesalbimanus TQAQQKTVAAVSPRVVIGSQPIVSTRPPNASAITLSALQGQGSTLLKNEQGQFQLLRI
Anophelesdarlingi TQAQQKTVAAVSPRVVIGSQPIVSTRPPNASAITLSALQGQGSTLLKNEQGQFQLLRI

Aedesaegypti -----
Anophelesgambiae -----
Anophelesalbimanus GPAPAGTQITPAGLTGSSANQITRLQTVPATHSSGSGAII VSSQSITTTPASYSI STQPTP
Anophelesdarlingi GPAPTGTQITPASLTPSSTNQTIRLQTVPATHASGTGAIIVSSQSGTTPTQTSYI STQPTP
GPAPTGTQITPASLTPSSTNQTIRLQTVPATHASGTGIIIVSSHSGTTTQNYISTQPTP

Aedesaegypti -----
Anophelesgambiae -----
Anophelesalbimanus VASVAPVPALAAQQNITITHTSPSQQVGGQPTVLAQQQQQ---QQTTVVATPHSVGQQQ
Anophelesdarlingi VASVAPVPALAAQQNITITHTSASFA---TVLSTQQPQQ---QQQQQHSGTGSVAGQQT
VASVAPVPALAAQQNITITHTSASFA---TVLSTQQQPQQPQQQQQHSSTGSVGGQQT

Aedesaegypti -----
Anophelesgambiae -----
Anophelesalbimanus SQQQQQQQTVVVTTTTPGTTPAQQRNSLDNTEKCKSKFLTNLIELSKREPAKVEQNVRTLII
Anophelesdarlingi SQQQQQQPTVVVVTTTTPAV--TQQRNSLDNTEKCKSKFLTNLIELSKREPTKVEQNVRTLII
SQQQQQQPTVVVVTTTTPAV--TQQRNSLDNTEKCKSKFLTNLIELSKREPTKVEQNVRTLII

Aedesaegypti -----
Anophelesgambiae -----
Anophelesalbimanus QELVDANVDPAEFCERLERLLNASFPQCLIGFLK-----
Anophelesdarlingi QELVDANVDPAEFCERLERLLNASFPQCLIGFLKKSPLLRQSLVTKEITIEGINPPSAA
QELVDANVDPAEFCERLERLLNASFPQCLIGFLKKSPLLRQSLVTKEITIEGINPPSAA

Aedesaegypti -----
Anophelesgambiae -----
Anophelesalbimanus -----AQIRPVAPTIVSQNSMVGQTQIRMLTSQSGVTTVPRIGQTTIRPAAPV
VAFAGTALSSIPAQIRPVAPTIVSQNSMIGQTQIRMLTNQSGVTTLPRIQTTIRPAAPI

```


Anophelesdarlingi VAFAGTALSSIPAQIRPVAPTIVSQGSMIGQTQIRMLTTQSGVTTLPRIQTTRPAAPI

Aedesaegypti -----MKSEQMPPAKPI
 Anophelesgambiae RIQTPLQQQQPPGGTTTTIVGPR--SITAQQIRPNATTIGHTTIVQTAGGQQLPQTIST
 Anophelesalbimanus RIQTPLQQQSTVTAGGTTIVGQPRTTTLTAQQIRPNVTTIGHTTIVQTA-GQQLPQTIST
 Anophelesdarlingi RIQTPLQQQSTVASGGTTIVGQPRTTTLTAQQIRPNVTTIGHTTIVQTA-GQQLPQTIST
 .:*:* :

Aedesaegypti VCTAMLQIRAPAGTAITRTPATLQIRATTPTIVSRQTAATNNTVT-----T
 Anophelesgambiae TPPALLPIRAPSGTSITRTGATLQIRTTTPV-SRTVTS-VGGTTVTTGGLGKQLLQ-SQV
 Anophelesalbimanus TPPALLPIRTPSGTSITRSGTTLQIRTTTPITSRTLTS-IGGTVTTTG--KQILQSQTV
 Anophelesdarlingi TPPALLPVSGNA--KFNASAQQIRTTTPITSRTLTS-IGGTVTTTG--KQILQSQSV
 . *:* : : : : *:*:* * : .:**** .

Aedesaegypti KTIRSQTPAVVSVAAAAAASGSTATQVKQVTAISNSNVVVAAST-----
 Anophelesgambiae NQIRGQTP-VASVAAVAAAAAASGTTATQVKQVTAITGGGNVVVSLNQVPPMPQPVSG
 Anophelesalbimanus NQIRGQTP-VASVAAVAAAAAASGSSATQVKQVTAITGGGNVVVSLNQVPPMPQPVSA
 Anophelesdarlingi NQIRGQTP-VASVAAVAAAAAASGSSATQVKQVTAITGGGNVVVSLNQVPPMPQPVSG
 : *:*.* *.*****.******:*****:.... *:* .

Aedesaegypti ----PSTAPGLVVTGTQPLPALALSSAVATLNNASNSNSTSLISTS-----
 Anophelesgambiae NAS--- IGGTAVSLVPTMPALTLTSSAVSAVGLSAAGIVSSSSASSSSASSSSAATTV
 Anophelesalbimanus LSGGSSQGGSLVSGTQAMPALTLTSAAS-AAGFGVSGGVVSGVKS-----
 Anophelesdarlingi LGGGSSQGGSLMVSGTQAMPALTLTSAAS-AAGFGVSGGVVSGVKT-----
 . *:* . :*:*:*:* : . . . : : :

Aedesaegypti ---IPSTTTVVVSTAPSISTAIT-----SSITSNSSASQVTTASTSSSSTTV-
 Anophelesgambiae GPPGGISATVVVNSVPATPAAAVASAAAPPTGTTSIGTAA---SGVGGASSSSSSAAT
 Anophelesalbimanus ---PAASATIVLNSSTVSTTAA-----AASIGSGT---AVSAGLAT-ASGTTLA
 Anophelesdarlingi ---SAVSSAIVLNSSTVSTTAA-----SASIGSGT---AVSAGLPT-ASGTTLA
 :*:*:*:* : : : : : *:* : : : *:*:

Aedesaegypti ----TSSSKSSSGSKSQSSAGTKKKANASAAVSSVDPNDPAAKKAASMQSSFYQHVV
 Anophelesgambiae VTTVSTNKTVTAKSQNLGASK---KKAGAASAASGPDAAESAAKRAGASAQSFYHHH-
 Anophelesalbimanus TPGLTTIKTITAKSQNLGAAAAAKKKASASAASAGAEQDASKRAGASAQSFYHHH-
 Anophelesdarlingi TPGLTTIKTITAKSQNLGAAAAAKKKASASAASAGTEQDASKRAGASAQSFYHHH-
 :* .: : : : .:*: ** :*:* . . . : : *:* *:*:*:

Aedesaegypti SSSMYGDDDDINDVAAMGGVNLAEETQRILGSTEFVGTQIRSCKDEIFLHMSALQAKIRGI
 Anophelesgambiae -ASMYGDDDDINDVAAMGGVNLAEETQRILGSTEFVGTQIRSCKDEVFLHLPALQSRIRAI
 Anophelesalbimanus -AAMYGEDDINDVAAMGGVNLAEETQRILGSTEFVGTQIRSCKDEVFLHLPALQSRIRNI
 Anophelesdarlingi -AAMYGEDDINDVAAMGGVNLAEETQRILGSTEFVGTQIRSCKDEVFLHLPALQSRIRNI
 :*

Aedesaegypti VARHGLEEPSSEVAVLISHACQERLKNIVEKLAVVAEHRIDI IKVDPRYEVTKDVRGQIK
 Anophelesgambiae IARHGLEEPSNEVAVLISHACQERLKNVVEKLAI IAEHRIDI IKVDPRYEVTKDVRGQIK
 Anophelesalbimanus IARHGLEEPSNEVAVLISHACQERLKNIVEKLAI IAEHRIDI IKVDPRYEVTKDVRGQIK
 Anophelesdarlingi IARHGLEEPSNEVAVLISHACQERLKNVVEKLAI IAEHRIDI IKVDPRYEVTKDVRGQIK
 :*****.******.******.******:*****:*****.******.******

Aedesaegypti FLEELDKAEQKRHEEQEREMLMRAAKRSKTEDPEQAKLKAKAKEMQRAEMEELRQDAN
 Anophelesgambiae FLEELDKAEQKRHEEQEREMLMRAAKRSKTEDPEQAKLKAKAKEMQRAEMEELRQDAN
 Anophelesalbimanus FLEELDKAEQKRHEEQEREMLMRAAKRSKTEDPEQAKLKAKAKEMQRAEMEELRQDAN
 Anophelesdarlingi FLEELDKAEQKRHEEQEREMLMRAAKRSKTEDPEQAKLKAKAKEMQRAEMEELRQDAN
 *****.******.******.******.******.******.******.******

Aedesaegypti LTALQAIGPRKKPKLEEGATTTTVSCPALVSVFTCFSTPFFCFFLAWCIRH---WSGSK
 Anophelesgambiae LTALQAIGPRKKPKLEEGASASTPGVSGISTLSGKAPTPLRPRIKRVNLRDMLFYLEQE
 Anophelesalbimanus LTALQAIGPRKKPKLEEGSSTSPGASGIGSLGKAPTPLRPRIKRVNLRDMLFYMEQE
 Anophelesdarlingi LTALQAIGPRKKPKLEEGSSTSATPGASGIGSLGKAPTPLRPRIKRVNLRDMLFYMEQE
 *****.******: : * . . : : : *:* : : *:* . : .:

Aedesaegypti REDRHPVEASNQEGQLA
 Anophelesgambiae RETGKSQM--LYKAYLK
 Anophelesalbimanus RESCRSQM--LYKAYLK
 Anophelesdarlingi RESCRSQM--LYKAYLK
 ** : : . *

Puesto que se encontró regiones conservadas de proteína entre las cuatro especies (*A. aegypti*, *A. gambiae*, *A. albimanus* y *A. darlingi*) se buscó las secuencias de ADN codificante, sin UTRs, de las cuatro especies y se realizaron alineamientos de estas secuencias. A continuación, se muestran las secuencias:

Secuencia codificante de *A. aegypti* sin UTRs

ATGAAGTCCGAGCAAATGCCGCTGCTAAACCTATCGTCTGCACTGCAATGCTGCAAATT
 CGCGTCCGGCCGGTACGGCAATAACCGGTACGCCAGCGACCCTCCAAATCCGTGCGACC
 ACGCCACAATAGTATCGCGCCAAACCGCAGCCACCAACAACACGACGGTTACCACCAA
 ACGATCCGTAGTCAAACACCGGCCGTGGTCTCGGTAGCAGCTGCTGCAGCAGCAGCGGCC
 GCTGCGGCATCTGGTTCCACGGCCACTCAGGTCAAGCAAGTGACAGCAATTAGTAACAGC
 AATGTAGTCGTCGCAGCCTCAACACCATCAACGGCACCTGGTCTTGTAGTGACCGGGACA
 CAACCGTTGCCAGCGTTAGCACTTAGCTCTTCCGCCGTGGCCACTTTGAATAATGCTAGT
 AATAGTAATAGTTCTACGAGTTTGATCAGTACAAGCATCCCTTCTACGACGACCGTAGTT
 GTCAGTACGGCTCCTAGTATCAGTACTGCAATCACTAGCAGTATTACTAGTAATAATAGT
 AGTGCCAGTCAGGTAACACTGCTAGCACTAGCAGTCTTCCACCACGGTCACCACTTCC
 AGTAGTAAATCAAGTTCAGGATCAAATCACAGGGCTCGTCGGCGGGCAGAAAAAGAAA
 GCAAATGCTAGTGCTGCCGTGAGTTCTGTTGATCCTAACGATCCGACAGCAGCTAAGAAA
 GCAGCCTCTATGCAATCCTCTTTTTATCAGCATCACGTGCTTCCCTCAATGTACGGGGAT
 GATGATATCAACGACGTTGCCGGCCATGGGTGGTGTCAACTTGGCGGAGGAAACCCAACGA
 ATTCTCGGTTCAACGGAATTTGTGGGGACACAGATTTCGATCTTGTAAGACGAAATATTT
 TTGCACATGTCGGCGCTGCAAGCGAAAATACGGGGGATTGTGCGGAGGCACGGACTGGAG
 GAACCGAGCAGTGAGGTCGCAGTACTAATATCCCATGCCTGCCAAGAACGACTGAAAAAC
 ATCGTGAAAAAGTTGGCCGTAGTTGCCGAGCATCGAATCGATATTATCAAGGTTGACCCA
 CGGTACGAAGTGACGAAGGACGTACGGGGCAAATCAAGTTCCTAGAAGAGTTGGACAAG
 GCGGAACAAAAGCGACACGAGGAACAGGAACGTGAAATGTTGATGCGAGCAGCCAAGTCT
 CGATCAAAAACGGAAGATCCGGAGCAAGCTAACTTAAGGCTAAGGCGAAGGAAATGCAA
 CGAGCAGAGATGGAGGAACCTCGACAGCGAGACGCTAATTTGACGGCCCTGCAAGCCATT
 GGACCACGAAAAAGCCTAACTGGAGGAGGGAGCAACTACGACTGTTACGGTTAGTTGT
 CCAGCACTTGTTCGGTCTTACATGTTTTTCAACTCCGTTTTTCTGTTTTTTTTAGCC
 TGGTGCATCCGGCATTGGAGTGGGAGCAAGCGGGAAGACCGCCACCCCGTTGAGGCCTCG
 AATCAAGAGGGTCAACTTGCGTGA

Secuencia codificante de *A. darlingi*, sin UTRs

>ADAC002025-RA cds:NOVEL_protein_coding

ATGGCGTCCGCCAACAATTTTTAGAGAAGGCCCTGAAATCTGCGGTCGATGAATCTGCG
 GTGAACGCGATCGTGGAACGCTCGAAAACAGCTGGATGTCAACACGAATCTAGTGCAA
 CAAGTCGGGAGTGTGGGAAATCGGAAACGGGTGCGGGAACGGGCGAGAGTGGCGTGAAA
 GGCCTCGGAACGGTGAAAAAATAGTGGTGTCCAACAACAATACCATCACGGCGAATAAC
 AACACCGCGAGCAAAAAGTGTCTGCCAAAGCCGCCACGGAATAATTCGGGTTCCGGTC
 GTGATAGCGGGTGGGGGAGCGCGGGGAGGCGGAAATATCAACATCATCAGCCAACAATC
 GTGGTGCCTCCTCCGCCGTTAACGTTCTCCACCAGTCAGAAGCAGCTGCAGACGTCT
 TCGAATATGCCAAGAATGAGCCCGTGAAGTTGGTGTATCCCGCGAATATGAACAACAAC
 CGCGTTACGCTGACTCCCAGGCTGTGCAACGGCACGATCACGGTTTTCGCAGCCGCAGCCG
 CAGTCGGGAAACGGCGGAGTTTCGGGACCGCCGACGCCGACGCTGATCATCAAAAACAG
 CAAACCAACGCCGTCATGAACCCGGGAACGCCGGGCATCGTGACGGTTTTCAAGCCGATG
 AACAAATCAGGCAACACCAAAACATTGTGCGTTTTACCTGGTGTACAAATTGTAATGTTAGA
 CCTGGCGCACAAACCAACAAGCACAGCAAAAAACTGTTGCCGCTGTATCACCTAGAGTT
 GTCATTGGTAGCCAGCCAATAGTTAGTACTAGACCACCAACGCAAGCGCTATCACATTA
 AGTGCCCTTCAAGGACAGCAAGGCTCGACGTTACTGCTAAAGAATGAGCAGGGTCAGTTC
 CAGTTGCTTCGGATTGGACCGGCCCCACCGGGACCCAAATCACGCCTGCCAGTCTGACG
 CCGTCGTCCACGAACCAACGATACGATTGCAAACAGTACCAGCTACCCATGCATCTGGT
 ACGGGAACGATCATTGTGAGTTCACATTCAGGTACGACAACGCAGACGAACATATCTCA
 ACACAGCCCACACCGGTCGCTTCGGTAGCACCGGTGCCGGCGCTAGCTGCACAGCAGAAT
 ATCACCATTACGCATACATCGGCGTCGCCAGCGACAGTGTGAGCACTCAACAACAACCA
 CAGCAACAACCACAACAACAGCAACAACAACATAGCTCCACGGGGAGTGTGGGTGGTCAA
 CAGACGTCCAGCAGCAGCAACAACAACCTACGGTTGTGGTTACAACGACACCCGCCGTA

ACCCAGCAGCGAAACTCCTTAGATAATACCAAAGAAAAGTGCAGCAAATTTCTGACGAAT
 CTAATCGAGCTGTCAAAGCGTGAACCGACCAAGGTGGAACAAAATGTGCGTACGCTGATA
 CAGGAGCTGGTTGATGCAAACGTGGATCCGGCGGAATTTTGTGAACGTCTCGAGCGGTTA
 CTC AACGCCAGTCCGCAACCATGTTTGATTGGTTTTTAAAGAAAAGTCTACCACTGCTT
 CGGCAATCGCTAGTAACTAAAGAGATAACCATCGAAGGTATCAACCCACCTCTGCAGCA
 GTTGCTTTCGCCGGTACCGCCTTATCCTCCATTCCTGCCCCAAATTCGTCTGTGCGCCG
 ACGATTGTTTCGCAAGGCAGTATGATCGGTCAAACACAGATCCGCATGTTAACCACACAA
 TCTGGCTGACAACACTGCCACGGATCGGCCAAACCACGATCCGGCCTGCGGCTCCGATC
 CGAATACAAACACCCTGCAGCAACAGTGCAGGTAGCGTCAGGCGGAACAACTATTGTA
 GGACAACCGCGTACCACTACACTCACTGCGCAACAGATACGACCAAACGTGACAACGATC
 GGCCACACGACGATCGTGCAGACGGCGGGCCAGCAGCTTCCGCAAACCATTTTCGACCACA
 CCTCCCGCCCTGCTACCGGTGAGTGGGAATGCTAAGTTCAATGCCTCCGCTCAGCAGCAG
 ATACGCACCACTACACCCATCACGTCGCGCACGTTAACGTCGATCGGTGGGACGACGGTG
 ACTACGACGGGCAAACAGATCCTTCAGTCGCAATCAGTCAATCAGATCCGTGGCCAGACG
 CCGTTCGCTTCGGTAGCGGCCGTGGCTGCAGCAGCTGCGGCCGCTGCCTCGGGATCTTCG
 GCAACACAGGTTAAGCAAGTGACAGCAATTACCGCGCGGTGGGAATGTAGTGGTTAGTCTG
 AACAGAATCCGCCCCCGATGCAGCCAGTTCGGCCCTCGGTGGTGGGAGCAGTCAAGGA
 GGATCGTTGATGGTCAGCGGGACACAAGCCATGCCAGCCTTGACTCTAACGTCCGCCGCC
 AGTGCCCGCCGGTTTCGGTGTGAGTGGCGGCGTTGTCTCTGGCGTCAAGACTGCATCCGCT
 GTATCGTCGGCGATCGTTCTTAACCTCATCCACAGTCTCGACCACGGCAGCGTCAGCT
 TCGATCGGTAGTGGTACGGCAGTATCCGCCGATTGCCAACTGCTAGCGGGACAACACTA
 GCAACGCCCGCCTTACGACTATTA AAAACTATTACCGCTAAATCGCAGAACCTCCGGGA
 GCAGCTGCGGCCAGTGCCAAGAAGAAGGCAAGTGCCTCGGCTGCATCGAGCGCCGGAACG
 GAACAGGATGCCAGCAAACGAGCCGGTGCTTCGGCCCAGTCTCAATTCTACCATCATCAT
 GCAGCCATGTACGGTGAAGACGATATCAACGATGTGGCCGCCATGGGTGGCGTCAATCTG
 GCGGAAGAAACGCAGCGTATTCTAGGTTTCGACCGAGTTCGTTCGGAACGCAGATTCGATCG
 TGCAAGGACGAGGTGTTTCTCCATCTGCCGGCGCTTCAGTCACGCATACGGAACATCATT
 GCCCGCCATGGATTGGAGGAACCGAGTAATGAGGTCGCTGTACTGATATCGCACGCCTGT
 CAGGAGCGTCTAAAAACGTTGTTGAAAAGCTAGCGATCATAGCCGAACATCGGATAGAT
 ATTATCAAGTTGATCCACGGTATGAAGTGACGAAGGATGTGCGAGGGCAGATCAAATTT
 CTGGAAGAGTTAGATAAGGCGGAACAAAAGCGTACGAAAGAGCAAGAGCGCGAGATGCTG
 ATGCGTGTGCCAAATCTCGTTCTAAAACCGAGGATCCAGAACAGGGCAAATTTGAAGGCT
 AAGGCGAAGGAAATGCAAAGAGCCGAGATGGAGGAACTACGTCAACGGGACGCTAATCTG
 ACTGCACTTCAAGCCATTGGACCGAGGAAGAAACCGAAGCTAGAAGAAGGCTCTTCCACA
 TCCGCCAATCCCGTGCATCTGGTATTGGGTCTTTAAGTGGGAAGGCGCCGACTCCGCTG
 CGCCTCGAATCAAGCGGGTTAATCTGCGTATGCTGTTCTACATGGAGCAGGAACGG
 GAAAGCTGTAGGAGTCAGATGCTTTACAAAGCCTACCTCAAGTGA

Secuencia codificante de *A. albimanus*, sin UTRs

>AALB004166-RA cds: protein coding

ATGGCGTCTGCCAACTTTTTGGAAGAGGCTCTGAAATCGGATGTCGATGAGTCTGCGGTG
 AACGCGATCGTGGGCACGCTCGAAAACCAGCTGGATGTCAACACGAACCTAGTGCAACAA
 GTCGGGAGTGTGGGAAATCGGAATCGGGTGAGAGTGCAATAGAGGAGGTGGCAAATGGG
 GCCACGGCGGTCTGTGTCAGCAACGGCCATCTAGCGGCAGTGGCGTGCCTCAGCAGAAG
 CGAGATCTTGGCGGTGGCCTCGCGAATGGTGAATAGCGGTGTGCAACAACAATACTATC
 ACGGCAAATAACAACACTCCTGGTAAACCCACGATAGTACTAGTGCGAACAGCTCGTCC
 ACGTCCACGGTCTGTTGCCCGATCCGCGAGTGTGCGGTTGCCAAAGAGTGGCGGTGAGCCG
 CAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCGGAGCAATTCGGGCTCGGTGGTATAGCGGGAGGAGGT
 GCGACTCGCGGAGGCGCAACATCAACATAATCAGCCAACAAATCGTGGTGCCTCCTCCG
 CCGTTTAAACGTTCTTCCAGCACTCAGAAGCAGCAGCAGCAGCAGGCTTGACAACGGCG
 GGGAACAGCATCGTCTTAGCAACCACAGCTCCAAACGTCTTCAATATGCCAAAGAAT
 GAGCCCGTGAAGTTGGTGTATCCCGCTGGTGGTCAACAAACGGCGGCAGTGCTCAATATG
 AACAACAATCGCGTTACGCTGACCCCGTCCGGTCTGTGCAACGGCACGATCACGATGTCC
 CAGCAGCCGACGCTCATCCAGACAGCGAACCTCGTCCGCAAAGCGACGACCACCTCCACA
 GTTCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGGCGGGAAGTGGCGGAGTT
 TCGGGACAGCCGACGCCAACGCTGATTATCAAAAACCAGCAAACCAACCCGTTATGAAC
 TCCGGCGCGCCGGGAATCGTGACGGTTTCGAAGCCGATGAACAATCAGGCAACACCAAAC
 ATAGTCGGTTTACCTGGTGTACAAATTGTAAATGTTAGACCTGGCGCAACCCACACAA

GCACAGCAAAAACTGTTGCCGCTGTATCACCTAGAGTTGTCATTGGTAGCCAGCCAATA
 GTTAGTACTAGACCACCAAACGCAAGCGCTATCACATTAAGTGCCCTTCAAGGACAGCAA
 GGCTCGACGTTACTGCTAAAGAATGAGCAGGGTCAGTTCAGTTGCTCCGGATTGGACCG
 GCCCGACCCGGGACCCAAATTACGCCCGCCAGTCTGACGCCGTCGTCTACGAACCAAACG
 ATACGATTGCAAACAGTACCAGCTACTCATGCGTCTGGTACGGGAGCGATCATTGTGAGT
 TCCCAATCCGGCAGCAGCCACAAACCAGCTATATCTCCACACAACCGACGCCGGTCGCT
 TCGGTAGCACCCGGTGCCAGCGCTAGCTGCACAGCAGAATATCACCATCACGCATACATCG
 GCGTCACCAGCAACAGTGTGAGCACTCAACAACCCCAACAACAACAACAGCAACAGCAA
 CATGGCTCCACAGGGAGTGTGGCTGGTCAGCAGACGTCACAGCAGCAGCAACAGCAACCG
 ACGTCTGTGGTTACAACAACACCTGCCGTACGCAGCAGCGGAACCTCCTTAGATAATACC
 AAAGAAAAGTGCAGCAAGTTTCTGACGAATCTAATCGAGCTGTCCAAGCGAGAACCAGCC
 AAGGTGGAACAGAATGTGCGTACGCTGATACAGGAGCTGGTGGATGCAAACGTAGATCCG
 GCGGAATTTTGTGAACGTCTCGAGCGATTACTTAACGCCAGTCCGCAACCATGTTTGATT
 GGTTTTTTAAAGAAAAGTCTACCACTGCTTCGGCAATCGCTAGTAACTAAAGAGATAACC
 ATCGAAGGTATCAACCCACCCTCTGCCGAGTTGCTTTCCGCCGGTACCGCCTTATCCTCC
 ATTCCCGCCCAAATTCCGCCCGTTGCACCGACGATTGTTTCGAAGGCAGTATGATCGGC
 CAAACACAGATCCGCATGTTAACCAACCAATCCGGCGTGACCACACTGCCCCGGATCCGG
 CAGACCACGATCCGTCCGGCGGCTCCGATACGAATACAAACACCACTGCAGCAACAGTCG
 ACGGTAACGGCTGGCGGGACGACCATTGTAGGGCAACCGCGTACGACCACGCTACCCGCG
 CAACAGATACGACCAAACGTGACAACGATCGGTACACGACGATCGTGCAGACGGCGGGT
 CAGCAGCTTCCGCAAACCATTTCCGACCACACCTCCCGCACTGCTACCGATTCCGACTCCT
 TCCGTTACATCGATAACGCGAAGCGCACACGCTTCAGATACGCACCACTACACCCATC
 ACGTCGCGCAGTTAACGTCGATCGGTGGGACGACGCGTACAAACGACGGGCAAACAGATC
 CTTACGTCGCAAACAGTCAATCAGATCCGTGGCCAGACGCCGGTTCGCTTCGGTAGCGGCC
 GTGGCTGCAGCAGCAGCGGCCGCTGCCTCGGGATCTTCGGCAACGCAGGTTAAGCAAGTG
 ACAGCAATTACCGGCGGTGGGAATGTAGTCGTACGTCTGAACCAGAATCCGCCCCCGATG
 CAGCCGGTGTCCGCCCTCAGCGGTGGCGGCAGCCAAGGAGGATCGTTGGTGGTACGTGGG
 ACGCAAGCCATGCCCGCCCTGACACTAACGTCGCCGCCAGTGCCGCCGGGTTCCGGTGTG
 AGCGGTGGCGTTGTCTCCGGCGTCAAGTCGGCACCCGCTGCATCGGCGACGATCGTTCTT
 AACTCCTCATCCACAGTCTCGACCACGGCAGCGGCAGCTTCGATCGGTAGTGGTACGGCA
 GTATCCGCCGGATTGGCTACTGCTAGCGGGACCACACTAGCAACGCCTGGGCTTACGACT
 ATAAAACCTATTACCGCTAAATCGCAGAACCTCTCGGGAGCCGCTGCGGCAAGTGCCAAG
 AAGAAGGCAAGTGCCTCGGCTGCATCGAGCGCTGGAGCGGAGCAGGATGCGAGCAAGCGA
 GCCGTTGCGTCCGCCAGTCTCAGTTTACCATCATCATGCGGCCATGTACGGTGAAGAC
 GACATCAACGATGTGGCCGCCATGGCGCGCTCAATCTGGCGGAAGAAACGCAGCGCATT
 TTAGGATCGACCGAGTTCGTTCGGAACGCAGATCCGATCGTGCAAGGACGGGTGTTTCTC
 CATCTACCGGCGCTACAGTCACGCATACGTAACATCATTGCCCGCCATGGACTGGAGGAA
 CCGAGCAATGAGGTCGCACTACTGATATCGCACGCCTGCCAGGAGCGCCTAAAGAACATC
 GTAGAGAAGCTAGCAATCATTGCCGAACATCGGATAGATATTATCAAGGTTGATCCACGG
 TATGAGGTGACGAAGGATGTGCGAGGACAGATCAAATTCCTGGAAGAGCTAGACAAAGCG
 GAACAAAAGCGGCACGAGGAGCAAGAGCGCGAGATGCTGATGCGTGCCGCCAAATCTCGC
 TCCAAAACGGAAGACCCGGAACAGGCGAAATTAAGGCAAGGCAAAGGAAATGCAACGA
 GCCGAGATGGAGGAGCTACGGCAACGGGACGCTAATCTAACCGCACTTCAAGCCATTGGA
 CCGCGGAAGAAACCGAAGCTCGAAGAAGGTTCTTCCACATCCTCCACTCCCGGTGCGTCT
 GGTATTGGGTCTTTAAGCGGGAAGGCGCCGACTCCGCTGCGTCTCGAATCAAGCGGGTC
 AATCTGCGTGATATGCTGTTCTACATGGAGCAGGAACGGGAAAGCTGCAGGAGTCAGATG
 CTTTACAAAGCCTACCTCAAGTGA

Secuencia codificante de *A. gambiae*, sin UTRs

>AGAP005719-RA cds:KNOWN_protein_coding

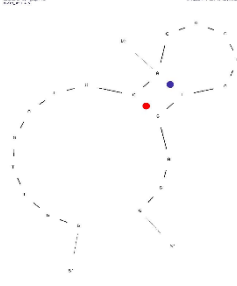
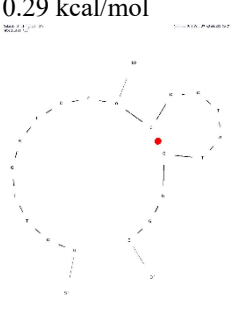

ATGCACAGACAGCCGGGTTCCGACGCTGCTGCTGAAGAATGAGCAGGGCCAGTTTCAGCTG
 CTCCGGATCGGACCCGGCACCCGCCGGTACCCAAATAACGCCCGCCGGTCTGACGGGGTTCG
 TCCGCGAATCAGACGATACGGTTGCAAACCTGTACCAGCTACACATTCATCCGGTTCCGGT
 GCAATAATAGTAAGCTCTCAGTCGATAACGACGACCCCGGCCAGCTACATCTGACCCAG
 CCGACGCCGGTTCGATCGGTTCGCGCCGGTACCGGCCCTGGCCGCGCAGCAAAATATCACG
 ATCACTCACTCGCCGTCCAGGTGGGAGGGCAACCGACCGTGTGGCGGCACAGCAGCAG
 CAGCAGCAGCAGACGACGCGGTTCGCAACACCTCATTCCGTGGGCCAACAGCAGTCG

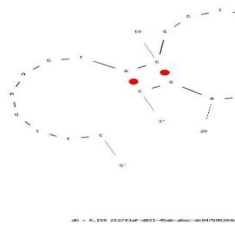
CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGACGGTGGTGGTCACTACCACGCCCCGGCACGACGCCGGCC
 CAGCAGCGAAACTCCTTAGATAAATACCAAAGAAAAGTGTAGCAAATTTTTGACGAACCTG
 ATCGAACTCTCCAAGCGGGAACCGGCCAAGGTGGAGCAGAATGTGCGAACGCTGATACAG
 GAGTTGGTGGACGCGAACGTCGATCCGGCGGAGTTTTGCGAGCGGCTCGAGCGTCTGCTG
 AATGCGAGTCCGCGACCCCTGCTTGATTGGGTTTTTAAAGGCCCAAATACGCCCGGTCGCA
 CCGACGATCGTGTGTCGAGAACAGCATGGTTCGGCCAGACGCAAATCCGCATGCTAACCTCT
 CAGTCCGGCGTGACGACGGTGCCACGCATCGGGCAGACCACCATCCGGCCGGCGGCACCC
 GTGCGAATACAGACGCCGCTGCAGCAGCAGCAGCAGCCCCGGCGGGCACAACGACCACG
 ATCGTGGGACCACGCTCCATCACTGCCCAGCAGATCCGACCGAACGCGACCACGATCGGC
 CACACGACGATCGTGCAGACGGCAGGCGGTTCAGCAGCTGCCACAAACCATCTCAACCACA
 CCCCCTGCATTGCTACCGATTGCGCGACCATCGGGCACCTCGATTACACGTAAGTGGTGC
 ACGTTACAGATACGCACCACTACGCCGGTGTGCGCGACGGTACGTCCGTCGGCGGCACG
 ACGGTGACGACCGGGCGGGCTCGGCAAACAGCTCCTCCAGTTCGAGGTCAATCAGATCCGG
 GGCCAGACGCCGGTTCGCTCGGTTGCGGCCGTCGCGGCCGCGGGCGGCAGCCGCCGCTCC
 GGCACGACCGCGACGCAGGTCAAGCAAGTGACAGCAATTACCGGCGGGCGGGAACGTGGTG
 GTCAGTTTGAACCAAGTGCCACCGCCGATGCAGCCAGTCTCAGGGAACGCCAGCATCATT
 GGCGGCACGGCCGTCAGCCTGGTGCCAACGATGCCCGCCCTCACGCTCACCTCGTCGGCG
 GTCAGTGCCGTCGGGCTGAGCGCCGCGGCATTGTGTCTCTCTTCCGCTTCTCTCTCC
 TCCGCTCTCTCTCTCTCTCGGCAGCGACAACGGTGGGGCCGCCCGGTGGCATTTCGCG
 ACGGTAGTAGTGAACCTCCGTCCCGTCAGCCACACCGGGCGGCGGGTGGCGTCCGCGGCG
 GCTCCACCCACGGGAACCTACTTCGATCGGCACGGCAGCAAGCGGGCTTGGTGGCGCGTCC
 AGCAGCAGCAGCAGCAGTGTGTCGACCGTACGACCGTATCGACTAATAAAACTGTTACC
 GCTAAATCGCAGAACCTCTCGGGGGCGTCCAAGAAGAAGGCTGGCGCGGCGTCGGCCGCG
 AGCGGCCCGGACGCGGAGAGTGCGGCAAGCAAGCGGGCGGGCGGTCGGCCCAGTCGCGAG
 TTCTACCACCACCACGCGTCCATGTACGGGGACGACGACATCAACGATGTGGCGGCGATG
 GGCGGCGTCAACCTGGCGGAGGAAACGCAGCGCATCCTCGGGTCGACCGAGTTCGTCGGC
 ACGCAGATCCGGTTCGTGCAAGGACGAGGTGTTTCTGCACCTGCCCGCCCTGCAGTCGAGA
 ATACGGGCGATCATTGCGCGGCACGGGCTGGAGGAGCCGAGCAACGAGGTGGCGGTGCTG
 ATATCGCACGCCTGCCAGGAGCGGCTGAAGAACGTCGTGGAGAAGCTGGCCATCATTGCG
 GAGCACCGGATAGATATTATCAAGGTGGATCCACGGTACGAAGTCACCAAGGACGTGCGG
 GGACAGATAAAGTTTCTCGAAGAGCTCGACAAGGCGGAGCAAAAGCGGCACGAAGAGCAG
 GAGCGTGAATGCTGATGCGGGCCGCGAAATCGCGCTCGAAAACGGAAGATCCGGAGCAG
 GCCAAGCTGAAGGCGAAGGCGAAAGAAATGCAACGTGCCGAAATGGAAGAGCTCCGGCAG
 CGAGACGCCAATTTGACCGCCCTGCAAGCCATCGGGCCGCGAAAGAAGCCCAAGCTAGAG
 GAAGGAGCCTCGGCATCCACCACGCCCGGTGTGTCCGGAATCAGTACGCTAAGCGGGAAG
 GCGCCACCCCGCTGCGGCCGCGCATCAAACGTGTCAACCTGCGTGATATGCTGTTCTAT
 CTGGAGCAGGAGAGGAAACGGGCAAAAGTCAGATGCTTTACAAAGCCTACCTCAAGTGA

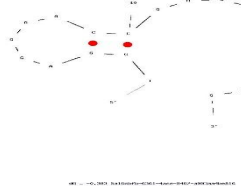
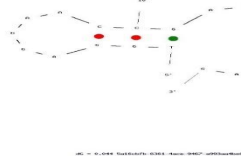
Estructuras secundarias de los cebadores diseñados para gen *nht*

Cuadro 80. Estructuras secundarias posibles formadas por los cebadores diseñados para clonar el gen *nht*

Set de cebadores	Cebador	Hairpins	Homodímeros	Heterodímeros
1	Nht1	-0.19 kcal/mol	Delta G: -4.62 kcal/mole. Base Pairs: 4	Delta G: -3.61 kcal/mole. Base Pairs: 4

<p>Set de cebadores</p>	<p>F</p>		<p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p> <p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p> <p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p> <p>Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p>	<p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG : : : : : : 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTTC</p>
		<p>0.29 kcal/mol</p> 	<p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p> <p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p> <p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p> <p>Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p>	<p>Delta G: -3.05 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG : : : 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTTC</p> <p>Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG : : 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTTC</p>
		<p>-0.53 kcal/mol</p> 	<p>Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p> <p>Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p> <p>Delta G: -1.47 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p> <p>Delta G: -1.47 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p> <p style="text-align: center;">Homodímeros</p> <p>Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p> <p>Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p> <p>Delta G: -1.47 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p> <p>Delta G: -1.47 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</p>	<p>Delta G: -1.94 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG : 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTTC</p> <p>Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG : : 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTTC</p> <p>Delta G: -1.47 kcal/mole Base Pairs: 2 5' GTTGATCCACGGTATGAGG 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTTC</p> <p style="text-align: center;">Heterodímeros</p>

			<p>Delta G: -1.34 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' GGTGATCCACGGTATGAGG :: 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</pre> <p>Delta G: -0.96 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' GGTGATCCACGGTATGAGG : : 3' GGAGTATGGCACCTAGTTGG</pre>	<p>Delta G: -1.34 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' GGTGATCCACGGTATGAGG : : 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</pre> <p>Delta G: -0.96 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' GGTGATCCACGGTATGAGG : : 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</pre> <p>Delta G: -0.96 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' GGTGATCCACGGTATGAGG : : 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</pre>
Set de cebadores	Nht1 R	<p>0.16 kcal/mol</p>  <p>Hairpins</p>	<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' CTTGAAGTCCGGTTAGATTAGC 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</pre> <p>Delta G: -3.54 kcal/mole Base Pairs: 3</p> <pre>5' CTTGAAGTCCGGTTAGATTAGC :: 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</pre> <p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' CTTGAAGTCCGGTTAGATTAGC : :: :: 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</pre> <p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' CTTGAAGTCCGGTTAGATTAGC : : :: 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</pre> <p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' CTTGAAGTCCGGTTAGATTAGC 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</pre> <p>Delta G: -1.94 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' CTTGAAGTCCGGTTAGATTAGC :: 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</pre> <p>Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' CTTGAAGTCCGGTTAGATTAGC : : :: 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</pre> <p>Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' CTTGAAGTCCGGTTAGATTAGC : : :: 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</pre> <p>Delta G: -1.47 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' CTTGAAGTCCGGTTAGATTAGC 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</pre> <p>Delta G: -0.96 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' CTTGAAGTCCGGTTAGATTAGC : : 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</pre> <p>Homodímeros</p>	<p>Heterodímeros</p>

			<p>Delta G: -0.96 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' CTTGAAGTGC GGTTAGATTAGC : :: : 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</p>	
			<p>Delta G: -0.96 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' CTTGAAGTGC GGTTAGATTAGC 3' CGATTAGATTGGCGTGAAGTTC</p>	
2	Nht2 F	-0.38 kcal/mol	<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : 3' GAGTAACGAGCCAAGGAGGT</p>	<p>Delta G: -9.92 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : : 3' CCGTTTCCTTACGTTGCTCG</p>
			<p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : 3' GAGTAACGAGCCAAGGAGGT</p>	<p>Delta G: -3.19 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : : 3' CCGTTTCCTTACGTTGCTCG</p>
		0.04 kcal/mol	<p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG :: : 3' GAGTAACGAGCCAAGGAGGT</p>	<p>Delta G: -7.04 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : : : : : 3' CCGTTTCCTTACGTTGCTCG</p>
			<p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG :: : 3' GAGTAACGAGCCAAGGAGGT</p>	<p>Delta G: -7.04 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : : 3' CCGTTTCCTTACGTTGCTCG</p>
			<p>Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : : : : 3' GAGTAACGAGCCAAGGAGGT</p>	<p>Delta G: -5.37 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : : 3' CCGTTTCCTTACGTTGCTCG</p>
			<p>Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG :: : 3' GAGTAACGAGCCAAGGAGGT</p>	<p>Delta G: -4.64 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : : 3' CCGTTTCCTTACGTTGCTCG</p>
			<p>Delta G: -1.47 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG 3' GAGTAACGAGCCAAGGAGGT</p>	<p>Delta G: -6.92 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : : : 3' CCGTTTCCTTACGTTGCTCG</p>
Set de ceba dres	Ceba dor	Hairpins	Homodímeros	Heterodímeros
	Nht2 R	-0.95 kcal/mol		

			<p>Delta G: -7.05 kcal/mole Base Pairs: 4</p> <pre> 5' GCTCGTTGCATTTCCCTTGCC 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>	<p>Delta G: -3.29 kcal/mole Base Pairs</p> <pre> 5' TGGAGAACCGAGCAATG : 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>
			<p>Delta G: -5.09 kcal/mole Base Pairs: 3</p> <pre> 5' GCTCGTTGCATTTCCCTTGCC :: 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>	<p>Delta G: -3.17 kcal/mole Base Pairs</p> <pre> 5' TGGAGAACCG 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>
			<p>Delta G: -3.81 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre> 5' GCTCGTTGCATTTCCCTTGCC 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>	<p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs</p> <pre> 5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : : 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>
			<p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre> 5' GCTCGTTGCATTTCCCTTGCC 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>	<p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs</p> <pre> 5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : : 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>
			<p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre> 5' GCTCGTTGCATTTCCCTTGCC 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>	<p>Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs</p> <pre> 5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : : 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>
			<p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre> 5' GCTCGTTGCATTTCCCTTGCC :: 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>	<p>Delta G: -1.94 kcal/mole Base Pairs</p> <pre> 5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : : : 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>
			<p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre> 5' GCTCGTTGCATTTCCCTTGCC :: :: 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>	<p>Delta G: -1.94 kcal/mole Base Pairs2</p> <pre> 5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>
			<p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre> 5' GCTCGTTGCATTTCCCTTGCC :: :: 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>	<p>Delta G: -1.94 kcal/mole Base Pairs2</p> <pre> 5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : : 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>
			<p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre> 5' GCTCGTTGCATTTCCCTTGCC 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>	<p>Delta G: -1.94 kcal/mole Base Pairs2</p> <pre> 5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : : 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>
			<p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre> 5' GCTCGTTGCATTTCCCTTGCC 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>	<p>Delta G: -1.8 kcal/mole Base Pairs2</p> <pre> 5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>
			<p>Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs2</p> <pre> 5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>	<p>Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs2</p> <pre> 5' TGGAGGAACCGAGCAATGAG : : 3' CCGTTTCCTTTACGTTGCTCG </pre>

Cuadro 81. Estructuras secundarias posibles formadas por los cebadores diseñados para amplificación de *nht* en PCR tiempo real

Cebador	Hairpins	Homodímeros	Heterodímeros
Nht_qPC Rf	-1.32 kcal/mol 	<p>Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : :: : 3' CAACGGCATCGAGGAGGTA</p> <p>Delta G: -1.47 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC 3' CAACGGCATCGAGGAGGTA</p> <p>Delta G: -0.96 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : : 3' CAACGGCATCGAGGAGGTA</p> <p>Delta G: -6.34 kcal/mole Base Pairs: 4</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : : 3' CAACGGCATCGAGGAGGTA</p> <p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC 3' CAACGGCATCGAGGAGGTA</p> <p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : :: : 3' CAACGGCATCGAGGAGGTA</p> <p>Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC 3' CAACGGCATCGAGGAGGTA</p>	<p>Delta G: -12.84 kcal/mole Base Pairs7</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGTA</p> <p>Delta G: -6.6 kcal/mole Base Pairs4</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGTA</p> <p>Delta G: -6.24 kcal/mole Base Pairs4</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGTA</p> <p>Delta G: -4.64 kcal/mole Base Pairs3</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGTA</p> <p>Delta G: -4.64 kcal/mole Base Pairs3</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGTA</p> <p>Delta G: -3.43 kcal/mole Base Pairs3</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGTA</p> <p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs2</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGTA</p> <p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs2</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGTA</p> <p>Delta G: -12.84 kcal/mole Base Pairs7</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGTA</p> <p>Delta G: -6.6 kcal/mole Base Pairs4</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGTA</p> <p>Delta G: -6.24 kcal/mole Base Pairs4</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGTA</p> <p>Delta G: -4.64 kcal/mole Base Pairs3</p> <p>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGTA</p>
Cebador	Hairpins	Homodímeros	

<p>Nht_qPC Rr</p>	<p>-1.07 kcal/mol</p> 	<p>Delta G: -4.67 kcal/mole Base Pairs: 3</p> <pre>5' AGGTTCTTCCACATCCTCCA : : : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' AGGTTCTTCCACATCCTCCA : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' AGGTTCTTCCACATCCTCCA : : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' AGGTTCTTCCACATCCTCCA : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -1.47 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' AGGTTCTTCCACATCCTCCA : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -1.34 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' AGGTTCTTCCACATCCTCCA : : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre>	<p>Heterodímeros</p> <p>Delta G: -4.64 kcal/mole Base Pairs: 3</p> <pre>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -3.43 kcal/mole Base Pairs: 3</p> <pre>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -4.64 kcal/mole Base Pairs: 3</p> <pre>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -3.43 kcal/mole Base Pairs: 3</p> <pre>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC : : : : 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre> <p>Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2</p> <pre>5' ATGGAGGAGCTACGGCAAC 3' ACCTCCTACACCTTCTTGGA</pre>
-----------------------	---	--	--

- A. Diseño de cebadores del gen *Doublesex* para evaluar la expresión genética por medio
1. Secuencias: A continuación, se encuentran las secuencias del gen *Dsx* de *An. albimanus* utilizadas en el diseño de cebadores para qPCR y las características de estos.

Secuencia 1. Secuencia del gen *Dsx* para *An. albimanus* con código de acceso AALB003344-RA

```
>AALB003344-RA cdna: protein_coding
GATGAGCTGGTCAAGCGGGCCAGTGGCTGGTGGAGAACTGAGTTACCCCTGGGAAATG
ATGCCCTGATGTACGTACTACTTAAGAGCGCGGATGGCGATGTACAAAAAGCGCACCAG
CGAATCGACGAAGGCACCAAAACGATTGTAGACTTCAACAAGAAGCTCCTGAAGTCGACG
CTGTACGCGACCGGCAACAGCGACCGGTTGACGGAGGAGGACGACGAGGATGAGAACATC
TCGGTTACCCCGCACCAACTCGAGCATCCGGTCCCGATCTAGCTCACGGTCACGATCGCGC
TCCTGTTCCCGGCAGCCGGGCGAATCATCGCCCCGCACCGACGAGCGAGCGCTCAATCTG
GACACGAAGCGACCGAGCAGCCGGCATCGCGACGATCGCGACGATGGTGCCGATTCCGTG
ACGTTTCGAGGAAGCGACGAGTCCGTCCGTGATTGTTCGCGGGTTCGTAAGACGGTGACCGAT
GGTAGCGCTTCGACGGTGGACGGTGGACAACCGGTGGCGGTGCGAACGGGCGGTGGCCGT
AGCCAGAACAAGCGGTTAAAGGACATGTTCGCGAATGAGCGCCGTACGCCAAGCCGATCA
CCGGTACCCTCGGCCGAACTGCCCCTTACCAGCAACACCGGCACCAGCGTCAGCAACAGT
GCCAGCGCCAGCGCCGTGTACGAACAGCAACTCCTGGAAGCGGCGAGCGGCCGGAAGTGT
CGGAGAGTCCACAGTCCAGTGCACCGTGATACGACGCCTGTGGCGACGGTAACGCCGGTG
GACAAGTCACCAGTTCACGAGGCCACGACGGCACAGTACGAGGCGTATCTAGCGTACGAA
GCGGCCCAATCGTCCCTGCGGGCGCGAAGTAAAAAGTTTCCCCACCGAAGGACCTGTCC
AGCAGTACGACGGCCGCGGTGGCTGCCGTAGCGGCCGACGCCGTGCCACCGTCGCCACG
GCCGCCAAGGAGGTGATCGTTCGACTGTTACGACAAGGAGAAGGAAGCTGGCCTGCCTGCG
TACACGCTACCGAAGGGGAGCCCGTTCGAGCGGCTCGATTTGCTGAAGAAACCGACCAGC
CTCGCCTTTCCGACCATGTACAAGTACGGTGGCATCGAGGCGAACCCTTTAACCTGCC
TTCACGCTGCTGCCCGGTGTTCGAGGCGGTCAACCGGACACTCTACTCGACCCCGTTTCCG
GCCCAGCTGCTCCCGTCCAGTCTCTATCCGTCCGTTAGCAGCGAGTCGGCGGGCGGGCA
GCAGCAGCGGCAGCGGCCACCGCAACCATGCCCATGTTTCACACCCACTTTCTCGGCTAC
CAACCACCCCTGCAGTACCAGCAGTTGAGTTCTATCGCAAAGAGCAGCAACAGCAACAG
CAACAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAAGCGCAGCTTCTGGAACCAAAGGAACCT
TCGTCTCGTTCGTTCGCTACTCCGGCCATCGTTCGGGGCCTGTTCTATGCGGGCGGGCC
ATGTCCCCGCGCAAGGAGGATGATTGTATTGCCGCATAGATGCTACAGCGTTGTGCCCCC
GGGAGGTCGATCGTTCGAGGTAGCGTCGTAAGTGTGGTCCCCGTTCCCTTAGTGTG
TTGCACAGCATCGTCAAGCCACACACACACACACCCACACACGTCCTCCCACCACAAC
GGCTTCGATTGTGGGCCGTGACTCGTTCGTTGGGCTCTTCACTTTCCAGAACTCC
TACAACAGACAGACAGCCTAAAACTGTAGGCAACAAGCGTTATTGATGATATTGTTTCGT
GCAACGAAAGTCTTTACTGTGATACAAAATGTTGTGTACAGGATGAGAACC GAATACAGA
CACACCTTATAGGCGAGGCGGAGAACGTGAACGTCGTGAGTGGGTAACAAACGGTACATT
TCATTTGTGATTTTTGTTCAGCCAGCGTCAGCCAGCGTTCAATCGCAGCTTCAAACAAA
CCCTCTTCAGCCTTCGTCGCTTCGTCAACGATTGTCCCACCAAAAATGTATTTGTTTTG
CTCCATGTTTTGGGGCCGCGATATTGCAAACGGCATGCAAACACATTCAGTAAGCGTTAG
GTTTTGAAGTGGGATCTTTTTGGAGATTTTAAATGGTTTCAAATGTTGCGAAGATCGCAA
AGGGTTTATCACTAGGCCGCTCGATTTGGAAGGAATGGATTGCGCGTTCCAATGTTCCCC
ATCTCCCATGGAAGATGGTTCGACAGGTTGGAAGTGGGAAATGGCTAATAAAAAAGAA
TTGAATTGTGATACGCACGCTCAGCATTGTTTCATGTAGCCTGTTAGTTTAAAGTCCCAC
ACCCCAAACGGTACGTGTGCGATGAAAAAGGGTGTCTTTTGCATGGGCAGCAGGGCA
GCAGGTCTATTGGCAGCAGCAGCCACCGTGAACCTGTGTTTTTCTTCTTTTTTCTTTAT
GTTGCCGTTGTCCCGGCTTTGTAATTGATGCTTATCTTCCGGTTTCGGTTTTTGTTTTTT
CCTCGTATTCGCGCTATTCCAAAAGTTTCCACGCCACCGTACAGACTCACACACACACA
CACACACAC
```

Secuencia 2. Secuencia del gen *Dsx* para *An. albimanus* con código de acceso AALB003342-RA

```
>AALB003342-RA cdna:_protein_coding
ATGGTGTCTCGCAGGACCGTTGGGCGGAAGCGATGTCTGGATTCCGGGTACGATTTCGCGGGCC
GATGGCAACGGGGCGTCCAGCTCGTGCAACAACACGCTGAACCCGCGGACGCCACCGAAC
TGTGCCCGGTGCCGCAACCACGGGCTCAAGATCGGGCTGAAGGGCCACAAGCGGTACTGC
AAGTATCGCCACTGCAACTGCGAAAAGTGCTGCCTGACGGCGGAACGGCAGCGCGTGATG
GCGCTGCAGACGGCGCTGCGCCGCGCCAGACCCAGGACGAGCAGCGGGCCCTCAACGAA
GGCGAGGTGCCACCCGAGCCGGTAGCTAACATTCACATAACCAAGCTGTCAGAGCTGAAA
GAGCTGAAGCATAATATGATTCATAATTCTCAGCCGAGATCGTTCGATTGCGACTCCTCC
ACCGGATCGATGGCGTCCACACCGGGAACATCCAGCATGGCACTGCCGGTCCACCGGCGG
TCACCCGACTACCGCATCATCCAACCGAACCGCAGCATCTCGGAGGTAAGTGTGCCCC
ACGAATCGCCCTTAA
```

Cuadro 82. Nombre y secuencia de los cebadores diseñados para amplificación del gen *Dsx*

Nombre de Pareja de primer	Secuencia de cebador forward 5'-3'	Secuencia de cebador reverse 5'-3'	Secuencia complementaria de Reverse 5'-3'
qPCR_DSX 1F qPCR_DSX 1R		GAATCGCCCTTAAGATG AGC	GCTCATCTTAAGGGCGA TTC
qPCR_DSX 2F qPCR_DSX 2R	ACAAGAAGCTCCTGAAG TCG	GAGCGCTCAATCTGGAC AC	GTGTCCAGATTGAGCGCT C
qPCR_DSX 3F qPCR_DSX 3R	GCTTGGGCTCTTCACTT TC	ACAGACACACCTTATAG GCG	CGCCTATAAGGTGTGTCT GT
qPCR_DSX 4F qPCR_DSX 4R	GGTGGAACTGAGGGAA ATG	CTTAATGTTGCCGTGTG CC	GGGACAACGGCAACATA AAG

Los cebadores se presentan en parejas, el primer dato que aparece en la columna nombre representa el cebador “forward” de cada pareja y el segundo dato es el cebador “reverse”. Los datos en la segunda columna son utilizados únicamente para localizar los cebadores en la secuencia ya que es la tercera columna la que se sintetizó.

Figura 104. Señalización de parejas de cebadores en la secuencia del gen *Dsx*. Los cebadores se encuentran señalados con diferente color en la secuencia.

```

>AALB003342-RA cdna: protein coding
ATGGTGTGCGCAGGACCGTTGGGCGGAAGCGATGTCGGATTCCGGGTACGATTCCGGGGCC
GATGGCAACGGGGCGTCCAGCTCGTGCAACAACACGCTGAACCCGGGACGCCACCGAAC
TGTGCCCGGTGCCGCAACCACGGGCTCAAGATCGGGCTGAAGGGCCACAAGCGGTACTG
AAGTATCGCCACTGCAACTGCGAAAAGTGTGCTGCTGACGGCGGAACGGCAGCGGTGATG
GCGTGCAGACGGCGTGCGCCGCGCCAGACCCAGGACGAGCAGCGGGCCCTCAACGAA
GGCGAGGTGCCACCGAGCCGGTAGCTAACATTACATACCCAAAGCTGTCAGAGCTGAAA
GAGCTGAACATAATATGATTATAATTCTCAGCCGAGATCGTTCGATTGCGACTCTCTCC
ACCGGATCGATGGCGTCCACACCGGGAACATCCAGCATGGCACTGCCGGTCCACCGCGG
TCACCCGGACTACCGCATCATCAACCGAACCCGACGATCTCGGAGGTAAGTGTGCCCC
ACGAATCGCCTTAAAGATGAGCTGGTCAAGCGGGCCAGTGGCTGCTGGAGAAACTGAGT
TACCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTACTTAAGAGCGGGATGGCGATGTA
CAAAAAGCGCACCAAGGAATCGACGAAGGCACCAAAACGATTGTAGACTTCAACAAGAAG
CTCCTGAAGTCGACGCTGTACGCGACCGGCAACAGCGACCGGTTGACGGAGGAGGACGAC
GAGGATGAGAACATCTCGGTTACCCGCACCAACTCGAGCATCCGGTCCCGATCTAGTCA
CGGTACGATCGCGCTCCTGTTCCCGGCGAGCCGGCGAAATCATCGCCCGCACCGACGAG
CGAGCGCTCAATCTGGACACGAAGCGACCGAGCAGCCGGCATCGCGACGATCGCGACGAT
GGTGCCGATTCCGTGACGTTTCGAGGAAGCGACGAGTCCGTCCGTGATTGTCCGGGGTCTG
AAGACGGTGACCGATGGTAGCGCTTCGACGGTGGACGGTGGACAACCGGTGGCGGTGG
ACGGCGGTGGCCGTAGCCAGAACAAAGCGGTTAAGGACATGTCCCGGAATGAGCGCCGT
ACGCCAAGCCGATCACCGTACCCCTCGGCCAACTGCCGTTACCAAGCAACACCGGCAC
AGCGTCAGCAACAGTGGCAGCGCCAGCGCGGTGTACGAACAGCAACTCTTGGAAAGCGGC
AGCGCCGGAAGTGTCCGAGAGTCCACAGTCCAGTGCACCGTGATACGACCGCTGTGGCG
ACGGTAACCGCGGTGGACAAGTCAACAGTTCACGAGGCGCACGCGCACAGTACGAGGCG
TATCTAGCGTACGAAGCGCCCAATCGTCCCTGCGGGCGCGAAGTAAAAAGGTTTCCCCA
CCGAAGGACCTGTCCAGCAGTACGACGGCCCGGTGGCTGCCGTAGCGCCCGCAGCCGCT
GCCACCGTCCGCCACGGCCGCCAAGGAGGTGATCGTCCACTGTTACGACAAGGAGAAGGAA
CTGGCCCTGCCTGCCTACCGCTACCGAAGGGGAGCCCGTTCCGAGCGGCTCGATTTGCTG
AAGAAACCGACCCGCTCCCTTTCCGACCATGTACAAGTACCGGTGCGATCGAGGGCAA
CACITTAACCTGCCCTTCACGCTGCTGCCCGGTGTCGAGGCGGTCAACCCGACACTTAC
TCGACCCCGTTCGCCGCCAGCTGCTCCCGTCCAGTCTCTATCCGTCCGTTAGCAGCGAG
TCGGCGGCGGGCGCAGCAGCAGCGGCGCCACCGCAACCATGCCATGTTTACACC
CACTTCTCGGCTACCAACCACCCCTGCAGCTACCGCAGCTTGAGTTCTATCGCAAGAG
CAGCAACAGCAACAGCAACAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAAGCGCAGCTTCTG
GAACCAAGGAACCTTCGTCCCTCGTCTGCTACTCCGGCCATCGTCCGGGGCCCTGTT
TATCGCGCGCGCCCATGTCCCGCGCAAGGAGGATGATTGTATTGCCCATAGATGCTA
CAGCGTTTGCCCCCGGAGGGTTCGATCGTCTGCTTCGAGGTAGCGTGTAAAGTGTGGTCC
CCGTTCCTTAGTGTGTGCACAGCATCGTCAAGCCACACACACACACACCCACACACGT
CCTCCACCACTGGCTTCCGATTGGGGCGTGACTCGTCGTGCTTTGGGCTCTTC
ACTTTCCAGAACTCCTACAACAGACAGACAGCCTAAAACTGTAGGCAACAAGCGTTATT
GATGATATTGTTTCGTGCAACGAAAGTCTTTACTGTGATACAAAATGTTGTGTACAGGATG
AGAACCGAATACAGACACCTTATAGGCGAGGCGGAGAACGTGAACGTCGTGAGTGGGT
AACAAACGGTACATTTCAATTTGTGATTTTTGTGAGCCAGCGTCAAGCGGTTCAATCG
CAGCTTCAAACCAACCCCTCTTCAGCCTTCCGTGCTTCGTCAACGATTGTCACCAAAA
AATGATTTGTTTTGCTCCATGTTTGGGGCCGCGATATTGCAACCGGCATGCAAAAACACA
TTCAGTAAGCGTTAGGTTTTGAAGTGGGATCTTTTTGGAGATTTTAAATGGTTTCAAATG
TTGCGAAGATCGCAAAGGGTTTACTACTAGCCGCTCGATTTGGAAGGAATGGATTGCGC
GTTCCAATGTTCCCATCTCCATGGAAGATGGTTCGACAGGTTGGAACTGAGGGAAAATG
GCTAATAAAAAAGAAATTGAATTGTGATACGCAGCTCAGCATTGTTCAATGTAGCCCTGTA
GTTTAAAGTTCCACACCCCCAAACGGTACGTGTGCGATGAAAAAAGGGTGTCTTTTGCA
ATGGGCAGCAGGGCAGCAGGTCTATTGGCAGCAGCAGCCACCGTGAACCTGTGTTTTTC
TTCTTTTTCTTTAGTTGCCGTTGTCCGCTTTGTAATTGATGCTTATCTCCGGTTT
CGGTTTTGTTTTTCCCTCGTATTCCGGCTATTCCAAAAGTTTCCACGCCACCGTACAG
ACTCACACACACACACACACAC

```

El área roja representa el área donde ya han sido diseñados cebadores con anterioridad para este gen, por lo que se decidió no trabajar en esta área y diseñar en áreas donde se obtuvieran cebadores que cumplan con todos los requerimientos.

2. Características de los cebadores: se muestran las características por set de cebadores, únicamente se muestra información de la pareja 1 y 2 ya que son las dos parejas que fueron sintetizadas.

Figura 105. Información general del cebador qPCR_DSX1F

RESULTS

SEQUENCE	5'- CAG AGC TGA AAG AGC TGA AG -3'
COMPLEMENT	5'- CTT CAG CTC TTT CAG CTC TG -3'
LENGTH	20
GC CONTENT	50 %
MELT TEMP	53.2 °C
MOLECULAR WEIGHT	6224.1 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	208400 L/(mole·cm)
nmole/OD ₂₈₀ :	4.8
µg/OD ₂₈₀ :	29.87

Figura 106. Horquillas del cebador qPCR_DSX1F

Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m (°C)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output
1		-2.6	56.3	-27.4	-83.17	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>

Figura 107. Homodímeros del cebador qPCR_DSX1F

Dimer Sequence:

5'- CAGAGCTGAAAGAGCTGAAG -3'

Maximum Delta G: -35.46 kcal/mole**Delta G: -6.34 kcal/mole Base Pairs: 4**

```

5'           CAGAGCTGAAAGAGCTGAAG
              ||||
3' GAAGTCGAGAAAGTCGAGAC

```

Delta G: -6.34 kcal/mole Base Pairs: 4

```

5' CAGAGCTGAAAGAGCTGAAG
      ||||  ::::
3' GAAGTCGAGAAAGTCGAGAC

```

Delta G: -6.34 kcal/mole Base Pairs: 4

```

5' CAGAGCTGAAAGAGCTGAAG
      ||||
3'           GAAGTCGAGAAAGTCGAGAC

```

Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5' CAGAGCTGAAAGAGCTGAAG
      ||  ::
3'           GAAGTCGAGAAAGTCGAGAC

```

Delta G: -3.55 kcal/mole Base Pairs: 3

```

5'           CAGAGCTGAAAGAGCTGAAG
              |||  ::
3' GAAGTCGAGAAAGTCGAGAC

```

Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5' CAGAGCTGAAAGAGCTGAAG
      ||  :  :  ::
3'           GAAGTCGAGAAAGTCGAGAC

```

Delta G: -3.55 kcal/mole Base Pairs: 3

```

5' CAGAGCTGAAAGAGCTGAAG
      |||  ::  ::  ::
3' GAAGTCGAGAAAGTCGAGAC

```

Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5' CAGAGCTGAAAGAGCTGAAG
      ||  ::
3'           GAAGTCGAGAAAGTCGAGAC

```


Figura 108. Heterodímeros del cebador qPCR_DSX1F



Figura 109. Información general del cebador qPCR_DSX1R

SEQUENCE	5'- GCT CAT CTT AAG GGC GAT TC -3'
COMPLEMENT	5'- GAA TCG CCC TTA AGA TGA GC -3'
LENGTH	20
GC CONTENT	50 %
MELT TEMP	60.5 °C
MOLECULAR WEIGHT	6108 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	187400 L/(mole·cm)
nmole/OD ₂₆₀ :	5.34
µg/OD ₂₆₀ :	32.59

Figura 110. Horquillas del cebador qPCR_DSX1R








Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m (°C)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output
1		0.54	16.9	-19.5	-67.22	Ct Det
2		0.75	11.1	-15.3	-53.83	Ct Det
3		0.81	7.2	-12.8	-45.66	Ct Det
4		0.88	12.1	-19.4	-68.01	Ct Det
5		0.95	5.7	-13.8	-49.48	Ct Det
6		1.05	4.1	-13.9	-50.13	Ct Det
7		1.32	1.3	-15.3	-55.75	Ct Det

Figura 111. Homodímeros del cebador qPCR_DSX1R

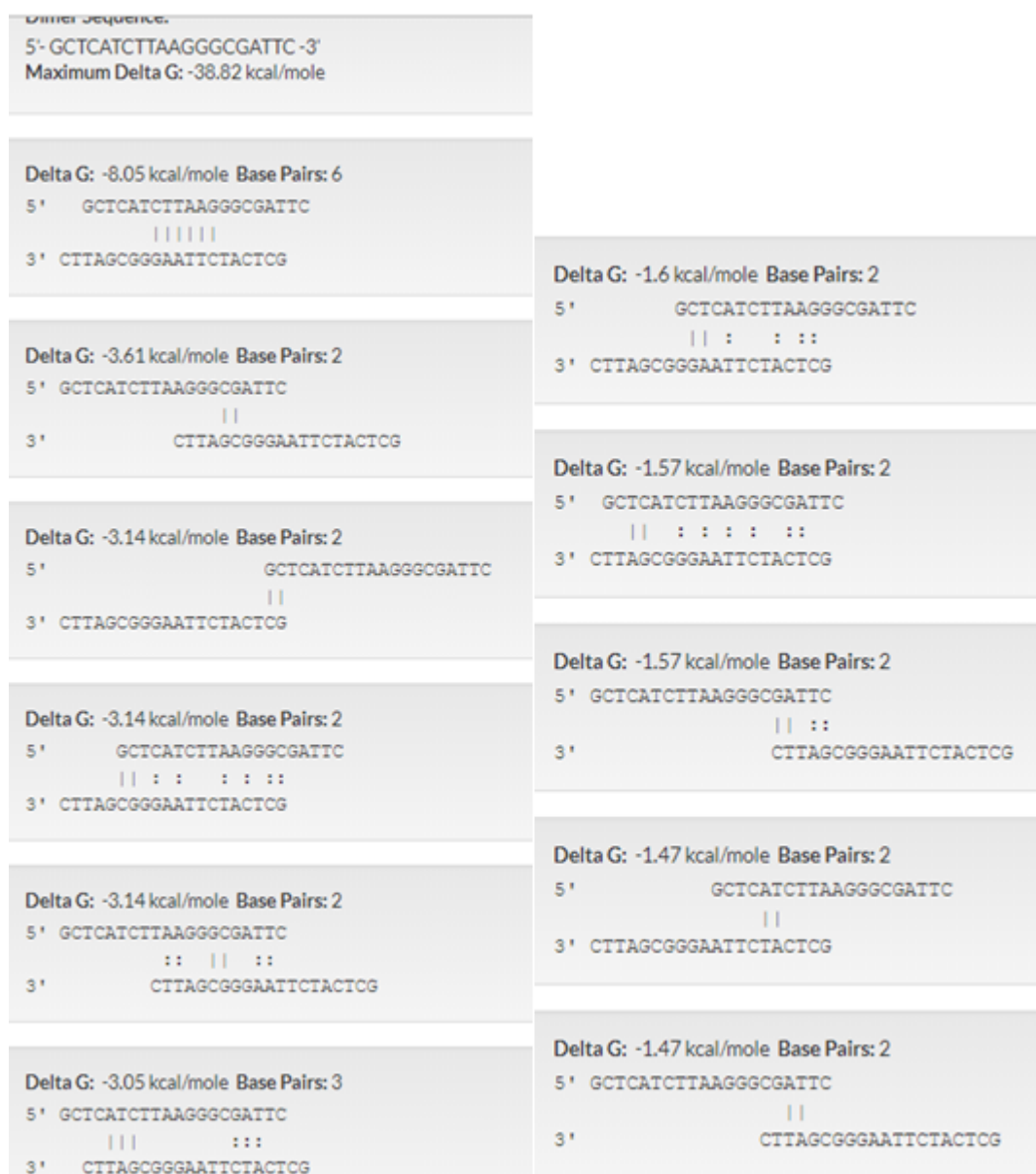


Figura 112.Heterodímeros del cebador qPCR_DSX1R

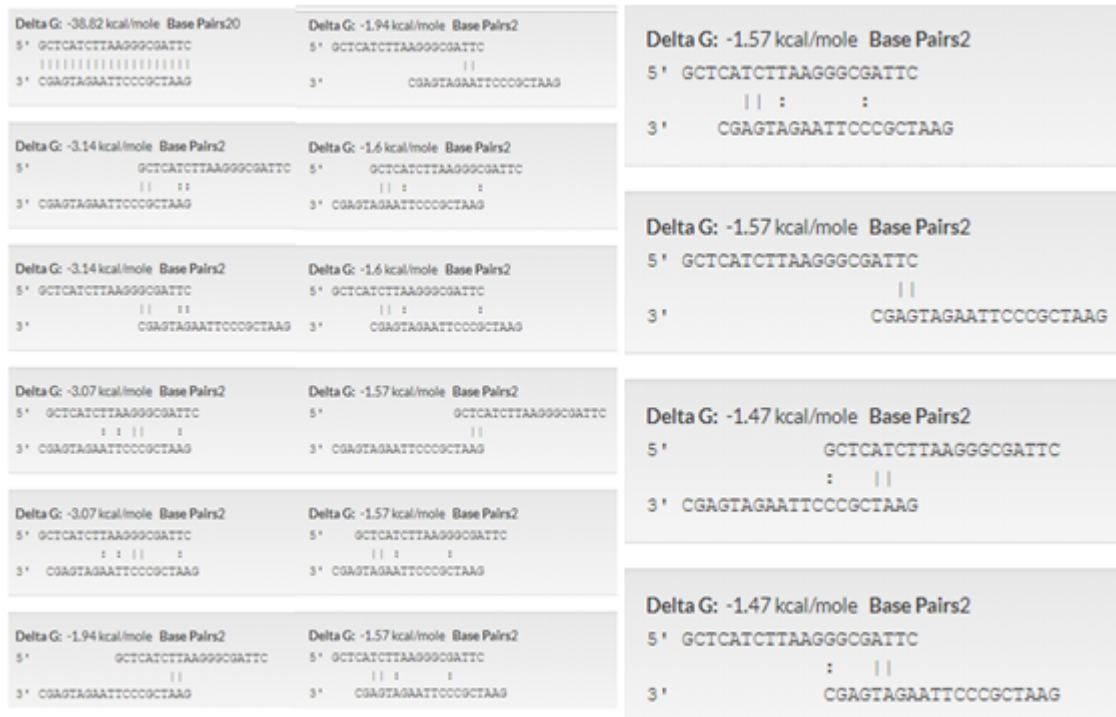


Figura 113. Información general del cebador qPCR_DSX2F

RESULTS

SEQUENCE	5'- ACA AGA AGC TCC TGA AGT CG -3'
COMPLEMENT	5'- CGA CTT CAG GAG CTT CTT GT -3'
LENGTH	20
GC CONTENT	50 %
MELT TEMP	54.6 °C
MOLECULAR WEIGHT	6135 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	200500 L/(mole·cm)
nmole/OD ₂₆₀ :	4.99
µg/OD ₂₆₀ :	30.6

Figura 114. Horquillas del cebador qPCR_DSX2F

Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output	
1		0.32	20.3	-19.9	-67.82	Ct	Det
2		0.61	15.1	-17.8	-61.75	Ct	Det
3		1.08	1.9	-12.8	-46.54	Ct	Det
4		1.15	8.7	-20	-70.95	Ct	Det
5		1.25	-5.4	-11	-41.09	Ct	Det

Figura 115. Homodímeros del cebador qPCR_DSX2F

<p>Dimer Sequence: 5'-ACAAGAAGCTCCTGAAGTCG-3' Maximum Delta G: -36.54 kcal/mole</p>	
<p>Delta G: -6.34 kcal/mole Base Pairs: 4 5' ACAAGAAGCTCCTGAAGTCG :: :: 3' GCTGAAGTCTCGAAGAACA</p>	
<p>Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2 5' ACAAGAAGCTCCTGAAGTCG 3' GCTGAAGTCTCGAAGAACA</p>	
<p>Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2 5' ACAAGAAGCTCCTGAAGTCG :: :: :: 3' GCTGAAGTCTCGAAGAACA</p>	
<p>Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2 5' ACAAGAAGCTCCTGAAGTCG : :: : 3' GCTGAAGTCTCGAAGAACA</p>	
<p>Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2 5' ACAAGAAGCTCCTGAAGTCG :: 3' GCTGAAGTCTCGAAGAACA</p>	<p>Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2 5' ACAAGAAGCTCCTGAAGTCG : 3' TGTTCTTCGAGGACTTCAGC</p>
<p>Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2 5' ACAAGAAGCTCCTGAAGTCG :: :: 3' GCTGAAGTCTCGAAGAACA</p>	<p>Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2 5' ACAAGAAGCTCCTGAAGTCG : 3' TGTTCTTCGAGGACTTCAGC</p>

Figura 116. Heterodímeros del cebador qPCR_DSX2F



Figura 117. Información general del cebador qPCR_DSX2R

SEQUENCE	5'- GTG TCC AGA TTG AGC GCT C -3'
COMPLEMENT	5'- GAG CGC TCA ATC TGG ACA C -3'
LENGTH	19
GC CONTENT	57.9%
MELT TEMP	62.5 °C
MOLECULAR WEIGHT	5819.8 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	177800 L/(mole·cm)
nmole/OD ₂₅₀ :	5.62
µg/OD ₂₅₀ :	32.73

Figura 118. Horquillas del cebador qPCR_DSX2R

Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m (°C)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output
1		0.07	23.9	-19.1	-64.29	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
2		0.46	14.6	-12.8	-44.48	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

Figura 119. Homodímeros del cebador qPCR_DSX2R

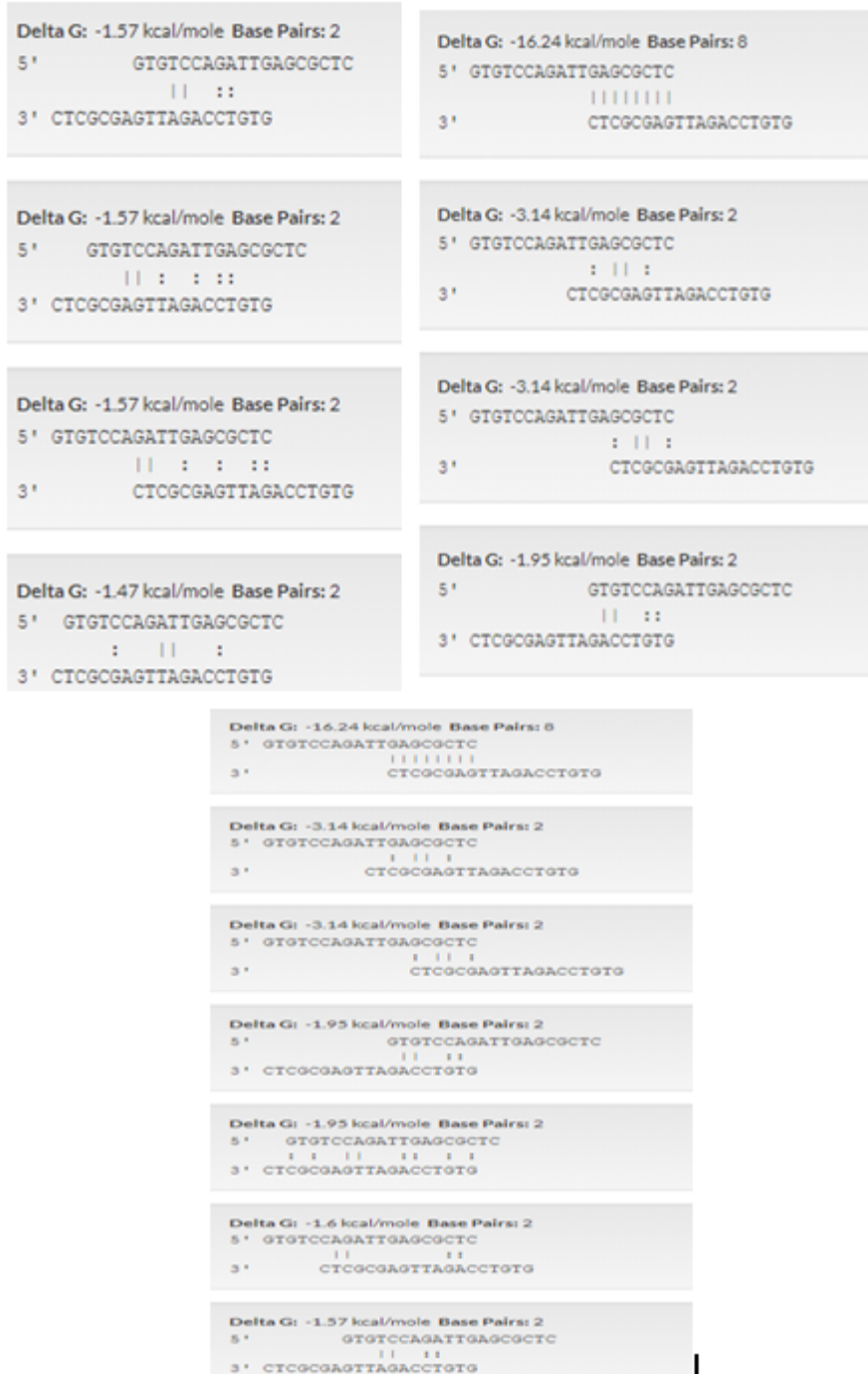


Figura 120. Heterodímeros del cebador qPCR_DSX2R

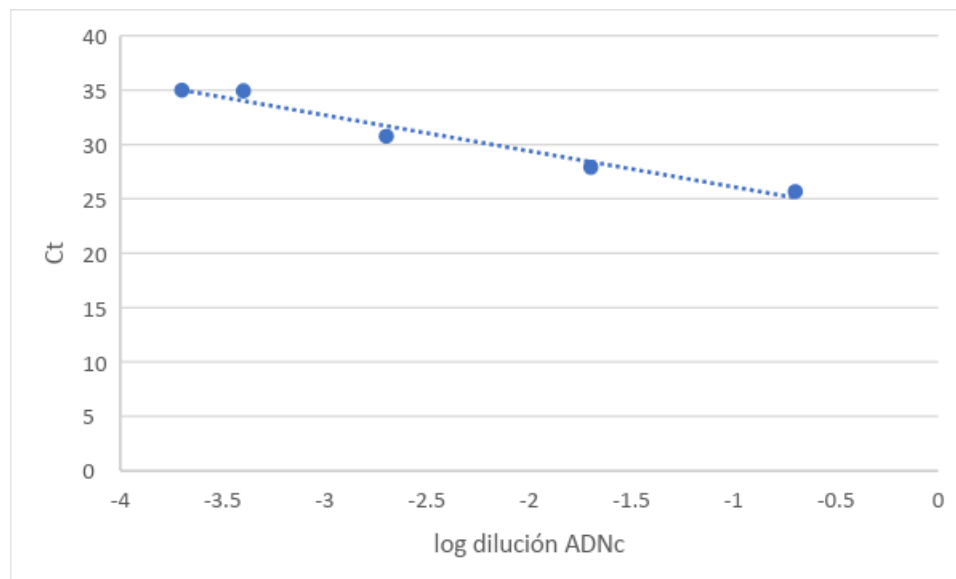


- B. Evaluar la eficiencia de los cebadores para evaluar la expresión genética por medio de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Cuadro 83. Datos obtenidos de qPCR con diferentes concentraciones de cebadores. Los datos en el cuadro 9 representan los valores obtenidos de los cebadores a diferentes concentraciones, este análisis se llevó a cabo con el software Excel.

Muestra	Cq	Cq Error	Cq mean	log dilución
PH PM 1:5	25.57	0.08	25.66	-0.69897
PH PM 1:5	25.73	0.08		
PH PM 1:5	25.69	0.08		
PH PM 1:50	27.94	0.04	27.9	-1.69897
PH PM 1:50	27.9	0.04		
PH PM 1:50	27.87	0.04		
PH PM 1:500	30.65	0.08	30.74	-2.69897
PH PM 1:500	30.8	0.08		
PH PM 1:500	30.78	0.08		
PH PM 1:2,500	34.89	0.03	34.92	-3.39794
PH PM 1:2,500	34.91	0.03		
PH PM 1:2,500	34.95	0.03		
PH PM1:5,000	34.97	0.01	34.98	-3.69897
PH PM1:5,000	34.98	0.01		
PH PM1:5,000	-	-		

Figura 121. Regresión lineal obtenida del qPCR de los cebadores a diferentes concentraciones.

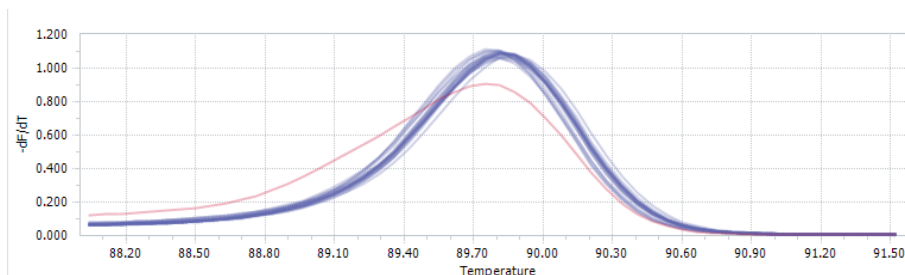


- C. Determinar el perfil de expresión relativa del gen *Doublesex* en relación a larva L3
 - 1. PCR en tiempo real

Las muestras que se analizaron por PCR en tiempo real fue el ADNc sintetizado. A continuación se muestran los datos obtenidos del análisis de *Dsx* en los siete estadios y para los genes de referencia RpL49

y RPS4. Los gráficos de curvas de qPCR mostrados corresponden a la réplica 1 de cada gen, los gráficos de las réplicas 2 y 3 se encuentran en anexos.

Figura 122. Curva de amplificación de Dsx réplica 1 en qPCR



2. Análisis estadístico de datos obtenidos de qPCR

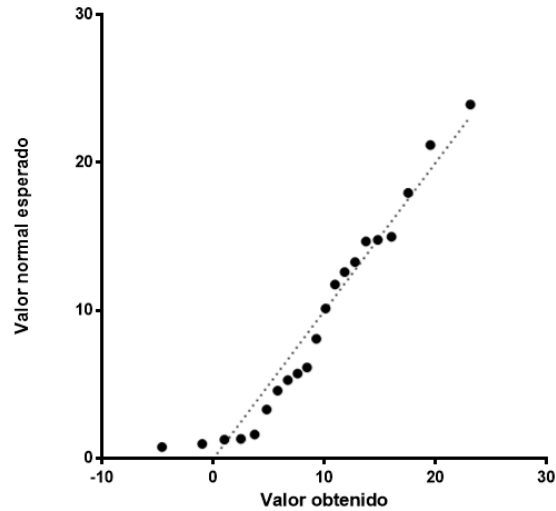
Cuadro 84. Prueba de normalidad de datos de Shapiro -Wilk para diferentes estadios de *An. albimanus*.

Valor	Estadio						
	L3	L4 TEM	L4 TAR	PH	PM	AH	AM
W	0.9801	0.8753	0.9691	0.7818	0.9811	0.882	0.9893
P value	0.7299	0.3107	0.6626	0.0718	0.7367	0.3304	0.8025
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

La prueba de Shapiro- Wilk se hizo por el software Prisma graphpad 7, donde W representa el coeficiente de concordancia, P value el valor P y por último se muestra que los datos pasan la prueba de normalidad.

Los resultados obtenidos de la prueba demuestran que estos datos son normales ya que el valor de P es mayor a 0.05

Figura 123. . Prueba de independencia de datos para diferentes estadios de *An, albimanus*. Se puede observar que los valores no están distribuidos normalmente ya que no siguen la tendencia lineal de los datos esperados.




Cuadro 85. Prueba de homogeneidad de varianzas de Brown- Forythe para diferentes estadios de *Dsx*.

Dato	Valor
F (DFn, DFd)	0.882 (6, 14)
P value	0.5328
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No

La prueba Brown- Forythe se hizo por el software Prisma graphpad 7, donde F representa el valor f, P value el valor P y por último se muestra que los datos pasan la prueba de normalidad.

Los resultados obtenidos de la prueba demuestran que este los datos son normales ya que el valor de P es mayor a 0.05.

<p>Universidad del Valle de Guatemala Laboratorio de Ingeniería Genética</p> 	<p>Procedimiento Normado de Operación</p>	<p>PNO: Versión: 2 Fecha: 13/09/17 Páginas Totales:7</p>
	<p>Extracción de ARN de <i>Anopheles albimanus</i> con kit SV total RNA Isolation System Z3100 de Promega</p>	<p>Autores: Andrea Ramos Revisado: Claudia P. y Pamela F.</p>

POE 9. Extracción de ARN con kit SV RNA Isolation system

1. Propósito:

1. Aprender a extraer ARN con el uso del kit SV total RNA Isolation System Z3100 de Promega.
2. Extraer ARN de *Anopheles albimanus* de buena calidad.

2. **Aplicación:** El ARN extraído se puede utilizar para hacer ADN copia y proceder con el análisis de PCR tiempo real, PCR de transcripción reversa, análisis de Northern blot, análisis de transcriptoma, análisis de micro arreglos, función y estructura de ARN. Se puede utilizar el PCR tiempo real para la cuantificación de la expresión de genes, para diagnosticar organismos genéticamente modificados y determinar silenciamiento de genes.

3. Referencias:

1. Promega. SV Total RNA Isolation System Technical Manual TM048 Z3100.
<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/sv-total-rna-isolation-system-protocol.pdf>

4. Terminología y abreviaciones:

1. BME: β -mercaptoetanol
2. GTG: Tiocianato de guanidina

5. **Principio:** El procedimiento se basa en la homogenización de tejido de zancudos, larvas y pupas de *An. albimanus* para la extracción de ARN mediante la combinación de tiocianato de guanidina (GTG) y β -mercaptoetanol para inactivar las ribonucleasas presentes en el tejido. El GTG junto con dodecilsulfato sódico (SDS) actúan como disruptor de complejos nucleoproteicos, permitiendo que el ARN liberado a la solución sea extraído libre de proteínas. La dilución de extractos celulares en presencia de altas concentraciones de GTG causa precipitación selectiva de proteínas celulares, mientras que el ARN se mantiene en la solución. Luego de la centrifugación hecha para aclarar el lisado de las proteínas precipitadas y debris celular, el ARN es selectivamente precipitado con etanol y se une a la superficie en la columna utilizada (Spin Basket). La ADnasa del kit es aplicada a la membrana para digerir el ADN genómico. El ARN total luego es purificado de sales contaminantes, proteínas e impurezas celulares.

6. Documentos asociados:

1. Promega. SV Total RNA Isolation System Technical Manual TM048 Z3100.
<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/sv-total-rna-isolation-system-protocol.pdf>

7. **Seguridad:**

1. El tiocianato de guanidina es un reactivo irritante por lo que si es inhalado, ingerido o absorbido causa quemaduras. Siempre utilizar guantes, bata y zapatos cerrados. Este reactivo rápidamente inhibe la actividad de RNAsas.
2. El β -mercaptoetanol es una solución igual de tóxica que causa irritaciones en la piel y en el tracto respiratorio, usar guantes y trabajar bajo campana.
3. El SDS es un reactivo ligeramente irritante y causa dermatitis, por lo cual se recomienda de igual manera utilizar guantes, bata y zapatos cerrados.

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

1. **Equipos**

1. Centrifuga
2. Macerador eléctrico

2. **Materiales**

1. Micropipetas: 1000uL, 200uL y 10uL.
2. Puntas: 1000uL, 200uL y 10uL.
3. Beaker de desechos
4. 8.2.4 Beaker para colocar maceradores o pistilos usados con cloro.
5. Tubos eppendorff 1.6mL libre de nucleasas (6 por duplicado).
6. Tubos eppendorff de 0.9 mL (6 por duplicado).
7. Tubos de 0.2 ML (2 por duplicado).
8. Pistilos libres de nucleasas (ver anexo).

1. **Reactivos**

1. Etanol al 95%

2. Procedimiento:

9.1 Preparar el lisado de tejido de *Anopheles albimanus* a partir de muestras menores o iguales a 30mg. El número de individuos a utilizar por extracción es el siguiente:

Cuadro 86. Número de individuos utilizados

Estadíos	Peso por individuo (mg)	Individuos por pool
Larva L1	0.20	150
Larva L2	0.25	120
Larva L3	0.70	40
Larva L4	4.3	7
Pupa	6.7	5
Adulto hembra	2.06	15
Adulto macho	1.1	25

Los adultos usados deben tener como máximo dos días de haber eclosionado de pupa a adulto.

9.3 Colocar las larvas, pupas o adultos en tubos de 1.6mL. Utilizar filtro de 53 um para trasladar las larvas en los tubos cuando estén en los estadios de L1, L2 y L3. Tratar de hacer este paso tratando de que no quede ninguna larva en el filtro y que todas sean colocadas en los tubos.

Extraer toda el agua de los tubos colocándolos en el bloque frío alrededor de 40 segundos- 1 minuto para que las larvas y pupas bajen al fondo del tubo, de esta manera será más fácil extraer el agua del tubo con pipeta de 1000uL o 200uL. No hay necesidad de usar filtro con las larvas L4 ni pupas para introducirlas en el tubo de 1.6mL. Para esto se usa una pipeta pasteur y se introducen en el tubo. Se coloca en bloque frío y se extrae el agua.

Los adultos que ya fueron previamente sexados se introducen al congelador de -20°C por 40 segundos o 1 minuto y rápidamente se pasan a sus respectivos tubos etiquetados previamente.

Los adultos deben de estar separados en machos y hembras. Las duplicas de los adultos hembras deben de estar separados de la siguiente manera: 15 individuos en un vaso y 15 individuos en otro vaso. Los adultos machos deben de estar separados 25 individuos en un vaso y 25 en otro. Así, al momento de meterlos al congelador no hay necesidad de contarlos antes de colocarlos en el tubo de 1.6mL.

9.4 Agregar a cada tubo, 175uL de RNA Lysis buffer (+ BME). Macerar con el macerador eléctrico y con los pistilos tratados con 2.5% SDS y NaOH 5N. Todas las maceraciones deben de realizarse en frío, es decir utilizando el bloque frío.

Si se están procesando menos de 24 muestras dejar incubar mínimo 15 minutos el macerado en el RNA lysis buffer en frío. Para que se logren concentraciones altas de ARN.

Macerar hasta que no se vea fragmentos de larva, pupa o adultos enteros. La maceración permite homogeneizar el tejido. El β-mercaptoetanol y los pistilos tratados con SDS y NaOH inhiben la contaminación por nucleasas.

	<p><i>Para adultos se considera necesario agregar inicialmente 100uL de RNA Lysis buffer (+ BME), macerar y luego agregar los 75uL de RNA Lysis buffer (+ BME) que faltan ya que se suele acumular tejido en la parte inferior del tubo luego de macerar por primera vez. Este tejido se puede mover ligeramente con una punta para luego agregar el volumen que hace falta de RNA Lysis buffer (+ BME), macerar nuevamente y así poder tener una solución homogénea.</i></p> <p><i>Posterior a la maceración, los pistilos deben de dejarse en romojo con cloro, luego tratarlos nuevamente si es necesario.</i></p>
9.5	<p>Añadir 350uL de RNA Dilution Buffer, mezclar por inversión de 3-4 veces y centrifugar por 10 minutos a 13,000 rpm a temperatura ambiente, transferir 475uL el lisado a un tubo de 1.6ml libre de nucleasas, nuevo y etiquetado según las muestra y número de duplica para evitar confusiones.</p> <p><i>Este buffer contiene tiocianato de guanidina que actúa como disruptor de complejos de nucleoproteínas, permitiendo que el ARN sea liberado a la solución. Los desechos celulares se descartan mediante centrifugación. *En este paso no se incubó a 70°C por 3 minutos debido a que al hacerlo el ARN sale en poca concentración y de baja integridad.</i></p>
9.6	<p>Agregar 200uL de etanol al 95% a cada tubo, mezclar bien por pipeteo y transferir a la Spin Basket o columna de ARN y centrifugar por 1 minuto bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Descartar lo que se eluyó y agregar 600uL de RNA Wash Solution. Centrifugar por 1 minuto. Hacer este paso a temperatura ambiente, ya no es necesario usar el bloque frío.</p> <p><i>El ARN es selectivamente precipitado con etanol. Luego de que se eliminó el débris celular y los desechos proteicos mediante la centrifugación, el ARN se une a la superficie de la columna. La reacción de unión a la columna ocurre rápidamente debido a la ruptura de las moléculas de agua por las sales caotrópicas, lo que permite la adsorción de los ácidos nucleicos en la sílica.</i></p>
9.7	<p>Preparar la mezcla de incubación de ADnasa mezclando 40uL de Yellow Core Buffer, 5uL de MnCl₂ 0.09M y 5uL de DNase I. Estos son los volúmenes usados para 1 tubo o una columna de extracción de ARN. Se deben de aumentar las cantidades dos o cuatro veces, ya que se trabaja en duplicado (o en el caso de adultos y pupas, se debe de aumentar cuatro veces dicha cantidad). Añadir 50 uL de la mezcla de ADnasa a cada tubo e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Agregar 200uL de DNase STOP SOLUTION y centrifugar 1 minuto.</p> <p><i>La ADnasa es aplicada directamente a la membrana para digerir todo el ADN genómico. El tiempo de incubación se aumentó 15 minutos más de los establecido por el protocolo del kit de extracción, porque al dejar solamente incubando por 15 minutos todavía se encontraba presencia de ADN genómico al hacer PCR convencional. Al dejarla por 30 minutos, se obtuvo una banda de amplificación menos fuerte luego de hacer PCR que en las muestras que se incubaron solamente por 15 minutos.</i></p>
9.8	<p>Añadir 600 uL de RNA Wash Solution, centrifugar 1 minuto y vaciar lo eluido. Añadir 250uL de RNA Wash Solution, centrifugar por 2 minutos y transferir la columna a un nuevo tubo de 1.6mL libre de nucleasas. Añadir 100uL de agua libre de nucleasas a la membrana y centrifugar por 1 minuto.</p> <p><i>El ARN extraído total es eluido con el agua libre de nucleasas al tubo de 1.6mL</i></p>
9.9	<p>Transferir el volumen obtenido de esta última centrifugación al tubo de elución (Elution tube) que trae el kit, el cual debe de estar correctamente etiquetado con fecha de extracción, especie, estadio y número de tubo al hacer la dúplica. Colocar nuevamente en bloque frío.</p> <p><i>No se transfiere directamente la columna de extracción de ARN a este tubo de elución, ya que al momento de centrifugar la tapadera del tubo que trae el kit se rompe, pero no se rompe en otros tubos libres de nucleasas comprados aparte.</i></p>

9.10	<p>Hacer 3 alícuotas del stock de ARN de 5uL, 3 alícuotas de 10uL y 1 alícuota de 2uL. Etiquetar de la misma manera los tubos de alícuotas. Guardar todas las muestras incluyendo el stock a -70°C, menos la alícuota de 2uL ya que se usa para cuantificar el ARN en Nanodrop, saber si la concentración es suficiente y si la extracción fue exitosa. Anotar las razones A260/280 y A260/230.</p> <p><i>Si se necesita verificar integridad se recomienda hacer gel de agarosa 1.5%, se dejan correr las muestras de 5uL de ARN y 1uL de loading buffer a 100V por 35 minutos.</i></p> <p><i>Si se quiere saber si hay contaminación por ADN genómico, realizar PCR convencional utilizando primers o iniciadores de Actina 10uM y 1uL de muestra de ARN extraído. Correr dichas muestras en gel de agarosa al 1.5% utilizando un marcador molecular de 50bp. Se puede observar que si hay presencia de ADN genómico, por lo tanto se debe de hacer un tratamiento con ADnasa antes de realizar la reacción de transcriptasa reversa.</i></p>
-------------	--

10. Cálculos:

N/A

11. Control de calidad:


1. Usar guantes en todo momento.
 2. Tener un área restringida únicamente para trabajo con ARN que contenga todo el material necesario tratado adecuadamente. Es decir, trabajar bajo campana de ARN, utilizando pipetas y puntas únicamente usadas para la extracción de ARN.
 3. Limpiar pipetas, caja de puntas y bloque frío con RNase Away. Dejar en campana de flujo laminar de ARN con luz UV por 15 minutos antes de realizar la extracción de ARN.
 4. Al mover reactivos, tocar espátulas para realizar mediciones de reactivos y tocar papel para pesar.
 5. En cualquier momento posible utilizar material plástico desechable para manipular ARN.
6. Política de resolución de conflictos.

12. Reporte de datos y documentos utilizados:**13. Reporte:**

ANEXO

- Pistilos tratados NaOH 5N y SDS 2.5%.
 1. Dejar overnight los pistilos usados en un beaker de 600mL con 250mL de NaOH 5N y 250mL de SDS 2.5%.
 2. Autoclavear al siguiente día.
 3. Dejar que los pistilos se sequen. Si considera necesario separarlos de cinco en cinco envolviéndolos en aluminio.
 4. Dejar secar.
 5. Guardar en gaveta de ARN.

POE 10. Tratamiento de ARN de *Anopheles albimanus* con Dnasa y reacción de transcripción reversa

<p>Universidad del Valle de Guatemala Laboratorio de Ingeniería Genética</p> 	<p>Procedimiento Normado de Operación</p>	<p>PNO:</p> <p>Versión:</p> <p>Fecha:</p>
	<p>Tratamiento de ARN de <i>Anopheles albimanus</i> con Dnasa y reacción de transcripción reversa</p>	<p>Páginas Totales:</p> <p>Autores: Andrea Ramos</p> <p>Preparado por: Andrea Ramos</p>

1. Propósito:

1. Realizar tratamiento con ADnasa para eliminar contaminación por ADN genómico en la extracción de ARN de *Anopheles albimanus* hecha usando el kit de RQ1 RNase-free DNase (Cat#M6101).
2. Verificar que el ARN esté libre de ADN genómico mediante PCR convencional con primers de Actina.
3. Hacer ADN copia a partir del ARN extraído usando el kit Go Script Revers Transcription System A5000-A50001.
4. Verificar la presencia ADN copia hecho mediante PCR convencional

2. Aplicación:

La RQ1 RNase-free DNase es utilizada en aplicaciones donde mantener la integridad del ARN es crítica y se quiere degradar las plantillas de ADN presentes en muestras. Esta DNase es adecuada para aplicaciones tales como remoción de ADN en muestras de ARN antes de aplicaciones como RT-PCR, producción de fragmentos aleatorios, remoción de plantillas de ADN luego de transcripción invitro, nick translation y escisión de ADN genómico para footprinting.

La síntesis de cDNA a partir de ARN permite la amplificación mediante qPCR de genes específicos, puede ser utilizado para cuantificar cómo se expresan ciertos genes a lo largo de la vida de una especie.

3. Referencias:

1. Promega. GoScript Reverse Transcription System Technical Manual. TM316. Consultado en: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/goscript-reverse-transcription-system-protocol.pdf>
2. Promega. RQ1 RNase-Free DNase. Part#9PIM610. Consultado en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/rq1-rnase-free-dnase-protocol.pdf?la=en>

2. Terminología y abreviaciones:

1. cDNA: ADN copia
2. PCR: reacción en cadena de la polimerasa

5. Principio:

La enzima RQ1 RNase-free DNase es una endonucleasa (DNase I) que degrada ADN de una hebra y de doble hebra. Una unidad de RQ1 RNase-Free DNase es definida como la cantidad requerida

para degradar 1 μ g de ADN lambda en 10 minutos a 37°C en 50 μ L de buffer conteniendo 40mM Tris-HCl (pH 7.9), 10mM NaCl, 6mM MgCl₂ y 10mM CaCl₂.

El kit GoScript Reverse Transcription System incluye transcriptasa reversa y un set optimizado de reactivos diseñados para hacer eficiente la síntesis de la primera hebra de cDNA a partir de plantillas de ARN, poly (A)+ mRNA o copias sintéticas de ARN.

6. Documentos asociados:

1. Promega. GoScript Reverse Transcription System Technical Manual. TM316. Consultado en: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/goscript-reverse-transcription-system-protocol.pdf>
2. Promega. RQ1 RNase-Free DNase. Part#9PIM610. Consultado en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/rq1-rnase-free-dnase-protocol.pdf?la=en>
3. Ausubel, F., R. Brent., R. Kingston, D., Moore., J.G. Seidman, J. Smith y K. Stuhl. 2003. Current Protocol in Molecular Biology. John Wiley & Sons. Consultado en:

http://www.aun.edu.eg/molecular_biology/Proceeding_Dec2011/Current%20Protocols%20in%20Mol.%20Biol..pdf

4. Fichas internacionales de seguridad. 2007. Bromuro de etidio. IPCS. Consultado en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/1605a1679/1676.pdf>

7. Seguridad:

1. Bromuro de etidio: causa irritación ocular, dolor de garganta, toz. Se descompone al calentarla intensamente produciendo gases tóxicos, incluyendo bromuro de hidrógeno y óxidos fuertes. Utilizar doble guante al trabajar con esta sustancia.

8. Equipos, materiales y reactivos:

1. Equipos

1. Termociclador
2. Minicentrífuga (para hacer spin down).

2. Materiales

1. Bloque frío
2. Micropipetas: 20, 100 y 10 μ L.
3. Puntas: 20, 100 y 10 μ L.
4. Beaker de desechos con cloro
5. Tubos ependorff 0.9mL (1 por muestra)
6. Tubos ependorff 0.2mL (2 por muestra)

3. Reactivos

1. RQ1 RNase-free DNase 10x Reaction Buffer
2. RQ1 RNase-free DNase
3. RQ1 DNase Stop Solution
4. GoScript 5X Reaction Buffer
5. PCR Nucleotide Mix
6. Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor

7. GoSript Reverse Transcriptase

9. Tratamiento con RQ1 RNase-free DNase (Cat #M6101) y Reacción de Transcriptasa Reversa con Kit GoScript Reverse Transcription System, A5000-A5001.

9.1	<p>Calcular el volumen de ARN que se debe de utilizar para tener una concentración de 1μg en el volumen agregado en todas las muestras de ARN a tratar. Este volumen debe de ser menor o igual a 8μL. Si el stock de ARN está muy concentrado, se recomienda hacer diluciones 1:10.</p> <p><i>Es obligatorio que la cantidad de ARN este estandarizada a 1μg para poder usar el kit de ADNasa como el protocolo señala.</i></p>
9.2	<p>Según el número de muestras a tratar, por ejemplo 5, se hace una solución de 5μL de RQ1 RNase-free DNase 10x Reaction Buffer y 5μL de RQ1 RNase-free DNase. Mantener en frío.</p> <p><i>Se debe de preparar antes de hacer las diluciones de ARN.</i></p>
9.3	<p>Etiquetar tubos de 0.9μL, identificando el estadio al que pertenece el ARN extraído. Colocarlos en bloque frío. Agregar a cada tubo 2μL de la solución hecha de RQ1 RNase-free DNase 10x Reaction Buffer y RQ1 RNase-free DNase.</p> <p><i>Los tubos deben de estar correctamente etiquetados para evitar confundirse con las muestras.</i></p>
9.4	<p>Hacer, por último, las diluciones de ARN si es necesario hacerlas. Agregar el volumen de ARN al tubo correspondiente (no mayor de 8μL) para tener un volumen total final de 10μL. Si el volumen de ARN es menor a 8μL, es necesario completar este volumen con agua libre de nucleasas para llegar a los 10μL totales. Hacer spin down.</p> <p><i>El ARN se agrega de último para evitar que se degrade.</i></p>
9.5	<p>Incubar a 37°C por 1 ½ hora en el termociclador. Terminado el tiempo de incubación agregar 1μL de RQ1 DNase Stop Solution e incubar a 65°C por 10 minutos.</p> <p><i>Es necesario agregar la DNase Stop Solution para parar la actividad de la DNasa y que esta no degrade el cDNA cuando se hace transcriptasa reversa.</i></p>
9.6	<p>Etiquetar nuevamente otros cinco tubos de 0.2mL (el número de tubos depende del número de muestras tratadas). Agregar en estos tubos 1μL de las muestras tratadas para hacer PCR (anexo) y verificar si todavía hay contaminación por ADN genómico al correr un gel de agarosa al 1.5%.</p>
9.7	<p>Agregar 1μL de agua libre de nucleasas y 1μL de random primers del kit GoScript Reverse Transcription System A5000-A5001 para tener un volumen total de 11μL. Calentar en el termociclador a 70°C por cinco minutos.</p> <p><i>Se agrega 1μL de agua libre de nucleasas para mantener el volumen original. Al calentar permite que los primers se peguen a la plantilla de ARN.</i></p>

9.8	<p>Luego de incubar por cinco minutos, colocar todos los tubos en frío (en hielo) hasta que la mezcla de Transcriptasa Reversa esté lista. Asegurarse de que todos los tubos estén cerrados y en buen estado. Preparar la reacción de transcriptasa reversa en un tubo de 0.2mL identificado y libre de nucleasas. Agregar los componentes en el orden del Cuadro 1.</p> <p>Cuadro 87. Preparación de reacción de Transcriptasa Reversa (mezclar cada componente antes de usar)</p> <table border="1" data-bbox="386 436 1406 842"> <thead> <tr> <th># de Reactivo</th> <th>Componente</th> <th>Volumen (uL)</th> <th>Volumen 5X</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>Nuclease-free water (a un volumen final de 15uL)</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>GoScript™ 5X Reaction Buffer</td> <td>4.0</td> <td>24</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>MgCl₂ (1.5-5.0 mM)</td> <td>2.0</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>Nucleotide Mix (concentración final de 0.5mM cada dNTP)</td> <td>1.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor</td> <td>1.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>GoScript™ Reverse Transcriptase</td> <td>1.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Volumen final</td> <td>9</td> <td>126</td> </tr> </tbody> </table> <p><i>Se recomienda agregar una reacción más, por error de pipeteo.</i></p>	# de Reactivo	Componente	Volumen (uL)	Volumen 5X	1	Nuclease-free water (a un volumen final de 15uL)	-	-	2	GoScript™ 5X Reaction Buffer	4.0	24	3	MgCl ₂ (1.5-5.0 mM)	2.0	12	4	Nucleotide Mix (concentración final de 0.5mM cada dNTP)	1.0	6	5	Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	1.0	6	6	GoScript™ Reverse Transcriptase	1.0	6		Volumen final	9	126
# de Reactivo	Componente	Volumen (uL)	Volumen 5X																														
1	Nuclease-free water (a un volumen final de 15uL)	-	-																														
2	GoScript™ 5X Reaction Buffer	4.0	24																														
3	MgCl ₂ (1.5-5.0 mM)	2.0	12																														
4	Nucleotide Mix (concentración final de 0.5mM cada dNTP)	1.0	6																														
5	Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	1.0	6																														
6	GoScript™ Reverse Transcriptase	1.0	6																														
	Volumen final	9	126																														
9.9	<p>Combinar 9 uL de la reacción de Transcriptasa reversa con cada tubo de 11 uL del RNA con random primers que se dejó en hielo. Realizar el anillamiento en el termociclador a 25°C por 5 minutos. Extensión en el termociclador a 42°C por 1 ½ hora inactivar la transcriptasa reversa a 70°C por 15 minutos. Hacer un alícuota de 1uL de cDNA, para PCR. Guardar a -20°C. <i>Hacer un programa específico en el termociclador con estas temperaturas. Es necesario hacer alícuotas de 1uL para verificar la presencia del cDNA.</i></p>																																
9.10	<p>Hacer PCR convencional para confirmar presencia de cDNA en las muestras, seguido de un gel de agarosa al 1.5%. Agregar al PCR la reacción de control negativo y control positivo.</p>																																

N/A

10. Cálculos:**11. Control de calidad:**

1. Usar guantes en todo momento.
2. En cualquier momento posible utilizar material plástico desechable para manipular ARN.
3. Tener un área restringida únicamente para trabajo con ARN que contenga todo el material necesario tratado adecuadamente, tratar todos los utensilios con RNase away.
4. Realizar PCR en área blanca.

ANEXO:**1. PCR para verificar contaminación por ADN genómico y presencia de cDNA.**

- Verificar si hay cDNA en las muestras de ARN tratadas con el kit de Reverse Transcription System haciendo un PCR con primers de Actina 900uM.

Cuadro 88. Volúmenes de master mix

Reactivo	Volumen 1x (uL)	Volumen 12x
Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x	7.5	90

Primer forward + reverse ACT 10 uM	1	12
RNA template/cDNA template	1	--
Nuclease free wáter	5.5	66
Volumen total	15	168


Cuadro 89. Programa de PCR usado

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	1 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	35
Anillamiento	56°C	10 seg	
Extensión	72°C	10 seg	
Extensión final	72°C	10 min	1
Hold	4°C	Indefinido	1

2. Gel de agarosa 1.5%

- Agregar 0.46g de agarosa en 30ml de buffer TBE 1x.
- Agregar 2-3uL de bromuro de etidio al gel antes de que se enfríe. Dejar solidificar por 20 minutos con el peine puesto.

POE 11

<p style="text-align: center;">Universidad del Valle de Guatemala Laboratorio de Ingeniería Genética</p> 	Procedimiento Normado de Operación	PNO: Versión: Fecha: Páginas Totales:
	PCR tiempo real de cDNA de <i>An. albimanus</i>	Autores: Andrea Ramos Nufio Preparado por: Andrea Ramos Nufio

1. Propósito:

1. Realizar PCR tiempo real en muestras obtenidas de las reacciones de transcripción reversa.
2. Analizar los datos obtenidos de Ct a partir del qPCR hecho para calcular la expresión relativa de los genes objetivo.
- 3.

2. Aplicación:

El PCR tiempo real es una técnica eficiente que ha permitido la cuantificación de ácidos nucleicos de manera más específica y sensitiva. Se aplica en diagnósticos moleculares,

cuantificación relativa de la expresión de genes, obtención de eficiencia de primers, detección de fitopatógenos, detección de organismos genéticamente modificados, así como en seguridad y control de calidad alimentaria.

3. Referencias

1. Roche. 2013. LightCycler 96 System Guides. Consultado en: https://lifescience.roche.com/documents/LightCycler96_Manual_Version2016.pdf
2. Mendoza, D., H. Arbelaez y N. Contreras. 2010. Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: Su aplicación en genética básica. Colección Lecciones. Escuela de la Salud y ciencias de la vida. Editorial Universidad del Rosario. Colombia. 69Pp.
3. Farrell, R. 2005. RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and Characterization. 3ra. Edición. Elsevier Academic Press. UK. 767Pp.

4. Terminología y abreviaciones:

1. qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativo

5. Principio:

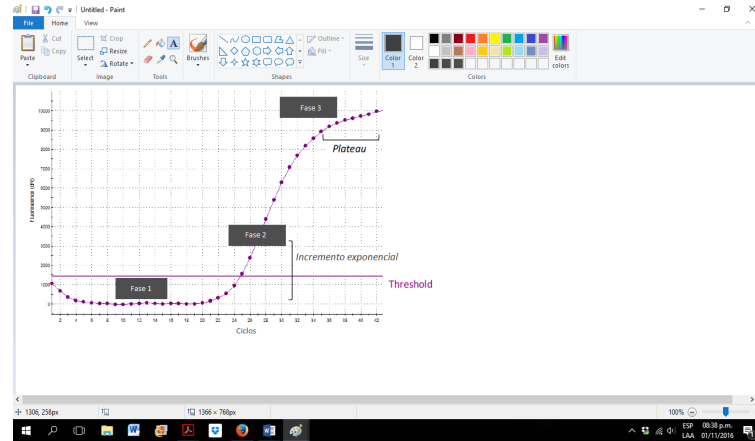
En el qPCR o PCR tiempo real, se cuantifican los productos que se obtienen de la amplificación de ADN formado mediante la detección por fluorescencia. Esta técnica permite evaluar la cinética de la reacción de amplificación. El PCR tiempo real se divide en 3 fases:

1. Fase de crecimiento lineal.
2. Exponencial.
3. Fase de finalización o *plateau*.

El reactivo usado, en este protocolo, para realizar qPCR es SYBR Green, el cual presenta fluorescencia al estar unido al ADN doble hebra. La fluorescencia producida es evaluada durante la fase de crecimiento exponencial temprana, y el ciclo de PCR en el que se produce la fluorescencia se llama Ct (Curve Threshold). Este valor está relacionado con el número de copias que posee la muestra analizada. En la siguiente gráfica se muestra la fase inicial en donde la producción de

fluorescencia está por debajo de la detección del termociclador. En la segunda fase se observa una forma exponencial debido a que hay un incremento en la fluorescencia. Por último, se observa una tercera fase (plateau) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia.

Figura 124. Análisis de gráfico de amplificación de PCR en tiempo real



6. Documentos asociados:

1. Mendoza, D., H. Arbelaez y N. Contreras. 2010. Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: Su aplicación en genética básica. Colección Lecciones. Escuela de la Salud y ciencias de la vida. Editorial Universidad del Rosario. Colombia. 69Pp.
2. Farrell, R. 2005. RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and Characterization. 3ra. Edición. Elsevier Academic Press. UK. 767Pp.
3. Life Technologies. 2012. Hoja de datos de la seguridad. SYBR Green. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/msds/2012/4304889_MTR-NALT_MS.pdf

7. Seguridad:

1. SYBR Green: ocasiona corrosión e irritación cutánea. Provoca lesiones oculares graves. A pesar de que se use guates y se trabaje en área blanca, lavarse las manos luego de la manipulación.

8. Equipos, materiales y reactivos:

1. Equipos

1. Termociclador LighCycler 96 Roche

2. Materiales

1. Micropipetas: 1000, 20 y 10 uL
2. Puntas: 1000uL, 20 y 10uL
3. Placa de multipozos y sellador de plástico.

3. Reactivos

1. Fast Start SYBR Green Master Version 09 Roche
2. Agua libre de nucleasas

9. Procedimiento:

- 9.1 Realizar un mapa de carga. Introducir el mapa de carga al programa de Light Cycler 96. Como se muestra a continuación. Este programa se encuentra en el termociclador de Light Cycler 96.

Figura 125. Mapa de carga

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	- C- ZPG	U PM1_... ZPG	U PM1_R1 ZPG	U PM1_R1 ZPG	U PM1_R2 ZPG	U PM1_R2 ZPG	U PM1_R2 ZPG	U PM1_R3 ZPG	U PM1_R3 ZPG	U PM1_R3 ZPG	- C- ZPG	U None
B	- C- ACTINA	U PM1_R1 ACTINA	U PM1_R1 ACTINA	U PM1_R1 ACTINA	U PM1_R2 ACTINA	U PM1_R2 ACTINA	U PM1_R2 ACTINA	U PM1_R3 ACTINA	U PM1_R3 ACTINA	U PM1_R3 ACTINA	- C- ACTINA	U None
C	- C- BOULE	U PM1_R1 BOULE	U PM1_R1 BOULE	U PM1_R1 BOULE	U PM1_R2 BOULE	U PM1_R2 BOULE	U PM1_R2 BOULE	U PM1_R3 BOULE	U PM1_R3 BOULE	U PM1_R3 BOULE	- C- BOULE	U None
D	- C- ZPG	U PH1_R1 ZPG	U PH1_R1 ZPG	U PH1_R1 ZPG	U PH1_R2 ZPG	U PH1_R2 ZPG	U PH1_R2 ZPG	U PH1_R3 ZPG	U PH1_R3 ZPG	U PH1_R3 ZPG	- C- ZPG	U None
E	- C- ACTINA	U PH1_R1 ACTINA	U PH1_R1 ACTINA	U PH1_R1 ACTINA	U PH1_R2 ACTINA	U PH1_R2 ACTINA	U PH1_R2 ACTINA	U PH1_R3 ACTINA	U PH1_R3 ACTINA	U PH1_R3 ACTINA	- C- ACTINA	U None
F	- C- BOULE	U PH1_R1 BOULE	U PH1_R1 BOULE	U PH1_R1 BOULE	U PH1_R2 BOULE	U PH1_R2 BOULE	U PH1_R2 BOULE	U PH1_R3 BOULE	U PH1_R3 BOULE	U PH1_R3 BOULE	- C- BOULE	U None
G	- C- ACTINA	U PM2_R1 ACTINA	U PM2_R1 ACTINA	U PM2_R1 ACTINA	U PM2_R2 ACTINA	U PM2_R2 ACTINA	U PM2_R2 ACTINA	U PM2_R3 ACTINA	U PM2_R3 ACTINA	U PM2_R3 ACTINA	- C- ACTINA	U None
H	- C- ACTINA	U PH2_R1 ACTINA	U PH2_R1 ACTINA	U PH2_R1 ACTINA	U PH2_R2 ACTINA	U PH2_R2 ACTINA	U PH2_R2 ACTINA	U PH2_R3 ACTINA	U PH2_R3 ACTINA	U PH2_R3 ACTINA	- C- ACTINA	U None

Puede tomar de ejemplo los siguientes mapas (Anexos). Los puede copiar e imprimir. Estos mapas fueron utilizados para hacer PCR tiempo real utilizando ADN copia de pupas y adultos de *An. albimanus*.


- 9.2 Preparar tres diferentes SYBR Green Master Mix en tres tubos de 1.6mL etiquetando con cada uno con los cebadores estipulados (*boule*, *zpg* y *actina*) con los siguientes volúmenes:

Cuadro 90. Master mix para qPCR

Reactivo	Volumen n=1	Volumen n=
Power up SYBR Green Thermo Fisher	5 ul	
Agua libre de nucleasas	1.7 uL	
Cebador Forward (<i>zpg</i> , <i>RpS4</i> , <i>RpL49</i>)	0.3 uL <i>dsx</i> 0.33uL <i>RpS4</i> y <i>RpL49</i>	
Cebador Forward (<i>zpg</i> , <i>RpS4</i> , <i>RpL49</i>)	0.3 uL <i>dxs</i> 0.33uL <i>RpS4</i> y <i>RpL49</i>	
Plantilla de cDNA diluída 1:10	2.5ul	
Volumen total	10 ul	

Hacer los cálculos necesarios para saber cuántas reacciones por pareja de cebadores que se van a utilizar (Por ejemplo: 25 reacciones). Mantener los volúmenes iniciales en las reacciones.

- 9.3 Hacer placa de PCR tiempo real en área blanca según el mapa que usted realizó.
- 9.4 Mantener la placa de PCR tiempo real con el Master Mix en frío y tapado mientras se preparan las diluciones 1:10 de todos los stocks de ADN complementario.
- Por ejemplo, si usted hará 30 reacciones, puede preparar una dilución de 27uL de agua libre de nucleasas y 3uL de cada stock de cDNA, o 36uL de agua libre de nucleasas y 4uL de cada stock de cDNA. El Máster Mix debe de hacerse de primero ya que el ADN complementario es inestable y se degrada fácilmente.
- Realizar el mismo procedimiento y análisis con la placa no. 2, después de hacer el análisis de PCR tiempo real con la placa 1.*
- 9.4 Agregar el volumen de la dilución 1:10 de ADN complementario de cada individuo en triplicado. Guiarse por el mapa de carga. Coloquelo en un lugar en donde pueda verlo cuando este planqueando. Sellar la placa y tratar de que no quede burbuja de aire al colocar el plástico sellador. Repasar la parte

9.5	<p>superior con un papel limpio para que quede sellado cada pozo. <i>Al momento de cargar en la placa, no crear burbuja, ya que esto interferiría en los resultados obtenidos. Para evitar contaminación de productos no deseados en el qPCR, Cargar placa y cerrarla dentro de campana.</i> <i>Este paso es muy importante, al cargar NO SE DESCONCENTRE!!</i> TIP: Al cargar el ADN, no pipeteé hasta descargar completamente el volumen de ADNc sino hasta el segundo tope para evitar burbujas y que el ADN salpique el pozo.</p>																		
9.5	<p>Centrifugar en la centrifugadora de placas de PCR tiempo real. <i>Esto permitirá que el volumen que se haya quedado en las paredes de los pozos baje al fondo y elimina las burbujas que se pudieron haber creado al cargar la placa.</i></p>																		
9.6	<p>Colocar placa en el termociclador LightCycler 96 de Roche como se muestra en la siguiente imagen:</p> <p style="text-align: center;">Figura 126. Forma de colocar placa de termociclador lightCycler</p> 																		
9.7	<p>Correr el programa de qPCR el cual tiene el siguiente perfil: Cuadro 91. Programa para qPCR</p> <table border="1" data-bbox="435 1050 1344 1203"> <thead> <tr> <th>Programa</th> <th>Ciclo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Preincubación (50°C por 60 segundos)</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Preincubación (95°C por 120 segundos)</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2 pasos de amplificación (95°C por 15 segundos, y 60°C por 60 segundos)</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>3 pasos de Melting</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table> <p>Los tres pasos de melting son: Cuadro 92. Temperatura de melting en qPCR</p> <table border="1" data-bbox="558 1285 1219 1409"> <thead> <tr> <th>Temperatura</th> <th>Tiempo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>95°C</td> <td>15 segundos</td> </tr> <tr> <td>60°C</td> <td>60 segundos</td> </tr> <tr> <td>95°C</td> <td>15 segundos, modo de adquisición continuo</td> </tr> </tbody> </table> <p><i>Seleccionar el volumen de reacción de 10uL</i></p>	Programa	Ciclo	Preincubación (50°C por 60 segundos)	1	Preincubación (95°C por 120 segundos)	1	2 pasos de amplificación (95°C por 15 segundos, y 60°C por 60 segundos)	50	3 pasos de Melting	1	Temperatura	Tiempo	95°C	15 segundos	60°C	60 segundos	95°C	15 segundos, modo de adquisición continuo
Programa	Ciclo																		
Preincubación (50°C por 60 segundos)	1																		
Preincubación (95°C por 120 segundos)	1																		
2 pasos de amplificación (95°C por 15 segundos, y 60°C por 60 segundos)	50																		
3 pasos de Melting	1																		
Temperatura	Tiempo																		
95°C	15 segundos																		
60°C	60 segundos																		
95°C	15 segundos, modo de adquisición continuo																		
9.8	<p>Finalizada la reacción, trasladar los datos del LightCycler 96 al USB del mismo y analizarlos en el programa LightCycler 96, de donde se puede obtener los valores Ct y las curvas de fusión o melting.</p>																		

Cálculos:

Cálculos de cebadores ZPG forward:

$$C1V1=C2V2522.58\mu\text{M}\times 100\mu\text{L}100\mu\text{M}\times 19.13\mu\text{L stock de primer forward}+80.87\mu\text{L Agua libre de nucleasas}$$

Hacer una dilución 1:10 de la solución de 100uM para tener una solución final de 10uM.

$$C1V1=C2V210\mu\text{M}\times 10\mu\text{L}0.4\mu\text{M}\times 0.4\mu\text{L primer forward 10uM}$$

Cálculos de cebadores ZPG reverse

$$C1V1=C2V2484.59\mu\text{Mx}=100\mu\text{L}100\mu\text{Mx}=20.63\mu\text{L stock de primer reverse}+79.36\mu\text{L Agua libre de nucleasas}$$

Hacer una dilución 1:10 de la solución de 100 μM para tener una solución final de 10 μM .

$$C1V1=C2V210\mu\text{Mx}=10\mu\text{L}0.4\mu\text{Mx}=0.4\mu\text{L primer reverse } 10\mu\text{M}$$

Cálculos de cebadores BOULE forward y reverse

Ambos stocks se encuentran a una concentración de 100 μM . Se deben de hacer dos diluciones 1:10 de la solución de 100 μM para tener una solución final de 1 μM .

$$C1V1=C2V210\mu\text{Mx}=10\mu\text{L}0.4\mu\text{Mx}=0.4\mu\text{L primer reverse } 10\mu\text{M}$$

- Se realizó el mismo procedimiento para el cebador forward.

Cálculos de cebadores ACTINA forward y reverse

Ambos stocks se encuentran a una concentración de 1000 μM . Se deben de hacer tres diluciones 1:10 de la solución de 1000 μM para tener una solución final de 1 μM .

$$C1V1=C2V210\mu\text{Mx}=100\mu\text{L}0.4\mu\text{Mx}=40\mu\text{L primer reverse } 1\mu\text{M}+60\mu\text{L Agua libre de nucleasas}$$

Se realizó el mismo procedimiento para el cebador forward.

Control de calidad:

Usar guantes en todo momento. Trabajar en campana de área blanca para hacer el SYBR Green Master Mix.

Utilizar únicamente agua desionizada y libre de nucleasas.

Tener un área restringida y limpiada con etanol y cloro, que haya sido expuesta a UV para cargar el SYBR Green y el cDNA para evitar contaminación.

Las diluciones 1:10 de cDNA hechas deben hacerse rápido y con mucho cuidado se de mantener en bloque frío y se hacen hasta que el Master Mix este hecho.

Reporte de datos y documentos utilizados:

N/A

Reporte:

N/A

Datos crudos de la optimización del método de producción de ARNd_h en *A. albimanus*

Cuadro 93. Concentraciones de ARNd_h después de la inactivación de bacteria por el método de incubación a 100°C por 1 hora

Método	Muestra	Concentración (ng/ μL)	A60/280	A260/230	Concentración de ARNd _h a alimentar (ng)
Después de 2h de inducir con IPTG	ANT 1	255.10	1.93	1.51	4081.6
	ANT 1.1	746.80	1.99	2.02	11948.8
	BOULE 1	909.00	2.01	1.61	14544
	BOULE 1.1	519.30	1.93	1.51	8308.8
	ZPG 1	971.00	2.00	1.93	15536

	ZPG 1.1	333.30	2.02	1.84	5332.8
Método	Muestra	Concentración (ng/uL)	A60/280	A260/230	Concentración de ARNdh a alimentar (ng)
Después de segundo lavado con PBS	ANT 2	597.50	1.97	1.65	9560
	ANT 2.2	371.50	1.97	1.74	5944
	BOULE 2	1538.80	1.99	1.96	24620.8
	BOULE 2.2	730.40	1.93	0.89	11686.4
	ZPG 2	1491.70	2.05	1.70	23867.2
	ZPG 2.2	982.00	2.03	1.61	15712
Después de tercer lavado con PBS	ANT 3	895.20	1.95	0.96	14323.2
	ANT 3.3	1094.50	1.99	1.31	17512
	BOULE 3	1041.40	2.03	1.86	16662.4
	BOULE 3.3	411.50	2.02	1.41	6584
	ZPG 3	356.40	1.99	0.63	5702.4
	ZPG 3.3	1253.20	1.84	1.83	20051.2
Después de inactivar 250uL de medio + 125uL de TRIzol	ANT 4	161.90	1.54	0.64	2590.4
	ANT 4.4	11.80	1.49	0.48	188.8
	BOULE 4	59.70	1.47	0.45	955.2
	BOULE 4.4	110.20	1.49	0.38	1763.2
	ZPG 4	88.00	1.47	0.42	1408
	ZPG 4.4	45.70	1.44	0.48	731.2
Después de inactivar 250uL de medio + 750uL de TRIzol	ANT 5	29.10	1.44	0.68	465.6
	ANT 5.5	19.60	1.41	0.45	313.6
	BOULE 5	36.60	1.46	0.23	585.6
	BOULE 5.5	21.30	1.42	0.40	340.8
	ZPG 5	39.50	1.42	0.35	632
	ZPG 5.5	39.50	1.43	0.37	632
	ANT 6	28.50	1.42	0.61	456
	ANT 6.6	19.50	1.41	0.56	312
	BOULE 6	22.70	1.42	0.66	363.2
	BOULE 6.6	18.00	1.41	0.39	288
	ZPG 6	16.50	1.41	0.64	264
	ZPG 6.6	31.40	1.41	0.64	502.4

Cuadro 94. Concentraciones de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de incubación a 70°C por 1 hora y 30 minutos, incubación con estreptomicina y ebullición por 5 minutos.

Método utilizado	Muestra	Concentración (ng/uL)	A260/280	A260/230	Concentración de ARNdh a alimentar	Promedio	DESV
Después de inducir 2h	1A	522.1	2.04	0.68	8353.6	6874.4	2091.90
	1B	337.2	2.04	0.72	5395.2		
Después de lavados	2A	231.7	1.97	0.48	3707.2	5160	2054.56
	2B	413.3	2.07	1.28	6612.8		
70°C x 30 min	3A	40.6	1.49	0.14	649.6	792	201.38
	3B	58.4	1.47	0.18	934.4		
70°C x 1h	4A	91.2	1.52	0.11	1459.2	819.2	905.09

	4B	11.2	1.5	0.05	179.2		
Heat shock	5A	376.6	1.96	0.52	6025.6	3536	3520.82
	5B	65.4	1.79	0.21	1046.4		
Strep pellet	6A	159.3	1.77	0.16	2548.8	4240	2391.71
	6B	370.7	2.19	1.29	5931.2		
Strep sobrenadante	7A	26.9	1.52	0.12	430.4	1098.4	944.69
	7B	110.4	1.54	0.16	1766.4		
Strep después de lavados	8A	290.2	1.98	0.66	4643.2	5444.8	1133.63
	8B	390.4	1.96	0.75	6246.4		

Cuadro 95. Concentraciones de ARNdH después de la inactivación de bacteria por el método de ebullición a 10 minutos con diferentes tiempos de centrifuga.

Muestra	Concentración (ng/ul)	A260/280	A260/230	Concentración de ARNdH en 200uL(ng)
Después de inducir	186.8	2.04	1.96	2988.8
Después de inducir	244.5	2.05	2.39	3912
Después de inducir	125.2	2.01	2.12	2003.2
Después de lavados (centrifugación 10min)	254.3	2.04	2.2	4068.8
Después de lavados (centrifugación 10min)	488.9	2.03	2.29	7822.4
Después de lavados (centrifugación 10min)	376.5	2	2.33	6024
Después de lavados (centrifugación 5 min)	226.3	2.03	1.98	3620.8
Después de lavados (centrifugación 5 min)	443.1	2.02	2.1	7089.6
Después de lavados (centrifugación 5 min)	322.7	2.01	1.71	5163.2
Inactivación por ebullición 10 min (centrifugación de 10 min)	206	1.95	1.32	3296
Muestra	Concentración (ng/ul)	A260/280	A260/230	Concentración de ARNdH en 200uL(ng)
Inactivación por ebullición 10 min (centrifugación de 10 min)	135.1	2.01	1.31	2161.6
Muestra	Concentración (ng/ul)	A260/280	A260/230	Concentración de ARNdH en 200uL(ng)
Inactivación por ebullición 10 min (centrifugación de 10 min)	165.4	1.99	2.22	2646.4
Inactivación por ebullición 10 min (centrifugación de 5 min)	153.1	1.94	2.1	2449.6

Inactivación por ebullición 10 min (centrifugación de 5 min)	160.3	2.01	1.62	2564.8
Inactivación por ebullición 10 min (centrifugación de 5 min)	259.9	2.04	1.86	4158.4

Cuadro 96. Concentración de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de ebullición a 15 minutos con freidora

Muestra	Concentración (ng/uL)	A260/280	A260/230	Concentración de ARNdh a alimentar (ng)	Promedio	DESV
Después de inducir 2h con IPTG						
Boule 1A	426.8	2.04	2.47	6828.8	6326.93	1074.98
Boule 1B	441.2	2.08	2.11	7059.2		
Boule 1C	318.3	2.05	2.3	5092.8		
ZPG 1A	230.5	2.01	2.55	3688.0	3674.66	156.42
ZPG 1B	239	2.03	1.85	3824.0		
ZPG 1C	219.5	2.02	2.26	3512.0		
ANT 1A	109.0	1.99	0.84	1744.0	4172.80	2147.30
ANT 1B	309.7	2.02	1.55	4955.2		
ANT 1C	363.7	2.03	2.4	5819.2		
ANT 2B	113.8	1.91	2.12	1820.8		
ANT 2C	376	2.02	2.07	6016.0	4319.46	2142.09
Boule 2A	214.3	2	2.33	3428.8		
Boule 2B	422.7	2.07	1.75	6763.2		
Boule 2C	172.9	1.98	2.43	2766.4	4180.80	1258.35
ZPG 2A	314	2.05	1.52	5024		
ZPG 2B	299	2.04	2.11	4784		
ZPG 2C	170.9	2	2.29	2734.4	4864.00	2661.27
ANT 2A	422.2	2.08	2.09	6755.2		

Cuadro 97. Concentración de ARNdh después de la inactivación de bacteria por el método de ebullición a 15 minutos con freidora y concentrando más el ARNdh, suspendiendo a la mitad del volumen inicial con agua ultrapura (Fue el alimento que se utilizó para aliment

Tratamiento	No. muestra	Concentración ng/uL	A 260/280	A 260/230	Promedio [ng/uL]	A dar en 200uL (ng)
HT115	A1	354.10	2.05	1.67	404.43	6470.93
HT115	A2	453.20	2.08	1.82		
HT115	A3	406.00	2.05	1.75		
Tratamiento	No. muestra	Concentración ng/uL	A 260/280	A 260/230	Promedio [ng/uL]	A dar en 200uL (ng)
HT115	B1	336.10	2.05	1.20	388.47	6215.47
HT115	B2	550.90	2.04	1.85		
HT115	B3	278.40	2.05	1.92		
ANT	A1	377.40	2.01	1.15	296.40	4742.40
ANT	A2	311.70	2.01	1.44		

ANT	A3	200.10	1.97	1.79		
ANT	B1	456.30	2.08	2.18	544.03	8704.53
ANT	B2	402.80	2.10	1.79		
ANT	B3	773.00	2.02	1.88		
BOULE	A1	134.80	1.98	1.81	181.63	2906.13
BOULE	A2	217.00	2.04	1.42		
BOULE	A3	193.10	1.92	1.36		
BOULE	B1	776.00	2.10	1.46	635.00	10160.00
BOULE	B2	389.60	2.09	1.85		
BOULE	B3	739.40	2.07	2.06		
ZPG	A1	193.10	1.98	2.03	192.30	3076.80
ZPG	A2	141.80	2.00	1.43		
ZPG	A3	242.00	2.01	1.78		
ZPG	B1	407.00	2.08	2.10	760.53	12168.53
ZPG	B2	838.50	2.04	1.76		
ZPG	B3	1036.10	2.05	1.60		

Figura 127. Estadística descriptiva sobre los diferentes métodos utilizados para la inactivación de la bacteria productora de ARNdH en BOULE (Realizado con R versión 3.3.2)

```

> arndh <- read.table(pipe("pbpaste"), sep="\t", header=TRUE)
> bartlett.test(Concentracion~Metodo,data=arndh)

    Bartlett test of homogeneity of variances

data:  Concentracion by Metodo
Bartlett's K-squared = 10.202, df = 7, p-value = 0.1774

> shapiro.test(arndh$Concentracion)

    Shapiro-Wilk normality test

data:  arndh$Concentracion
W = 0.91036, p-value = 0.07515

> aov_arndh <- aov(Concentracion~Metodo, data=arndh)
> summary(aov_arndh)

            Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Metodo      7 151004   21572   1.982  0.149
Residuals  11 119749   10886

```

La prueba de homogeneidad de varianzas (Bartlett) demostró una significancia mayor a 0.05 por lo que no se rechaza la hipótesis nula y se demuestra que los datos son homogéneos. La prueba de distribución normal mostró una significancia mayor a 0.05, por lo que no se rechaza la hipótesis nula y se demuestra que los datos vienen de poblaciones normalmente distribuidas. El ANOVA de un factor demuestra que no

hubo una diferencia significativa entre los distintos, ya que el valor de p fue mayor a 0.05, por lo que no se rechaza la hipótesis nula.

Figura 128. Estadística descriptiva sobre la concentración de ARNdh antes y después de la inactivación de la bacteria por ebullición por 15 min y concentrando el ARNdh de los distintos tratamientos (Realizado en Excel 2017)

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
Fila 1	6	2378.7	396.45	9307.603	
Fila 2	6	2521.3	420.216667	37624.38167	
Fila 3	6	2449.9	408.316667	80577.83367	
Fila 4	6	2858.5	476.416667	139271.2537	

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de la variación	Grados de libertad	Suma de los cuadrados	Media Cuadrática	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3	22557	7519	0.112736634	0.95163337	3.098391212
Dentro de los	20	1333905.36	66695.268			
Total	23	1356462.36				

Debido a que el $F <$ valor crítico, no se rechaza H_0 , por lo que no hay diferencia significativa entre tratamiento antes y después de inducir.

A. Evaluación de cebadores de *zpg* de *A. albimanus* mediante qPCR

Cuadro 98. Concentración de ARN total extraído de la primera réplica biológica de un grupo de 5 pupas macho.

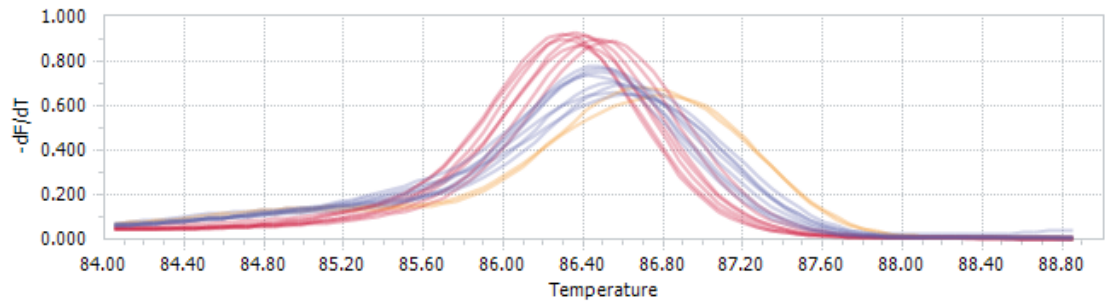
Muestra	Concentración ARN (ng/ul)	A 260/280	A 260/230
ZPG 1	223.1	2.19	2.14
	267.5	2.19	2.02
	264.6	2.20	2.16
ZPG 2	197.0	2.20	2.20
	189.3	2.19	2.09
	198.1	2.19	2.18
Boule 1	211.2	2.19	2.12
	207.9	2.2	2.14
	193.9	2.19	1.90
Boule 2	234.3	2.19	1.90
	209.4	2.18	1.91
	231.3	2.19	1.95
BZ 1	218.4	2.19	2.20
	231.6	2.19	2.18
	233.2	2.18	2.18
Muestra	Concentración ARN (ng/ul)	A 260/280	A 260/230
BZ 2	180.7	2.17	2.17
	205.2	2.18	2.20
	185.2	2.18	2.18
ANT 1	243.7	2.19	2.19
	247.0	2.18	2.13
	245.9	2.18	2.07
ANT 2	209.0	2.18	1.68
	217.3	2.18	1.66

	220.0	2.17	1.64
HT115 1	89.2	2.16	1.43
	91.2	2.13	1.32
	94.5	2.14	1.43
HT115 2	264.0	2.19	1.97
	260.8	2.19	1.87
	271.3	2.20	1.98
ABC 1	223.4	2.18	2.02
	212.4	2.18	2.28
	185.4	2.18	2.27
ABC 2	164.1	2.26	2.01
	178.9	2.16	2.05
	174.0	2.16	2.10
Cereal 1	190.9	2.18	1.68
	159.9	2.18	2.00
	153.8	2.19	1.68
Cereal 2	217.5	2.18	2.07
	228.1	2.18	2.10
	232.6	2.20	2.10

*Para cada réplica biológica se realizó un duplicado, sin embargo, para el presente módulo sólo se utilizó el duplicado 1, a excepción de la muestra HT115, que se utilizó el duplicado 2.

Cuadro 99. Datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de ZPG 0.4uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.

Muestra	Gen	Cq	Promedio Cq	Error Cq
PM 1:10	ZPG	30.52	30.83	0.51
PM 1:10	ZPG	31.42	30.83	0.51
PM 1:10	ZPG	30.54	30.83	0.51
PM 1:25	ZPG	31.49	31.55	0.2
PM 1:25	ZPG	31.39	31.55	0.2
PM 1:25	ZPG	31.77	31.55	0.2
PM 1:50	ZPG	32.22	32.18	0.06
PM 1:50	ZPG	32.12	32.18	0.06
PM 1:50	ZPG	32.21	32.18	0.06
PM 1:100	ZPG	32.74	32.98	0.44
PM 1:100	ZPG	32.71	32.98	0.44
PM 1:100	ZPG	33.48	32.98	0.44
Muestra	Gen	Cq	Promedio Cq	Error Cq
PM 1:250	ZPG	33.29	33.58	1
PM 1:250	ZPG	32.76	33.58	1
PM 1:250	ZPG	34.7	33.58	1
PM 1:500	ZPG	34.92	34.86	0.09
PM 1:500	ZPG	-	-	-
PM 1:500	ZPG	34.79	34.86	0.09

Figura 129. Curva de fusión de los cebadores de *zpg* a una concentración de 0.4uMCuadro 100. Datos crudos del C_q obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de *zpg* 0.3uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.

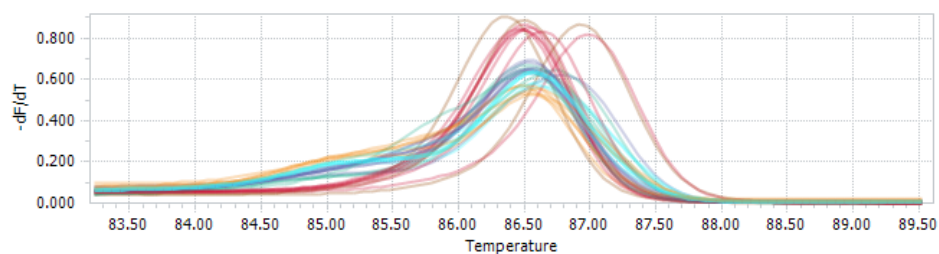
Muestra	Gen	C_q	Promedio C_q	Error C_q
PM 1:10 0.3uM	ZPG	32.63	31.88	0.65
PM 1:10 0.3uM	ZPG	31.52	31.88	0.65
PM 1:10 0.3uM	ZPG	31.48	31.88	0.65
PM 1:25 0.3uM	ZPG	32.48	32.49	0.11
Muestra	Gen	C_q	Promedio C_q	Error C_q
PM 1:25 0.3uM	ZPG	32.61	32.49	0.11
PM 1:25 0.3uM	ZPG	32.39	32.49	0.11
PM 1:50 0.3uM	ZPG	32.9	33.06	0.25
PM 1:50 0.3uM	ZPG	33.35	33.06	0.25
PM 1:50 0.3uM	ZPG	32.93	33.06	0.25
PM 1:100 0.3uM	ZPG	33.86	34.4	0.83
PM 1:100 0.3uM	ZPG	35.35	34.4	0.83
PM 1:100 0.3uM	ZPG	33.98	34.4	0.83
PM 1:250 0.3uM	ZPG	35.27	35.29	0.02
PM 1:250 0.3uM	ZPG	35.3	35.29	0.02
PM 1:250 0.3uM	ZPG	-	-	-
PM 1:500 0.3uM	ZPG	-	-	-
PM 1:500 0.3uM	ZPG	35.22	35.22	0
PM 1:500 0.3uM	ZPG	-	-	-

Cuadro 101. Datos crudos del C_q obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de *zpg* 0.6uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.

Muestra	Gen	C_q	Promedio C_q	Error C_q
PM 1:10 0.6uM	ZPG	34.25	33.37	0.82
PM 1:10 0.6uM	ZPG	32.62	33.37	0.82
PM 1:25 0.6uM	ZPG	33.25	33.06	0.57
PM 1:25 0.6uM	ZPG	32.42	33.06	0.57

PM 1:25 0.6uM	ZPG	33.51	33.06	0.57
PM 1:50 0.6uM	ZPG	34.06	33.08	0.86
PM 1:50 0.6uM	ZPG	32.43	33.08	0.86
PM 1:50 0.6uM	ZPG	32.76	33.08	0.86
PM 1:100 0.6uM	ZPG	35.26	34.21	1.05
PM 1:100 0.6uM	ZPG	34.21	34.21	1.05
PM 1:100 0.6uM	ZPG	33.17	34.21	1.05
PM 1:250 0.6uM	ZPG	33.28	33.49	0.2
PM 1:250 0.6uM	ZPG	33.51	33.49	0.2
PM 1:250 0.6uM	ZPG	33.68	33.49	0.2
PM 1:500 0.6uM	ZPG	-	-	-
PM 1:500 0.6uM	ZPG	-	-	-
PM 1:500 0.6uM	ZPG	34.9	34.9	0

Figura 130. Curva de fusión de los cebadores de zpg a una concentración de 0.6 y 0.3uM

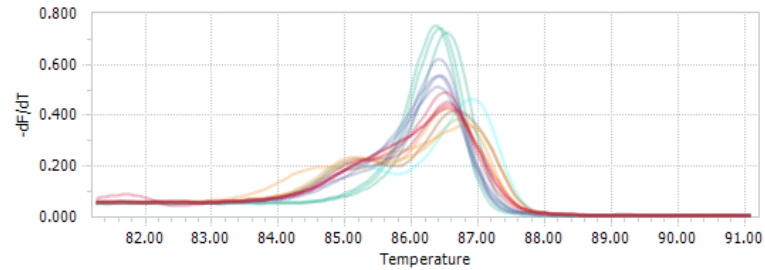


Cuadro 102. Datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de zpg 0.2uM bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante.

Muestra	Gen	Cq	Promedio Cq	Cq Error
1:10	ZPG	31.78	31.42	0.47
1:10	ZPG	31.59	31.42	0.47
1:10	ZPG	30.88	31.42	0.47
1:25	ZPG	31.93	31.94	0.01
1:25	ZPG	31.95	31.94	0.01
1:25	ZPG	31.94	31.94	0.01
1:50	ZPG	32.16	32.12	0.45
1:50	ZPG	31.65	32.12	0.45
1:50	ZPG	32.55	32.12	0.45
1,100	ZPG	33.6	33.67	0.48
1,100	ZPG	33.23	33.67	0.48
Muestra	Gen	Cq	Promedio Cq	Cq Error
1,100	ZPG	34.19	33.67	0.48
1,250	ZPG	35.06	34.56	0.45
1,250	ZPG	34.19	34.56	0.45
1,250	ZPG	34.42	34.56	0.45
1,500	ZPG	-	-	-

1,500	ZPG	35.13	35.13	0
1,500	ZPG	-	-	-

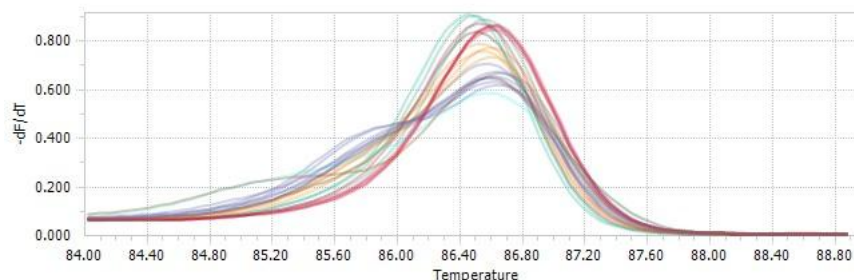
Figura 131. Curva de fusión de los cebadores de *zpg* a una concentración de 0.2uM



Cuadro 103. Resumen de los datos crudos del C_q obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de *zpg* 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante, usando dilución 1:25, 1:50, 1:100, 1:250 y 1:500

Resumen	Cebador					
	ZPG		RPL49		RpS4	
	Mean	Des.Est.	Mean	Des.Est.	Mean	Des.Est.
ZPG 1.1	32.975	0.275772	26.44	0.14	20.94	0.2
BZ 1.1	32.9	0.31	26.07	0.09	21.54	0.05
ANT 1.1	32.34	0.15	25.97	0.11	20.44	0.09
HT 1.1	33.46	0.480833	25.93	0.09	21.52	0.09
ABC 1:25	33	0.41	26.12	0.04	20.65	0.16
ABC 1:50	33.125	0.091924	26.52	0.12	21.34	0.04
ABC 1:100	33.65	0.39	27.27	0.06	22.08	0.08
ABC 1:250	34.4	0	28.48	0.18	23.43	0.06
ABC 1:500	0	0	29.46	0.26	24.32	0.07

Figura 132. Curva de fusión de los cebadores de zpg a una concentración de 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa



Cuadro 104. Resumen de los datos crudos del Cq obtenidos en la evaluación de las eficiencias de los cebadores de zpg 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa bajo las condiciones del programa descrito por el fabricante, usando dilución 1:10, 1:25, 1:50, 1:75 y 1:100

Resumen	Primer					
	ZPG		RPL49		RpS4	
	Mean	Des.Est.	Mean	Des.Est.	Mean	Des.Est.
ZPG 1.1	33.240	0.250	26.600	0.050	20.890	0.030
BZ 1.1	32.460	0.580	26.180	0.050	21.610	0.030
ANT 1.1	32.790	0.320	25.830	0.060	20.460	0.060
HT 1.1	33.415	0.262	25.670	0.030	21.250	0.110
ABC 1:10	31.490	0.190	25.190	0.070	19.885	0.092
ABC 1:25	32.770	0.350	26.180	0.040	21.010	0.240
ABC 1:50	32.905	0.007	26.630	0.110	21.490	0.150
ABC 1:75	34.740	1.470	27.040	0.010	21.790	0.110
ABC 1:100	33.645	0.516	27.320	0.060	22.270	0.080

Figura 133. Curva de fusión de los cebadores de zpg a una concentración de 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa de una dilución de 1:25 a 1:250

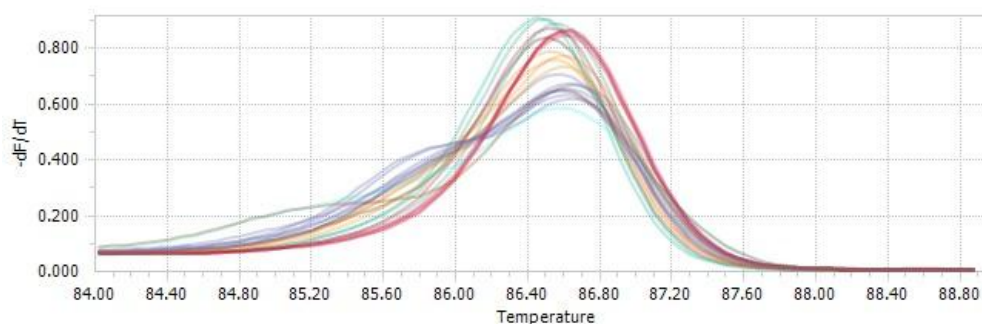


Figura 134. Curva estándar y de fusión de cebadores de genes de referencia (*RpS4* y *RpL49*) a una concentración de 0.33uM

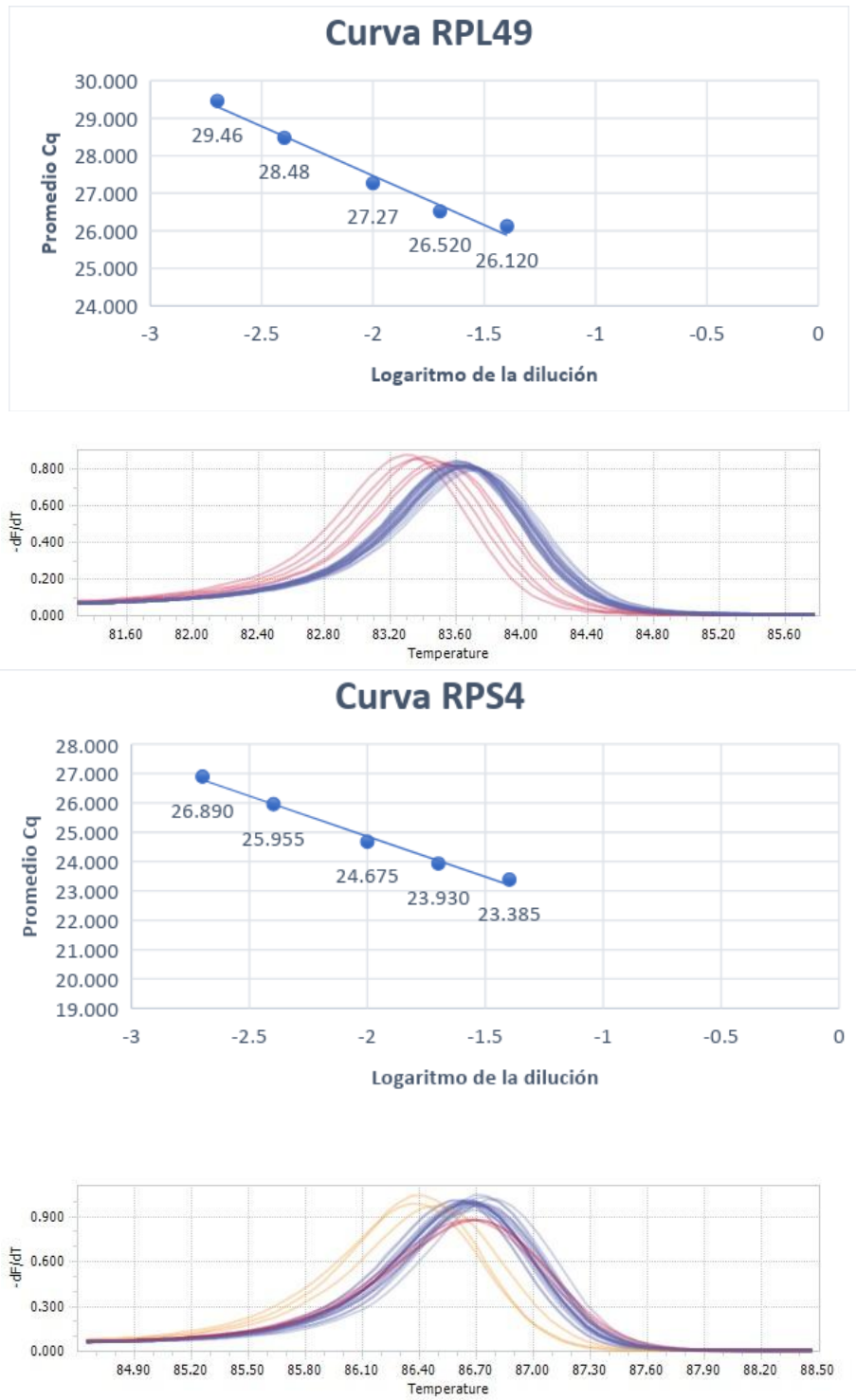


Figura 135. Curva de fusión de los cebadores de ZPG a una concentración de 0.3uM con el método de Curva Estándar Relativa de una dilución de 1:10 a 1:150

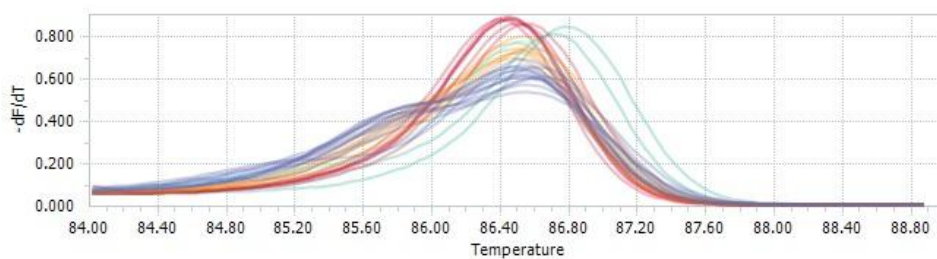
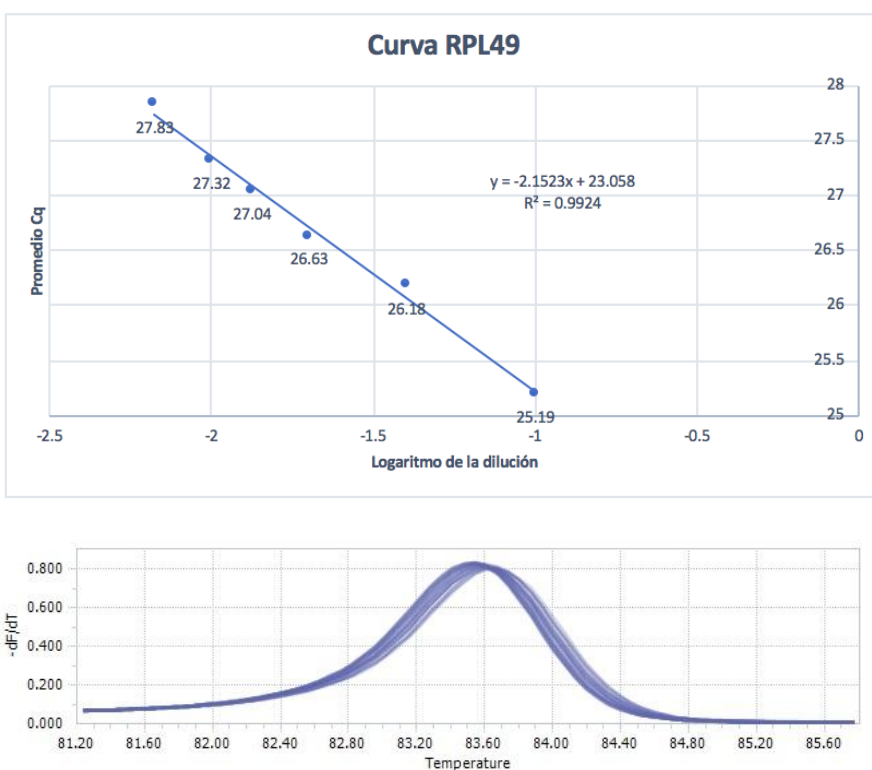
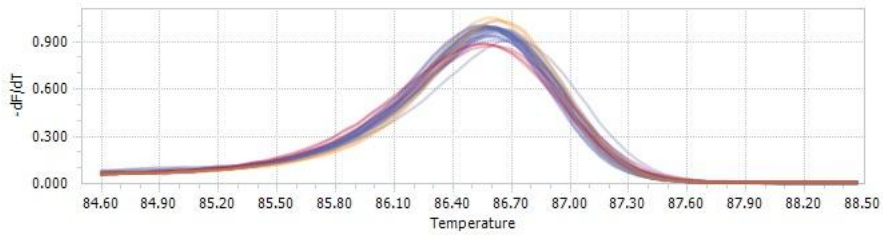
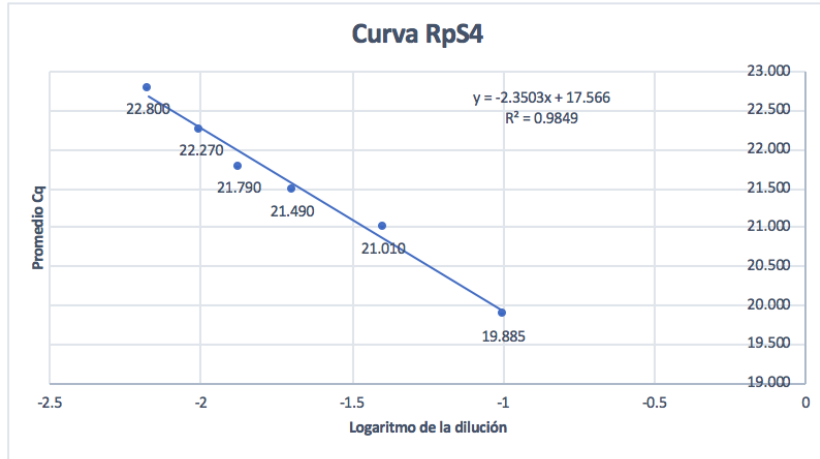


Figura 136. Curva estándar y de fusión de cebadores de genes de referencia (RpS4 y RpL49) a una concentración de 0.33uM





Expresión de *zpg* al momento de realizar la Curva Estándar Relativa

Cuadro 105. Expresión de *zpg* en dilución 1:25-1:250

Muestra	Fold Difference Target		Fold Difference Target	
	Calibrador		Calibrador	
	RPL49		RpS4	
	ANT	HT	ANT	HT
ZPG	0.998	0.782	1.268	0.994
BZ	0.987	0.802	1.219	0.990

Fuente: Elaboración propia *Con eficiencia de 389.34% y R² 0.9475

Cuadro 106. Expresión de *ZPG* en dilución 1:10-1:150

Muestra	Diferencia de expresión con el blanco		Diferencia de expresión con el blanco	
	Calibrador		Calibrador	
	<i>RpL49</i>		<i>RpS4</i>	
	<i>ANT</i>	<i>HT</i>	<i>ANT</i>	<i>HT</i>
<i>zpg</i>	0.990	0.757	1.302	0.995
<i>zpg+boule</i>	0.964	0.761	1.223	0.965

Fuente: Elaboración propia *Con eficiencia de 105.15% y R² de 0.8427

Alineamientos del gen candidato *gas8* entre diferentes dípteros


```

A. albimanusgas8      ATGTACGACGATCTGCTTTCGCTGATCGAGGGCAAGCTGGTCAAGTACGGTATCACGCTG
A. darlingigas8      ATGTACGATGATCTGCTCTCGTTGATTGAGGGCAAGCTGGTCAAGTACGGTATCACACTC
A. gambiaegas8      ATGTACGATGATCTGCTGCTGCTGATTGAGGGCAAGCTGGTCAAGTACGGCATCACGCTG
Ae. aegyptigas8     ATGTACGACGACTTGTGCTGATGATGGAGGCTAAATTGGCAAAGTATGGCATAACTTTA
***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
A. albimanusgas8      AAGGATCTCGAGCTTACCAACCTACGGCCAGAGAAGTGA---
A. darlingigas8      AAGGATCTCGAGCTTACCAATTTGCGGCAGGAGAAGTGA---
A. gambiaegas8      AAGGACCTGGAGCTGCAGAACCTGCGGCAGGAGAGCAAGTAG
Ae. aegyptigas8     AAGGATCTGGAGCTGAGCAGCATGAGATTGGAAAAGTGA---
***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Alineamiento del gen candidato *fzo* entre diferentes dípteros.

El color color naranja y verde subrayados representan a los cebadores diseñados para ARNdH en *A. albimanus*. El color morado representa a los cebadores diseñados para ARNdH en *Aedes aegypti*, según el estudio de Whyard, S. *et al.* 2015. La secuencia coloreada de verde y fucsia representan a los cebadores diseñados para PCR en tiempo real para *A. albimanus* y la gris para *A. aegypti*.

El alineamiento fue realizado en el software Clustal 2.1 multiple sequence alignment de la base de datos de Vector base. Como resultado se muestra que el mayor score de similitud fue de 93% entre *Anopheles albimanus* y *A. darlingi*. En el caso de *A. albimanus* vs *Ae. Aegypti* fue de 46%.

```

A. albimanusfzo      ATGGCCACCTACCTGAATCGCACCCCTGTCGATGGTGACGGGA---AATGGTAACGCTTCA
A. darlingifzo      ATGGCCACCTACCTGAACCGCACCCCTGTCGATGGTGACGGGA---AACGGTAACGCTTCG
A. gambiaefzo      ATGGCAACCTACCTGAACCGCACACTGTCGATGGTGACCGGC---AACGGAAACGCTTCG
Ae. aegyptifzo      ATGGCCGCTATCTTAACCGTACCCCTGTCGATGGTGACGGGCTCGAATGGGTGGCCCTCG
***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

A. albimanusfzo      ATG---TACGACACGGCGCCCTGATCGATCCGAACGC-----GCGCACGCTCCACA-
A. darlingifzo      ATG---TACGACACTGCGGCCCTGATCGATCCGAACGC-----GCGCACGCTTCACA-
A. gambiaefzo      ATG---TACGATACGGCGCCCTGATCGATCCGAACGC-----CCGCACGCTGCACA-
Ae. aegyptifzo      ACGGGATACGACACGGCGGCACTGATCGATCCGAACACATCGTCGCCGCGGGGTCTGCAC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

A. albimanusfzo      ACAAC-----GCG-----AACGATGTTTCGCCTCTGCAGATCTTTGTG
A. darlingifzo      ACAAC-----GCG-----AACGATGTTTCGCCTCTGCAGATCTTCGTG
A. gambiaefzo      ACAAT-----GCG-----ACCGACGTGTCGCCGCTACAGATTTTCGTG
Ae. aegyptifzo      ACGGCCACTGGTGGCGGGCTGCCGCCACAACGACGCTCTCGCGGTTGCAGATTTTCGTG
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

A. albimanusfzo      CGAGCCAAGAAGAAGATCAACGATATTTTGTGAAATCGATGACTACGTGGTCGAAACG
A. darlingifzo      CGAGCCAAGAAGAAGATCAACGATATTTTGTAGAGATCGATGACTACGTTCGTCGAAACG
A. gambiaefzo      CGGGCGAAAAAGAAGATCAACGATATTTTCGTGAGATCAATGATTATGTCGTCGAAACG
Ae. aegyptifzo      CGCGCCAAGAAGAAGATCAACGACATCTTCGGCGAGATCGAGGACTATGTGGTGAGACA
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

A. albimanusfzo      ACCGGCTTTATGATGGCGAGCTTTCGGCGACATCGGAAATCGTGGATAAGGCGGAAGCC
A. darlingifzo      ACCGGTTTATCGATGGCGAGCTTTCGGCGACATCGGAAATCGTGGATAAAGCGGAAGCC
A. gambiaefzo      ACCGGTTTCATCGAAGCTGAACCTACCGCCTCGTCCGAGATCGTCGACAAGGCGGAAGCC
Ae. aegyptifzo      ACCGGATTCATCGATGCC---CTCCCGACGATGGTGGAAATCGTGGACAAAGCCGAGTCC
***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

A. albimanusfzo      GAACAGTTTAAAAGTTATGTCCTTAAAGTACGCGGAATCCGGGAGGTGTTGGCGCGGAC
A. darlingifzo      GAGCAGTTCAAAGCTATGTCCCAAAGTACGCGGTATCCGGGAGGTGTTGGCACGCGAC
A. gambiaefzo      GAACAGTTCAAAGCTATGTGCTTAAAGTACGCGGAATCCGGGAGGTGTTGGCGCGGAT
Ae. aegyptifzo      GAGCTATTCGGGAGCTATGTGCTGAAAGTGTCCGGCATCCGGGAGGTGCTCGCCCGTAC
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

A. albimanusfzo      AATATGAAGGTAGCCTTCTTCGGCCGTACCTCGAACGGCAAGAGCTCGGTATCAATGCG
A. darlingifzo      AATATGAAGGTAGCCTTCTTCGGCCGTACCTCGAATGGCAAGAGCTCGGTATCAATGCG
A. gambiaefzo      AACATGAAGGTGCGATTTTTCGGCCGCACTCGAACGGCAAAAGCTCCGTATCAATGCG
Ae. aegyptifzo      CACATGAAGGTGGCCTTCTTTCGGCCGCACTCGAACGGCAAAAGTTCAGTGATCAACGCT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```


A.albimanusfzo GAGTTTCAAGATTTTCGAGCGCAAGTTCGAGGAGTGCATTTTCGAAGAGTGCGGTTCAGAACC
 A.darlingifzo GAGTTTCAAGATTTTCGAACGCAAAATTCGAGGAGTGCATTTTCGAAGAGTGCGGTTCAGGACC
 A.gambiaefzo GAGTTCCAGGACTTTGAGCGTAAGTTCGAGGAATGCATTTCCAAGAGTGCGGTTCGGGACC
 Ae.aegyptifzo GAGTTCCAGGACTTCGAACGGAAGTTCGAGGAATGCATCTCGAAAAGTGCAGTCAGAACC
 ***** * * * * *

A.albimanusfzo AAGTTCGAACAGCATAGTCTCGCGGGTAAGAACATTGCGAGCGATATGCGCATGATGCTG
 A.darlingifzo AAGTTCGAACAGCACAGTCTCGCGGGTAAGAACATTGCGAGCGATATGCGCTTGATGCTG
 A.gambiaefzo AAGTTCGAGCAGCACAGTCTCGCGGGCAAAAACATTGCGAGCGATATGCGCATGATGCTC
 Ae.aegyptifzo AAATTTGAACAGCACAGTCTCGCGGCAAGAGCATCTCAACGGAGATGCGCATGATGCTG
 ** * * * * *

A.albimanusfzo GACAGTATCTTTGAGCGGGCAACACGCTGCGCAATCAGAAGCTGGAACAAAAGAAGCGT
 A.darlingifzo GATAGTATCTTCGAGCGGGCACCCTGCTGCGTAATCAGAAGCTGGAGCAAAAAGAACCGT
 A.gambiaefzo GACAGCATCTATGAGCGGGCAACGCTGCTGCGCAACCAGAAGCTCGAGCAAAAGGAAGCGC
 Ae.aegyptifzo GACAACATCTTCGACCGGGCAATGCTCTGCGCAATCAGAAGCTGGAACAGAAGAAGAAA
 ** * * * * *

A.albimanusfzo CTTACGGATCGTATTGCGAACACCGAAACGCTGCTGATGCAGGTAACGCGGAGATGAAA
 A.darlingifzo CTTACGGATCGTATTGCGAACACCGAGACGCTGCTGATGCAGGTAACGCGGAGATGAAG
 A.gambiaefzo CTGACGGACCGGATCGCCAGCACGGAGACGCTGCTGATGCAGGTAACGCGGAGATGAAG
 Ae.aegyptifzo CTGACTGATCGGATCGCAATACCGAAACACAACCTGATGCAAGTGCACGAGAGATGAAA
 ** ** * * * * *

A.albimanusfzo CTCAGATCCATACCATGGTAGAGGAGTTCGAGCAGAAGTGGCGAAGGCACTGAATGAG
 A.darlingifzo CTTAAGATCCACACCATGGTAGAGGAAGTTCGAGCAAAAAGTGGCTAAGGCGTTGAACGAG
 A.gambiaefzo ATGAAGATCCATACGATGGTCGAGGAGTTCGAGCAGAAGTGGCGAAGGCGTGAACGAA
 Ae.aegyptifzo ATGAAGATCCACAACATGGTCGAGGAAGTTCGAGCAAAAAGTGGCAAGGCACTGAACGAG
 * * * * *

A.albimanusfzo GAAATTTGGCGGCTGAACGTACTGGTGACGAATTCATCTACCGTTCACACCGATCCG
 A.darlingifzo GAAATTTGGAGGCTGAACGTGCTGGTCGACGAATTTAATCTACCGTTCACACCGATCCG
 A.gambiaefzo GAAATCTGGCGGCTGAACGTGCTGGTGACGAGTTCATCTGCGGTTCCACACCGATCCG
 Ae.aegyptifzo GAAATTTGGCGACTAAACGTGCTGGTGATGAGTTCACCTGCCTTTCCACACCGATCCA
 ***** ** * * * * *

A.albimanusfzo CTCGTGCTGAACGTGTACAAGAAGGAAATTAATGCTCACGTCGAGAATGGGCTCGGGTTCG
 A.darlingifzo CTCGTGCTGAACGTGTACAAGAAGGAAATCAATGCTCACGTCGAGAATGGGCTCGGGTTCG
 A.gambiaefzo CTCGTGCTGAACGTGTACAAGAAGGAAATCAATGCGCACGTCGAGAAGCGGGCTCGGGTTCG
 Ae.aegyptifzo TTGGTTCTGAACGTTTACAAAAAGAAATCAACGCCACGTCGAAAGTGGCCTTGGTTTCG
 * ** * * * * *

A.albimanusfzo AACTTACGCGCTCGCCTCAGTACCGCACTGGCCATGAACGTGGAGACGGCTCAGCGTGAA
 A.darlingifzo AACTTACGCGCTCGCCTCAGCACCAGCACTGGCCATGAACGTGGAGACGGCTCAGCGTGAA
 A.gambiaefzo AACCTGCGCGCCCGGCTCAGCAGCGGCTGGCGATGAACGTGGAGACGGCGCAGCGCGAA
 Ae.aegyptifzo AATCTGAGGGCGCACTTAGCACAGCTTAGCCATGAACGTGAAACAGCGCAAAAGGGAA
 ** * * * * *

A.albimanusfzo ATGACGGCCCGTATGACGGCTCTGCTGCCTTCGGAGAAGATGCTCTCCAGCAGCATCAG
 A.darlingifzo ATGACCACCCGTATGACGGCTCTGCTGCCTTCGGAGAAGATGCTCGCCAGCAGCACCAG
 A.gambiaefzo ATGACGAGCCGCATGACGGCGTCTACCGTCGAGAAGATGAGCGCCAGCAGCATCAG
 Ae.aegyptifzo ATGACCGACCGCATGACTGCGCTGATCCGTCGGAAGATCATCACCCACACGATCAC
 ***** ** * * * * *

A.albimanusfzo GTGGTAGCCCGTACGCAACCGTTCGAGATGCTGTACACGCTCAACTGTGAGAATCTGTGC
 A.darlingifzo GTGGTAGCCCGTACGCAACCGTTCGAGATGCTGTACACTCTCAATTGTGAGAATCTGTGC
 A.gambiaefzo GTGGTCGTGCGCACGCAACCGTTCGAGATGCTGTACACGCTCAACTGTGAGAATCTGTGC
 Ae.aegyptifzo GTCGTGCGCGGAATCAACCGTTCGAGATGCTGTACACGCTGAACTGTCAAAACCTATGT
 ** ** * * * * *

8

A.albimanusfzo GCCGATTTCCAAGAGGATCTGAGTTCGGATTTTCGTTGGGGCATTCGGGCTCTGATTGCC
 A.darlingifzo GCCGACTTCCAGGAGGATCTGAGTTCGGATTTTCGTTGGGGCATTCGGGCTCTGATTGCC
 A.gambiaefzo GCCGATTTCCAGGAGGACCTGGAGTTCGGTTCGTTGGGGCATTCGGGCTCTGATTGCC
 Ae.aegyptifzo TCCGATTTCCAAGAGGATCTGAAATTTCCGCTTCTCCTGGGGAATCACTGCGTTCATAGCG

** * * * * *

Alineamientos de ZPG entre diferentes dípteros

Los cebadores coloreados en verde representan a los diseñados por la tesis y utilizados en la evaluación de eficiencia en este estudio. Los coloreados en amarillo son los cebadores de ZPG para tiempo real en *A. aegypti*, y los coloreados en turquesa representan a los cebadores diseñados en este estudio que se esperan sean óptimos para evaluar silenciamiento en ZPG.

```
An.albimanuszpg ATGCTGGAACCTCGTCCGTCATTCGCGGGCATTCTACAGATAAAAAGCGGTCAA CACGACC
An.darlingiinx ATGTTGGAACCTCGTCCGCCCCGTTGCGGGGCATTTTGCAGATAAAAAGCGGTCAACACGACC
Ae.aegyptizpg ATGCTGGAATCACCAGTCTTTCGCGGGATATTCTCGTGCCAAATCATTCGACTCGACC
An.gambieinx2 ATGCTGGAGTTTGTAAAGCCGTTGCAGAGCATTTGCAGATCAAGCAGGTCAACTCGACC
D.melanogasterzpg ATGTACGCAGCTGTTAAACCCTCTCCAAGTATCTGCAGTTCAGTTCGGTGCACATCTAC
*** * * * * * * * * *
```

```
An.albimanuszpg GATCTCGTCTGGCGTTTGCCTGCGGGTCAACCGTTTATCTGTTGCTGTTTCGCGGCCCTG
An.darlingiinx GATCTCGTCTGGCGTTTGCCTGCGGGTCAACCGTTTATCTGTTGCTGTTTCGCGGCCCTG
Ae.aegyptizpg AACACGGTTTGGCGCCTCCACAGCCGGATCACCGTGTACATGTTGGTCTTTTTACCATC
An.gambieinx2 GATCTCGTATGGCGCTTCACTGTCTGTGACGGTGTTCCTGCTGCTAGCGTCACTA
D.melanogasterzpg GATGCTATTTTACGCTGCACTCCAAAGTCAAGTGGCCCTGCTTTTGGCCTGCACATTT
* * * * * * * * *
```

```
An.albimanuszpg CTACTTCCGCACGCCAATACTTTGGCAATCCGATCGACTGCGTGGCTGGATC CGCCGAT
An.darlingiinx CTGCTTCCGCACGCCAATACTTTGGCAATCCGATCGACTGCGTGGCCGATCCGGTGTAT
Ae.aegyptizpg CTGCTGTCCGCCCCGTTCTTATTTTGGGAACCGATCGAATGC---ATCAGCTCCGCACGCA
An.gambieinx2 TTGCTATCCGCCCTCAATACTTTGGCAATCCGATCGACTGCGTGTATCCGATCCGGCAGC
D.melanogasterzpg TTGCTTCCCTCGAAACAATAATTTCCGGCGATCCCATCCAGTGT-----TTTGGGGACA
* * * * * * * * *
```

```
An.albimanuszpg GTCTCCATTTGCACGA---TGAACGATTTCTGCTGGATCATGGGCACCTACATCAGCAAG
An.darlingiinx GTCCGCAATTTTCGACGA---TGAACGATTTCTGCTGGATCATGGGAACCTACATCAGCAAG
Ae.aegyptizpg CCCACGGTTAGGGCCAGTCTACACAGCTTCTGTTGGACACTGGGAACCTACATCAGCCGC
An.gambieinx2 GTGTCTCTTCGACGA---TGAACGAATTTCTGCTGGATCATGGGCACCTACATTAGCAAC
D.melanogasterzpg ---AGGATATGGACTA-CGTGCACGCCCTTTGTTGGATCTACGGGCCTATGTGAGCGAC
* * * * * * * * *
```

```
An.albimanuszpg GATCCGAACCTTTGTAC-----TGGAGAGTACGGATTTGGTGAAGATCAAC-GCCAAAATT
An.darlingiinx GATCCCAACCTTTGTGC-----TGGAGAGCAGCGATTTGGTGAAGATCAAC-GCCAAAATC
Ae.aegyptizpg GATCCGAATTTTGTGG-----AAGCCAGCTGGGACATCATCGAAATAGGA-ACGCACATG
An.gambieinx2 GATCCGAACCTTCGTGT-----TGGATAGCACCAGATTTGGTGAAGATCAAT-GCCAAGATT
D.melanogasterzpg AATGTGACTGTGACGCCCTTAAGGAATGGAGCTGCACAGTCCGACCAGATGCGGTTAGT
** * * * * *
```

```
An.albimanuszpg GGCCATATTCGGAGGAGGAGCGCTCGTACCAGAAGTACTACCATGGGTCGTGTTTCATA
An.darlingiinx GGACACATTCGGAGGAGGAGCGCTCCTACCAGAAGTACTATCAGTGGGTCGTGTTTCATA
Ae.aegyptizpg GGTCACATTCCTCCAAAGAAGAACGACTCTACCAGAAGTACTACCATGGGTCGTGTTTCATA
An.gambieinx2 GGACACATTCGGAGAGTGGAGCGATCCTACCAGAATACTACCATGGGTCGTGTTTCATA
D.melanogasterzpg AAGGTAGTGCCTCCCGGAAATCGTAACCTACATAACTATCAGTGGGTCGTGTTTCATA
* * * * * * * * *
```

```
An.albimanuszpg CTGGCGTTCACAGCCTGTCTGCTGACCCTGCCAATGTGCTGTGGAAGATCTGGGAGGGT
An.darlingiinx CTGGCGTTCCAGGCCTGCCTGCTGACCCTGCCAATGTGCTGTGGAAGATCTGGGAGGGT
Ae.aegyptizpg TTGGCCATTCAGGCATCTCTGTTCTCGTTCCCAACACTTGTGGCGATTTTGCGAACGC
An.gambieinx2 CTGGCGCTGCAGGCGTGCATGTTCTCGGTGCCAACTTCTGTGGAAGGCCTGGGAGGGC
D.melanogasterzpg TTGCTGCTCGAGTCTGTTTGTGTTTATATGCCAGCATTTCTCTGGAAGATTTGGGAGGGC
** * * * * *
```

```
An.albimanuszpg GGCCGCTCGAGGCGCTATGCGAAGGGCTAACGATGCCCATACTGCCGGAGCAGTGGAAAG
An.darlingiinx GGCCGCTCGAGGCGCTATGCGAAGGGCTAACGATGCCCATACTGCCGGAGCAGTGGAAAG
Ae.aegyptizpg GGTCTGTTGAAACGTTGTGTACAACTGACTTCTATCTTTCACCTGGTGGCTGGACT
An.gambieinx2 GGTCTGTTGAAACGTTGTGTACAACTGACTTGTGTTGACTACACCCATCGTTCCGGATCTGGGAG
D.melanogasterzpg GGTCTGTTGAAACGTTGTGTGCGATGATTTCCACAAGATGGCCGTTTGCAAGGACAAGAGC
** * * * * *
```

```
An.albimanuszpg CAATCAAGCAAGAAAAAGCTGATCCGCTACCTGACGACGGAGTGTAGAACGCACCATCGA
An.darlingiinx CAATCGAGCAAGAAAAAGCTGATCCGCTACCTCACGACGGAGTGTAGAACGCACCATCGG
Ae.aegyptizpg CGGAAGCGTAAAGCCTTAACTTACTTTATTTGACCCAAGAGAGCCGCAAGGACACAAC
```

An.gambieinx2 AAGACGCGCAAGAAGCAGCTGATCACTTACCTGTGGCCGATTTCGCCCGCTGCACCGC
D.melanogasterzpg AGGACCCATTTGCGCGTACTAGTCAACTACTTCTCCAGCGATTACAAAGACCCCACTTC
* * * * *

An.albimanuszpg GGTTACATGTACCGCTACTGCTTCTGCATGATCCTCAACTTTGCCAACGTGCTGGCAAAC
An.darlingiinx GGTTACATGTACCGCTACTGCTTCTGCATGATGCTCAACTTTGCCAATGTACTGGCAAAC
Ae.aegyptizpg AAATACGCATGATTTTTATCGGATGTGAGATTCTCAACTTTTTTCATAGTCCCTCCTGAAC
An.gambieinx2 ACGTACCTGCTGCGGTATTGCTTCTGCACGCTGCTCAACTTCTGCAACGTGCTGCTGAAC
D.melanogasterzpg CGCTACTTCGTTAGCTACGTCCTTCTGCGAAATACTCAATTTGAGCATCAGTATTCTAAAC
*** * * * * * * * * * *

An.albimanuszpg ATCCTGCTGATGAATACGCTTCTTCCGGCTTCTGGATGAACTACCATCCGGCCATGATG
An.darlingiinx ATCCTGCTGATGAATACGCTGTTCTCCGGCTTCTGGATGAACTACCATCCTGCCATGATG
Ae.aegyptizpg ATGTTCTTGATGAACCTTCTGTTCCGAGGTTTTTGGGCCAGTTACCAACCGCCATTCAG
An.gambieinx2 ATCTTTCTCGTGAACGTGATCTTTTCCGGCTTCTGGTTCGAACTACCACCCGCGCTCAAG
D.melanogasterzpg TTCCTTCTGTTGGACGATTTTTTCCGAGGTTTTTGGGGCCGCTACCGTAATGCCTTGCTG
* * * * * * * * * * * * * * *

An.albimanuszpg GCGCTGCTGTCGTTTCGATTTTCCCTCCTGGAACCGCTACAACCT-CGCAAGTATTCCCAA
An.darlingiinx GCGCTGCTGTCGTTTTCGACTTCCCTCCTGGAATCGCTACAACCT-CGCAGTATTCCCAA
Ae.aegyptizpg GCACTGCTTTCACCTGGACATGAACGCTGGACTTCGTATAAATT-CTCTGGTCTTTCGGAA
An.gambieinx2 GCACCTGCTGTCGTTTCGATTTTCCCTCCTGGAACCGGTACAACCT-CGCAGTATTTCGGAA
D.melanogasterzpg TCCCTTTACAATGGCGACTATAACCAAGTGGAA-CATTATAACCATGGCAGTCTTCCCAA
* * * * * * * * * * * * * * *

An.albimanuszpg GCTGGCCAAATGCGACTTCCATTTTCGTTGGACCGAGCGGTTTCAAGCAGAACCGCGATGG
An.darlingiinx GCTTGGCCAAATGCGACTTTCATTTTCGTTGGACCGAGCGGTTTCAAGCAGAATCGAGATGG
Ae.aegyptizpg GCTGGCCAAATGCGACTTTCAGCTATATTGGCCAAAGTGGATCCAAGCAAACCTTTGATGC
An.gambieinx2 AATTGCCAAAGTGTGATTTCCACTTTCGTCGGGCCGAGCGGTTTCAAGCAAACCGGGACGG
D.melanogasterzpg GTGTGCCAAAGTGCAGATGTACAAGGGCGGCCAGCGGTTTTCACACATATACGACTA
***** * * * * * * * * * * * * * *

An.albimanuszpg GCTGTGCCTGTTGCCGTTGAACGTGGTGAACGAGAAGATATTTGCATTCCTGTGGCTGTG
An.darlingiinx GCTGTGCCTGTTGCCGCTGAACGTGGTGAACGAGAAGATATTTGCCTTCTGTGGCTGTG
Ae.aegyptizpg CCTGTGCCTTCTGCCGCGAACAATCGTCAACGAGAAAATCTTCGCTTCCCTGTGGCTTTG
An.gambieinx2 ACTGTGCCTGCTGCCGCTGAACGTGGTCAACGAGAAGATCTTTGCCTTACTGTGGCTGTG
D.melanogasterzpg CCTTTGCCTGCTGCCCTGAATATACTGAACGAGAAAATCTTCGCTTCTGTGGATATG
* * * * * * * * * * * * * * *

An.albimanuszpg CTTCCGGATTCTTGGCGTCAATTCGGCCATTAATCTGCTCTTCTGGTGTGCCCTGCTCTG
An.darlingiinx GTTTTGGTATTCTTGGCGTCAATTCGGCCCTTAATCTGCTCTTCTGGTGTGCCCTGCTCTG
Ae.aegyptizpg GTTCATTGTGCTGGCCGCTGATCCGGTGTGCAACTGTGCTACAGGCTGGCGCAGCTTTC
An.gambieinx2 GTTCTTGGGGCTACTGGTGAATATCGATGCTGAATCTACTCTTCTGGATAGTGGTCTGTG
D.melanogasterzpg GTTTATACTAGTGGCTATGCTCATTTCCCTCAAGTTTCTGTACCCGCTGGCCACCGTTTT
*** * * * * * * * * * * * * * *

An.albimanuszpg CAGCAAGGGCATCCGCGCTGGTTGCTGCGCCAGCAAATGCAACCGATCCGTT--CGGTG
An.darlingiinx CAGCAAGGGTATCCGCGCTGGTTGCTGCGCCATAAATGCAACCGATCCGTT--CGGTG
Ae.aegyptizpg CTGCCGACGCTTCCGTTCAACTGTTGTTTCAAGTGTGTTGACCCAAATCAGTACCATCG
An.gambieinx2 CAGCAAAGGCTTTCGCTTTGGCTGCTTACCCTGCTTACCCTGCTTACCCTGATA--CGTCC
D.melanogasterzpg GTATCCCGAATGCGTCTTCAAGTGTGCTTCCGTCAGGGCAGCTTTCATGCCCAAGAAGCA
* * * * * * * * * * * * * * *

An.albimanuszpg GTTGTCAACAATGCGCTACCGCGAATGTATCGGCAAATGGTTTCTGCTGTTGCAGCTG
An.darlingiinx GTCGTGAGCAATGCACTGCGCGGCAATGTATCGGCAAATGGTTTCTGCTGTTGCAGCTG
Ae.aegyptizpg TTTGAAGCGAGTTGTCGGGGAAGCCAA--CATCGGATACTGGTTTCTACTGTACCAAATG
An.gambieinx2 TACGTGCGCAGTGCCTGGACGGTCAAGGGCTCGGACAGTGGTTCTTGTCTATCAGCTG
D.melanogasterzpg CTTGTCAGGTGG--CATTGCGCAATGTCAGTTTTGGCGACTGGTTCTGCTGATGCGCGTG
* * * * * * * * * * * * * * *

An.albimanuszpg TGCCGCAATCTGAACCCGCTGGTCCAGCCGTGATATATGCTCTGATCTCGAAGA--AAC
An.darlingiinx TGCCGCAATCTGAACCCACTGGTTAGCCGTGACATATGTTTTGCATCTCGAAGA--AAC
Ae.aegyptizpg GCTCGCAACATCAATAAGGGTGTGATGAGGGAAATCATCCGGATCTGTCCAGAATCGAT
An.gambieinx2 TGTGCAATCTGAACCCGATCGTCCGGCCGAGAGCTGGTCCAGAGTGTGTGCA--GCG
D.melanogasterzpg GGCAACAACATCAGCCCCGAGCTATTCGGTAAGTTGCTGGAGGAGCTACCGAAGCTCAG
*** * * * * * * * * * *


```

An.albimanuszpg      GACCCACCGACAGTCTTTACGCTAAACCAAAGAGCATGATGAT-GACCGCCGATTTCTAC
An.darlingiinx      GACACCCCGAGAGTCTTTACTCCAACCAAAGAGCATGATGAT-GACCGCCGATTTCTAT
Ae.aegyptizpg       CAAGAGCTAAACATGTGCAAAATCGAACGTAATGAGCTGCAATTGGAGGTCGAGGCCGAG
An.gambieinx2       GAAGGGACACAATGGTCACAA---AACGTTC-CGAATGCCGAAGGGTGTT-GAACCGGAC
D.melanogasterzpg   TCCTTGATCAAATACCGCCAG-GAGCGGACAAGATC-----
                    * * *

```

```

An.albimanuszpg      CAGGACCAAGATGGCGATCTAGAGATAGGCGAGGTTAATGTTTGG
An.darlingiinx      CAGGACCAAGATGGAGATCTAGAGATAGGCGAGGTTAATGTTTGG
Ae.aegyptizpg       GATGAATTGGA-GGAGAT-TGAAGAT-GACGAGGCAACGGTGTGA
An.gambieinx2       TTTTACACCGA-TCCGGA-AGGATAC-GATGAGGAAGCGTGTGA
D.melanogasterzpg   -----

```

Alineamiento de ZPG de *A. albimanus* con otras inexinas de *A. aegypti*

Únicamente se muestran los dos pares de cebadores diseñados en este estudio (coloreados en turquesa) para el gen de ZPG de *A. albimanus*.

```

AALB006050ZPG      -----ATGCT-----GGAAct----CGTGC---GTCCATTGCGGGGCATTCTACAGATA
42
AAEL006726Innexin4 -----ATGCT-----GGAAT----CACCA---AGTCTTGCGGGGATATTCTCGTGCCC
42
AAEL008588Innexin7 -----ATGTT-----GAATACATT-TTCGGTACTCTCTCCTCATCTGAAATTCAAGAAT
48
AAEL011248Innexin3 ATGGCTGTGTTTCGACTGGTCTCGTGGTGGCCGGCTTTCATCAAGGTCGGTACCTGATC
60
AAEL014846Innexin1 -----ATGTA-----TAAGCTCTGGGAGG----ATT---GAAGGATTATTTCAAAGG
42
AAEL014227Innexin2 -----ATGTT-----GGATATATTTCTGTGG----ATT---GAAAACCTTAGTCAAAT
42
AAEL014227Innexin8 -----ATGTT-----GGATATATTTCTGTGG----ATT---GAAAACCTTAGTCAAAT
42

```

**

```

AALB006050ZPG      AAAGCGGTCAACACGACCGATCTCGTCTGGCGTTGCACTGCCGGGTCACCGTTTATCTG
102
AAEL006726Innexin4 AAATCATTGACTCGACCAACACGGTTTGGCGCCTCCACAGCCGGATCACCGTGTACATG
102
AAEL008588Innexin7 AAATTTGTATCCATTGATAATGTTGCATTTAAATTTCACTATCGAGCTACCTTCACCATT
108
AAEL011248Innexin3 GATAAGCCATCATCGATAATATGGTGTCCGGTGTCTATTACCGGTTAACAGCGCTGTG
120
AAEL014846Innexin1 CAAGATATATACACCGATAGTGCCGTATTCGGCCTTCACAATAGTTTTACAACGGCATTG
102
AAEL014227Innexin2 AGCCATGTAATAACCGATTACCTGTATTTGACTGCACTACTCAATCACCGTGTATGATC
102
AAEL014227Innexin8 AGCCATGTAATAACCGATTACCTGTATTTGACTGCACTACTCAATCACCGTGTATGATC
102

```

* * ** ** *

```

AALB006050ZPG      TTGCTGTTGCGGGCCTTGCTACTTTCCGACGCCAATACTTTGGCAATCCGATCGACTGC
162
AAEL006726Innexin4 TTGGTCTTTTTCACCATCTGCTGTGCGCCCGGCTTTATTTGGGGAACCGATCGAATGC
162
AAEL008588Innexin7 CTGCTTGATGTACACTTCTTGTAACATCCAGGCAATACATAGGAGAGCATATACGATGC
168
AAEL011248Innexin3 CTCTTCTATGCTGCGTGCTCGTGACAGCCAACAATCTAATTTGGTGTATCCATTTCTCTGC
180
AAEL014846Innexin1 TTGCTGGCTGTAGTTTAATAATAAAGTCCACACAATATGTCGGACAGCCAATTAGTTGC
162
AAEL014227Innexin2 TTGATGGCATTTTCACTTATTGTAACGACGAAGCAATATGTCGGTAATCCCATTTGACTGC
162
AAEL014227Innexin8 TTGATGGCATTTTCACTTATTGTAACGACGAAGCAATATGTCGGTAATCCCATTTGACTGC
162

```

* * * * * ** * * ** ***

```

AALB006050ZPG      GTGGCTGGATCCGGCGATGCTCCATTTTCGACGATGAACGATTTCTGCTGGATCATGGGC
222
AAEL006726Innexin4 ATCAGCTCGGCAGCACCCACCGTTAGGGCCAGTCTACACAGCTTCTGTTGGACTGGGA
222

```

AAEL008588Innexin7 225 ATTACAGGAGGATCCATTCTGAG---CATGTTATCAACACTTTTTGTTTTTTTACAAC
 AAEL011248Innexin3 237 ATCAACGACGGCGCTATTCGGC---CATGTGATCAATACCTACTGCTGGATTACGTAC
 AAEL014846Innexin1 216 ATTGTCACGGGATCCC---ACA---CATGTCGTCATACATTCTGTTGGATTTCAGT
 AAEL014227Innexin2 219 GTTCACACGAAAGACATACCAGAA---GAAGTACTCAACACGTATTGCTGGATACATTCA
 AAEL014227Innexin8 219 GTTCACACGAAAGACATACCAGAA---GAAGTACTCAACACGTATTGCTGGATACATTCA
 * * * * *
 AALB006050ZPG 276 ACCTACATCAGCAAGGATCCGAACTTTGTACTGGAGAGTACGG-----ATTTGGTGAAG
 AAEL006726Innexin4 276 ACGTACATCAGCCGCGATCCGAATTTTGTGGAAGCCAGCTGGG-----ACATCATCGAA
 AAEL008588Innexin7 285 ACGTTTACGGTTGTAAGACATTTCAACGAATCAATGCTACAAGATGGAAACATACCTCAC
 AAEL011248Innexin3 291 ACCTTCACGTTGCCGGCCAGCAGCGGGCACCAGTGGGCACTT-----CGGTAGCACAC
 AAEL014846Innexin1 270 ACTTTTACTATGCCTGATGCGTATAAACGAGAGGTAGGACGCG-----AAGTGGCTCAC
 AAEL014227Innexin2 273 ACATATGCATTGAAAAGTCTATTCTGAAAAAAGTCGGTAGCG-----AAGTACCCTAT
 AAEL014227Innexin8 273 ACATATGCATTGAAAAGTCTATTCTGAAAAAAGTCGGTAGCG-----AAGTACCCTAT
 ** * * * * *
 AALB006050ZPG 336 ATCAACGCCAAAATTGGCCATATTCGGGAGGAGGAGCGCTCGTACCAGAAGTACTACCAG
 AAEL006726Innexin4 336 ATAGGAACGCACATGGGTACATTCCCAAAAGAAGCAGACTCTACCAGAAGTACTACCAG
 AAEL008588Innexin7 342 CCAGGAGTTGGACATACAT---ATTGAGATGACCTATAAAGTACCACGCATATTATCAA
 AAEL011248Innexin3 345 TCCGGTCTCGGCAACGAGTAC-----AACCAGGAGCGAACGTACCACAGCTACTACCAG
 AAEL014846Innexin1 330 CCTGGCGTAGCTAACGATTTTAAATGACGAGGATGCTAAAAAGTATTACACGTACTATCAA
 AAEL014227Innexin2 333 CCAGGTGTTGGCAACTCAGATGGAAAGAACATAGATAAGAAAATATACAAATACTACCAG
 AAEL014227Innexin8 333 CCAGGTGTTGGCAACTCAGATGGAAAGAACATAGATAAGAAAATATACAAATACTACCAG
 * * * * *
 AALB006050ZPG 396 **TGGGTCGTGTTCACTGCG**GTTCCAAGCCTGTCTGCTGACCCGCCCCAATGTGCTGTGG
 AAEL006726Innexin4 396 TGGGTTCCGTTCTGTTGGCCATTCAGGCATTCCTGTTCTCGTTCCCAAAACACTTGTGG
 AAEL008588Innexin7 402 TGGGTCCCGTTTGTGTTATTTATCCAAGCAATATGTTCTATGGACCGCATTATATATGG
 AAEL011248Innexin3 405 TGGGTGCCGTTTCATGCTGTTCTTCCAGGGCCTACTGTTCTACATGCCCACTGGGTCTGG
 AAEL014846Innexin1 390 TGGGTTTGTGTTTGTACTTTTCTTCCAGGCAGCGCATGTTATTTGCCTAAATTTTATGG
 AAEL014227Innexin2 393 TGGGTGTGTTTTGTTTTATTTTTTCAGGCAATTTTATTTTATACGCCGAGATGGCTGTGG
 AAEL014227Innexin8 393 TGGGTGTGTTTTGTTTTATTTTTTCAGGCAATTTTATTTTATACGCCGAGATGGCTGTGG
 ***** ** * * * * * ** * * * * *
 AALB006050ZPG 456 AAGATCTGGGAGGGTGGCCGTCTCGAGGCGCTATGCGAAGGGCTAACGATGCCCATACTG
 AAEL006726Innexin4 456 CGATTTTGCGAACGCGGTGCTGTTGAAACGTTGTGTCACAATCTGACTTCTATCCTTTCA
 AAEL008588Innexin7 462 CGTAATATGGAAGGAGGAAAAATTAACGCTTGTGGATGGTCTTCGTATGGTTGAAGTT
 AAEL011248Innexin3 465 AAGAACTGGGAAGAGGGCAGGATGCGCATGATCTCCGACGGATTGCGTGGCAACATGATC

```

AEL014846Innexin1      GATGCAACGGAAGGAGGATTAATGCGTACTATTGTTATGGGACTAAACATCGGAATAT--
  448
AEL014227Innexin2      AAGTCCTGGGAAGGAGGCCAAAATACACGCATTAATGATGGACCTTGACATAGGCATTT--
  451
AEL014227Innexin8      AAGTCCTGGGAAGGAGGCCAAAATACACGCATTAATGATGGACCTTGACATAGGCATTT--
  451
                        **   **   *       *       *

AALB006050ZPG          CCGGAGCAGTGGAAGC-----AATCAAGCAAGAAAAAGCTGAT-----
  494
AEL006726Innexin4      CCTGGTGCGTGGACTC-----GGAAGCGTAAAGCCTTAACTCT-----
  494
AEL008588Innexin7      TCAAGATACTACAAACAAAACAAAGTTGTAACATTTGACAGCAAATACACACTATATCCC
  522
AEL011248Innexin3      ATCAGCCCAGG-----TGAGCGCAAAGGGCGCCAAAGTCGGCT-----
  503
AEL014846Innexin1      -GTCGAGAAGA-----TGAAAAATGTGCCAAAAACAAGCCCT-----
  485
AEL014227Innexin2      -GTTCCGAAAT-----AGAAAAGAAGCAGAAGAAAAAATTGCT-----
  488
AEL014227Innexin8      -GTTCCGAAAT-----AGAAAAGAAGCAGAAGAAAAAATTGCT-----
  488

AALB006050ZPG          -----CCGCTACCTGACGACGGAGTGTAGAACG
  522
AEL006726Innexin4      -----ACTTTATTTGACCCAAGAGAGCCGCAAG
  522
AEL008588Innexin7      AAATCGGAACTTGACAAAAAATTGAAATGTCATGTGAAGCTTTTCACAAGCACATAATT
  582
AEL011248Innexin3      -----CGCTAAGTACCTCTACGATTCACTCAAT
  531
AEL014846Innexin1      -----TATAGAATACGTTTTGAAACGATTAAGA
  513
AEL014227Innexin2      -----TCTTGATTATTTGTGGGATAATTTAAGG
  516
AEL014227Innexin8      -----TCTTGATTATTTGTGGGATAATTTAAGG
  516
                        *           *           *

AALB006050ZPG          CACCATCGAGGTTACATGTACCGCTACTGCTTCTGCATGATCCTCAACTTTGCCAACGTG
  582
AEL006726Innexin4      GGACACAACAAATACGCATTGATTTTTATCGGATGTGAGATTCTCAACTTTTTTCATAGTC
  582
AEL008588Innexin7      TTGAATCATATGTGGGCCCTCGAAACACGTA CTCTGCGAAACTTTAAATTTGGTAAATGTA
  642
9AEL011248Innexin3      ACGCACAAACAGCTACTCGTTCGGTTACTTCATCTGCGAAGCACTGAAC TTCGCAACGTT
  591
AEL014846Innexin1      CGGCACAAATTATATGTACTGCGTACTTCGCATGTGAAGCACTTTGTTTTGTGAACATC
  573
AEL014227Innexin2      TATCATAACTGGTGGGCGTATAGTACTATATATGTGAATTTTTATCACTAGTGAATGTG
  576
AEL014227Innexin8      TATCATAACTGGTGGGCGTATAGTACTATATATGTGAATTTTTATCACTAGTGAATGTG
  576
                        *           *           **          *           *           *           *

AALB006050ZPG          CTGGCAAACATCCTGCTGATGAATACGCTCTTCTCCGGCTTCTGGATGAACTACCATCCG
  642
AEL006726Innexin4      CTCCTGAACATGTTCTTGATGAACCTTCTGTTCGGAGGTTTTTGGGCCAGTTACCAACCG
  642
AEL008588Innexin7      TTAGCGCAAGTATGGTTTACAAAATAAGTTTCTAGGAGGACGGTTCTATAGGCTTGGTTTG
  702
AEL011248Innexin3      ATTGCAACATCTTCTTCGTGGACAAGTTCCCTCGGCGGTGCTTTCTCACCTACGGTTCC
  651
AEL014846Innexin1      TTAGTGCAACTGTGGATGATGAATCGTTTTTTTCGATGGCGAATTCTATTCATATGGATGG
  633
AEL014227Innexin2      ATAGGCCAAATGTTTCTAATGAACCGGTTTTTTGACGGTGAATTTATGACGTTTGGATTA
  636

```

AAEL014227Innexin8 636 ATAGGCCAAATGTTTCTAATGAACCGGTTTTTTGACGGTGAATTTATGACGTTTGATTA
* * * * * * * * * *

AAEL006726Innexin4 702 GCCATTGAGGACTGCTTTTCACTGGACATGAACGCCTGGACTTCGTATAATTTCTCTGGTC
AAEL008588Innexin7 753 GATTT-----CATTGAGGAGACTTTTCAGGATCAATGGATGTGCTGGATACTATA
AAEL011248Innexin3 711 GAAGTGCTCAAGTTCAGCGACATGGATCAGGAGAATCGCTCGGATCCCATGATCGAGATC
AAEL014846Innexin1 693 AAGGTACTGAAATTTTCGGAAGTCCACAAGATCAACGCTTAGATCCGATGGTTTACGTA
AAEL014227Innexin2 696 GACGTGATAACGCATATGGAAGCGGATCAAGAAGATCGCATGGATCCAATGATCTACATA
AAEL014227Innexin8 696 GACGTGATAACGCATATGGAAGCGGATCAAGAAGATCGCATGGATCCAATGATCTACATA
* *

AAEL006726Innexin4 762 TTTCCGAAGCTGGCCAAATGTGACTTCAGCTATATTGGCCCAAGTGGATCCAAGCAAAAC
AAEL008588Innexin7 813 TTTCCAAAGATTACAAAATGCCATTTCCATAAATATGGCCCATCAGGGACAATCCAAAAG
AAEL011248Innexin3 771 TTCCCTCGCGTGACGAAGTGTACATTTCCACAATAACGGAGCTTCCGGCAGTATCCAGAAG
AAEL014846Innexin1 753 TTCCCACGAGTTACAAAATGCATTTTCTACAATAACGGAGCATCAGGAACAATTCAAAAA
AAEL014227Innexin2 756 TTCCCGAGAATGACCAAAATGTACTTTCTACAAGTATGGTGTGAGCGGTGAAGTCGAACGA
AAEL014227Innexin8 756 TTCCCGAGAATGACCAAAATGTACTTTCTACAAGTATGGTGTGAGCGGTGAAGTCGAACGA
** * * * * * * * * *

AAEL006726Innexin4 822 TTTGATGCCCTGTGCCTTCTGCCGCAGAACATCGTCAACGAGAAAATCTTCGCCTTCTCTG
AAEL008588Innexin7 873 CATGATGCTCTCTGTGTAATGGCACTGAATGTGATAAATGAGAAAATATTCACATTCCTC
AAEL011248Innexin3 831 CACGATGCCCTTTGCGTCTGGCGTTGAACATCCTGAACGAAAAGATCTACATCTTCTCTG
AAEL014846Innexin1 813 CACGATTCTTTGTGTATACTTCCACTAAATATTGTGAATGAGAAGACTTACATCTTCATT
AAEL014227Innexin2 816 CATGATGCCATATGTATTCTACCACTAAACGTAGTCAACGAGAAAATTTATATTTTCTG
AAEL014227Innexin8 816 CATGATGCCATATGTATTCTACCACTAAACGTAGTCAACGAGAAAATTTATATTTTCTG
*** * * * * * * * * * * * * * *

AAEL006726Innexin4 882 TGGCTTTGGTTCATTGTGCTGGCCGTCGTATCCGGTGTGCAACTGTGCTACAGGCTGGCG
AAEL008588Innexin7 933 TGGTCTGGTATGCAGTACTTATTTTTGTATCAATAAGCGCACTTGTATGGAGAATAACC
AAEL011248Innexin3 891 TGGTCTGGTTCATCCTGCTGTCCATCCTCTCTGGACTGGCCATTCTGTACTCGGCGGCC
AAEL014846Innexin1 873 TGGTCTGGTTTATTATATTAGCCACAATGTTATTCTGCTTGGTATATACAGGCTATG
AAEL014227Innexin2 876 TGGTTTTGGTTTATTATTCTGACGATACTGACGACGTTAACGATATTTTATAGAATAATT
AAEL014227Innexin8 876 TGGTTTTGGTTTATTATTCTGACGATACTGACGACGTTAACGATATTTTATAGAATAATT
*** * * * * * * * * *

AAEL006726Innexin4 882 TGGCTTTGGTTCATTGTGCTGGCCGTCGTATCCGGTGTGCAACTGTGCTACAGGCTGGCG
AAEL008588Innexin7 933 TGGTCTGGTATGCAGTACTTATTTTTGTATCAATAAGCGCACTTGTATGGAGAATAACC
AAEL011248Innexin3 891 TGGTCTGGTTCATCCTGCTGTCCATCCTCTCTGGACTGGCCATTCTGTACTCGGCGGCC
AAEL014846Innexin1 873 TGGTCTGGTTTATTATATTAGCCACAATGTTATTCTGCTTGGTATATACAGGCTATG
AAEL014227Innexin2 876 TGGTTTTGGTTTATTATTCTGACGATACTGACGACGTTAACGATATTTTATAGAATAATT
AAEL014227Innexin8 876 TGGTTTTGGTTTATTATTCTGACGATACTGACGACGTTAACGATATTTTATAGAATAATT
*** * * * * * * * * *

AALB006050ZPG 942 CTGCTCTGCAGCAAGGGCATCCGCGCCTGGTTGCTGCGCCAGCAAATGCAACCGATCCGT
 AAEL006726Innexin4 942 CAGCTTTCCTGCCGACGCGTTCGGTTCCAACCTGTTGTTGACCTGTTGGACCCAATCAGC
 AAEL008588Innexin7 993 ACACCTACTTGTTCATGCAAGATCGGTCAAATTTAACAGCTTCGTTTTCTGCAAGGTTAGT
 AAEL011248Innexin3 951 ATTGTCATGATGCCGACAACGCGGAGGGCCGCCCTCAAGCGTCGCTTCCGCACGGCCCCG
 AAEL014846Innexin1 933 ATAGTATTTATGCCTTCATTTTCGTATCCGTTTGTCTGAATACAATCAACAGAATGGTGCCG
 AAEL014227Innexin2 936 ATTATTTTTTCGCCTCGAATGCGAGTGTATTTATTAAGACTAAGGTTTAGGTTAGTTTCGT
 AAEL014227Innexin8 936 ATTATTTTTTCGCCTCGAATGCGAGTGTATTTATTAAGACTAAGGTTTAGGTTAGTTTCGT

*

AALB006050ZPG 987 -----TCGGTGGTTGTCAACAATGCGCTACGCGCGAATGTATCGGCAA
 AAEL006726Innexin4 987 -----TACCATCGTTTGAAGCGAGTTGTCCGGGAAGCCAACATCGGATA
 AAEL008588Innexin7 1053 CCTGGAATGCTGAACTCATATGATCTGGATTTTCATAACGGAGAGCCTTTCATTTTCGGAC
 AAEL011248Innexin3 996 -----GCAAATCAGATCGAGAACCTGGTCCGCCGATCCAGATCGGTGAC
 AAEL014846Innexin1 978 -----CGCGAAGCTGCAGAAGCTATTGGTCAGAAAATGATTTAGGTGAT
 AAEL014227Innexin2 981 -----CGCGACGCTATAGAGATTATAGTAAGACGTTTCGAAAATGGGCGAT
 AAEL014227Innexin8 981 -----CGCGACGCTATAGAGATTATAGTAAGACGTTTCGAAAATGGGCGAT

*

*

*

AALB006050ZPG 1047 TGGTTTCTGCTGTTGCAGCTGTGCCCAATCTGAACCCGCTGGTCAGCCGTGATATTATG
 AAEL006726Innexin4 1047 TGGTTTCTACTGTACCAAATGGCTCGCAACATCAATAAGGGTGTGATGAGGGAAATCATC
 AAEL008588Innexin7 1113 TGGATGTTTTTATATTATTTAGGAAGAAATATAGACAGTCATCTTTTCAAGGCTCTGTTT
 AAEL011248Innexin3 1056 TTCTCATGATTCACCTCCTGGACAGAACATCAACGTGACGTCTTACAGCGAGGTGCTG
 AAEL014846Innexin1 1038 TGGTGGATAATATACATGTAGGAGGAACTGGATCCTCCATTTTCAAGGATGTTGTA
 AAEL014227Innexin2 1041 TGGTTTTTATTATATAGATTAGGTGAAAATTTAGATAGTATTATATTTTCGTGATGTTATG
 AAEL014227Innexin8 1041 TGGTTTTTATTATATAGATTAGGTGAAAATTTAGATAGTATTATATTTTCGTGATGTTATG

* * * * * ** * * * * *

AALB006050ZPG 1107 TCCTGTATCTCGAAGAAACGACCCACCGACAGTCTTTACGCTAAACCAAAGAGCATGATG
 AAEL006726Innexin4 1099 CGGGATCTGTCCAGAATC-GATCAAGAGCTAAACAT-----GTCGAAATCGAACGTAA
 AAEL008588Innexin7 1155 AGAGGTATTATTCAAAGGTTCAATGGAACCTCGACATGAATCG-----
 AAEL011248Innexin3 1116 CACTCGCTGATGAACCGCCTAAACGAGGACAGAACTCGCGATACGCCTTCGGCGCGTCC
 AAEL014846Innexin1 1090 GCGGAACTCGCCAAGCAGATAGAACCACCACATAAAAATGGAAAACAAAGAC-----
 AAEL014227Innexin2 1096 CAAGATTTAGCGAATCGTCTACATAATAATCAACACCATCGTGTACCTGGTATG-----A
 AAEL014227Innexin8 1096 CAAGATTTAGCGAATCGTCTACATAATAATCAACACCATCGTGTACCTGGTATG-----A

*

AALB006050ZPG 1159 ATGACCGCCGATTTCTA--CCAGGACCAAGATG-----GCGATCTAGAGATAGGCGAGG
 AAEL006726Innexin4 1159 ATGAGCTGCAATTGGAGGTCGAGGCCGAGGATGAATTGGAGGAGATTGAAGATGACGAGG

```

AAEL008588Innexin7 -----AGTAAAAAATCAGTAAAAATCAGAACGATGAGGCTGACGAAACTGAACTTA
    1207
AAEL011248Innexin3 ACCC----TGGAGATGGCTCCCATCTATCCGAAATTGGAAAATACGGTAAAGATACTGC
    1172
AAEL014846Innexin1 -----
    1090
AAEL014227Innexin2 A-----AGGTG-----AAATACAG-----GA
    1112
AAEL014227Innexin8 A-----AGGTG-----AAATACAG-----GA
    1112

```

```

AALB006050ZPG          TTAATG-----TTAG      1170
AAEL006726Innexin4    CAACGG-----TGTGA     1170
AAEL008588Innexin7    TAAGTGAAAAACATTGA     1224
AAEL011248Innexin3    TATCTGA-----        1179
AAEL014846Innexin1    --TCTGA-----        1095
AAEL014227Innexin2    TGCATGA-----        1119
AAEL014227Innexin8    TGCATGA-----        1119

```

*

Resultados de secuenciaciones

Magenta indica la secuencia de un cebador , celeste indica región codificante conservada y amarillo indica probable región 3'-UTR.

>FA3R

```

CGATCAAGATCAAGATCATTGCC CCGCCTGAGCGTAAGTACTCCGTCTGGATCGGTGGATCCA
TCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGTCGATGTGGATCTCCAAGCACGAATACGATGAGGGCG
GCCAGGAATCGTCCACCGCAAGTGCTTCTAAG CACTAGGCACAAATGATGGTGGCTAAAGC
AATTAACAACAACCATGGTACTATAACATCACCATTTACATCTGAGCTAACCTAGCGAAATCA
ATCACTACCAGAAGAGCAAACGACAAGCATTATCGTATACCCAAGGCTACACATGGCTCCGG
CACGAACAACATGGCATGTGAAGAAGTGCAAGAGAAGAGATTTGAAGGAAATGAAGGCAGA
CAGGGCACGGTGCTGACCAGTGGAATTTGACATCCAATCACTACATCCTCATTTCGARAGTACC
CACGCAAGAGAACGATGATTGGCGCAAAAAGGCCTAGA

```

>FA5F

```

CGATCAAGATCAAGATCATTGCC CCGCCTGAGCGTAAGTACTCCGTCTGGATCGGTGGATCCA
TCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGTCGATGTGGATCTCCAAGCACGAATACGATGAGGGCG
GCCAGGAATCGTCCACCGCGAGTGCTTCTAAG CACTAGGCACAAATGATGGTGGCTAAAGC
AATTAACAACAACCATGGTACTATAACATCACCATTTACATCTGAGCTAACCTAGCGAAATCA
ATCACTACCAGAAGAGCAAACGACAAGCATTATCGTATATCCAAGGCTACGCATGGCTCCGG
CATGAACAACATGGCATGTGAAGAAGTGCAAGAGA

```

>FA4F

```

CGATCAAGATCAAGATCATTGCC CCGCCTGAGCGTAAGTACTCCGTCTGGATCGGTGGATCCA
TCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGTCGATGTGGATCTCCAAGCACGAATACGATGAGGGCG
GCCAGGAATCGTCCACCGCAAGTGCTTCTAAG CACTAGGCACAAATGATGGTGGCTAAAGC
AATTAACAACAACCATGGTACTATAACATCACCATTTACATCTGAGCTAACCTAGCGAAATCA
ATCACTACCAGAAGAGCAAACGACMAGCMTTATCGTATACCCAAGGCTACACATGGCTCCGG
CATGAACAACATGGCATGTGAAGAAGTGCARGAGAAGAGATTTGAAGGAAATGAAGG

```

>FA5R

```

TTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGT
CGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGATTCTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAG
TACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

```

>FA1F

```

AATACGACTMCTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCC
GCGGGAATTCGATTCTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT

```

>FA4R

AAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATT
CACTAGTGATTCTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT

>FP3R

CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGGCCTGAGCGTAAGTACTCCGTCTGGATCGGTGGATCCA
TCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGTCGATGTGGATCTCCAAGCACGAATACGATGAGGGCG
GCCAGGAATCGTCCACCGCAAGTGCTTCTAAGCACTAGGCACAAATGATGGTGGCTAAAGC
AATTAACAACAACCATGGTACTATAACATCACCATTTACATCTGAGCTAACCTAGCGAAATCA
ATCACTACCAGAAGAGCAAACGACAAGCATTATCGTATACCCAAGGCTACACATGGCTCCGG
CATGAACAACATGGCATGTGAAGAAGTGCAAGAGAAGAGATTTGAAGGAAATGAAGGCAGA
CAGGGCACGGTGCTGACCAGTGAATTTGACATCCAATCACTACATCCTCATTGAGAGTACC
CACGCAAGAGAACGATGATTGGCG

>MA3F

CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGGCCGGAGCGTAAGTACTCGGTCTGGATCGGTGGCTCCA
TCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGACGATGTGGATCTCGAAGCACGAGTACGACGAGGGCG
GCCCCGGGCATCGTGCACCGCAAGTGCTTCTAAGGCAACGGCGGACCTCATCCAGTCGTCGATC
TTGTCGGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAAACGGCAGAAGCAAACC
AAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGAGCTCTATTGTGGTGTCTGTCTCTCGTTCTTT
TACCACCAGCATCTTTTCTATGATTTCTCTTTTACCATCTCTTTTATTTTTTGTGTTTTGTTTCT
GTGCAAATCTTCTTCGACTTGTAACARACAGCGCTTAGGGCGGTGCCTASAGAAGTAAATATA
TCTTTTTTGATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCRACSCGTGGCCTAGTAGTAGAAT
CACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCMGGTCGACCATATGGGARAGCTCCAACGCGTTGGAT
GCATAGC

>MA2F

CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGGCCGGAGCGTAAGTACTCGGTCTGGATCGGTGGCTCCA
TCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGACGATGTGGATCTCGAAGCACGAGTACGACGAGGGCG
GCCCCGGGCATCGTGCACCGCAAGTGCTTCTAAGGCATCGGCGGACCTCATCCAGTCGTCGATC
TTGTCGGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAAACGGCAGAAGCAAAGCC
AAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGAGCTCTATTGTGGTACTGTCTCTCGTTCTTT
TACCACCAGCATCTTTTCTATGATTTCTCTTTTACCATCTCTTTTATTTTTTGTGTTTTGTTTCT
GTGCAAATCTTCTTCGACTTGTAACAAAMAGCGCTTAGGGCGGTGCCTAGAGAAGTAAATAT
ATCWTTTTTGATAACGTTAAARAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTARTCGACGCGTGG

>MA1R

CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGGCCGGAGCGTAAGTACTCGGTCTGGATCGGTGGCTCCA
TCCTGGCCTCGCTGTCCACCT

>MA5R

CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGGCCGGAGCGTAAGTACTCGGTCTGGATTGGTGGCTCCA
TCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGACGATGTGGATCTCGAAGCACGAGTACGACGAGGGCG
GCCCGGCATCGTGCACCGCAAGTGCTTCTAAGGCATCGGCGGACCTCATCCAGTCGTCGATC
TTGTCGGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAAACGGCAGAAGCAAAGCC
AAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGAGCTCTATTGTGGTGTCTGTCTCTCGTTCTTT
TACCACCAGCATCTTTTCTATGATTTCTCTTTTACCATCTCTTTTATTTTTTGTGTT

>MA5F

ATTWAMMMMSGCCMGTGAAWTGTAATACSACTCCTATARGGCGAATTGGGCCCGASGTCCAT
GCTCCCGGCCGCATGGCGGCCGCGGGAATTCMATTCTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACT
AGTRCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

>MA4F

CTTYMMRMSGSSMMSKTGAAWTGTAATACCGACTMACTATAGGGCGAATTGGGCCGACGT
CGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTCTACTACTACTAGGCCACGCGT
CGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

>MA3R

AGWYMSSMMRSTWWTTAGGTGAMACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGG
AGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTACTACTACTAG
GCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

>MA2R

GKWTMSCMARCWWTTTAGGTGACACTATAGAATACTMAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGG
AGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTACTACTACTAG
GCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

>MP1R

CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGGCCAGAGCGTAAATACTCCGTCTGGATCGGTGGTCCA
TCCTGGCTTCCCTGTCTACCTTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGGAGGAGTACSACGAGTCCG
GCCCCGGGCATTGTTACCCGCAAGTGCTTCTAAGGCATCGGCGGACCTCATCCAGTCGTCGATC
TTGTCTGGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAAACGGCAGAAGCAAGCC
AAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGARCTCTATTG

>MP2F

CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGGCCGAGCGTAAAGTACTCGGTCTGGATCGGTGGCTCCA
TCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGACGATGTGGATCTCGAAGCACGAGTACGACGAGGGCG
GCCCCGGGCATCGTGCACCGMAAGTGCTTCTAAGGCATCGGCGGACCTCATCCAGTCGTCGATC
TTGTCTGGGTTAACCAACATCAACACCAACTTCCCTTCCCAACACCAAACGGCAGAAGCAAGCC
AAAGCAACATACTATCAAACAGCAGCCGATTGAGCTCTATTGTGGTGTCTGTCTCTSGTTCTTT
TACCACAGSATCTTTTCTATGATTCCCTTTTACCATCTCTTTATTTTTTTGTGTRTGTTCW
GTGCAAATMT

>MP4R

CGATCAAGATCAAGATCATTGCCCGGCCGAGCGTAAAGTACTCGGTCTGGATCGGTGGCTCCA
TCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGACGATGTGGATCTCGAASCACGAGTACGACGAGGGCG
GCCCCGGGCATCGTGCACCGCAAGTGCTTCTAAGGCATSGGCGGACCTCATCCASTCGTCGATC
TTGKCGGGTTAACCAACATCAA

>MP3R

TCKMYSSCMARCCWWTTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGG
GAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTACTACTACTACTACTACTA
GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

>MP2R

TKTYCGCMAGCWTTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAG
CTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTACTACTACTACTACTACTAGGC
CACGCGTCGACTAGTACTT

Figura 137. Vector utilizado en clonación de 3'-UTR

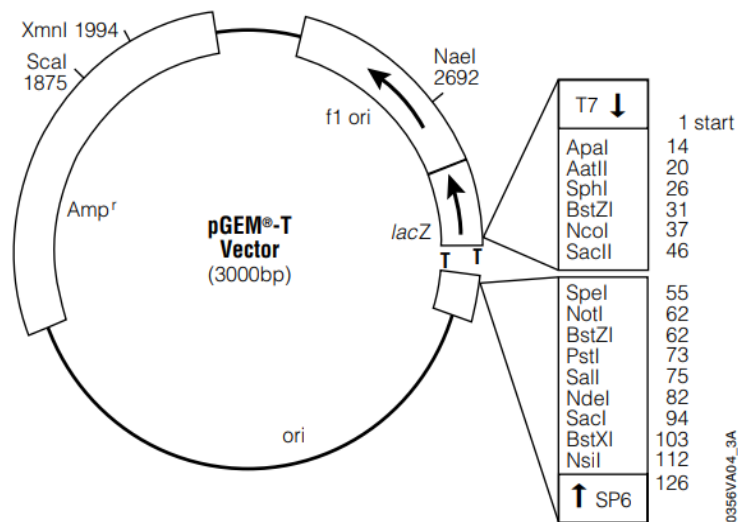


Figura 138. Cebadores M13

M13 Forward Sequence - 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'
 M13 Reverse Sequence - 5'-GGATAACAATTCACACAGG-3'

POE 12: Precipitación de ARN con acetato de sodio y etanol

10. Propósito:

1. Precipitar stocks de ARN extraído de *Anopheles albimanus* que no tuvieron la concentración óptima para hacer ADN copia.
2. Tener ARN de buena calidad para hacer ADN copia.

11. Aplicación:

Esta técnica es ampliamente usada para purificar ácidos nucleicos que pueden ser utilizados luego para hacer ADN copia y qPCR.

12. Referencias:

1. Zumbo, P. Ethanol Precipitation. Weill Cornell Medical College. http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/files/ETHANOL_PRECIPITATION.pdf

13. Terminología y abreviaciones:

N/A

14. Principio:

Los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos compuestos de una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos y un grupo fosfato. Las moléculas de ácidos nucleicos son moléculas polares debido a que contienen átomos de oxígeno y de nitrógeno que son aceptores de enlaces de hidrógeno, por lo tanto, son solubles en agua. A pesar de esto, no se disocian en el agua porque las fuerzas intramoleculares entre nucleótidos son más fuertes que las fuerzas intermoleculares entre el agua y los nucleótidos. Para que los cationes de sodio, de la sal agregada, en este caso acetato de sodio, interactúen con los grupos fosfatos cargados negativamente, es necesario que los espacios de agua que existen entre los ácidos nucleicos sean reducidos, lo cual se logra agregando alcohol. El etanol es el alcohol más usado para precipitar ADN y ARN. Este tiene una constante dieléctrica más baja que el agua, que en presencia de cationes monovalentes hace que las moléculas de agua alrededor de los ácidos nucleicos se reduzcan. Cuando los cationes y las cargas negativas de los ácidos nucleicos interaccionan, los ácidos nucleicos son neutralizados, no se disuelven en agua y precipitan. El precipitado purificado se colecta mediante centrifugación y se resuspende en el volumen de agua libre de nucleasas de conveniencia.

15. Documentos asociados:

1. Zumbo, P. Ethanol Precipitation. Weill Cornell Medical College. Laboratory Consultado en: http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/files/ETHANOL_PRECIPITATION.pdf
2. Panreac. Etanol absoluto. Ficha de Datos de Seguridad. Consultado en: http://iebsrv1.upc.es/gieb/Riscos_laborals/FDS/Etanol/Etanol.htm
3. Fichas Internacionales de Seguridad Química. Acetato de sodio. Consultado en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/501a600/nspn0565.pdf>

16. Seguridad:

1. Etanol absoluto: es fácilmente inflamable, mantener alejado de las fuentes de ignición. Usar gafas y guantes apropiados ya que el contacto ocular o por inhalación ocasiona irritaciones leves. Por ingestión provoca náuseas y vómitos.
2. Acetato de Sodio 3M: causa irritación en piel y ojos. La sustancia se descompone al calentarla y en contacto con ácidos fuertes. Reacciona violentamente con oxidantes fuertes. Utilizar guantes protectores y si es necesario gafas de seguridad.

17. Equipos, materiales y reactivos:**1. Equipos**

1. Centrifuga refrigerada

2. Materiales

1. Micropipetas: 10uL, 200uL
2. Puntas: 10uL, 200uL
3. Beaker de desechos con cloro
4. Tubos de 0.2mL

3. Reactivos

1. Acetato de sodio 3M pH 5.5
2. Glicógeno 20mg/mL
3. Etanol al 100%
4. Etanol al 70%
5. Agua libre de nucleasas

18. Procedimiento:

9.1	<p>Descongelar lentamente el ARN, si estaba a una temperatura de -70°C. Añadir 0.1 volúmenes de acetato de sodio al stock de ARN que se quiere precipitar.</p> <p><i>El acetato de sodio es la utilizada para precipitar el ARN. Esta sal carboxilada es polar, se disocia en agua en aniones de acetato y cationes de sodio. Los cationes neutralizan los ácidos nucleicos y hace que estos ya no sean disueltos en agua.</i></p>
9.2	<p>Añadir 3 volúmenes de etanol absoluto frío (ice cold) a cada stock.</p> <p><i>Se utiliza etanol absoluto porque baja la constante dieléctrica de la solución que contiene los ácidos nucleicos y los cationes monovalentes, lo que permite que se precipiten.</i></p>
9.3	<p>Añadir 1uL de glicógeno 20mg/mL.</p> <p><i>El glicógeno es un polisacárido inerte que es usado para facilitar la recuperación de ácidos nucleicos. El glicógeno es insoluble en etanol o isopropanol y forman un precipitado que ayuda a atrapar y agrupar ácidos nucleicos. Durante la centrifugación forma un pellet visible, que ayuda a remover el sobrenadante fácilmente sin perturbar el pellet.</i></p>
9.4	<p>Dejar overnight a -80°C.</p> <p><i>Se deja overnight a esta temperatura para tener mejor rendimiento de ácidos nucleicos porque aumenta la viscosidad de la solución que retrasan el movimiento de los ácidos nucleicos agregados.</i></p>
9.5	<p>Centrifugar a 13 000 rpm a 4°C por 20 minutos. Posteriormente, lavar con 200uL de etanol al 70%.</p> <p><i>Esto permite que el precipitado se vaya al fondo del tubo.</i></p>
9.6	<p>Centrifugar nuevamente a 13 000 rpm a 4°C por 15 minutos.</p>
9.7	<p>Descartar etanol y dejar secar el pellet.</p> <p><i>Tener cuidado ya que en este paso el pellet se puede safar con mayor facilidad.</i></p>
9.8	<p>Agregar el volumen de agua libre de nucleasas que considere necesario para tener un ARN más concentrado. Cuantificar en Nanodrop, seguir con el proceso para hacer ADN copia y no volver a congelar el ARN. Se recomienda revisar la integridad del ARN mediante un gel de agarosa y si no se va a usar en ese momento hacer alícuotas para evitar que se degrade completamente el stock.</p>

19. Cálculos:

1. Solución de acetato de sodio 3M
 10mL 1L 1000mL 3mol 1L 82.04g 1mol = 2.4612 g de acetato de sodio en 10mL de agua libre de nucleasas

2. Solución de etanol al 70%.
 100mL 70mL etanol 100mL solución = 70mL etanol al 100% + 30mL de agua libre de nucleasas

20. Control de calidad:

1. Usar guantes en todo momento. Al mover reactivos, tocar espátulas para realizar mediciones de reactivos y tocar papel para pesar.
2. En cualquier momento posible utilizar material plástico desechable para manipular ARN y RNase away para prevenir la contaminación por nucleasas.
3. Utilizar únicamente agua desionizada, no obstante hay una baja probabilidad que esta esté contaminada con RNAsas. Para revisar esto se puede incubar una muestra de RNA en agua y verificar su composición por medio de electroforesis.
4. Tener un área restringida únicamente para trabajo con ARN que contenga todo el material necesario tratado adecuadamente.

POE 13: 3' RACE

1. Propósito:	Amplificar la región 3'-UTR de actinas expresadas en cada estadio y determinar si alguna tiene expresión específica en hembras.
2. Aplicación:	Se busca obtener esta región porque con ella se pueden reconocer isoformas diferentes de actina. Se debe usar la secuencia 3'-UTR porque la región codificante es altamente conservada en todas las especies.
3. Referencias:	
	3.1
	3.2
4. Terminología y abreviaciones:	
	4.1 GSP: cebador específico del gen
	4.2 ACE: Rapid Amplification of cDNA Ends
	4.3 P: adapter primer
	4.4
	4.5
	4.6
5. Principio:	La reacción 3'RACE se basa en el uso de la secuencia poli(A) de todos los ARNm producidos. El kit incluye un AP que se une a esta secuencia y posee una cola con la secuencia la que se unen los cebadores universales. La reacción con el AP produce cDNA que contiene este adaptador. Posteriormente, el cebador universal se usa en conjunto con el cebador forward previamente diseñado. Con ambos se amplifica la región entre el cebador específico y el cebador universal.

6.	Documentos asociados:
6.1	Manual de kit 3'RACE de Invitrogen
7.	Seguridad:
7.1	Algunos reactivos son dañinos para la salud, utilizar guantes y bata en todo momento
7.2	Las muestras son fácilmente contaminables, trabajar en campana libre de ARNasas y utilizar guantes
8.	Equipos, materiales y reactivos:
8.1	Tubos estériles de microcentrifuga 0.5ml
8.2	Pipetas automáticas de 1-20 ul y de 20-200 ul
8.3	Puntas estériles libres de ARNasas
8.4	Agua DEPC
8.5	GSP externo
	GSP interno
8.6	Microcentrifuga de 14,000 x g
8.7	Baños calientes de 37°C, 42°C y 70°C
8.8	<i>Taq</i> ADN polimerasa
8.9	Cloroformo
8.10	Aceite mineral
8.11	Tubos de PCR
8.12	Kit 3'RACE
8.13	Muestra de ARN <50 ng/ul
9.	Prueba estandar:
	<ul style="list-style-type: none"> • Geles de agarosa: observar bandas marcadas • Secuenciación: comparar con base de datos
10.	Procedimiento:
	Síntesis de primera hebra de cDNA
10.1	Mezclar y centrifugar brevemente cada componente
10.2	Combinar 1-5ug de ARN total con agua DEPC para llegar a volumen 11ul en tubo 0.2ml <i>Se puede usar 2ul del ARN control 100ng</i>
10.3	Agregar 1ul de solución AP 10uM, mezclar suavemente y centrifugar brevemente

10.4	<p>Calentar a 70°C por 10 min. y enfriar en hielo 1 min. Centrifugar brevemente y agregar:</p> <p style="text-align: center;">Cuadro 107. Componentes de master mix</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Componente</th> <th>Volumen (ul)</th> <th>n=</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10X buffer PCR</td> <td>2</td> <td></td> </tr> <tr> <td>25mM MgCl₂</td> <td>2</td> <td></td> </tr> <tr> <td>10mM mezcla dNTP</td> <td>1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>0.1M DTT</td> <td>2</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Componente	Volumen (ul)	n=	10X buffer PCR	2		25mM MgCl ₂	2		10mM mezcla dNTP	1		0.1M DTT	2																
Componente	Volumen (ul)	n=																													
10X buffer PCR	2																														
25mM MgCl ₂	2																														
10mM mezcla dNTP	1																														
0.1M DTT	2																														
10.5	Mezclar suavemente y centrifugar brevemente. Llevar muestra a 42°C por 2-5 min.																														
10.6	Agregar 1ul de SuperScript II RT. Incubar a 42°C por 50 min.																														
10.7	Parar reacción con incubación a 70°C por 15 min.																														
10.8	Enfriar en hielo y centrifugar brevemente.																														
	Agregar 1ul de ARNasa H al tubo, mezclar e incubar por 20 min. a 37°C																														
10.9	Se puede guardar la mezcla a -20°C																														
10.10	<p>Amplificación de cDNA target</p> <p><i>Las condiciones óptimas varían según el cebador y el target usados, pero generalmente las concentraciones más bajas de MgCl₂ (1-1.5mM) y de dNTP (50-200uM) producen mayor fidelidad y especificidad. También se debe hacer hot start a 75°C-80°C o colocar en termociclador a 80°C-90°C después de estar en hielo</i></p>																														
10.11	<p>En nuevo tubo agregar: go taq hot start colorless master mix</p> <p><i>Se usa el UAP para que haya más posibilidades de que la secuenciación salga bien desde el principio porque tiene una región extra en 5'</i></p> <p style="text-align: center;">Cuadro 108. Componentes master mix</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Componente</th> <th>C1</th> <th>C2</th> <th>Volumen (ul)</th> <th>n=</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2X buffer PCR</td> <td>2X</td> <td>1X</td> <td>12.5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Agua DEPC</td> <td></td> <td></td> <td>10.5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>GSP externo 10uM</td> <td>10uM</td> <td>0.4uM</td> <td>1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UAP (10uM)</td> <td>10uM</td> <td>0.4uM</td> <td>1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td></td> <td></td> <td>25</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Componente	C1	C2	Volumen (ul)	n=	2X buffer PCR	2X	1X	12.5		Agua DEPC			10.5		GSP externo 10uM	10uM	0.4uM	1		UAP (10uM)	10uM	0.4uM	1		Total			25	
Componente	C1	C2	Volumen (ul)	n=																											
2X buffer PCR	2X	1X	12.5																												
Agua DEPC			10.5																												
GSP externo 10uM	10uM	0.4uM	1																												
UAP (10uM)	10uM	0.4uM	1																												
Total			25																												
10.12	<p>Agregar 1ul de cDNA al tubo, mezclar suavemente. Centrifugar brevemente.</p> <p><i>Considerar diluir 1:5 1:10 dependiendo de cómo salga</i></p>																														
10.13	Incubar a 94°C por 3 min.																														
10.14	<p>30 ciclos de PCR según protocolo de Taq</p> <p style="text-align: center;"><i>Cuadro 109. Condiciones de PCR</i></p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Temperatura (°C)</th> <th>Tiempo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>95</td> <td>2 min</td> </tr> <tr> <td>95</td> <td>30s</td> </tr> <tr> <td>61</td> <td>30s</td> </tr> <tr> <td>72</td> <td>1 min</td> </tr> <tr> <td>72</td> <td>5 min</td> </tr> </tbody> </table>	Temperatura (°C)	Tiempo	95	2 min	95	30s	61	30s	72	1 min	72	5 min																		
Temperatura (°C)	Tiempo																														
95	2 min																														
95	30s																														
61	30s																														
72	1 min																														
72	5 min																														
10.16	<p>Analizar 10-20ul de muestra amplificada, haciendo gel de agarosa. Si se usó el control, debe aparecer banda en 720bp</p> <p>Dilución 1:1000 o 1:10000</p>																														
11.	Cálculos:																														
	-																														

12.	Control de calidad:	
	12.1	Tamaño esperado de 540 bp en el cebador PCR
	12.2	
	12.3	Conflict solution policy:
	(a)	Sin bandas: Usar ARN control, mantener procedimiento para evitar contaminación por ARNasas, precipitar con etanol para eliminar inhibidores de RT
	(b)	Bandas inesperadas: Probar si hay contaminación con ADN genómico repitiendo primera hebra sin SuperScript II RT, hacer digestión con ADNasa, hacer hot start y seguir instrucciones de Taq polimerasa

POE 14: PCR de colonia

Área	Ingeniería genética
Versión	Primera
Idioma	Español
Título	PCR de colonias de cepa transformada con inserto de <i>Boule</i> y <i>ZPG</i>
Escrito por Fecha y firma	Paula Villatoro y Ana Gabriela Lara 28 de mayo de 2018
Revisado por Fecha y firma	
Aprobado por Fecha y firma	

1. Propósito

1.1. Confirmar la presencia del inserto de *Boule* / *ZPG* en las cepa de *E. coli* HT115 (DE3) transformadas.

2. Aplicación

El PCR de colonias permite seleccionar a las colonias de *E. coli* HT115 (DE3) que fueron transformadas de manera exitosa. Es decir, verificar que colonias cuentan con el constructo plasmidial con el inserto del gen (*Boule* o *ZPG*). Esto permite identificar las colonias de interés para hacer stocks de glicerol de las mismas.

3. Referencias

Promega Corporation. (2009). Recombinant Clone Screening Using the GoTaq® Hot Start

Green Master Mix. Encontrado en: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/promega-notes/101/recombinant-clone-screening-using-the-gotaq-hot-start-green-master-mix.pdf?la=en>

4. Terminología y abreviaciones

4.2. *zero population growth*, gen identificado en *Drosophila melanogaster* que está implicado en espermatogénesis.

4.3. *boule*: gen identificado en *Drosophila melanogaster* que está implicado en formación de espermatozoides.

4.4. ANT: proteína de codificación en la especie de *Arabidopsis thaliana*.

4.5. *E. coli* HT115(DE3): Cepa transgénica de *Escherichia coli*, que posee una mutación en el gen que codifica para la Rnasa III, lo que evita la hidrólisis enzimática del material genético acumulado.

4.6 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

5. Principio

El PCR se basa en múltiples ciclos de temperatura que permiten la síntesis y amplificación de un fragmento específico de ADN. El PCR de colonias utiliza primers específicos para amplificar la porción del plásmido que cuenta con el inserto del gen. La presencia o ausencia del inserto se verifica por medio de bandas del tamaño esperado para el gen con electroforesis en gel de agarosa.

6. Documentos asociados

Promega Corporation. (2009). Recombinant Clone Screening Using the GoTaq® Hot Start

Green Master Mix. Encontrado en:

<https://www.promega.com/-/media/files/resources/promega-notes/101/recombinant-clone-screening-using-the-gotaq-hot-start-green-master-mix.pdf?la=en>

7. Seguridad

Usar doble guantes y bata de laboratorio especial para trabajar con bromuro de etidio.

8. Equipos materiales y reactivos

8.1 Equipo y materiales

- Micropipetas de 10 y 100 μ l
- Puntas para micropipetas de 10 y 100 μ l
- Tubos eppendorf para PCR
- Termociclador
- Cámara de electroforesis
- Transiluminador UV

8.2 Reactivos

- ADN plasmidial usado en transformación
- Go Taq Hot Start Master Mix
- Primers M13 forward y reverse
- Colonias de bacterias transformadas
- Loading buffer
- Escalera 100pb Novagen
- Buffer TBE
- Agarosa

- Bromuro de etidio

9. Procedimiento

9.1 Reacción de PCR de colonias

9.1.1 Preparar el *Master mix* en un tubo eppendorf de 600 μ l (cuadro 1).

9.1.2 Traspasar 14 μ l de *master mix* a 7 tubos eppendorf de 200 μ l (uno para cada reacción)

9.1.3 Con ayuda de una micropipeta picar una colonia de *E. coli* HT115 (DE3) transformada con inserto de *Boule* / *ZPG* y resuspender la colonia en la mezcla de reacción de tubo.

9.1.4 A tres tubos diferentes con 14 μ l del *master mix* cada uno, agregar 1 μ l del ADN plasmidial con inserto del gen *Boule*, *ZPG* y *ANT* respectivamente para cada tubo. Estos serán los controles positivos del PCR.

Usar el clon 2 de plásmido de ZPG y clon 3 de plásmido de Boule (plásmidos utilizados para la transformación).

9.1.5 Dejar un tubo con 14 μ l del *master mix* sin plásmido ni colonia, como control negativo del PCR.

9.1.6 Correr en termociclador en programa de Colony PCR

Cuadro 110. Reacción de PCR de colonias

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	1 reacción	8 reacciones
Go Taq Hot Start Master Mix	2X	1X	7.5 μ l	60 μ l
Primer M13F	10 μ M	0.5 μ M	0.75 μ l	6 μ l
Primer M13R	10 μ M	0.5 μ M	0.75 μ l	6 μ l
Agua			5 μ l	50 μ l
Colonia/plásmido			1 μ l	N/A

9.2 Electroforesis en gel de agarosa

9.2.1 Preparar gel de agarosa 0.8% en buffer TBE. Colocar mezcla en erlenmeyer y calentar en microondas hasta que esté cristalino.

Es importante que esté completamente transparente, de lo contrario el gel no se podrá visualizar bien.

9.2.2 Esperar a que la temperatura disminuya y agregar 2 μ l de bromuro de etidio y colocar gel sobre la canasta con el peine. Dejar polimerizar el tiempo que sea necesario.

9.2.3 Pasar el gel a la cámara de electroforesis y llenar la cámara con buffer TBE.

Asegurarse que esté colocado en dirección de negativo a positivo.

9.2.4 Cargar 7 μ l de escalera de 100pb en el primer pozo.

9.2.5 En los demás pozos cargar 6 μ l de los productos de PCR y de los controles

9.2.6 Correr a 100V por 30 minutos.

Estar atento para que la corrida no se salga del gel, de ser necesario apagar la cámara antes de que transcurran los 30 minutos.

10. Cálculos

Gel de agarosa 0.8% en buffer TBE

$$C1V1=C2V2$$

$$100\%V1=0.8\%(45 \text{ TBE})$$

$$V1=0.36\text{g de agarosa}$$

11. Control de calidad

Se esperan bandas de 440 pb para el gen *Boule* y de 412 pb para *ZPG*.

12. Reporte de datos y documentos utilizados

Anotar el mapa de carga del gel y anotar los tamaños obtenidos de los fragmentos.

13. Reporte N/A

Cuadro 111. Datos obtenidos para realización de eficiencia de los cebadores qPCRfemaleUTR_2F y qPCRfemaleUTR_2R en diferentes diluciones utilizando pupa hembra como estadio de prueba.

Dilución	Valor CT	Valor CT	Valor Ct promedio
1/50	17.81	17.93	17.93
1/50	17.95	17.93	
1/50	18.04	17.93	
1/500	21.4	21.21	21.21
1/500	21.03	21.21	
1/500	21.21	21.21	
1/5000	24.57	24.56	24.56
1/5000	24.49	24.56	
1/5000	24.61	24.56	
1/50000	27.88	27.83	27.83
1/50000	27.71	27.83	
1/50000	27.9	27.83	
1/500000	30.59	30.86	30.92
1/500000	31.01	30.86	
1/500000	31.33	30.86	

Datos obtenidos de $\Delta\Delta C_T$ de valores C_T

Cuadro 112. Datos de $\Delta\Delta C_T$ de valores C_T usando el gen de Referencia *RPL49*

	RPL49	Female actin			
Muestra	Promedio C_T	Promedio C_t	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-(\Delta\Delta C_T)}$
Control 1 (L3)	30.29	34.52	4.23	-0.62	1.5
Control 2 (L3)	29.25	34.44	5.19	0.34	0.8

Control 3 (L3)	30.42	35.55	5.13	0.28	0.8
L4 tem 1	28.37	25.91	-2.46	-7.31	158.7
L4 tem 2	29.46	34.24	4.78	-0.07	1.0
L4 tem 3	28.82	33.65	4.83	-0.02	1.0
L4 tar 1	29.34	26.04	-3.3	-8.15	284.0
L4 tar 2	29.45	28.49	-0.96	-5.81	56.1
L4 tar 3	29.78	28.31	-1.47	-6.32	79.9
PH 1	28.53	22.05	-6.48	-11.33	2574.4
PH 2	28.66	20.61	-8.05	-12.90	7643.4
PH 3	28.96	20.16	-8.8	-13.65	12854.6
PM 1	28.15	27.36	-0.79	-5.64	49.9
PM 2	28.43	27.16	-1.27	-6.12	69.6
PM 3	28.97	28.3	-0.67	-5.52	45.9
AH 1	28.58	20.51	-8.07	-12.92	7750.1
AH 2	29.59	21.455	-8.135	-12.99	8107.3
AH 3	29.02	21.66	-7.36	-12.21	4737.8
AM 1	29.4	30	0.6	-4.25	19.0
AM 2	30.78	31.55	0.77	-4.08	16.9
AM 3	29.49	31.9	2.41	-2.44	5.4

Los números delante de cada estadio corresponde a la réplica biológica. Promedio $\Delta C_T = 4.85$.

Cuadro 113. Datos de $\Delta\Delta C_T$ de valores C_T usando el gen de Referencia *RPS4*

	RPS4	Female Actin			
Muestra	Promedio C_T	Promedio C_t	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-(\Delta\Delta C_T)}$
Control 1 (L3)	25.39	34.52	9.13	-1.34	2.5
Control 2 (L3)	23.73	34.44	10.71	0.24	0.8
Control 3 (L3)	23.97	35.55	11.58	1.11	0.5
L4 tem 1	23.18	25.91	2.73	-7.74	214.3
L4 tem 2	24.02	34.24	10.22	-0.25	1.2
L4 tem 3	23.57	33.65	10.08	-0.39	1.3
L4 tar 1	24.53	26.04	1.51	-8.96	499.2
L4 tar 2	23.51	28.49	4.98	-5.49	45.0
L4 tar 3	24.44	28.31	3.87	-6.60	97.2
Muestra	Promedio C_T	Promedio C_t	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-(\Delta\Delta C_T)}$
PH 1	24.31	22.05	-2.26	-12.73	6809.5
PH 2	23.94	20.61	-3.33	-13.80	14296.1
PH 3	24.14	20.16	-3.98	-14.45	22433.0
PM 1	23.98	27.36	3.38	-7.09	136.6
PM 2	23.8	27.16	3.36	-7.11	138.5

PM 3	24.77	28.3	3.53	-6.94	123.1
AH 1	24.36	20.51	-3.85	-14.32	20500.0
AH 2	25.43	21.455	-3.975	-14.45	22355.4
AH 3	24.18	21.66	-2.52	-12.99	8154.2
AM 1	24.5	30	5.5	-4.97	31.4
AM 2	25.78	31.55	5.77	-4.70	26.1
AM 3	24.84	31.9	7.06	-3.41	10.7

Promedio $\Delta C_T = 10.47$.

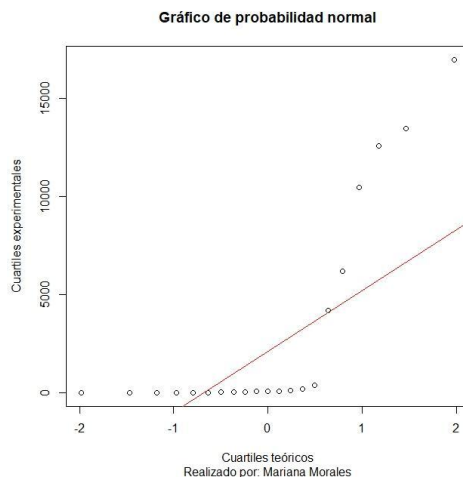
Cuadro 114. Datos de $\Delta\Delta C_T$ de valores C_T usando el promedio de los genes de referencia *RPL49* y *RPS4*

	RPL49	RPS4		Female Actin			
Muestra	Promedio C_T	Promedio C_T	Promedio Ref genes	Promedio C_T	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-(\Delta\Delta C_T)}$
Control 1 (L3)	30.29	25.39	27.84	34.52	6.68	-0.98	2.0
Control 2 (L3)	29.25	23.73	26.49	34.44	7.95	0.29	0.8
Control 3 (L3)	30.42	23.97	27.20	35.55	8.355	0.69	0.6
L4 tem 1	28.37	23.18	25.78	25.91	0.135	-7.53	184.4
L4 tem 2	29.46	24.02	26.74	34.24	7.5	-0.16	1.1
L4 tem 3	28.82	23.57	26.20	33.65	7.455	-0.21	1.2
L4 tar 1	29.34	24.53	26.94	26.04	-0.895	-8.56	376.5
L4 tar 2	29.45	23.51	26.48	28.49	2.01	-5.65	50.3
L4 tar 3	29.78	24.44	27.11	28.31	1.2	-6.46	88.1
PH 1	28.53	24.31	26.42	22.05	-4.37	-12.03	4186.9
PH 2	28.66	23.94	26.30	20.61	-5.69	-13.35	10453.3
PH 3	28.96	24.14	26.55	20.16	-6.39	-14.05	16981.4
PM 1	28.15	23.98	26.07	27.36	1.295	-6.37	82.5
PM 2	28.43	23.8	26.12	27.16	1.045	-6.62	98.1
PM 3	28.97	24.77	26.87	28.3	1.43	-6.23	75.1
AH 1	28.58	24.36	26.47	20.51	-5.96	-13.62	12604.6
Muestra	Promedio C_T	Promedio C_T	Promedio Ref genes	Promedio C_T	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-(\Delta\Delta C_T)}$
AH 2	29.59	25.43	27.51	21.455	-6.055	-13.72	13462.6
AH 3	29.02	24.18	26.60	21.66	-4.94	-12.60	6215.6
AM 1	29.4	24.5	26.95	30	3.05	-4.61	24.4
AM 2	30.78	25.78	28.28	31.55	3.27	-4.39	21.0
AM 3	29.49	24.84	27.17	31.9	4.735	-2.93	7.6

Promedio $\Delta C_T = 7.66$.

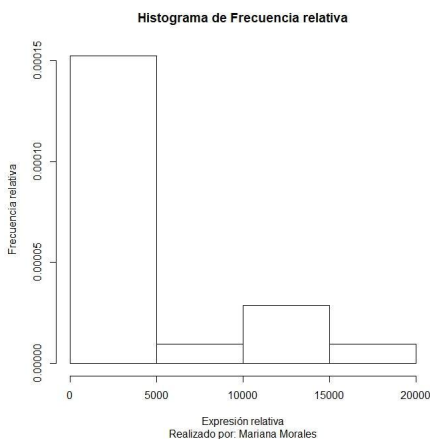
Pruebas estadísticas realizadas para la expresión relativa del gen evaluado.

Figura 139. Prueba de normalidad



Los datos no están distribuidos en una línea recta. No parece haber normalidad en los datos.

Figura 140. Histograma de distribución de los datos de expresión relativa.



Los datos no siguen la forma de campana de Gauss con asimetría negativa. No parece haber normalidad en los datos.

Cuadro 115. Prueba de Bartlett y Shapiro para verificación de normalidad de los datos

Prueba	Valor P
Shapiro-Wilk	4.26×10^{-6}
Bartlett	1.37×10^{-15}

En estas pruebas, para la prueba de Shapiro-Wilk se establece que H_0 : Existe normalidad en los datos y H_a : no existe normalidad en los datos. No hay normalidad en los datos debido a que el valor P es menor a un alfa de 0.05, por lo que se rechaza H_0 . Para Bartlett, H_0 : Existe homogeneidad de varianza en los datos y H_a : No existe homogeneidad de varianza

en los datos. Debido a que el valor P es menor a un alfa de 0.05 se rechaza H_0 y se concluye que los datos no son homogéneos. Para Bartlett;

Debido a que no se cumple con ninguno de los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas ni independencia, se realizó el análisis de los datos usando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($P=0.0102$, se rechaza H_0) por lo que se prosiguió con la Prueba de Dunn como Post Hoc, y así verificar que muestras son las que difieren.

Cuadro 116. Prueba de Kruskal-Wallis de Expresión relativa para comparar entre estadios y réplicas biológicas.

	Valor P
Entre estadios	0.0102
Entre réplicas biológicas	0.7134

Cuando el valor P es menor a 0.05 algunas de las medianas son estadísticamente diferentes. Valor p mayor a 0.05 indica que no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula.

Cuadro 117. Comparación de Expresión relativa en los estadios evaluados utilizando prueba de Dunn con método de Bonferroni.

Comparación	Valor P ajustado con Bonferroni
AH-AM	0.45
AH-L3	0.033
AM-L3	1.00
AH – L4 tardío	1.00
AM-L4 tardío	1.00
L3- L4 tardío	1.00
AH – L4 temprano	0.45
AM – L4 temprano	1.00
L3 – L4 temprano	1.00
L4 tardío – L4 temprano	1.00
AH- PH	1.00
AM- PH	0.53
L3 – PH	0.042
L4 tardío – PH	1.00
L4 temprano – PH	0.53
AH - PM	1.00
Comparación	Valor P ajustado con Bonferroni
AM-PM	1.00
L3 – PM	1.00
L4 tardío - PM	1.00
L4 temprano - PM	1.00
PH - PM	1.00

Para La prueba de Dunn, ajustado con Bonferroni, si son menor a 0.05 son significativamente diferentes. Las abreviaturas de PH y PM se refieren a pupa hembra y pupa macho. AH y AM se refieren a adulto hembra y adulto macho. Se encontró que los estadios de pupa hembra y adulto hembra son significativamente diferentes al control usado (L3).

XII. GLOSARIO

- *ANT*: *Arabidopsis thaliana*, es una especie de crucífera nativa de Europa, Asia y el noroeste de África.
- Argonautas: familia de proteínas altamente conservadas que intervienen en el proceso de silenciamiento de genes mediante el sistema de ARN de interferencia. Dichas proteínas interactúan con “DICER” y el complejo “RISC”.
- ARNdH: Ácido ribonucleico de doble hebra. Está conformado por la unión del ARN antisentido y el ARN con sentido. Este ARNdH es cortado por “dicer” para formar siRNA.
- ARNi: ARN de interferencia, es el mecanismo de silenciamiento de genes que ocurre naturalmente en muchos organismos y es activado por la presencia de ARNdH que es convertido a siRNA (Farrell 2005).
- Carb: Carbenicilina, es un antibiótico que pertenece al grupo de las carboxipenicilinas (poseen un anillo betalactámico) que posee cobertura para las Gram negativas pero acción limitada para las Gram positivas. Actúa inhibiendo el último paso de la síntesis de la pared celular bacteriana, uniéndose a unas proteínas denominadas PBPs (Penicillin-Binding Proteins) localizadas en la pared celular.
- Cebador: Secuencia corta de ADN de hebra simple que ha sido diseñada de manera artificial. Existen cebadores sentido llamados “Forward” abreviados con la letra F y cebadores antisentido, llamados “Reverse” abreviados con la letra R.
- DICER: Es una ribonucleasa de tipo III específica para doble hebra que se encarga de cortar el ARNdH endógeno (Farrell 2005).
- “Hairpins”: tipo de estructura secundaria que se forma entre dos partes complementarias de una hebra de ADN o ARN.
- Inducción: producir o causar la expresión de determinados genes.
- RISC: Complejo de silenciamiento inducido por ARN, por sus siglas en inglés. Este complejo posee varias proteínas y dominios (argonaute, dominio PAZ y PIWI). Su función es asociarse con los siRNA producidos por la proteína “DICER”. Además este complejo puede funcionar como una helicasa dependiente de ATP que separa el siRNA en dos hebras, lo cual permite el apareamiento de la hebra antisentido del siRNA con la secuencia de ARNm de interés. Luego el complejo RISC realiza un corte en el ARNm cerca del centro de la secuencia a la que se unió la hebra antisentido del siRNA (Farrell 2005).
- “Scoop”: medida de la parte interior de un asa de inoculación de 10uL.
- siRNA (ARN corto de interferencia, por sus siglas en inglés): son moléculas de ARNdH cortas, de 21 a 23 pares de bases.
- Tet: Tetraciclina, es un antibiótico que actúa como bacteriostático a dosis habituales, pero a dosis altas puede ser bactericida. Su mecanismo de acción se basa por: (1) descoplación de la fosforilación oxidativa de las bacterias, (2) inhibiendo la síntesis proteica del ribosoma principalmente de la subunidad 30S y (3) alteración de la membrana citoplasmática.