

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Análisis de expresión génica de la familia de citocromo P450
CYP6 en cepas de laboratorio de *Anopheles albimanus*
(Wiedemann) con resistencia o susceptibilidad a deltametrina

Trabajo de graduación en modalidad de **tesis** presentado por
Ana Cristina Benedict Villagrán

para optar al grado académico de Licenciada en
Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2018

Análisis de expresión génica de la familia de citocromo P450
CYP6 en cepas de laboratorio de *Anopheles albimanus*
(Wiedemann) con resistencia o susceptibilidad a deltametrina

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Análisis de expresión génica de la familia de citocromo P450
CYP6 en cepas de laboratorio de *Anopheles albimanus*
(Wiedemann) con resistencia o susceptibilidad a deltametrina

Trabajo de graduación en modalidad de **tesis** presentado por
Ana Cristina Benedict Villagrán

para optar al grado académico de Licenciada en
Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2018

Vo.Bo. Asesor Principal

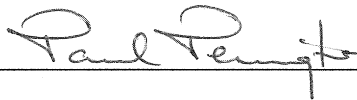


(Dra. Norma Padilla)

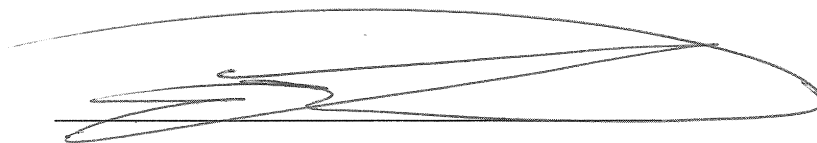
Tribunal Examinador



(Dra. Norma Padilla)



(Dra. Pamela Pennington)



(Dr. Diego Archila)

Fecha de aprobación: 19 de febrero de 2018 Guatemala

PREFACIO

En Guatemala se ha observado el desarrollo de resistencia a insecticidas, incluyendo la deltametrina, en el vector principal de la malaria, *Anopheles albimanus*. En Guatemala se ha observado el desarrollo de resistencia a insecticidas, específicamente a deltametrina, en el vector principal de la malaria, mosquito hembra de la especie *Anopheles albimanus* (Wiedemann). En ensayos realizados para la determinación del mecanismo de resistencia metabólica en otras especies de *Anophelinos* se ha reportado un aumento en la expresión y actividad de enzimas de la familia citocromo P450 CYP6. Consecuentemente, es necesario la implementación de un sistema de vigilancia de resistencia que sea rápida y eficiente. Este sistema de vigilancia debe incluir la detección de mecanismos de resistencia de manera que se pueda prevenir o prolongar la vida útil de los insecticidas. Sin embargo, el principal impedimento es la falta de las secuencias de ARNm y la identidad de los genes de la familia citocromo P450 CYP6 sobre-expresados, al igual que un ensayo que permita la detección del mecanismo de resistencia. Con base en primers degenerados diseñados para la familia de citocromo P450 CYP6 para *Anopheles gambiae* ((Ranson *et al.*, 2002a) y utilizados en *Anopheles funestus* (Amenya *et al.* 2005), se validaron *in silico* los mismos primers en *An. albimanus* por Ramírez (2009) y se validaron *in vivo* por Lol (2011). Por lo tanto, la presente investigación tuvo como objetivo realizar un análisis de expresión génica de la familia de citocromo P450 CYP6 en cepas de laboratorio de *An. albimanus* con resistencia o susceptibilidad a deltametrina mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés).

Este estudio fue financiado por la Unidad de Entomología Médica y Malaria del Centro de Estudios en Salud y el apoyo del Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala. Le agradezco a Dios por brindarme virtud y capacidad para poder completar este reto y por presentarme con tantas oportunidades y momentos de aprendizaje. Agradezco a la Dra. Norma Padilla, asesora final, por darme la oportunidad de realizar mi tesis; a Juan Carlos Lol, mi primer asesor, por todo su apoyo; a Claudia Paiz por su tiempo y comprensión en cualquier duda; a David Castañeda por compartirme su conocimiento en la parte experimental de qPCR y en el análisis de resultados; a Mabel Taracena por su apoyo moral y técnico en las últimas fases del trabajo experimental y a la Dra. Pennington por su guía en el alcance del estudio. Agradezco al personal del insectario – Martín Viteri, Pedro Peralta, Jorge Sincal, Alfonso Salam, Gustavo Augusto y Adel Mejía – por mantener las cepas del laboratorio. Reconozco a todos los mencionados anteriormente por su paciencia y por haberme guiado durante las diferentes fases de mi primera investigación. Agradezco a mis amigas – Isabella García,

Mariana López, Luisa Mejía, Madahí Mejía, Andrea Cuadra y Yaimie López – por brindarme su amistad, y el apoyo que me dieron en cualquier duda experimental, por su apoyo moral, sus consejos y por darme los ánimos de seguir adelante. Por último, agradezco a mi familia por apoyarme en este largo camino que presentó muchas dificultades y en especial a mis padres por darme el apoyo económico, el apoyo moral, por su amor incondicional y por la oportunidad de estudiar lo que quería. Le agradezco a Rodrigo Bran por su paciencia, por darme consejos, por hacerme ver los retos de una forma positiva y por su amor incondicional.

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| LISTA DE CUADROS | ix |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| ABSTRACT | xi |
| RESUMEN..... | xii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN..... | 4 |
| III. OBJETIVOS | 5 |
| IV. HIPÓTESIS | 6 |
| V. JUSTIFICACIÓN | 7 |
| VI. MARCO TEÓRICO | 9 |
| A. Situación de la malaria en el mundo y Guatemala..... | 9 |
| B. Ciclo de vida de malaria | 11 |
| C. Principales vectores de la malaria en Guatemala | 13 |
| D. Medidas de control vectorial que se utilizan en Guatemala..... | 13 |
| E. Tipos de insecticidas..... | 14 |
| 1. Piretroides..... | 14 |
| 2. Deltametrina..... | 16 |
| F. Definición de resistencia a insecticidas | 17 |
| G. Métodos de cuantificación y determinación de resistencia..... | 18 |
| H. qPCR..... | 20 |
| I. Base genética de la resistencia a insecticidas..... | 23 |
| J. Interacción entre genes | 24 |
| K. Factores que afectan el desarrollo de resistencia | 25 |
| L. Otros factores que pueden afectar el desarrollo de resistencia..... | 25 |
| M. Mecanismos de resistencia a insecticidas | 26 |
| N. Resistencia en el sitio blanco | 26 |
| O. Resistencia debido a reducción en penetración..... | 27 |
| P. Resistencia debido a modificaciones en el comportamiento..... | 27 |
| Q. Resistencia metabólica..... | 27 |
| 1. Ejemplos de resistencia metabólica..... | 28 |
| R. Uso de insecticidas en la historia de Guatemala y resistencia de insecticidas en los vectores de malaria en Guatemala | 30 |
| S. Resistencia en <i>Anopheles albimanus</i> en Guatemala | 31 |
| T. Estudios recientes sobre la resistencia de <i>An. albimanus</i> | 32 |

| | | |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| U. | Citocromo P450..... | 33 |
| 1. | Generalidades..... | 33 |
| 2. | Estructura..... | 33 |
| 3. | Mecanismo de acción..... | 34 |
| 4. | Citocromos P450 relacionados a resistencia en insectos. | 35 |
| 5. | Familia CYP6. | 36 |
| VII. | METODOLOGÍA..... | 39 |
| A. | Sitio de estudio | 39 |
| B. | Sujetos de estudio | 39 |
| C. | Tipo y tamaño de muestra..... | 40 |
| D. | Metodología..... | 40 |
| VIII. | RESULTADOS..... | 43 |
| A. | Extracción de ARN total y cuantificación de ARN total | 43 |
| B. | Gel de integridad de ARN total | 44 |
| C. | Verificación de la presencia de ADN contaminante | 44 |
| D. | Tratamiento con DNAsas..... | 45 |
| E. | Optimización de la síntesis de ADNc | 45 |
| F. | Síntesis de ADNc a partir de ARN total | 46 |
| G. | Optimización de PCR de CYP6 a diferentes temperaturas de anillamiento | 46 |
| H. | Optimización del PCR de CYP6 a diferentes concentraciones de ADNc..... | 47 |
| I. | Curvas de eficiencia con PCR tiempo real (qPCR) | 48 |
| J. | Porcentajes de eficiencia..... | 50 |
| K. | Comparación del nivel de expresión de CYP6 en la cepa RDelta y la cepa Sanarate..... | 51 |
| IX. | DISCUSIÓN | 55 |
| X. | CONCLUSIONES | 65 |
| XI. | RECOMENDACIONES..... | 66 |
| XII. | BIBLIOGRAFÍA | 68 |
| XIII. | ANEXOS | 74 |
| A. | Tratamiento de material para eliminación de RNAsas | 74 |
| B. | Extracción de ARN con TRI Reagent® Solution – Applied Biosystems Part Number AM9738..... | 77 |
| C. | Integridad del ARN por medio NanoDrop..... | 81 |
| D. | Verificación de contaminación del ARN total extraído con ADN genómico mediante un PCR con primers de actina | 83 |
| E. | Tratamiento de ARN total con RQ1 RNase-Free DNase para eliminación de ADN genómico contaminante..... | 86 |
| F. | Síntesis de ADNc..... | 89 |
| G. | Optimización de PCR con primers degenerados de la familia CYP6 | 92 |
| H. | qPCR con primers degenerados de la familia CYP6 | 95 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Modo de acción de los insecticidas acción de los insecticidas | 16 |
| Cuadro 2. Métodos de cuantificación y determinación de resistencia..... | 20 |
| Cuadro 3. Resistencia a los insecticidas | 27 |
| Cuadro 4. Citocromos P450 de <i>Anophelinos</i> africanos asociados a resistencia a insecticidas. Estos P450s son expresados de forma heteróloga y han sido validados como capaces de metabolizar de insecticidas..... | 38 |
| Cuadro 5. Citocromos de P450 de <i>Aedes</i> asociado a resistencia a insecticidas. Los P450 en negrita han sido expresados de manera heteróloga y han sido validados como capaces de metabolizar de insecticidas..... | 38 |
| Cuadro 6. Secuencia de primers de CYP6, Actina y Rsp7..... | 41 |
| Cuadro 7. Concentración y pureza de ARN total extraído de la cepa Sanarate y RDelta de <i>An. albimanus</i> | 43 |
| Cuadro 8. Optimización de la curva de eficiencia y los porcentajes de eficiencia de CYP6..... | 50 |
| Cuadro 9. Porcentaje de eficiencia de Actina y Rsp7..... | 50 |
| Cuadro 10. Valores de Cts de los qPCR de Actina, Rsp7 y CYP6 para cepa la Sanarate y RDelta | 51 |
| Cuadro 11. Conclusión de pruebas estadísticas para la comparación de medias para el análisis de expresión de CYP6..... | 53 |
| Cuadro 12. Análisis de las temperaturas de disociación del qPCR de CYP6..... | 54 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Casos de Malaria por Departamento (enero-septiembre 2013)..... | 10 |
| Figura 2. Casos reportados de Malaria en Guatemala | 11 |
| Figura 3. Financiamiento para la malaria en Guatemala, 2000-2014 | 11 |
| Figura 4. Ciclo de vida de Plasmodium sp. | 12 |
| Figura 5. Estructura del piretroide tipo I y tipo II..... | 15 |
| Figura 6. Estructura del insecticida deltametrina | 16 |
| Figura 7. qPCR con el método de TaqMan | 22 |
| Figura 8. Mecanismos de resistencia..... | 26 |
| Figura 9. Historia del uso de insecticidas en Guatemala | 31 |
| Figura 10. Regiones de importancia en las enzimas citocromo P450 y la estructura tridimensional general | 34 |
| Figura 11. Reacción general que catalizan las enzimas citocromo P450..... | 35 |
| Figura 12. Gel de agarosa para verificar la integridad de ARN total. | 44 |
| Figura 13. Verificación de la presencia de ADN contaminante en ARN total mediante un PCR de Actina | 44 |
| Figura 14. Verificación del tratamiento del ARN total con DNAsas para eliminar la contaminación de ADN genómico mediante un PCR de Actina. | 45 |
| Figura 15. Optimización de la síntesis de ADNc mediante un PCR de CYP6 | 45 |
| Figura 16. Verificación de síntesis de ADNc mediante un PCR de Actina..... | 46 |
| Figura 17. Optimización de PCR de CYP6 con diferentes temperaturas (Tms)..... | 46 |
| Figura 18. Optimización del PCR de CYP6 con diferentes concentraciones de ADNc | 47 |
| Figura 19. Curva de eficiencia de qPCR del gen de Actina | 48 |
| Figura 20. Curva de eficiencia de qPCR del gen Rsp7..... | 49 |
| Figura 21. Curva de eficiencia de qPCR de CYP6 (primers a 0.6uM) | 49 |
| Figura 22. Curvas de disociación del qPCR de CYP6 con las cepas Sanarate y RDelta de la primera réplica de ADNc | 52 |
| Figura 23. Curvas de disociación del qPCR de CYP6 con las cepas Sanarate y RDelta de la segunda réplica de ADNc | 52 |
| Figura 24. Análisis de expresión de CYP6 | 53 |
| Figura 25. Gráfico de caja y bigote del análisis de la temperatura de disociación de qPCR de CYP6.. | 54 |

ABSTRACT

Malaria is a disease caused by the protozoan *Plasmodium* sp. transmitted by the bite of infected female mosquitoes of the genus *Anopheles*. In Guatemala, the main vector is *Anopheles albimanus*, due to its high density and wide distribution in the country. In 2016, a total of 4,854 cases were reported nationwide. In Guatemala, as in other countries, the development of insecticide resistance has been observed due to their high and continuous use. Resistance has been specifically observed for deltamethrin since it is the most commonly used insecticide at the public health level. It has been reported in several species of mosquitoes - *An. funestus*, *An. gambiae* and *An. arabiensis* - that pyrethroid resistance, among these deltamethrin, is due mostly to metabolic resistance mechanisms in which monooxygenase enzymes such as cytochrome P450 enzymes are involved. Therefore, the objective of this study was to determine the level of constitutive expression of genes of the cytochrome P450 CYP6 family in laboratory strains of *Anopheles albimanus* with resistance and susceptibility to deltamethrin. To achieve the objective, amplification was carried out with qPCR with CYP6 degenerate primers designed by Amenya, 2005 and Ramírez, 2009 using complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) synthesized from total ribonucleic acid (RNA) extracted and purified from a resistant and a susceptible strain to deltamethrin. By means of Welch's T test we concluded that there is no significant difference in the level of constitutive expression of genes of the cytochrome P450 CYP6 family between the susceptible strain, Sanarate, and the deltamethrin resistant strain, RDelta generation 89. Therefore, the overexpression of this gene family is not involved in the metabolic resistance to deltamethrin in the RDelta strain, generation 89. However, the optimization of the qPCR reaction for the cytochrome P450 CYP6 family will allow the future research and the determination of the level of expression of this family with other strains of *An. albimanus* and the possibility of using it with field strains to verify the presence of metabolic resistance. Future results, subsequently, will allow the development of molecular tests, specific for the cytochrome P450 CYP6 family, for the surveillance of insecticide resistance in the main malaria vector in Guatemala.

RESUMEN

La malaria es una enfermedad causada por el protozoo *Plasmodium* sp. transmitido por la picadura de mosquitos hembras infectadas del género *Anopheles*. En Guatemala, el vector principal es *Anopheles albimanus* dado a su alta densidad y amplia distribución en el país. Solamente en el 2016, se reportaron un total de 4,854 casos a nivel nacional. En Guatemala, así como en otros países, se ha observado el desarrollo de resistencia a insecticidas debido a su alto y continuo uso. Se ha observado resistencia específicamente para deltametrina ya que es el insecticida utilizado con mayor frecuencia a nivel de salud pública. Se ha observado en varias especies de mosquitos – *An. funestus*, *An. gambiae* y *An. arabiensis* – que la resistencia a piretroides, entre estos deltametrina, se debe mayormente a mecanismos de resistencia metabólica en la cual las enzimas monooxigenasas como las enzimas citocromo P450 están involucradas. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el nivel de expresión constitutivo de genes de la familia de citocromo P450 CYP6 en cepas de laboratorio de *Anopheles albimanus* con resistencia y susceptibilidad a deltametrina. Para lograr el objetivo se llevó a cabo la amplificación con qPCR con primers degenerados de CYP6 diseñados por Ameny, 2005 y Ramírez, 2009 utilizando ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) sintetizado a partir de ácido ribonucleico (ARN) total extraído y purificado de una cepa resistente y otra susceptible a deltametrina. Por medio de la prueba T de Welch se concluyó que no hay diferencia significativa en el nivel de expresión constitutivo de genes de la familia de citocromo P450 CYP6 entre la cepa susceptible, Sanarate, y la cepa resistente a deltametrina, RDelta generación 89. Por lo tanto, la sobre-expresión de esta familia de genes no se encuentra involucrada en la resistencia metabólica a deltametrina en la cepa RDelta, generación 89. Sin embargo, la optimización de la reacción de qPCR para la familia de citocromos P450 CYP6 permitirá a futuras investigaciones la determinación del nivel de expresión de dicha familia con otras cepas de *An. albimanus* y la posibilidad de utilizarlo con cepas de campo para verificar la presencia de resistencia metabólica. Los futuros resultados, posteriormente, permitirán el desarrollo de pruebas moleculares, específicas para la familia de citocromo P450 CYP6, para la vigilancia de resistencia a insecticidas en el principal vector de malaria en Guatemala.

I. INTRODUCCIÓN

La malaria o el paludismo es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* y es transmitida por la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles* infectadas con el parásito. Aproximadamente 3.2 mil millones de personas, la mitad de la población mundial, se encuentran en riesgo de ser infectados, lo cual la convierte en una enfermedad de gran impacto. En el 2016 se registraron 4,854 casos de malaria en Guatemala, convirtiéndolo en el segundo país de Centroamérica con el mayor número de casos. Debido a la distribución de los vectores y los focos de esta enfermedad, que han variado según factores como agricultura, desastres naturales, entre otros, aproximadamente el 52% de la población guatemalteca se encuentra en riesgo de contraer malaria (WHO, 2015a, 2017).

El parásito de la malaria se transmite entre dos hospederos los cuales son el humano y el mosquito hembra de la especie *Anopheles*. Dentro de cada hospedero el parásito presenta un ciclo de vida distinto. Dentro del humano los parásitos invaden las células hepáticas donde se replican para luego ser liberados al torrente sanguíneo donde invaden los eritrocitos y continúan su crecimiento y reproducción. Al picar al humano, el mosquito se infecta con el parásito sanguíneo. Estos se replican en el intestino del mosquito y luego migran a las glándulas salivales por lo que son transmitidos cuando el mosquito pica a otro humano sano (“Parasite lifecycle | Medicines for Malaria Venture,” n.d.).

Los vectores que son responsables por la transmisión de malaria en Guatemala son *Anopheles albimanus* (Wiedemann), *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles darlingi* y *Anopheles vestitipennis* (WHO, 2015a). *An. darlingi*, *An. pseudopunctipennis*, *An. vestitipennis* se encuentran distribuidos mayormente en la parte norte del país. A comparación, *An. albimanus* es el mayor vector de malaria en Guatemala ya que se encuentran distribuidos por todo el país (OMS & OPHA, 2014).

Para combatir la enfermedad de malaria en Guatemala se han implementado varias medidas de control vectorial las cuales incluyen el uso de mosquiteros tratados con deltametrina de larga duración, el tratamiento de criaderos con *Bacillus sphaericus* y el rociado intradomiciliar focal (WHO, 2015a).

Actualmente se cuentan con cuatro tipos de insecticidas, dentro de estos se incluyen: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. Estos insecticidas tienen en común la característica de tener un efecto neurotóxico (Savolainen & Vähäkangas, 2009). Los piretroides son los insecticidas más utilizados debido a que presentan alta toxicidad a bajas concentraciones para invertebrados, pero aun así son levemente neurotóxicos para humanos. Los piretroides son los únicos insecticidas aprobados para el tratamiento de mosquiteros (Nardini, Christian, Coetzer, & Koekemoer, 2013). Existen dos tipos de piretroides, Tipo I y Tipo II,

los cuales se diferencian por su método de acción y por su estructura. Los dos piretroides más seguros son etofenprox y deltametrina, debido a que presentan la menor toxicidad a los humanos ya que se requiere de una alta dosis para causar síntomas serios de intoxicación (Croft *et al.*, 2001). La deltametrina es el insecticida de primer uso para los mosquiteros utilizados como medida de control vectorial para la malaria, aunque también se utilizan otros piretroides como permetrina y alfacipermetrina (WHO, 2015b).

Desde la implementación de insecticidas se ha observado el desarrollo de diferentes mecanismos de resistencia en mosquitos, causando ineficiencias en el control de las poblaciones e incrementando el riesgo de malaria. La resistencia puede definirse como el desarrollo de una habilidad de un organismo a tolerar dosis de un insecticida que son letales para la mayoría de individuos de una población de la misma especie (Coleman & Hemingway, 2007; Corbel & Guessan, 2013). Se encuentran varios factores que afectan el desarrollo de resistencia los cuales incluyen la frecuencia de aplicación de insecticidas, la dosis y persistencia del efecto del mismo, la tasa de reproducción y el aislamiento de la población (Austin *et al.*, 2011). Otros factores que pueden afectar el desarrollo de resistencia son el uso de insecticidas agrícolas, productos de petróleo que son utilizados como larvicidas, hidrocarburos y contaminación ambiental (Djouaka *et al.*, 2008).

Los mosquitos han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia a los insecticidas los cuales incluyen resistencia metabólica, resistencia en el sitio de blanco, reducción en penetración y resistencia por medio de variaciones en el comportamiento (Austin *et al.*, 2011). La resistencia metabólica es uno de los mecanismos más comunes que se basa en el incremento de sistemas de enzimas – esterasas, monooxigenasas y glutatión S-transferasas (GST) – que desintoxican y eliminan los insecticidas del cuerpo de los mosquitos antes de que este tenga un efecto tóxico en estos y así no pueda llegar al sitio blanco. La resistencia metabólica se ha observado en una gran variedad de vectores de malaria los cuales incluyen *Anopheles funestus*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* (Corbel & Guessan, 2013; Djouaka *et al.*, 2008; Munhenga & Koekemoer, 2011; Nardini *et al.*, 2013).

Como mencionado anteriormente la resistencia es un fenómeno que se ha observado para todos los insecticidas en todas partes del mundo. En Guatemala en los años 1978 y 1979 se evaluó el uso de deltametrina, un piretroide que presentaba dos características favorables: acción residual de larga duración y efectividad contra los anofelinos (Obispo *et al.*, 2011). No obstante, ya en 1989 se observó que la población de mosquitos de las costas de Guatemala presentaba de moderada a alta frecuencia de resistencia a deltametrina (Beach *et al.*, 1989). En 1990 se confirmó la presencia de resistencia cruzada a fenitrotion y a deltametrina en *An. albimanus* de tres poblaciones de la costa sur de Guatemala (Beach *et al.*, 1989). En 1992 se observó la resistencia en *An. albimanus* a carbamatos, resultados fueron obtenidos mediante pruebas bioquímicas o bioensayos (Brogdon *et al.*, 1992). Brogdon *et al.*, 1999, también indico la presencia de resistencia cruzada de piretroides y DDT (Brogdon *et al.*, 1999¹; Brogdon *et al.*, 1999²). En el 2013, con muestras de Guatemala, México, Nicaragua, Costa Rica, Ecuador y

Colombia, se describió por primera vez la región *kdr* en *An. albimanus* al igual que la presencia de polimorfismos los cuales se encuentran asociados a resistencia a insecticidas (Lol *et al.*, 2013).

La resistencia a insecticidas es determinada por varios métodos, los cuales incluyen bioensayos de diagnóstico con papel filtro, bioensayos de botella, ensayos bioquímicos y métodos moleculares. Los ensayos de diagnóstico de la OMS (Organización Mundial de la Salud) consisten en la exposición de mosquitos a papel filtro impregnado con insecticida a dosis diagnosticadas, este bioensayo mide la concentración mortalidad. El bioensayo de la botella CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, por sus siglas en inglés) utiliza botellas de vidrio impregnadas con insecticidas preparados con una base de acetona o alcohol absoluto, este bioensayo mide tiempo-mortalidad. A comparación, los ensayos bioquímicos son utilizados para la detección de un incremento en la actividad de sistemas de enzimas tales como las oxidasas – P450s–, GST o esterases enzimas asociadas a la resistencia a insecticidas. Finalmente, los métodos moleculares consisten en: la reacción en cadena polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) convencionales, microarreglos y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés) (Coleman & Hemingway, 2007).

La resistencia metabólica se encuentra mediada por varios grupos de enzimas entre las cuales se encuentran las enzimas citocromo P450. Las enzimas citocromo P450 también denominadas citocromo monooxigenasas, son enzimas hidrofóbicas ubicuas presentes en la mayoría de organismos vivos. Estas son de gran importancia debido a que se encuentran involucradas en una gran cantidad de procesos metabólicos endógenos y exógenos ya que presentan la capacidad de actuar sobre diversos sustratos (Bergé *et al.*, 1998; Hemingway *et al.*, 2004). Estas enzimas se encuentran presentes en procesos como la biosíntesis de varios mediadores de hormonas y participan en muchas reacciones del metabolismo a medicamentos e insecticidas. Estas enzimas también juegan un papel fundamental en mecanismos de adaptación o resistencia a químicos tóxicos presentes en las plantas que sirven de alimento para ciertos insectos (Bergé *et al.*, 1998). Se ha observado una relación entre las enzimas citocromo P450, específicamente la familia CYP6, y la resistencia principalmente metabólica para la mayoría de clases de insecticidas disponibles y en la mayoría de especies de artrópodos que son consideradas plagas (Bergé *et al.*, 1998). La resistencia por las enzimas citocromo P450 se debe a una sobre producción de la enzima la cual se puede deber a una sobreexpresión del gen que codifica la enzima (Bergé *et al.*, 1998; Hemingway *et al.*, 2004).

La información que se tiene acerca de los mecanismos moleculares y metabólicos que confieren resistencia a *An. albimanus* es muy poca. En este caso, la investigación de este vector y de la familia de genes de citocromo P450 CYP6 se vuelve imprescindible. Los resultados de este estudio y estudios posteriores permiten el desarrollo de pruebas moleculares, específicas para la familia de citocromo CYP6, y poder monitorear la resistencia a insecticidas e identificar estrategias más adecuadas para el control del principal vector de malaria en Guatemala.

II. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

A. General

1. ¿Cuál es el nivel de expresión génica de genes de la familia citocromo P450 CYP6 en cepas de laboratorio de *Anopheles albimanus* resistente a deltametrina a comparación de la cepa susceptible?

B. Específicas

1. ¿Cuál es el mejor método para el aislamiento de los ADNc de *An. albimanus* para el análisis de expresión génica?
2. ¿Cuál será la eficiencia de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) para la familia de citocromo P450 CYP6 de *An. albimanus*?
3. ¿Serán similares y comparables los porcentajes de eficiencia de qPCR para CYP6, Actina y Rsp7?
4. ¿Existe una diferencia significativa en el nivel de expresión génica de genes de la familia citocromo P450 CYP6 en cepas de laboratorio de *Anopheles albimanus* resistente a deltametrina en comparación con la cepa susceptible?

III. OBJETIVOS

A. General

1. Realizar un análisis de expresión génica de la familia de citocromo P450 CYP6 en cepas de laboratorio de *Anopheles albimanus* con resistencia o susceptibilidad a deltametrina.

B. Específicos

1. Síntesis de ADNc a partir del ARN total aislado de los genes de la familia de citocromo P450 CYP6 expresados constitutivamente en cepas de laboratorio de *An. albimanus* con resistencia o susceptibilidad a deltametrina.
2. Estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real para la familia de citocromo P450 CYP6 de *An. albimanus*.
3. Determinar si existe una diferencia significativa en el nivel de expresión constitutivo de la familia de citocromo P450 CYP6 entre cepas de laboratorio de *Anopheles albimanus* con resistencia o susceptibilidad a deltametrina por medio de PCR tiempo real.

IV. HIPÓTESIS

A. Hipótesis nula:

1. No existe diferencia significativa en el nivel de expresión constitutivo de los genes de la familia de citocromo P450 CYP6 entre las cepas de *Anopheles albimanus* con resistencia o susceptibilidad a deltametrina.

B. Hipótesis alternativa:

1. Existe diferencia significativa en el nivel de expresión constitutivo de los genes de la familia de citocromo P450 CYP6 entre las cepas de *Anopheles albimanus* con resistencia o susceptibilidad a deltametrina.

V. JUSTIFICACIÓN

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* sp., y es transmitida por la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles*, infectadas por estos parásitos. Según el reporte mundial de malaria de la OMS, un total de 214 millones casos confirmados fueron reportados para el 2015 de los cuales 438,000 resultaron en muertes (World Health Organization, 2015). En el 2016 se registraron 4,854 casos de malaria en Guatemala, convirtiéndolo en el segundo país de Centroamérica con el mayor número de casos (World Health Organization, 2015). El principal vector de malaria en Guatemala es *Anopheles albimanus* debido a que éste presenta una amplia distribución y alta densidad poblacional después de la época lluviosa. Las medidas de control vectorial en Guatemala incluyen mosquiteros tratados con deltametrina de larga duración, el tratamiento de criaderos con *Bacillus sphaericus* y el rociado intradomiciliar focal en caso de brotes (“WHO | Malaria,” 2016). Debido al alto y continuo uso de insecticidas en el país se ha observado el desarrollo de resistencia a insecticidas, como la deltametrina, ya que este es el principal insecticida utilizado. En el año 2012 la OMS lanzo el Plan Mundial para el Manejo de la Resistencia a Insecticidas en los Vectores de la Malaria, en donde uno de los pilares fundamentales, es el desarrollo de nuevas herramientas para la vigilancia de resistencia a insecticidas y establecer los mecanismos involucrados a esta (WHO, 2015a).

Para mantener la eficacia de estas medidas de control es indispensable poder monitorear la resistencia, así como identificar los mecanismos de resistencia presentes en las poblaciones de vectores. Esto permite mantener la eficacia de los insecticidas y disminuir su dispersión. Los métodos actuales para la detección de resistencia incluyen bioensayos de la OMS y bioensayos del CDC. La desventaja que tienen estas pruebas es que requieren de un tiempo extenso y de bastantes individuos para ser confiables. Los métodos moleculares que incluyen PCR y qPCR presentan la ventaja de requerir menos inversión de tiempo y poder utilizar pocos individuos. Se ha reportado en investigaciones previas la sobre-expresión de genes de las familias de citocromo P450 CYP4, CYP6 y CYP9. Sin embargo, los genes de la familia CYP4 se encuentran relacionados primordialmente a resistencia por reducción en penetración. Los genes reportados de la familia CYP9 se encuentran relacionados primordialmente con resistencia inducida en la presencia de piretroides y hay menos genes reportados para esta familia para *Anophelinos*. A comparación, se han descrito más genes de la familia de citocromos P450 en varias especies de *Anophelinos* y se ha reportado su asociación específicamente con respecto a la resistencia a deltametrina y otros piretroides como la permetrina. Por lo tanto, el presente trabajo determinó el nivel de expresión constitutivo de genes de la familia de citocromo P450 CYP6, asociados a la resistencia metabólica a deltametrina, en cepas de laboratorio de *Anopheles albimanus* con resistencia o susceptibilidad a deltametrina. Los resultados obtenidos en esta investigación permitirán establecer una

asociación de estos genes con la resistencia metabólica mediante PCR en tiempo real, con el fin de desarrollar herramientas diagnósticas que permitan el monitoreo de estos mecanismos de resistencia en poblaciones de campo.

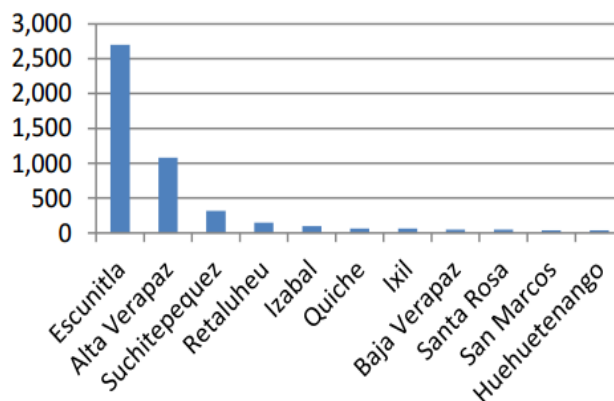
VI. MARCO TEÓRICO

A. Situación de la malaria en el mundo y Guatemala

La malaria o el paludismo es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* y es transmitida por la picadura de mosquitos hembras infectadas del género *Anopheles* (OMS & OPHA, 2014). Según un reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2015 hubo un total de 214 millones casos de malaria confirmados de los cuales resultaron en 438,000 muertes. La malaria es una enfermedad de gran impacto debido a que aproximadamente 3.2 mil millones de personas, la mitad de la población mundial, se encuentran en riesgo de ser infectados. Debido a que existe investigación continua a nivel mundial y que se han desarrollado nuevas tecnologías, se ha logrado disminuir la incidencia de malaria de poblaciones en riesgo en un 37% a nivel mundial entre el año 2000 y 2015 (“WHO | Malaria,” 2016¹). La malaria es endémica en 21 países de Latinoamérica con un total de 389,390 casos y 87 muertes reportados en el 2014. En la región de las Américas 108 millones de persona se encuentran en riesgo de contraer malaria (OMS & OPHA, 2014).

Guatemala es el segundo país de Centroamérica con el mayor número de casos de malaria, siendo estos un total de 4,854 casos en el 2016 (WHO, 2017). No obstante, se ha reportado una disminución en la incidencia de más del 75% desde el 2000 al 2015. Aproximadamente el 52% de la población guatemalteca se encuentra en riesgo de contraer malaria. Además, el 25% de esta población presenta un alto riesgo de ser infectada y cabe mencionar que en su mayoría son poblaciones rurales. Los departamentos que presentan los mayores casos de malaria son los de la costa sur del país los cuales incluyen: Escuintla, Alta Verapaz, Retalhuleu y Suchitepéquez como se puede observar en la Figura 1. (Colanta, 2016; García, Gobern, Sagastume, & Chávez, 2017; Lennon *et al.*, 2016; WHO, 2015a). En el 2013, el 41% de todos los casos de malaria en Guatemala fueron reportados en el departamento de Escuintla y fueron causados casi en su totalidad por *P. vivax*. Menos del 5% de los casos reportados fueron causados por *P. falciparum*, pero de estos todos fueron reportados en el departamento de Escuintla (WHO, 2015a). En el 2017 se han reportado muy pocos casos causados por *P. falciparum*, por lo que se ya no se considera endémico a Guatemala (Colanta, 2016; García, Gobern, Sagastume, & Chávez, 2017; Vásquez, 2016). Sin embargo, el departamento que presenta la mayor cantidad de casos de malaria sigue siendo Escuintla, representando el 66% de los casos reportados en Guatemala para 2017. El municipio con el mayor número de casos de Escuintla es La Gomera (Colanta, 2016; García *et al.*, 2017; Lennon *et al.*, 2016; WHO, 2015a)

Figura 1. Casos de Malaria por Departamento (enero-septiembre 2013)



(Performance, 2013)

La distribución de los vectores y los focos de malaria en Guatemala han ido variando dependiendo de varios factores como la agricultura y desastres naturales (WHO, 2015a). En 1990 hubo cambios en la agricultura los cuales consistieron en el remplazo de cultivos de algodón y arroz por palma africana y banano al igual que un incremento en la agroindustria de la caña de azúcar. El incremento de trabajadores y su migración alrededor del país causó un incremento en la transmisión de malaria (OMS & OPHA, 2014; WHO, 2015a). En el 2005 se obtuvo el apoyo financiero del Fondo Mundial para lucha contra el VIH/SIDA (Virus de la Inmunodeficiencia Humana/Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida), Tuberculosis y Malaria y se iniciaron programas para intensificar el control de vectores en Guatemala para reducir la transmisión de la enfermedad. Del 2005 al 2009 se vio una disminución del 82% de casos de malaria (Figura 2 y Figura 3). La Figura 2 muestra el número de casos reportado de malaria en Guatemala desde 1990 hasta el 2012. La Figura 3 muestra al apoyo financiero aportado por el Fondo Mundial, USAID, fondos del gobierno u otros fondos desde el año 2005 hasta el 2010. En el gráfico se puede observar un descenso drástico en los casos reportados de malaria a partir del 2005 lo cual se debe a la cooperación y apoyo del Fondo Mundial. No obstante, es importante mencionar que en el 2008 se cree que debido a la expansión de las plantaciones de caña de azúcar en las áreas costales del sur del país hubo un incremento en la transmisión de malaria, nuevamente debido a la migración de trabajadores y a un incremento de sitios de reproducción artificiales de mosquitos. Continuando con el apoyo financiero del Fondo Mundial en el 2010 en Guatemala se aumentó la cobertura en el uso de medidas vectoriales para el control del vector, principalmente con el uso de mosquiteros tratados con insecticidas de larga duración (MILDs) (OMS & OPHA, 2014; WHO, 2015a).

Figura 2. Casos reportados de Malaria en Guatemala

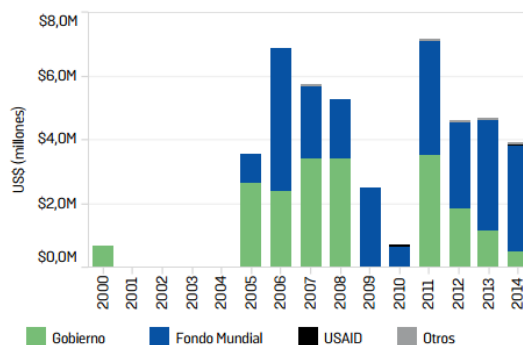


El declive rápido en los casos después de 2005 corresponde al comienzo del apoyo del Global Fund para el programa de control de Malaria en Guatemala. La vigilancia y las actividades de hallar casos an incrementado progresivamente en los últimos años, resultando en una carga relativamente estable de casos desde el 2008.

*Guatemala no distingue entre el número de casos reportados locales o importados.

(WHO, 2015a)

Figura 3. Financiamiento para la malaria en Guatemala, 2000-2014



*No se dispone de datos sobre el financiamiento para el 2001-2004, ni los fondos proporcionados por el gobierno para el 2009-2010.

(OMS & OPHA, 2014)

B. Ciclo de vida de malaria

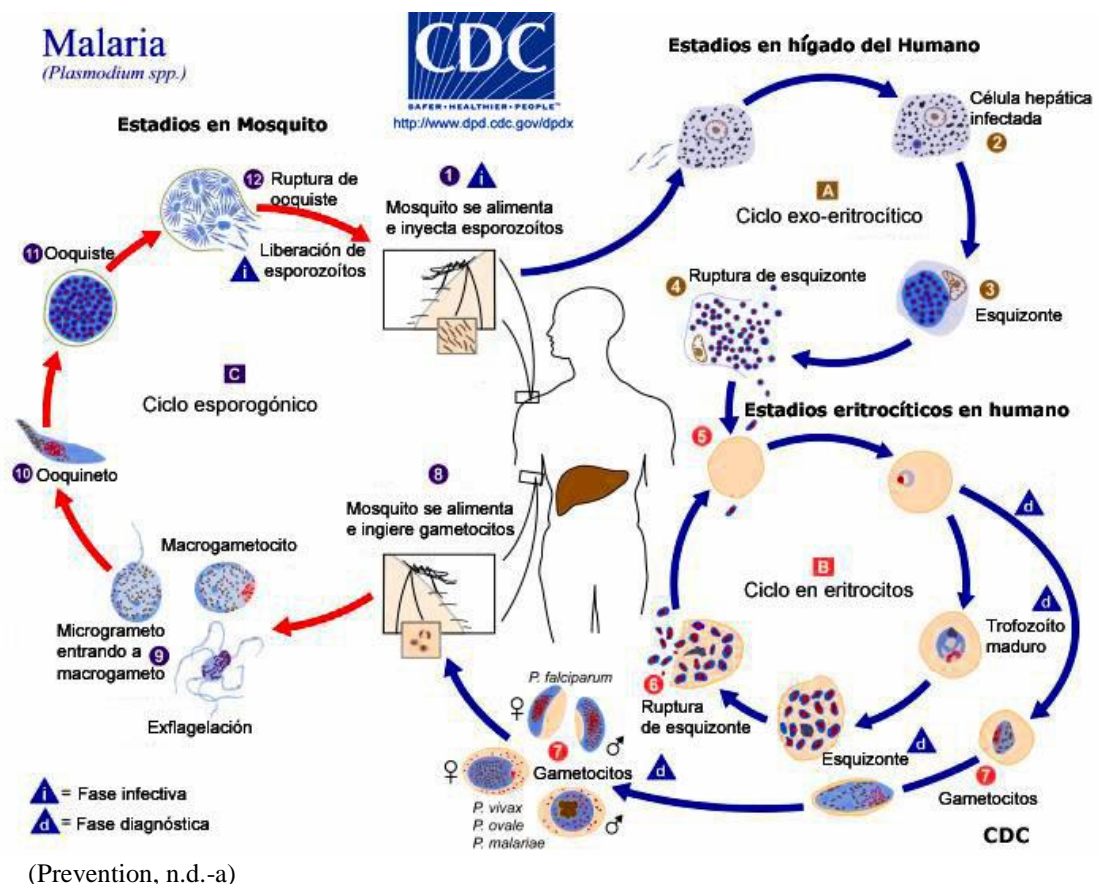
El parásito de la malaria se transmite entre dos hospederos los cuales son el humano y el mosquito hembra de la especie *Anopheles*. Dentro de cada hospedero el parásito presenta un ciclo de vida distinto (“Parasite lifecycle | Medicines for Malaria Venture,” n.d.).

En humanos los parásitos invaden primero las células hepáticas donde crecen e inician su reproducción formando esquizontes, el estadio multinucleado durante la reproducción asexual, Figura 4 pasos 1-3. Ciertas células del parásito, de las especies *P. vivax* y *P. ovale*, pueden formar hipnozoitos que permanecen en los hepatocitos como células latentes (“Plasmodium Life cycle,” 2016). Los demás parásitos en el estadio de merozoitos son liberados al torrente sanguíneo cuando se lisan los hepatocitos, Figura 4 paso 4. En el torrente sanguíneo los merozoitos invaden los eritrocitos donde continúan su crecimiento y su reproducción asexual destruyendo los eritrocitos en el proceso. La reproducción asexual en los eritrocitos da como resultado gametocitos femeninos y masculinos, denominados

macrogametocitos y microgametocitos respectivamente pasos 5 y 7 de la Figura 4. Otros merozoitos forman trofozoitos que maduran a esquizontes que luego se lisan liberando más merozoitos, pasos 5 y 6 de la Figura 4 (“Parasite lifecycle | Medicines for Malaria Venture,” n.d.; Prevention, n.d.-a).

Los gametocitos presentes en el torrente sanguíneo son el estadio que infecta a un mosquito hembra *Anopheles* no infectada cuando este se alimenta de la sangre, Figura 4 paso 8 (Josling & Llinás, 2015). Dentro del mosquito los gametocitos se fusionan formando un cigoto diploide que se convierte en ookinete, la segunda fase del ciclo de vida del parásito denominado ciclo esporogónico, Figura 4 pasos 9 y 10. Los ookinetos migran al intestino del mosquito y pasan a través de la pared intestinal formando ooquistes que sufren división mitótica produciendo esporozoítos, Figura 4pasos 11 y 12. Los esporozoítos luego migran a las glándulas salivales del mosquito donde pueden permanecer por 10-18 días. En el momento que el mosquito infectado se alimente de nuevo inyecta saliva al humano que contiene esporozoítos infectando nuevamente al humano, Figura 4 paso 1. Es de esta manera que los mosquitos hembras de la especie *Anopheles* sirven como vector del parásito que causa malaria y lo transmiten de persona a persona. Cabe mencionar que el mosquito únicamente es un vector de la enfermedad debido a que ellos no son afectados por el parásito (“Parasite lifecycle | Medicines for Malaria Venture,” n.d., “Plasmodium Life cycle,” 2016; Josling & Llinás, 2015; Prevention, n.d.-a).

Figura 4. Ciclo de vida de *Plasmodium sp.*



C. Principales vectores de la malaria en Guatemala

Los vectores que son responsables por la transmisión de malaria en Guatemala son *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles darlingi* y *Anopheles vestitipennis* (WHO, 2015a). *An. darlingi* y *An. vestitipennis* se encuentran distribuidos mayormente en la parte norte del país (OMS & OPHA, 2014). *An. pseudopunctipennis* se encuentra distribuido mayormente en la parte norte del país, pero también se ha reportado en el sur. *An. albimanus* es el principal vector debido a que presenta una amplia distribución y altas densidades en general después de la época lluviosa en todo el país (WHO, 2015a). No obstante, desde el 2009 el mayor número de casos de malaria en el sur de Guatemala se reportan durante la época seca. Se cree que este cambio estacional de la transmisión se pueda deber a la expansión de las plantaciones de caña de azúcar en el sur de país desde el 2008, incrementando el flujo de poblaciones móviles, la migración y la proliferación de sitios de reproducción del vector de origen antropogénico y artificiales (Comunicación personal, Dra. Norma Padilla). Estos vectores se encuentran infectados con dos tipos de parásito: *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* (WHO, 2015a).

D. Medidas de control vectorial que se utilizan en Guatemala

Para combatir la enfermedad de malaria se han implementado varias medidas de control vectorial (WHO, 2015a). Una de las medidas más utilizadas es el uso de mosquiteros tratados con insecticidas de larga duración (MILDs). Los mosquiteros son mayormente tratados con deltametrina y funcionan no solo como una barrera física que previene el contacto del vector con el ser humano, sino que también químicamente lo repele, lo incapacita o lo mata. Debido a su amplio uso es uno de los factores principales que ha causado la resistencia a deltametrina en poblaciones de *Anopheles* (World Health Organization, 2009). En el 2005 se inició la iniciativa de distribución de MILDs que en condiciones óptimas presentan una vida útil del insecticida de 3 años o aproximadamente 20 lavadas. Otra medida de control vectorial complementaria a los MILDs, que no se ha implementado de forma sistemática, es el tratamiento de criaderos con *Bacillus sphaericus*. Las esporas de esta bacteria producen toxinas que al ser ingeridas por las larvas de mosquitos causan la muerte de las mismas (WHO, 2015a). El rociado residual intradomiciliar focal es la última medida de control vectorial utilizada actualmente que tampoco se ha implementado de forma sistemática. El programa de rociado intradomiciliar con cobertura completa se inició desde 1956 y fue modificada posteriormente para que se implementara el rociado únicamente en los focos con mayor incidencia (WHO, 2015a). No obstante, cabe mencionar que actualmente en Guatemala se realiza el rociado residual intradomiciliar focal únicamente en la presencia de brotes (WHO, 2015a) y para reducir la transmisión en focos resilientes (Colanta, 2016). El último rociado intradomiciliar reportado, luego de muchos años de no implementar esta medida de control, fue realizado del 30 de noviembre al 21 de diciembre de 2017 en el municipio de Las Cruces, Escuintla (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2017).

E. Tipos de insecticidas

Actualmente se cuentan con cuatro familias de insecticidas que se utilizan en salud pública: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. Estos insecticidas tienen en común la característica de tener un efecto neurotóxico (Savolainen & Vähäkangas, 2009).

Los organoclorados presentan las características de ser neurotóxicos, teratogénicos, genotóxicos y carcinógenos. El mecanismo de acción de los organoclorados es afectar el sistema nervioso central, causando un estímulo repetitivo de nervios periféricos conllevando a temblores y convulsiones. Los organoclorados incluyen el diclorodifeniltricloroetano (DDT) el cual tiene una resistencia alta a la biodegradación por lo que se acumula en las cadenas alimenticias. El DDT específicamente reduce el transporte de los iones de potasio de la membrana, reduce la velocidad de cierre del canal de sodio y por ende interfiere con el transporte de sodio necesario para la repolarización nerviosa (Coleman & Hemingway, 2007; Savolainen & Vähäkangas, 2009).

Los organofosforados presentan una mayor toxicidad aguda. En humanos pueden causar riesgos a la salud a largo plazo al afectar al sistema nervioso periférico. El mecanismo de acción de los organofosforados es la inhibición irreversible de la enzima acetilcolinesterasa al fosforilarla. Esta inhibición causa la acumulación de acetilcolina conllevando a la estimulación excesiva de receptores colinérgicos causando así daño neurológico y apoptosis celular (Savolainen & Vähäkangas, 2009).

Los carbamatos también presentan una mayor toxicidad aguda. El mecanismo de acción principal de estos insecticidas es interactuar con la enzima acetilcolinesterasa bloqueando la hidrólisis de acetilcolina. Nuevamente, el exceso de acetilcolina causa una excesiva activación conllevando a espasmos nerviosos, convulsiones y finalmente la muerte (Coleman & Hemingway, 2007; Savolainen & Vähäkangas, 2009).

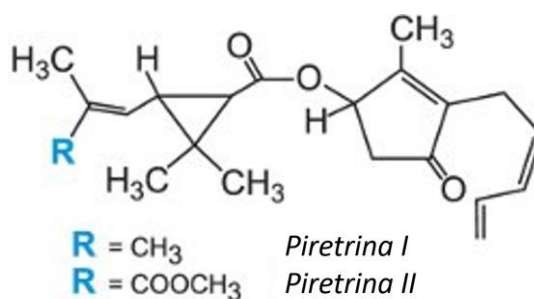
Por último, los piretroides son los insecticidas que presentan menor toxicidad para los mamíferos. El mecanismo de acción principal es por medio de modificar los canales de sodio causando fallas en el sistema nervioso de los insectos. El insecticida de interés en este estudio es le deltametrina que se encuentra dentro de este grupo de insecticidas. Por lo tanto, se profundizará sobre los usos y mecanismos de acción de los piretroides.

1. Piretroides. Los piretroides son insecticidas sintéticos que simulan a las piretrinas, las cuales son derivadas de las flores de crisantemos. Estos insecticidas sintéticos son utilizados debido a que presentan una toxicidad aguda baja, pero aun así, son levemente neurotóxicos para humanos y son los únicos insecticidas aprobados para el tratamiento de mosquiteros (Nardini *et al.*, 2013). El modo de acción de los piretroides se basa en la modificación de los canales de sodio regulados por voltaje de las células del sistema nervioso central y periférico de los insectos. Las modificaciones a este canal impiden que este se cierre, por lo cual las funciones nerviosas de los insectos se ven afectadas, causando falta de coordinación, hiperactividad, convulsiones y finalmente parálisis, con un efecto llamado

“knockdown”(Davies, Field, Usherwood, & Williamson, 2007). Los piretroides se utilizan en conjunto con un sinergista, como piperonil butoxida, en caso que se detecte resistencia, ya que estos ayudan a inhibir las enzimas encargadas de desintoxicar o degradar el insecticida en los insectos. Los piretroides también causan estrés oxidativo por medio de la inducción de la peroxidación de lípidos, la oxidación de proteínas y el agotamiento de glutatión lo cual incrementa la toxicidad de este insecticida. Las especies oxidativas de los piretroides causan daño a lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos conllevando eventualmente a la muerte celular (Davies *et al.*, 2007).

Existen dos tipos de piretroides: los Tipo I y Tipo II, los cuales se diferencian por su método de acción y por su estructura, como se puede observar en la Figura 5. Con respecto al método de acción, los piretroides tipo I causan descargas nerviosas repetitivas mientras que los piretroides tipo II producen despolarización estímulo-dependiente e inhibición neuronal (Palmquist, Salatas, & Fairbrother, 2012). Con respecto a su estructura, los piretroides tipo I no presentan un grupo ciano en la posición alfa a comparación del piretroide tipo II que si lo tiene. No obstante, cabe mencionar que esta clasificación se realizó en base a sus efectos en mamíferos ya que en insectos no se observan efectos muy distintos al ser expuestos a los dos tipos de piretroides (“National Pesticide Telecommunications Network,” n.d.; Palmquist *et al.*, 2012; Savolainen & Vähäkangas, 2009).

Figura 5. Estructura del piretroide tipo I y tipo II



(Savolainen & Vähäkangas, 2009)

Los piretroides tienen un amplio uso y son utilizados en la agricultura, horticultura y salud pública, representando el 25% de los insecticidas utilizados a nivel mundial (Cáceres, Rovira, García, & Torres, 2011). En el caso de prevención de malaria, estos son usados como insecticida para MILDs y para el rociado residual intradomiciliar. Como insecticidas, son especialmente útiles debido a que presentan un efecto rápido de “Knockdown” y tienen un potencial como insecticida alto, o alta toxicidad, a bajas concentraciones (Corbel & Guessan, 2013; Croft *et al.*, 2001). Su amplio uso también se debe a otras características las cuales incluyen: baja toxicidad en aves y mamíferos, es selectivo o específico para insectos e invertebrados, bajo potencial de bioacumulación y es capaz de ser metabolizado en los receptores de mamíferos. De igual manera los piretroides presentan bajas presiones de vapor y altos coeficientes de octanol-agua lo cual lo hace poco volátil y le da una alta afinidad a la materia orgánica,

tierra y barro. Estas características favorecen su uso, debido a que se adhiere fuertemente a las superficies reduciendo así su biodisponibilidad a organismos no objetivo e incrementando el tiempo de retención en el lugar aplicado (Palmquist, *et al.* 2012).

El Cuadro 1 a continuación presenta un resumen a grandes rasgos de los diferentes tipos de insecticidas o químicos utilizados para el control vectorial y los principales sitios blanco de acción que afectan.

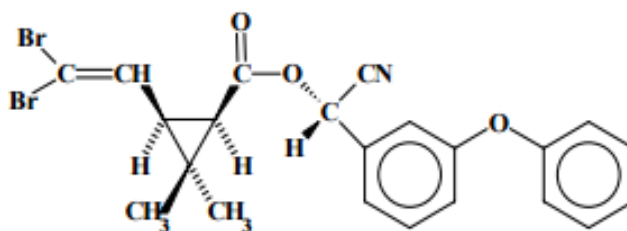
Cuadro 1. Modo de acción de los insecticidas acción de los insecticidas

| Sitio Blanco Primario | Sub-grupo químico | Ejemplos |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Acetilcolinesterasa (AChE) | Carbamatos | Bendiocarb, propoxur |
| | Organofosforados | Fenitrothion, pirimifos-metilo, malatión, temefos |
| Moduladores de canal de sodio | Piretroides y piretrinas | Alletrin, bifentrina, lambda-cialotrina, alfa-cipermetrina, deltametrina, ciflutrina, permetrina, etofenprox, fenotrina, transflutrina |
| | DDT | DDT |
| Imitador a la hormona juvenil | Piriproxifeno | Piriproxifeno |
| Disruptores microbianos de membranas de intestino de insectos | <i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i> | |
| | <i>Bacillus sphaericus</i> | |
| | | |

(Austin *et al.*, 2011)

2. Deltametrina. La deltametrina, junto con el etofenprox, son de los dos piretroides más seguros, debido a que presentan los valores más bajos de toxicidad en humanos y se requiere una alta dosis para provocar síntomas de intoxicación serios (Croft *et al.*, 2001). La deltametrina es un insecticida piretroide del tipo II que fue descrita por primera vez en 1974 y entró al mercado en 1978. Este se encuentra como compuesto activo en una gran variedad de insecticidas utilizados para el pasto, los jardines ornamentales, y en salud pública en el rociado intradomiciliario y los MILDs. La deltametrina es utilizada para matar a una gran variedad de insectos y mata por contacto o por ingesta. Al ser un piretroide presenta una baja toxicidad para mamíferos, incluyendo a los humanos, debido a la alta proporción de masa y área superficial. A comparación, es altamente tóxico para los insectos debido a su baja proporción de masa y área superficial. (“Deltamethrin General Fact Sheet,” 2010). Su mecanismo de acción es producir una despolarización estímulo-dependiente e inhibición neuronal (Palmquist *et al.*, 2012) y su estructura química se puede observar en la Figura 6.

Figura 6. Estructura del insecticida deltametrina



(“Deltamethrin General Fact Sheet,” 2010)

F. Definición de resistencia a insecticidas

Desde la implementación de insecticidas como herramienta para el manejo del control de vectores, se ha observado que diferentes mecanismos de resistencia se han desarrollado, causando fallas en el control de poblaciones vectoriales e incrementando el riesgo y propagación de distintas enfermedades, como la malaria. La resistencia puede definirse como la selección de características heredadas en una población de insecto que resulta en el fracaso recurrente de un insecticida en proveer el nivel de control deseado al ser utilizado adecuadamente (“WHO | Malaria,” 2016). También se puede definir resistencia como el desarrollo de una habilidad de un organismo a tolerar dosis de un insecticida que son letales para la mayoría de individuos de una población de la misma especie (Coleman & Hemingway, 2007; Corbel & Guessan, 2013). Es importante reconocer que los insecticidas no causan la resistencia en los mosquitos, sino que únicamente seleccionan mutaciones genéticas que ocurren naturalmente permitiendo al mosquito sobrevivir los efectos del insecticida. La resistencia se puede deber a muchos factores incluyendo la frecuencia con el cual son utilizados y las concentraciones a las cuales son expuestos los insectos. Al incrementar la frecuencia de insectos resistentes en una población se ve afectado drásticamente la eficiencia de ese insecticida por lo que tiene que ser reemplazado. No obstante, se ha observado que insecticidas con mecanismos de acción similares no pueden reemplazar adecuadamente al insecticida al cual ya se desarrolló resistencia (Austin *et al.*, 2011; Coleman & Hemingway, 2007).

Es importante reconocer que existen tres tipos de resistencia: resistencia simple, resistencia cruzada y resistencia múltiple. La resistencia simple es conferida por un único mecanismo de resistencia. La resistencia cruzada ocurre cuando el mecanismo de resistencia se ha desarrollado para un insecticida y esta es capaz de conferirle resistencia a otro insecticida. Esto puede ocurrir con insecticidas de la misma familia, por ejemplo entre piretroides, o entre distintas familias, como organofosforados y carbamatos (Austin *et al.*, 2011). Esto es más frecuente cuando los insecticidas actúan sobre el mismo sitio blanco y al momento de surgir una modificación en el sitio, esta les confiere resistencia a estos insecticidas. Un claro ejemplo de ello es la resistencia cruzada entre DDT y piretroides, ya que ambos actúan sobre el canal de sodio (Corbel & Guessan, 2013). Una mutación denominada *kdr* (*knock-down resistance*), en el canal de sodio, que le confiere resistencia a una población al DDT también puede conferirle resistencia a un piretroide sin que la población haya sido expuesta a dicho insecticida. La resistencia cruzada también se observa comúnmente entre organofosforados y carbamatos al ser alterada la enzima acetilcolinesterasa, sitio blanco de ambos (Austin *et al.*, 2011; Corbel & Guessan, 2013).

La resistencia múltiple se observa cuando una población presenta varios y distintos mecanismos de resistencia. En ciertos casos los distintos mecanismos de resistencia pueden funcionar sinérgicamente causando así la resistencia a varios insecticidas (Austin *et al.*, 2011; Corbel & Guessan, 2013). Es importante mencionar que la resistencia puede ser molecular causada por mutaciones en el sitio blanco donde se une el insecticida o debido a la sobre-expresión de enzimas metabólicas.

G. Métodos de cuantificación y determinación de resistencia

Existen varios métodos de cuantificación y determinación de resistencia los cuales incluyen bioensayos de diagnóstico con papel filtro, bioensayos de botella, ensayos bioquímicos y métodos moleculares. Es importante reconocer que los bioensayos identifican la resistencia fenotípica.

Los bioensayos de diagnóstico de la OMS consisten en la exposición de mosquitos a papel filtro impregnado con insecticida a dosis diagnosticadas. La dosis diagnóstica del insecticida corresponde a una concentración dos veces más alta a la concentración que mata al 100% de mosquitos hembras de tres días no alimentadas con sangre de una cepa susceptible. Por lo tanto, este ensayo presenta los resultados de resistencia con respecto a la concentración de insecticida y a la tasa de mortalidad. Con este método la sobrevivencia del 5% de los mosquitos expuestos indica la presencia de resistencia, evitando el riesgo de falsos positivos. No obstante, la desventaja de este método es que puede matar a individuos heterocigotos resistentes por lo que la resistencia por esta vía se detecta cuando ya es elevada en lugar de cuando está empezando a surgir. Por lo mismo no se puede implementar esta técnica para monitorear las frecuencias de genes resistentes. Otra desventaja es que no presenta ninguna indicación del tipo de mecanismo de resistencia involucrado por lo que no se puede utilizar para predecir resistencia cruzada entre insecticidas (Coleman & Hemingway, 2007).

El bioensayo de la botella del CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, por sus siglas en inglés) consiste en utilizar botellas de vidrio impregnadas con insecticidas preparados con una base de acetona o alcohol absoluto y a una dosis diagnóstica. Los mosquitos son colocados dentro de las botellas para determinar su grado de resistencia. Cabe mencionar que este ensayo tiene la ventaja de poder observar la tasa de mosquitos muertos a lo largo del tiempo de exposición. Por lo tanto, este ensayo presenta los resultados con respecto al tiempo de mortalidad. La dosis diagnóstica de insecticida corresponde a la dosis más baja que mata al 100% de los mosquitos expuestos en el tiempo más corto. Este ensayo puede utilizarse para predecir la resistencia mediada por mecanismos metabólicos si la población de mosquitos se expone previamente a un sinergista. De igual forma que los ensayos de diagnóstico de la OMS, este ensayo no puede ser utilizado para monitorear bajos niveles de resistencia al no ser lo suficientemente sensible. Cabe recalcar que la mejor manera de monitorear resistencia es detectarla cuando está comenzando a surgir y no se encuentra establecida en la población (Coleman & Hemingway, 2007).

Los ensayos bioquímicos son utilizados para la detección de un incremento en la actividad de sistemas de enzimas tales como las oxidasas -P450s-, glutatión S-transferasas (GST) o esterasas enzimas asociadas a la resistencia a insecticidas. La elevación de esterasas y GSTs se realiza por medio de una microtitulación que permite cuantificar de manera precisa los niveles de dichas enzimas utilizando un lector de placas a diferentes longitudes de onda, 340nm para GSTs. En cuanto a la detección de P450s, cuenta con una prueba de heme modificado que permite obtener una estimación a grandes rasgos sobre la expresión de P450s. Sin embargo, esta prueba presenta un grado de interpretación alto y únicamente detecta altos niveles de expresión de la enzima. Por último, se cuenta con un ensayo bioquímico que

permite identificar la resistencia del sitio blanco específicamente de las enzimas acetilcolinesterasas (AChE). Este ensayo consiste en una placa de microtitulación que contiene un análogo a carbamato. Cabe mencionar que este ensayo presenta resultados precisos y permite diferenciar entre organismos resistentes heterocigotos u homocigotos (Coleman & Hemingway, 2007).

Los métodos moleculares consisten en: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) convencional, PCR tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés) y microarreglos. Los PCRs convencionales pueden ser utilizados para la detección de mutaciones puntuales que confieren resistencia por modificación del sitio blanco del insecticida, al igual que para la detección de mutaciones en enzimas involucradas en la resistencia metabólica. Actualmente se cuentan con ensayos de PCR específicos que son utilizados para amplificar y obtener resultados sobre los receptores GABA, los canales de sodio (*kdr*) y AChE. Un PCR presenta la ventaja de poder diferenciar y detectar organismos resistentes heterocigotos y homocigotos que no logran ser detectados con otras pruebas de resistencia (Coleman & Hemingway, 2007). A comparación, el qPCR es utilizado para determinar un incremento en la transcripción de genes específicos y para genotipificar a un organismo por lo que puede ser utilizado para la vigilancia de genes asociados a resistencias metabólicas. El qPCR presenta varias ventajas entre las cuales se puede mencionar que es un método más específico, sensible y requiere de menos tiempo. Entre las desventajas de este método se resalta que presenta un costo relativamente bajo, aunque presenta un costo mayor al de PCR convencional, y debido a su alta especificidad no presenta mucha flexibilidad (Nardini *et al.*, 2013).

Los microarreglos son útiles para la identificación de grandes números de genes asociados a un fenotipo de resistencia en particular o transcritos que son únicos a un fenotipo (Nardini *et al.*, 2013). Esta tecnología se puede utilizar para determinar rápidamente genes que se encuentran sobre-expresados en una población (Coleman & Hemingway, 2007). Los resultados obtenidos por microarreglos luego son verificados por medio de clonación o mediante qPCR para confirmar la localización y la sobre-expresión del gen involucrado. Luego de esto, se realiza un tamizaje para verificar si dicho gen presenta un alelo con un polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) para poder realizar un PCR convencional de fácil utilidad en campo. La ventaja de esta técnica es que se puede realizar con insectos muertos. No obstante, la limitación de este método molecular es que es extremadamente costoso (Nardini *et al.*, 2013).

Es importante mencionar que muchas de las resistencias metabólicas se deben a un mecanismo desconocido por lo que no se encuentran ensayos alelo específicos disponibles para su fácil detección.

A continuación, se presenta la Cuadro 2 que resume los métodos de cuantificación y determinación de resistencia con sus respectivas ventajas y desventajas.

Cuadro 2. Métodos de cuantificación y determinación de resistencia

| Método | Ventajas | Desventajas |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bioensayos utilizando las dosis de insecticidas diagnóstica de la OMS | Estandarizado, simple, detecta resistencia sin importar el mecanismo de resistencia. | No presenta sensibilidad ni provee información sobre el nivel o el tipo de resistencia, se debe realizar con mosquitos vivos. |
| Bioensayos sensibles a una dosis, Bioensayo de la botella de CDC | Provee información sobre el nivel de resistencia en la población sin importar el mecanismo de resistencia. | Requiere de grandes cantidades de mosquitos vivos y los datos obtenidos de diferentes grupos no son fácilmente comparables. |
| Ensayos bioquímicos para detectar la actividad de enzimas asociados a la resistencia a un insecticida | Provee información para mecanismos específicos asociados a la resistencia. | Requiere de cadena de frío para preservar los mosquitos. No se encuentra disponible para todos los mecanismos de resistencia, sensibilidad y especificidad para detalle en ciertos ensayos. |
| Ensayos moleculares para detectar alelos resistentes | Altamente sensible. Puede detectar alelos recesivos y así proveer un “aviso” sobre futura resistencia. | Requiere de equipo especializado y costoso. Solo disponible para un número limitado de mecanismos de resistencia. |

(Corbel & Guessan, 2013)

H. qPCR

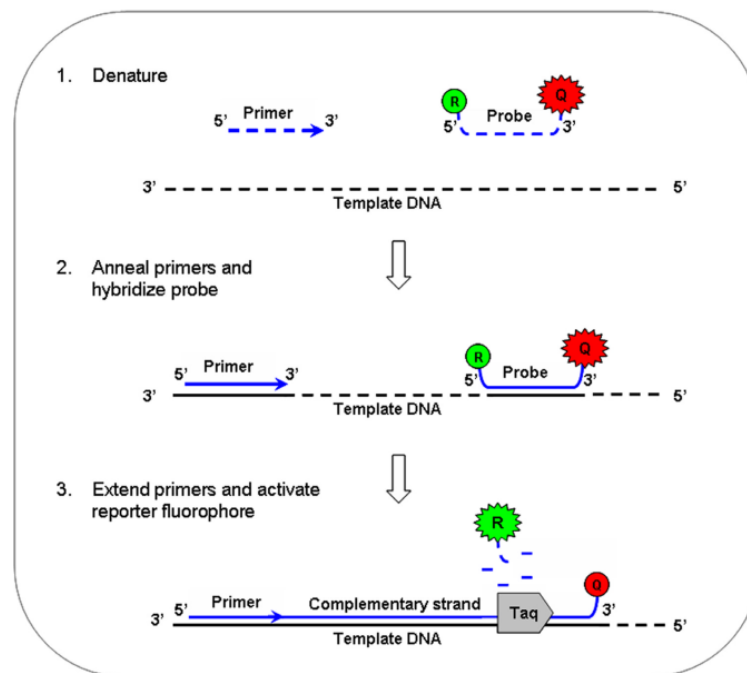
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una de las herramientas más utilizadas y más eficientes en el área de biología molecular. La herramienta de PCR en tiempo real, (qPCR, por sus siglas en inglés) permite el monitoreo de la amplificación a lo largo de toda la reacción en lugar de observar el resultado por medio de electroforesis en gel. El monitoreo a lo largo de la reacción permite determinar con alta precisión la cantidad inicial de un gen de interés presente en una muestra. En la reacción de qPCR se puede determinar la cantidad de ácido desoxirribonucleico (ADN) presente en cada ciclo por medio de tintes fluorescentes. La señal de fluorescencia es directamente proporcional al número de copias del amplicón generado. Las ventajas de qPCR son que presentan la habilidad de monitorear el proceso de una reacción mientras esta ocurre y se puede determinar con precisión la concentración del amplicón en cada ciclo por lo que se puede determinar por medio de cuantificación la concentración inicial del amplicón en la muestra con muy alta precisión. Esta técnica también presenta las ventajas de presentar un rango amplio de detección y la capacidad de realizar en un solo paso la amplificación y detección eliminando la manipulación post amplificación. Debido a estas ventajas y el poder de precisión, esta técnica es la herramienta más utilizada para la detección y cuantificación de ADN o ácido ribonucleico (ARN) (BIO-RAD, 2006; Bonab *et al.*, 2015; Pfaffl, 2006; Wang & Seed, 2016).

A pesar de que las técnicas de PCR y qPCR son muy similares hay ciertas diferencias que se deben tomar en cuenta. Uno de los factores más importantes para qPCR es que el tamaño del amplicón debe encontrarse en un rango de 50-150pbs ya que productos de mayor longitud no se amplifican de manera eficiente. Otros factores a tomar en cuenta son las características de los primers, los cuales deben presentar una longitud de 18-24 nucleótidos, los pares de primers deben de tener temperaturas de hibridación (T_m 's) con una diferencia máxima de 5°C y deben presentar un contenido de Citosinas y Guaninas (CG's) de aproximadamente el 50%. Otra diferencia que presenta el qPCR es que se utilizan reporteros fluorescentes los cuales incluyen tintes que se unen a ADN de doble hebra o moléculas de tinte las cuales se unen a los primers o a las sondas que se hibridizan con el producto de PCR durante la amplificación (BIO-RAD, 2006; Bonab *et al.*, 2015; Pfaffl, 2006; Wang & Seed, 2016).

Los ensayos más utilizados para qPCR son denominados ensayos de nucleasa 5' y los más conocidos son TaqMan y SYBR Green. Estas dos tecnologías presentan diferencias que les proveen ventajas y desventajas (BIO-RAD, 2006; Bonab *et al.*, 2015; Pfaffl, 2006; Wang & Seed, 2016).

El ensayo de TaqMan requiere de una sonda y un par de primers. Una sonda es una secuencia de nucleótidos complementaria a una región del gen de interés downstream de uno de los dos primers. La sonda debe presentar otras características las cuales incluyen: tener una temperatura de hibridación (T_m) entre 58-60, una longitud de 15-30pb y un contenido de CG's entre 30-80% (PREMIER Biosoft, n.d.). El ensayo de TaqMan se basa en un fenómeno como FRET (Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, por sus siglas en inglés). En FRET, la emisión de un tinte fluorescente, denominado reporter, puede ser reducida por la presencia de otro tinte, denominado el quencher, cuando ambos están cerca uno del otro. Estos tintes se encuentran presentes en los extremos de la sonda y al estar intacta la sonda la fluorescencia del reporter es reducida por el quencher. No obstante, cuando hay amplificación, la ADN polimerasa desaloja y degrada la sonda por lo que el quencher y el reporter son separados y el reporter emite fluorescencia la cual es captada por el equipo, esto se puede observar en la Figura 7. Este ensayo presenta mayor especificidad al gen de interés debido al uso de una sonda que también es complementaria a la secuencia del gen. De igual forma los resultados son más confiables debido a que la señal de fluorescencia únicamente se debe a la amplificación del gen de interés. La desventaja del ensayo de TaqMan es que es necesario saber la secuencia del gen de interés para el diseño adecuado de la sonda y por lo tanto también esta técnica presenta un costo mayor (BIO-RAD, 2006; Bonab *et al.*, 2015; Pfaffl, 2006; Wang & Seed, 2016).

Figura 7. qPCR con el método de TaqMan



(Rasmussen & Morrissey, 2008)

El ensayo de SYBER Green se basa en el uso de un tinte que al unirse a ADN de doble hebra (ADNdh) presenta una señal mayor de fluorescencia a comparación de cuando no se encuentra unido. Debido a esto, este ensayo no presenta la especificidad que presenta el ensayo de TaqMan ya que el tinte se puede unir a cualquier secuencia de ADNdh, no necesariamente únicamente al producto de interés. Para compensar esta inespecificidad, se hace uso de la curva de disociación, la cual indica la temperatura de desnaturalización de los productos de PCR de ADNdh. La temperatura de desnaturalización se relaciona con la longitud y la secuencia del producto, por lo que se puede utilizar para diferenciar e identificar el amplicón y verificar si corresponde al gen de interés. El gen de interés, al tener una única secuencia, presenta una temperatura de disociación (T_m , por sus siglas en inglés) específica mientras que productos alternos presentarán diferentes temperaturas de disociación. Por lo tanto, la curva de disociación de un gen de interés debe presentar únicamente un pico, angosto, simétrico y sin la presencia de anomalías como hombros, jorobas o divisiones. Cualquier anomalía indica la presencia de múltiples productos que presentan un mismo T_m o un T_m similar (BIO-RAD, 2006; Bonab *et al.*, 2015; Pfaffl, 2006; Wang & Seed, 2016).

Los experimentos que implementen la tecnología de qPCR deben de planear su diseño experimental en base al tipo de cuantificación que deseen realizar. La cuantificación absoluta se puede utilizar cuando se tiene conocimiento de la concentración exacta de una muestra y esta es utilizada para generar una curva estándar. Por medio de esta cuantificación se logra identificar la concentración de una muestra desconocida al compararla con la curva estándar. A comparación, la cuantificación relativa se utiliza en experimentos que tienen como objetivo identificar el nivel de expresión de un gen de interés en una

muestra en comparación con otra muestra. Para implementar este tipo de cuantificación se requiere de un gen, normalmente un gen de referencia, para normalizar los datos obtenidos y eliminar fuentes de variabilidad del experimento. Es importante mencionar que el gen de referencia debe de encontrarse presente a niveles consistentes en todas las muestras que se desean comparar, que presente una abundancia y una eficiencia de amplificación similar al gen de interés (BIO-RAD, 2006; Bonab *et al.*, 2015; Pfaffl, 2006; Wang & Seed, 2016).

Dentro del método de cuantificación relativa existe el método de la curva estándar relativa y el método comparativo del Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). El método de la curva estándar relativa requiere la menor validación ya que las eficiencias del gen de interés y el gen de referencia no requieren eficiencias iguales. No obstante, este método requiere que se monte la curva estándar en cada placa de muestras a analizar por lo que requiere de más reactivos y más espacio en una placa de qPCR. A pesar de esto, este método da resultados cuantitativos con alta precisión ya que los valores de muestras desconocidas son determinadas mediante interpolación de la curva estándar. Este método se utiliza cuando se quieren analizar pocas muestras y se buscan cambios de expresión leves. A comparación, el método comparativo del Ct (ΔCt) presenta la ventaja que no requiere de la corrida de curvas estándar en cada placa de muestras a analizar por lo que resulta en el uso de menos reactivos. Los requisitos para implementar este método incluyen que las eficiencias de amplificación del gen de interés y los genes de referencia sean cercanos al 100%. Se recomienda utilizar dicho método cuando se quieren analizar muchas muestras y se recomienda utilizarlo con la tecnología de TaqMan para identificar cambios pequeños en el nivel de expresión (BIO-RAD, 2006; Bonab *et al.*, 2015; Pfaffl, 2006; Wang & Seed, 2016).

La eficiencia de amplificación se refiere a la tasa de amplificación del producto de interés en cada ciclo. Una reacción presenta una eficiencia del 100% cuando la cantidad del amplicón de interés se duplica en cada ciclo de amplificación durante la fase exponencial de la reacción. Es importante reconocer que se encuentran muchos factores que pueden afectar la eficiencia de una reacción las cuales incluyen el tamaño, la estructura secundaria y el contenido de CG's del amplicón de interés. El rango aceptable de eficiencia es de 90-100%. Eficiencias menores al 90% se deben a concentraciones inadecuadas de reactivos y a la calidad de la enzima utilizada. Eficiencias mayores al 100% se deben a la presencia de contaminantes que inhiben la reacción. Inhibidores de reacciones de qPCR usualmente incluyen compuestos orgánicos, compuestos fenólicos, polvo, iones de calcio y compuestos grasos (BIO-RAD, 2006; Bonab *et al.*, 2015; Pfaffl, 2006; Wang & Seed, 2016).

I. Base genética de la resistencia a insecticidas

Los individuos que poseen mutaciones que les confieren resistencia, a uno o varios insecticidas, son capaces, y tienen mayor probabilidad, de sobrevivir la exposición a estos. Esta mutación, entonces, representa una ventaja evolutiva para el insecto, y el uso del insecticida representa la presión de selección de esta mutación. Esta mutación se hereda y se mantienen en el genoma de la descendencia, confirmando resistencia para los insecticidas a las siguientes generaciones. El uso continuo de insecticidas causa que a lo largo de las generaciones la cantidad de individuos susceptibles disminuya y por lo tanto aumento el

número de individuos resistentes dentro de la misma población. Esto causa que el alelo resistente sea más estable en la población general, que en cierto punto se fije la mutación conllevando a que todos los individuos de la población sean resistentes (Austin *et al.*, 2011; Corbel & Guessan, 2013).

Es importante mencionar que la mayoría de mecanismos de resistencia a insecticidas observados en mosquitos son mecanismos que se encuentran controlados por genes recesivos o genes semi-dominantes. En caso de un gen recesivo es necesario que ambos padres de la descendencia presenten el gen mutado o la característica que confiere resistencia, por lo que es más difícil que dicho gen se exprese en todos los individuos de una población y se vuelva estable y predominante. A comparación, con un gen semi-dominante, para que la descendencia lo presente es necesario que únicamente uno de los dos padres presente dicho gen. Esto facilita que la mutación de un gen se vuelva más común en una población. No obstante es importante reconocer que el gen es expresado parcialmente (Austin *et al.*, 2011; Corbel & Guessan, 2013).

La resistencia a insecticidas puede causar una disminución o un costo en el “*fitness*” del organismo. El “*fitness*” se refiere a la capacidad de un organismo de sobrevivir, llegar a la edad reproductiva, reproducirse y ser más susceptibles a enemigos naturales o más susceptibles a mortalidad según el clima y la temperatura. Se ha observado que un incremento en la producción de enzimas presenta un menor costo en el *fitness* a comparación de alteraciones estructurales de los genes (mutaciones puntuales asociados a resistencia con modificación del sitio blanco). Los genes de resistencia usualmente permanecen en una población únicamente cuando persiste la presión de selección o el uso del insecticida. Cuando se elimina esta presión de selección la población resistente pierde el gen de resistencia y se revierte a ser nuevamente susceptible. El proceso de reversión es uno lento y variable que depende del tipo de insecticida, los años que fue implementado, y el mecanismo de resistencia involucrado. No obstante, la reversión únicamente se observa si la mutación que confiere resistencia causa una disminución en el *fitness*. En caso de que la mutación no tenga ningún efecto sobre el *fitness* es posible que la reversión no suceda o requiera mucho más tiempo para ocurrir. Esto es algo que se observó claramente en Sri Lanka donde la resistencia en *Anopheles culicifacies* y *Anopheles subpictus* al DDT se mantuvo en el 50% de la población aun cuando se eliminó el factor de selección al discontinuar su uso por 20 años (Austin *et al.*, 2011; Corbel & Guessan, 2013).

J. Interacción entre genes

La interacción aditiva entre genes o loci pueden contribuir o afectar la resistencia observada de un individuo (Corbel & Guessan, 2013). La epistasis se refiere a la ausencia de interacción aditiva que puede incrementar la tasa de resistencia y el nivel de resistencia en una población. En *Culex pipiens quinquefasciatus* se identificó interacción entre *kdr* y P450 lo cual confería una mayor resistencia a insecticidas cuando los alelos resistentes en individuos son homocigotos o heterocigotos. Es importante reconocer que las interacciones entre genes resistentes individuales pueden ser muy complejas y pueden afectar la resistencia observada en una población por lo que su estudio es de alta importancia (Corbel & Guessan, 2013; Moore & Williams, 2005).

K. Factores que afectan el desarrollo de resistencia

Se encuentran varios factores que afectan el desarrollo de resistencia los cuales incluyen la frecuencia de aplicación de insecticidas, la dosis y persistencia del efecto del mismo, la tasa de reproducción y el aislamiento de la población (Austin *et al.*, 2011; Georghiou & Taylor, 1977).

La frecuencia de aplicación de insecticidas es importante debido a que esta favorece la selección de la población resistente. La dosis y la persistencia también son importantes dado a que estos incluyen en la duración en tiempo del insecticida y por ende la cantidad de generaciones que afectará y seleccionará la población resistente (Austin *et al.*, 2011; Corbel & Guessan, 2013; Georghiou, 1994).

Otro aspecto que influye en el desarrollo de resistencia es la tasa de reproducción del insecto. En este caso, los mosquitos tienen un ciclo de vida de 10-14 días, un ciclo de vida relativamente corto (Prevention, n.d.-b). Entre menor es el tiempo de vida, mayor es la tasa de dispersión de los genes de resistencia a través de la población. La fecundidad de los mosquitos también tiene un gran efecto sobre el desarrollo de resistencia dado que cada hembra puede ovopositar miles de huevos en su vida reproductiva, miles de generaciones y cada una seleccionada por el insecticida (Austin *et al.*, 2011; Corbel & Guessan, 2013; Georghiou, 1994).

Por último, el aislamiento de la población también afecta el desarrollo de resistencia. Entre más aislada se encuentra la población atacada con el insecticida menor tiempo es necesario para que la resistencia se establezca y se distribuya por toda la población. No obstante, si la población no se encuentra aislada individuos susceptibles causan que se diluyan los genes de resistencia en la población total (Austin *et al.*, 2011; Corbel & Guessan, 2013; Georghiou, 1994).

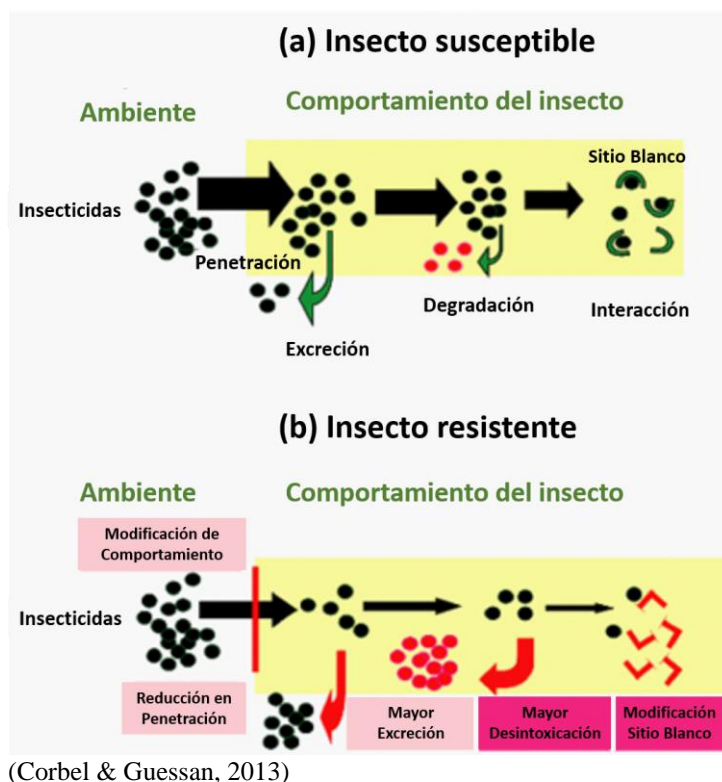
L. Otros factores que pueden afectar el desarrollo de resistencia

Otros factores que pueden afectar el desarrollo de resistencia son el uso de insecticidas agrícolas, productos de petróleo, hidrocarburos y contaminación ambiental. Los insecticidas agrícolas contaminan los sitios de reproducción de mosquitos y pueden inducir la resistencia en larvas. Los productos de petróleo son utilizados como larvicidas debido a que presentan un bajo costo y son más accesibles que los insecticidas comerciales. El mecanismo de acción de estos productos es por medio de causar toxicidad en contacto, no obstante, al ser utilizado en concentraciones no letales fácilmente induce resistencia. Los hidrocarburos son productos que presentan similitudes estructurales a los piretroides y podrían ser un agente potencial que induce la resistencia en mosquitos. Los contaminantes ambientales también afectan el desarrollo de resistencia debido a mala sanidad y el uso de otros productos como repelentes e insecticidas en la forma de atomizadores y el uso de incienso espiral repelente de mosquitos. El uso de xenobioticos también puede inducir la resistencia a insecticidas específicamente de piretroides como permetrina (Djouaka *et al.*, 2008).

M. Mecanismos de resistencia a insecticidas

Los mosquitos han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia a los insecticidas los cuales incluyen resistencia metabólica, resistencia en el sitio de blanco, reducción en penetración y resistencia por medio de variaciones en el comportamiento (Austin *et al.*, 2011). Estos se pueden observar en la Figura 8, donde la Figura “a” muestra a un mosquito susceptible mientras que la Figura “b” muestra los mecanismos que se llevan a cabo en un mosquito resistente (Corbel & Guessan, 2013).

Figura 8. Mecanismos de resistencia



N. Resistencia en el sitio blanco

La resistencia en el sitio blanco es el segundo mecanismo de resistencia más común. Esta resistencia se observa cuando hay cambios a nivel de aminoácidos en el sitio donde se unen los insecticidas, comúnmente en el sistema nervioso, resultando en mutaciones puntuales no silenciosas (Corbel & Guessan, 2013). Al ser modificado el sitio blanco, ya no se une efectivamente el insecticida y esto permite que los mosquitos sean resistentes o menos susceptibles. Los sitios blancos que comúnmente sufren mutaciones o modificaciones son la acetilcolinesterasa – blanco de organofosforados y carbamatos – y el canal de sodio que da el fenotipo knockdown resistance (*kdr*) – blanco de DDT y piretroides (Austin *et al.*, 2011). Es por la mutación *kdr* que comúnmente se observa resistencia cruzada entre DDT y piretroides.

Cuadro 3. Resistencia a los insecticidas

| Insecticidas | Blanco molecular | Mecanismos de Resistencia | |
|-----------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------|------------------------------------------|
| | | Sitio Blanco | Mecanismos enzimáticos |
| Piretroides, Tipo I y Tipo II | Canal de sodio | Mutaciones <i>kdr</i> | Monooxigenasas + esterasas |
| Organoclorados | Canal de sodio | Mutaciones <i>kdr</i> | Glutación S-transferase + monooxigenasas |
| Carbamatos | Acetilcolinesterasa | Mutación <i>Ace1^R</i> | |
| Ciclodienos, lindano, fosfatos bicíclicos, Fenilpirazoles | Receptor GABA | Mutación <i>Rdl</i> | Glutación S-Transferasas |

(Corbel & Guessan, 2013)

O. Resistencia debido a reducción en penetración

La resistencia debido a una reducción en penetración se debe a modificaciones en la cutícula o el tracto digestivo del mosquito que previenen o minimizan la absorción de los insecticidas. Estos dos mecanismos afectan, al igual que la resistencia metabólica, la acción tóxica de más de un insecticida (Austin *et al.*, 2011). En el caso de vectores de malaria, los insecticidas colocados principalmente sobre superficies o mosquiteros entran en contacto y son absorbidos por los apéndices del insecto por lo que un incremento en el grosor de la cutícula torsal puede conferir resistencia (Corbel & Guessan, 2013).

P. Resistencia debido a modificaciones en el comportamiento

Por último, la resistencia debido a modificaciones en el comportamiento son aquellas en las cuales el mosquito cambia su comportamiento de picada o reposo para evitar los efectos letales de los insecticidas (Austin *et al.*, 2011). Los cambios en el comportamiento se pueden clasificar en dos: excitación por contacto y repelencia espacial sin contacto. Excitación por contacto se refiere al comportamiento de los mosquitos que causa que al tener un breve contacto con superficies tratadas con insecticidas el mosquito rápidamente se retire del hogar sin picar. Este fenómeno observado y se ha reportado para poblaciones de *Anopheles quadrimaculatus*. En el caso de la repelencia espacial sin contacto, este ocurre cuando un mosquito se aleja de una superficie tratada con insecticida antes de tener contacto directo con la misma (Austin *et al.*, 2011).

Q. Resistencia metabólica

La resistencia metabólica es uno de los mecanismos más comunes que se basa en el incremento de sistemas de enzimas – esterasas, glutación S-transferasas (GST) y monooxigenasas– que desintoxican y eliminan los insecticidas del cuerpo de los mosquitos antes de que este llegue al sitio blanco y tenga un efecto tóxico. La resistencia metabólica se ha observado en mosquitos para los cuatro principales tipos de insecticidas mencionados anteriormente (Austin *et al.*, 2011; Corbel & Guessan, 2013).

Las esterasas, al ser sobre expresadas, confieren resistencia a organofosforados y levemente a piretroides (Coleman & Hemingway, 2007; Corbel & Guessan, 2013; Djouaka *et al.*, 2008). A

comparación, las GSTs se encuentran primordialmente involucradas en resistencia a DDT, piretroides y organofosforados (Coleman & Hemingway, 2007; Corbel & Guessan, 2013; Djouaka *et al.*, 2008). Por último, las citocromo P450 confieren mayormente resistencia a piretroides y carbamatos pero también confieren una resistencia leve a organofosforados y organoclorados (Coleman & Hemingway, 2007). Se ha observado que hay cuatro familias de P450 involucradas en mecanismos de resistencia: *CYP4*, *CYP6*, *CYP9* y *CYP12* (Munhenga & Koekemoer, 2011).

Es importante mencionar que el aumento en la actividad enzimática de las familias de enzimas involucradas en la resistencia a insecticidas puede ocurrir por cuatro vías. La sobre-expresión de una familia de enzimas se puede deber a un aumento en la transcripción de una única copia del gen o una duplicación o triplicación del gen. También, se ha observado un incremento en el metabolismo sin un incremento en la expresión de esterasas debido a una estructura alterada que permite metabolizar el insecticida a una tasa mucho mayor. Por último, se encuentra la posibilidad de que ocurra una mutación en el sitio blanco de una enzima que previamente no metabolizaba el insecticida que cause que logre metabolizarlo (Coleman & Hemingway, 2007; Corbel & Guessan, 2013).

1. Ejemplos de resistencia metabólica. La resistencia metabólica se ha observado en una gran variedad de vectores de malaria los cuales incluyen *Anopheles funestus*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis*.

Resistencia metabólica observada en *Anopheles funestus*

En el 2005 se reportó el aislamiento y la secuenciación de genes de citocromos P450 sobre-expresados en una cepa resistente a piretroides de mosquitos *An. funestus*, vector principal de malaria en Sur África y el sur de Mozambique. Se estudiaron específicamente genes de las familias *CYP4*, *CYP6* y *CYP9* ya que se ha observado que estas están implicadas en la resistencia a insecticidas en *An. gambiae*. Este estudio demostró que hay una similitud muy alta en estos genes entre *An. funestus* y *An. gambiae*. Esta similitud es explicada por la necesidad de tener enzimas desintoxicantes que ayudan a los mosquitos a sobrevivir o enfrentar la exposición a toxinas en su medio ambiente (Amenya *et al.*, 2005). En el 2010 se realizó un estudio nuevamente con *An. funestus* de Mozambique y se observó una resistencia muy elevada a piretroides, a carbamatos y a bendiocarb. El principal mecanismo de resistencia a piretroides fue asociada a una sobreexpresión de genes P450, específicamente *CYP6P9a* y *b*, enzimas que logran metabolizar piretroides tipo I y tipo II (Corbel & Guessan, 2013). En el caso de la resistencia a carbamatos, esta se debe probablemente a una alteración de la enzima acetilcolinesterasa y a un aumento en los niveles de los P450 (Cuamba *et al.*, 2010).

Resistencia metabólica observada en *Anopheles gambiae*

En el sur de África se ha reportado resistencia en *An. gambiae* a las cuatro clases de insecticidas. En el 2008, Djouaka *et al.* reportó la sobre-expresión en enzimas citocromo P450s, específicamente *CYP6P3* y *CYP6M2*, en poblaciones de *An. gambiae* resistentes a diferentes piretroides en el sur de Benin y en

Nigeria. Se analizaron cuatro poblaciones de mosquitos de Akron, Gbedjromede, Ojoo y Orogun. Como se ha mencionado anteriormente, para todas las poblaciones se observó un nivel de expresión mayor para los genes P450s *CYP6P3* y *CYP6M2* y se reportó que estos tienen la capacidad de metabolizar los piretroides permetrina, deltametrina y cipermetrina *in vitro* (Djouaka *et al.*, 2008). Es importante mencionar que la sobreexpresión de los genes que le confieren resistencia a *An. gambiae* en este estudio son sobre-expresados constitutivamente y no son inducidos al exponer a los mosquitos a los insecticidas.

Otros estudios demostraron que *CYP6Z1* logra metabolizar DDT pero no piretroides; *CYP6Z2* logra unirse a permetrina y cipermetrina, pero no logra metabolizar estos insecticidas; *CYP6M2*, *CYP6P3* y *CYP6Z2* codifican enzimas que logran unirse a los piretroides tipo I y tipo II, pero únicamente *CYP6P3* y *CYP6M2* logran metabolizarlos (Corbel & Guessan, 2013).

Otro estudio realizado en 2005 con *An. gambiae* utilizando microarreglos identificó resistencia a permetrina mediada por 77 esterasas diferencialmente expresadas, un gen de citocromo P450 *CYP3I4A1*, al igual que peptidasas, intercambiadores de sodio y calcio y genes implicados en el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Vontas *et al.*, 2005).

Resistencia metabólica observada en *Anopheles arabiensis*

Para la especie de *Anopheles arabiensis* se han realizado varios estudios para identificar mecanismos de resistencia. En el 2011 se realizó un estudio con una cepa de laboratorio resistente a permetrina con el objetivo de determinar los genes de citocromo P450s que se encuentran implicados en dicha resistencia. Se determinó que específicamente los genes *CYP6Z1*, *CYP6Z2* y *CYP6M2* se encuentran sobre-expresados, los cuales también han sido asociados a la resistencia a permetrina en *An. gambiae* y resistencia piretroides (Munhenga & Koekemoer, 2011).

En el 2013 se reportó resistencia a piretroides en *Anopheles arabiensis* en todo el archipiélago de Zanzibar, Tanzania (Jones *et al.*, 2013). La resistencia a lambda-cialotrina y a deltametrina se vio mediada en parte por una sobre-expresión de citocromos P450s, específicamente el gen *CYP4G16*. Este gen presenta corte y empalme alternativo con cuatro transcritos localizados en el cromosoma X y se encuentra extremadamente conservado entre *An. arabiensis* y *An. gambiae*. El gen *CYP4G17* también se encontró sobre-expresado en *An. arabiensis* resistente a piretroides. Se cree que esta resistencia se debe en parte a alteraciones en la cutícula del mosquito y se ha observado que los genes *CYP4G* catalizan el paso final de la síntesis de hidrocarburos cuticulares lo cual provee a los mosquitos con una capa protectora impermeable (Jones *et al.*, 2013).

Otro estudio realizado en el 2013 con *An. arabiensis* resistente a DDT y a piretroides, específicamente permetrina, demostró que había un aumento en la transcripción de genes de citocromos P450s, genes redox y genes que codifican para las glutatión s-transferasas, específicamente los genes *CYP6AG2*, *CYPZ1*, *TPX2*, *CYPZ2* y *CYP6P1* (Nardini *et al.*, 2013). La mayoría de estos genes también se observaron sobre-expresados en una cepa que presenta resistencia cruzada a DDT y deltametrina

(Nardini *et al.*, 2013). La resistencia a deltametrina se cree haber desarrollado *de novo* debido a los mecanismos de resistencia contra DDT. El gen *CYP6Z1* también han sido identificados sobre-expresado específicamente en una cepa de *An. arabiensis* resistente a deltametrina (Nardini *et al.*, 2013).

En el 2011, Liu *et al* reportó la sobre-expresión de múltiples genes de citocromos P450 constitutivos e inducidos en una población de mosquitos *Culex quinquefasciatus* resistentes a permetrina (Liu *et al.*, 2011). Se encontró una correlación fuerte entre el nivel de expresión de los genes de citocromos P450 y el nivel de resistencia a permetrina. Se observó que en adultos el gene *CYP6AA7* fue el único de los genes estudiados que presentó una sobre-expresión significativa al realizar un análisis tejido específico. Se reportó una sobreexpresión del mismo en el tórax y una mayor sobre-expresión en el abdomen. No obstante, se observó una mayor expresión de los genes *CYP6AA7*, *CYP9J34* y *CYP9M10* al ser inducidos con permetrina (Liu *et al.*, 2011).

R. Uso de insecticidas en la historia de Guatemala y resistencia de insecticidas en los vectores de malaria en Guatemala

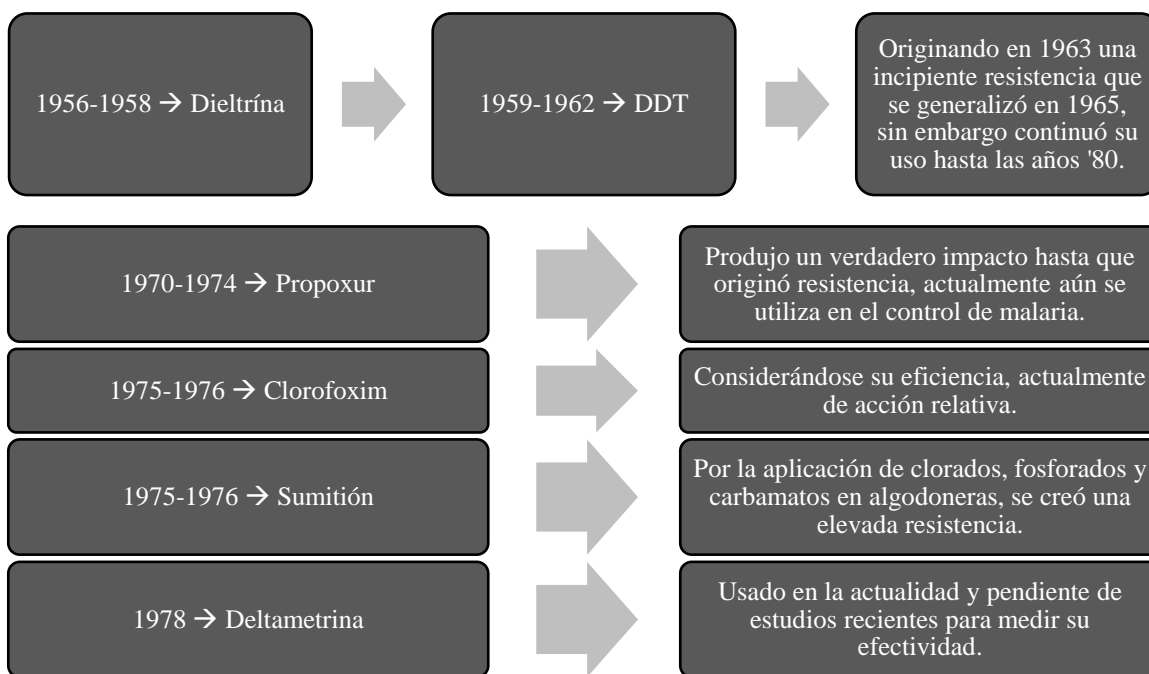
En 1874 se dio a conocer el DDT y este se introdujo para el control de plagas, específicamente para las plantaciones de algodón en Guatemala en el año 1950 (Obispo *et al.*, 2011). En 1959 se inició un programa para la aplicación prolongada de DDT semestralmente por parte de Salud Pública específicamente en las regiones de Petén, Izabal, Quiché y Alta Verapaz para el control de la malaria. Sin embargo, en 1962 se comenzó a observar resistencia moderada al DDT en especies de anofelinos y en 1965 esta resistencia elevada ya se encontraba generalizada en todas las especies. Se cree que esta resistencia elevada observada se debe al uso ilimitado de organoclorados para el cultivo de algodón que inició en 1950. A pesar de esta resistencia se continuó el uso de DDT para el rociado intradomiciliar en áreas donde la resistencia se consideraba moderada. Por otro lado, en 1974 se instituyó la Ley Reguladora la cual disminuyó la importación, elaboración, almacenamiento, transporte, venta y uso de pesticidas como el DDT. El Decreto No. 43-74, 23.7.1974 específicamente dictaba la reducción gradual del DDT en un 20% de disminución anual. De esta forma se esperaba que en 1980 se llegara a prohibir el uso total del DDT (Obispo *et al.*, 2011).

En marzo de 1971 se inició el uso del carbamato Propoxur, insecticida que posee alto poder residual y sirve como fumigante (Obispo *et al.*, 2011). No obstante, en 1974 se comenzó a observar resistencia alta en especies endofílicas anofelinas. Debido a esta observación se comenzó el uso de Clorofoxim y Fenitrothion en los años 1975 y 1976. Para 1978 se observó nuevamente resistencia alta en anofelinos a los organoclorados, fosforados y carbamatos específicamente en áreas de cultivo de algodón (Obispo *et al.*, 2011). Con respecto al fenitrothion se observó que la resistencia también era causada por la insensibilidad de la enzima acetilcolinesterasa que es responsable por la resistencia cruzada a organofosforados en 1988 (Beach & Brogdon, 1990; Patton & Liston, 1992).

Cabe mencionar que en los años 1978 y 1979 se observó una resistencia cruzada al DDT de un 90% (Obispo *et al.*, 2011).

La Figura 9, demuestra un resumen de la historia del uso y resistencia a insecticidas utilizados en Guatemala a partir de 1956 hasta 1978.

Figura 9. Historia del uso de insecticidas en Guatemala



(Obispo *et al.*, 2011)

Es importante mencionar que de las tres medidas de control vectorial únicamente dos implementan el uso de insecticidas: el rociado intradomiciliario focal y el uso de mosquiteros tratados con insecticidas de larga duración (MILDs). Es importante mencionar que el rociado intradomiciliario focal no se ha realizado de forma sistemática por lo que no es uno de los principales factores de selección que influye en la resistencia observada. La distribución de MILDs se ha implementado de una forma más sistemática, aunque no en su totalidad, en ciertas regiones del país que presentan la mayor incidencia de casos de malaria. Sin embargo, se considera que el uso de MILDs es la medida de control vectorial que más influye en la resistencia observada en las diferentes especies de mosquitos. No obstante, el uso de insecticidas en el sector agrícola sigue siendo el mayor factor de selección de resistencia (Comunicación personal, Dra. Norma Padilla).

S. Resistencia en *Anopheles albimanus* en Guatemala

En los años 1978 y 1979 se evaluó el uso de deltametrina, un piretroide que presentaba dos características favorables: acción residual de larga duración y efectividad contra los anofelinos (Obispo *et al.*, 2011).

En 1989 se observó que la población de mosquitos de las costas de Guatemala presentaba moderada a alta frecuencia de resistencia a deltametrina, el cual presentaba correlación con las frecuencias de resistencia observadas para fenitrotion (Beach *et al.*, 1989).

En un estudio publicado en 1990, Richards reportó que el 95% de los mosquitos de *An. albimanus* de campo, cerca de Los Amates, Izabal, estudiados presentaban susceptibilidad a los piretroides, incluyendo la deltametrina. Estos resultados fueron obtenidos por medio de ensayos de botella de la OMS (Richards *et al.*, 1994).

En 1990 se confirmó la presencia de resistencia cruzada a fenitrotion y a deltametrina en *An. albimanus* de tres poblaciones de la costa sur de Guatemala, causada por resistencia metabólica específicamente por B-esterasas, específicamente carboxilesterasas (clasificación Aldridge) (Beach *et al.*, 1989). En este año también se observó la resistencia a piretroides en *An. albimanus*, de Tecojate, Guatemala, debido a un aumento en la actividad de citocromos P450. Cabe mencionar que para este año únicamente se conocía que la resistencia a piretroides era mediada por knockdown resistance (*kdr*) y mecanismos oxidativos (Beach *et al.*, 1989; Brogdon & Barber, 1990).

En 1992 se observó la resistencia en *An. albimanus* a carbamatos mediado por la insensibilidad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), que por el momento es el único mecanismo de resistencia descrito. Estos resultados fueron obtenidos mediante pruebas bioquímicas o bioensayos (Brogdon *et al.*, 1992).

Brogdon *et al.*, 1999, también indicó la presencia de resistencia cruzada de piretroides y DDT obtenido por medio del mecanismo de oxidasas, incluyendo las citocromo P450s. También se observó que la permetrina, un piretroide, selecciona niveles más altos de oxidasas y mayor actividad de esterasas (Brogdon *et al.*, 1999; Brogdon *et al.*, 1999).

En el 2013, con muestras de Guatemala, México, Nicaragua, Costa Rica, Ecuador y Colombia, se describió por primera vez la región *kdr* en *An. albimanus* al igual que la presencia de polimorfismos los cuales se encuentran asociados a resistencia a insecticidas. Se descubrieron alelos homocigotos del gen de *kdr* asociados a la resistencia a insecticidas lo que sugiere que la resistencia cruzada a piretroides y a DDT observada en el pasado se podrían deber al mecanismo de *kdr* (Lol *et al.*, 2013).

T. Estudios recientes sobre la resistencia de *An. albimanus*

Uno de los principales vectores de malaria en México, así como en Guatemala, es *Anopheles albimanus* por lo que se han realizado varios estudios sobre la resistencia que esta especie presenta a varios insecticidas y los mecanismos involucrados (Penilla *et al.*, 2006). En el 2006 se realizó un estudio con mosquitos de tres diferentes pueblos y se observó un aumento en la actividad enzimática de la enzima glutatión S-transferasa en poblaciones resistentes a DDT. La resistencia a DDT, en general, se debe a una sobre-expresión de GSTs, la presencia de *kdr* y acierto grado P450s. Estos mecanismos producen resistencia cruzada a organofosforados y a piretroides. Es importante mencionar que *An. albimanus* es

una población panmíctica, lo cual significa que hay un alto grado de apareamiento aleatorio entre distancias de aproximadamente 130km, lo cual incrementa significativamente la diversidad de esta especie (Penilla *et al.*, 2006). En el 2007 se realizó otro estudio en el sur de México para determinar mecanismos de resistencia en *An. albimanus*. Se observó alta resistencia a DDT y alta resistencia a deltametrina mediadas por niveles altos de GST, citocromo P450s y esterasas. Estos mecanismos explican la resistencia que se encuentra a DDT y a piretroides. De igual manera se identificó que la resistencia a deltametrina se ve principalmente mediado por un alto contenido de citocromos P450 y elevados niveles de esterasas (Dzul, 2007).

Estudios recientes en Panamá identificaron resistencia de *Anopheles albimanus* a organofosforados, carbamatos y piretroides. Se observó resistencia a cipermetrina, lambdacihalotrina, ciflutrina y deltametrina por medio de bioensayos. Este artículo relata también como se ha observado la resistencia en Guatemala a DDT, permetrina y malatión indicando la importancia de vigilar la aparición de resistencia (Cáceres *et al.*, 2011).

U. Citocromo P450

1. Generalidades. Las enzimas citocromo P450, también denominadas citocromo monooxigenasas, son enzimas hidrofóbicas ubicuas presentes en la mayoría de organismos vivos. Estas enzimas contienen un grupo hemo y se encuentran presentes en las membranas internas de las mitocondrias en eucariotas (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). El nombre citocromo P450 se debe a la característica que al ser reducidas o saturadas con monóxido de carbono presentan la capacidad de absorber luz visible a 450nm (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2003; Bergé *et al.*, 1998; Groves, 2015; Hemingway *et al.*, 2004). Estas son de gran importancia debido a que se encuentran involucradas en una gran cantidad de procesos metabólicos endógenos y exógenos ya que presentan la capacidad de actuar sobre diversos sustratos (Bergé *et al.*, 1998; Hemingway *et al.*, 2004). Estas enzimas se encuentran presentes en procesos como la biosíntesis de varios mediadores de hormonas y participan en muchas reacciones del metabolismo a drogas, medicamentos e insecticidas.

2. Estructura. Las enzimas citocromo P450 se encuentran clasificadas en cuatro clases. La clase I se caracteriza por necesitar de una redoxina de sulfuro de hierro y una reductasa que contiene dinucleótido flavina adenina (FAD, por sus siglas en inglés). La clase II presenta enzimas que requieren únicamente de reductasas P450 que contienen FAD y/o mononucleótido flavin (FMN, por sus siglas en inglés) para la transferencia de electrones. La clase III contiene enzimas que son auto suficientes y no requieren de ningún donante de electrones. Por último, la clase IV requiere de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, por sus siglas en inglés) para recibir electrones (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

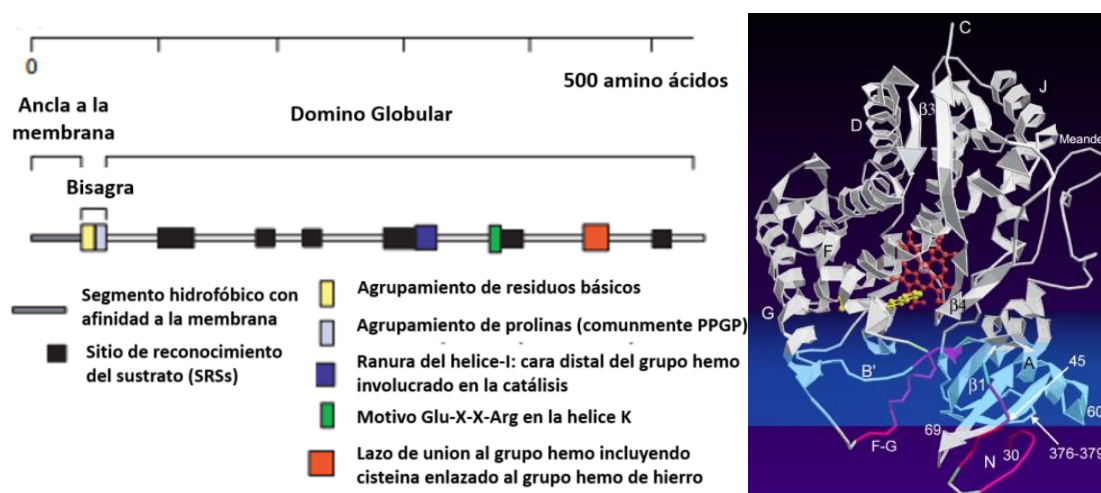
Es importante mencionar que las P450 presentan menos del 20% de similitud, entre estas la presencia de tres amino ácidos completamente conservados. A pesar de esto, estas enzimas presentan una

conservación muy alta en su plegamiento, donde el sitio estructural más conservado es el centro de la proteína donde se encuentra el grupo hemo. Esta estructura es conservada debido a la transferencia de electrones y protones y a la activación de oxígeno que lleva a cabo la enzima (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

El centro conservado se encuentra compuesto por cuatro haces de hélices – D, E, I y L –, por dos hélices – J y K –, dos conjuntos de hojas beta y un resorte conglomerado denominado “meander”. Todas estas regiones se involucran en la formación de varias estructuras. El lazo de unión al grupo hemo, presente en la cara proximal del grupo hemo, que presenta la secuencia consenso (Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly) contiene una cisteína conservada en todas las enzimas la cual tiene la función de ser el quinto ligando del grupo hemo con hierro. Luego de esto se observa el motivo conservado Glu-X-X-Arg dentro de la hélice K la cual le da estabilidad a la estructura central. Por último, se encuentra el hélice I, en la parte central, que presenta la secuencia Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser, y que es responsable por la transferencia de protones entre el grupo hemo (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). La estructura general y estas regiones conservadas se pueden observar en la Figura 10, al igual que la estructura tridimensional de los citocromos P450 en general.

Las regiones variables de estas enzimas se encuentran en el canal que presenta acceso al sustrato y el sitio catalítico denominado sitios de reconocimiento de sustrato (SRSs por sus siglas en inglés). Estas regiones son altamente flexibles para favorecer la unión del sustrato y así llevar a cabo la reacción catalítica (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

Figura 10. Regiones de importancia en las enzimas citocromo P450 y la estructura tridimensional general



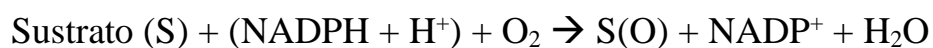
(Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000)

3. Mecanismo de acción. Las enzimas citocromo P450 requieren de la flavoproteína NADPH citocromo P450 reductasa o en ciertos casos de la citocromo b₅ (Janet Hemingway *et al.*, 2004). Las enzimas citocromo P450 enlazan oxígeno molecular y reciben electrones de NADPH para introducir una molécula de oxígeno dentro del sustrato. En este proceso se da la formación de agua con la otra molécula

de oxígeno (Bergé *et al.*, 1998; J Hemingway & Ranson, 2000). La reacción general se puede observar en la Figura 11. Los electrones necesarios para que se lleve a cabo dicha reacción se obtienen a partir del NADPH y son transferidos al complejo enzima-sustrato por la enzima citocromo P450 NADPH reductasa (Bergé *et al.*, 1998).

Es importante mencionar que las enzimas citocromo P450 presentan una alta variedad de sustratos entre los cuales se pueden incluir esteroides, hormonas juveniles, hidrocarburos, pesticidas, etc. Debido a la gran diversidad de sustratos, dichas enzimas también se encuentran involucradas en diversas reacciones, que presentan una reacción similar, las cuales incluyen: hidroxilación, epoxidación, desalquilaciones de oxígeno, nitrógeno y sulfuro y oxidaciones de nitrógeno y sulfuro (Bergé *et al.*, 1998).

Figura 11. Reacción general que catalizan las enzimas citocromo P450



(Bergé *et al.*, 1998)

4. Citocromos P450 relacionados a resistencia en insectos. Las enzimas citocromo P450 se encuentran involucradas en actividades del metabolismo de todos los insecticidas utilizados. En insectos las enzimas citocromo P450 son esenciales para la síntesis y degradación de hormonas esteroides que estimulan la muda, hormonas juveniles y el metabolismo de feromonas (Bergé *et al.*, 1998). Por lo tanto, estas enzimas presentan un rol en el crecimiento, desarrollo, alimentación y protección de los insectos (Scott & Wen, 2001). Estas enzimas también juegan un papel fundamental en mecanismos de adaptación o resistencia a químicos tóxicos presentes en las plantas que sirven de alimento para ciertos insectos (Bergé *et al.*, 1998).

Se ha observado una relación entre las enzimas citocromo P450 y la resistencia principalmente metabólica para la mayoría de clases de insecticidas disponibles y en la mayoría de especies de artrópodos que son consideradas plagas (Bergé *et al.*, 1998). Estas enzimas presentan un papel importante en el metabolismo de piretroides, la activación o desintoxicación de organofosforados y un rol menor en la resistencia a carbamatos (J Hemingway & Ranson, 2000). Estas enzimas funcionan al activar la molécula activa del insecticida o realizar la desintoxicación de la misma (Bergé *et al.*, 1998). La desintoxicación del insecticida ocurre mediante su metabolización y degradación y en ciertas enzimas es tan eficiente que en ciertos casos la molécula activa del insecticida nunca llega al sitio blanco dentro del insecto (Bergé *et al.*, 1998).

La resistencia causada por enzimas citocromo P450 se debe a una sobre producción de la enzima la cual se puede deber a una sobreexpresión del gen que codifica la enzima (Bergé *et al.*, 1998; Janet Hemingway *et al.*, 2004). No obstante, también se puede deber a la estabilización del ARN mensajero (ARNm) o de la proteína en sí. El incremento en el número de enzimas citocromo P450 resulta en una

actividad enzimática mayor resultando en una mayor degradación de los insecticidas en organismos resistentes. Un incremento en producción de P450 en una cepa resistente también podría presentar un mayor rango de especificidad a distintos sustratos en comparación con el P450 de una cepa susceptible (Bergé *et al.*, 1998). No obstante, es importante mencionar que la sobre-producción de P450 pareciera ser inestable en los insectos debido a que fácilmente se puede perder en la ausencia del factor selectivo o insecticida (Bergé *et al.*, 1998).

La resistencia causada por enzimas citocromo P450 también se puede deber a sustituciones de los amino ácidos que posiblemente juegan un rol importante en la estructura y eficiencia de la enzima. Este es el caso para la enzima CYP6A2, en *Drosophila* resistente a DDT, donde se sustituyen tres amino ácidos: R335S, L336V y V476L (Bergé *et al.*, 1998; Janet Hemingway *et al.*, 2004).

Entre estos insectos que presentan las enzimas citocromo P450 se incluye a los mosquitos que presentan más de 100 genes que codifican para estas enzimas (David, Ismail, Chandor-Proust, & Paine, 2013).

5. Familia CYP6. Se ha reportado en investigaciones previas la sobre-expresión de genes de las familias de citocromo P450 CYP4, CYP6 y CYP9. Sin embargo, los genes de la familia CYP4 se encuentran relacionados primordialmente a resistencia por reducción en penetración. Los genes reportados de la familia CYP9 se encuentran relacionados primordialmente con resistencia inducida en la presencia de piretroides y hay menos genes reportados para esta familia para *Anopheles*. A comparación, se han descrito más genes de la familia de citocromos P450 en varias especies de *Anopheles* y se ha reportado su asociación específicamente con respecto a la resistencia a deltametrina y otros piretroides como la permetrina, por lo tanto, son el enfoque de este estudio.

Se ha asociado la resistencia metabólica en *Anopheles* particularmente a las citocromo P450 agCYP6M2 y agCYP6P3 presentes en los tubos de Malpighi y en el intestino que se involucran en la metabolización de piretroides. Los citocromos responsables por la metabolización de insecticidas se encuentran presentes en el retículo endoplasmático en lugar de en la mitocondria de las células (Balabanidou *et al.*, 2016; Raghavendra, Bp, & Gbks, 2012).

En *Anopheles gambiae* resistentes a piretroides se ha observado una asociación con CYP6Z1, CYP6Z2, CYP6M2, CYP6P3 y CYP325A3. De estas enzimas las que se han observado sobretranscritas mayormente han sido CYP6P3 y CYP6M2 en poblaciones de *Anopheles gambiae* de campo resistentes. Estas dos enzimas han presentado actividad y capacidad de metabolizar piretroides incluyendo permetrina y deltametrina (David *et al.*, 2013; Edi *et al.*, 2014; Janet Hemingway *et al.*, 2004; Stevenson *et al.*, 2011). El gen CYP6M2, a comparación del gen CYP6P3, también se encuentra involucrado en el metabolismo de DDT. Los genes CYP6P1, CYP6P2, CYP6P3, CYP6P4 y CYP6M2 también ha sido descritos en *An gambiae* resistentes a bendiocarb en poblaciones de Tiassalé, África (Edi *et al.*, 2014). El gen CYP6M2 se ha descrito sobre-expresado en poblaciones de *Anopheles gambiae* resistentes a DDT

en Ghana (David *et al.*, 2013; Edi *et al.*, 2014). Este gen tiene la característica de metabolizar deltametrina produciendo 4'-hidroxideltametrina el cual luego es metabolizado a otras moléculas menos tóxicas que son excretadas con mayor facilidad. También se ha observado la sobre-expresión de CYP6Z1 en poblaciones resistentes a piretroides y a DDT y se ha logrado demostrar la capacidad de esta enzima de metabolizar DDT. La enzima CYP6Z2 también se ha observado sobre-expresada en cepas de *An. gambiae* resistentes a permetrina y cipermetrina, no obstante, dicha enzima no logra metabolizar el insecticida sino únicamente enlazarlo (David *et al.*, 2013; Ibrahim, Riveron, Stott, Irving, & Wondji, 2016; Müller, Donnelly, & Ranson, 2007).

En *Aedes aegypti* se ha demostrado que la enzima CYP6Z8, ortólogo a la enzima CYP6Z2 de *An. gambiae*, es capaz de metabolizar varios metabolitos producidos por las carboxilesterasas que se encuentran involucradas en la metabolización de piretroides (David *et al.*, 2013).

Otras enzimas que se han visto asociadas a la resistencia piretroides en son las CYP6P9 (CYP6P9a, CYP6P9b), CYP6P4, CYP6P13 CYP6Z1, CYP6Z3 y CYP6M7 sobre-expresados en *Anopheles funestus* (David *et al.*, 2013; Ibrahim *et al.*, 2016; Malik Arif, Khalid Mahmud Khan, Muhammad Asif, Hafiz Muhammad Arsalan, Sara Zahid, Abdul Manan, 2013). De estas enzimas CYP6Z1 y CYP6Z3 ya se han reportado en investigaciones con *An. gambiae* resistentes. También se han reportado en *An. funestus* CYP6P9 y CYP6M7 enzimas ortólogas a las enzimas previamente descritas y asociadas a resistencia en *An. gambiae*, CYP6P3 y CYP6M2 (Abdalla *et al.*, 2014; David *et al.*, 2013; Edi *et al.*, 2014). En *Neja* poblaciones de *An. arabiensis* se ha observado la sobre-expresión de CYP6P4, enzima que no puede metabolizar bendiocarb y malatión, pero parece ser la enzima causando la resistencia a piretroides (Ibrahim *et al.*, 2016).

Se considera que las P450 sobre-expresadas que confieren resistencia a piretroides también se encuentran involucradas en la resistencia cruzada observada a carbamatos. Los genes de la familia de CYP6 que se encuentran duplicados en cepas resistentes a piretroides incluyen *CYP6P9* y *CYP6P4*. Para el gen *CYP6P9*, específicamente en *Drosophila melanogaster*, se ha identificado que la duplicación de este gen confiere resistencia a piretroides. En poblaciones de mosquitos de campo las enzimas CYP6Pa y CYP6Pb, que al ser expresadas en *E. coli*, demuestran la capacidad de metabolizar permetrina y deltametrina (David *et al.*, 2013).

En *Anopheles minimus*, el vector de malaria en Asia, también se ha observado resistencia a permetrina, cipermetrina y deltametrina en cepas de laboratorio mediada por las enzimas CYP6P7 y CYP6AA3 (David *et al.*, 2013; Ibrahim *et al.*, 2016). En estudios más detallados, se ha observado que la enzima CYP6AA3 al metabolizar deltametrina produce 3-fenoxibenzaldehído, el cual luego puede ser metabolizado por otras enzimas (David *et al.*, 2013). En un estudio realizado con una cepa de laboratorio de *An. minimus* resistentes a deltametrina se observó la sobre-expresión de CYP6AA2, por lo que también se observa involucrada en la resistencia metabólica de este mosquito (Rongneparut, Boonsuepsakul, Chareonviriyaphap, & Thanomsing, 2003).

Con respecto a la especie de *Culex quinquefasciatus* se ha identificado sobre-expresión e inducción del gen *CYP6AA7* asociado a la resistencia a permetrina en varias poblaciones de mosquitos (Gong, Li, Feng, & Liu, 2017; Liu *et al.*, 2011). También se ha asociado la resistencia en *C. quinquefasciatus* a la sobre-expresión leve del gen *CYP6F1* que permite la resistencia a permetrina (Janet Hemingway *et al.*, 2004).

Ibrahim *et al.* (2016) reporta la sobre-expresión del gen *CYP6P4* responsable por la alta resistencia a piretroides observada en poblaciones de *Anopheles arabiensis* de Chad, África Central. En este estudio se demuestra cómo esta enzima es capaz de metabolizar piretroides tipo I y II, con la excepción de deltametrina ya que únicamente logra enlazarse a este insecticida pero no metabolizarlo (Ibrahim *et al.*, 2016). Este gen se ha observado sobre-expresado 22 veces más en poblaciones resistentes, de *An. arabiensis*, a permetrina en comparación a poblaciones susceptibles a DDT, permetrina y deltametrina (Abdalla *et al.*, 2014).

Cuadro 4. Citocromos P450 de Anophelinos africanos asociados a resistencia a insecticidas. Estos P450s son expresados de forma heteróloga y han sido validados como capaces de metabolizar de insecticidas.

| P450 | Especie | Localización | Insecticida |
|----------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| CYP6P3 | <i>An. gambiae</i> | Ghana (Dodowa); Benin (akron y Gbedjromede); Nigeria (Orogun) | Permetrina, Deltametrina |
| CYP6M2 | <i>An. gambiae</i> | Ghana (Odumasy y Dodowa; Great Accra); Benin (Akron y Gbedjromede); Nigeria (Orogun) | Deltametrina, DDT |
| CYP6Z1 | <i>An. gambiae</i> | Kenya (Kisumu ZANU) | DDT |
| CYP6Z3 | <i>An. gambiae</i> | Ghana (Odumasy) | Permetrina |
| CYP4G16 | <i>An. arabiensis</i> | Cameroon del Norte | Deltametrina |
| CYP4H24 | <i>An. arabiensis</i> | Cameroon del Norte | Deltametrina |
| CYP6AG1 | <i>An. arabiensis</i> | Cameroon del Norte | Deltametrina |
| CYP6P9 | <i>An. funestus</i> | Mozambique | Permetrina, deltametrina |

(David *et al.*, 2013)

Cuadro 5. Citocromos de P450 de Aedes asociado a resistencia a insecticidas. Los P450 en negrita han sido expresados de manera heteróloga y han sido validados como capaces de metabolizar de insecticidas.

| P450 | Especie | Localización | Insecticida |
|----------------|--------------------|-------------------------------|--------------|
| CYP6CB1 | <i>Ae. aegypti</i> | Tailandia (Ban Pang Mai Dang) | Permetrina |
| CYP6M6 | <i>Ae. aegypti</i> | Isla de Martinique | Deltametrina |
| CYP6M10 | <i>Ae. aegypti</i> | Cepa de laboratorio | Permetrina |
| CYP6M11 | <i>Ae. aegypti</i> | Cepa de laboratorio | Permetrina |
| CYP6Z6 | <i>Ae. aegypti</i> | Isla de Martinique | Deltametrina |
| CYP6Z8 | <i>Ae. aegypti</i> | Isla de Martinique | Deltametrina |
| CYP6F3 | <i>Ae. aegypti</i> | Cepa de laboratorio | Permetrina |

(David *et al.*, 2013)

VII. METODOLOGÍA

A. Sitio de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la unidad de Entomología Médica y Malaria del Centro de Estudios en Salud (CES) situado en la Universidad del Valle de Guatemala en Guatemala, Guatemala.

B. Sujetos de estudio

Los sujetos del presente estudio fueron mosquitos *Anopheles albimanus* hembras vírgenes únicamente alimentadas con agua miel de tres días de vida de una cepa susceptible y otra resistente a deltametrina.

La cepa susceptible a deltametrina, denominada Sanarate, es fenotípicamente susceptible a DDT, deltametrina, permetrina, alfa-cipermetrina, bendiocarb y malatión según el bioensayo de la botella CDC. Esta cepa fue establecida en el año de 1987 en el insectario del CES, y es originaria del municipio de Sanarate, El Progreso.

La cepa resistente a deltametrina, denominada RDelta, es una sub-muestra de la cepa Sanarate que ha sido seleccionada con deltametrina por 89 generaciones en condiciones de laboratorio. Esta cepa fue establecida en el insectario del CES en el año de 2011. La generación 89 de cepa de RDelta es la progenie de la última generación seleccionada, generación 88. Las hembras de la generación 87 y 88 fueron seleccionadas con una concentración de 8.827ug/mL de deltametrina. A comparación, los machos de la generación 87 y 88 fueron seleccionados con una concentración de 2.33ug/mL de deltametrina. Se utilizaron estas concentraciones para la selección debido a que fueron los valores dosis letal (LD, por sus siglas en inglés) 75 recalculados para la generación 87. Con la selección de la generación 88 bajo estas condiciones se observó un porcentaje de mortalidad de 49% y 86% para hembras y machos, respectivamente.

Las dos cepas se mantuvieron a una temperatura de alrededor de 28°C con una humedad relativa de aproximadamente 80%, y un ciclo de luz de 12 horas día/noche. Ambas cepas fueron seleccionadas, cuidadas y monitoreadas por personal del insectario del CES. Los individuos de ambas cepas utilizados para la investigación se criaron hasta adultos a partir de larvas en primer estadio (L1) y se sexaron en estadio de pupa por la investigadora principal del estudio, estudiante Ana Cristina Benedict.

C. Tipo y tamaño de muestra

Se realizó un triplicado biológico para cada cepa de *An. albimanus*, resultando en tres muestras para la cepa RDelta y tres muestras para la cepa Sanarate. Estas muestras fueron utilizadas para el análisis de expresión génica entre ambas cepas. Cada muestra biológica consistió en un pool de 20 mosquitos hembra vírgenes únicamente alimentadas con agua miel de tres días de vida. Las tres muestras biológicas se obtuvieron de la misma ovoposición para poder tener resultados comparables.

D. Metodología

Extracción de ARN total

La extracción de ARN total de *Anopheles albimanus* de la cepa RDelta y la cepa Sanarate se realizó de los pools de 20 hembras, lo cual corresponde a aproximadamente 20 mg de tejido. Para esto, se procesaron tres muestras biológicas para cada cepa utilizando el TRI Reagent Solution (Ambion-Life Technologies, California, USA), siguiendo instrucciones del fabricante. La concentración y pureza de cada réplica biológica se midió utilizando el NanoDrop One (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Las muestras de ARN total se preservaron a -80°C hasta su utilización. Posteriormente, se verificó la contaminación del ARN total con ADN genómico mediante un PCR con primers de actina y el GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix de Promega. Se implementó un gel de agarosa al 1.5% con 0.02mg/mL de bromuro de etidio para observar los resultados de amplificación o ausencia de amplificación los cuales indicaron la presencia o ausencia de contaminación de ADN genómico, respectivamente. Los geles de agarosa se corrieron a 100 voltios por 25 minutos. Ver el procedimiento D, Verificación de contaminación del ARN total extraído con ADN genómico mediante un PCR con primers de actina, de Anexos.

Tratamiento de ARN total para eliminación de ADN genómico contaminante

La eliminación de ADN genómico contaminante presente en todas las muestras de ARN total de *Anopheles albimanus* se realizó con el kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Winsconsin, USA). Se siguió el procedimiento del fabricante trabajando con 1ug de ARN total por reacción. Se realizó la modificación de extender la incubación a 37°C a una hora y el adicionar RQ1 DNase Stop Solution antes de analizar la eficiencia de la eliminación de ADN genómico mediante un PCR con primers de actina con su respectivo gel de agarosa al 1.5% con 0.02mg/mL de bromuro de etidio (BrEt). Ver el procedimiento E, Tratamiento de ARN total con RQ1 RNase-Free DNase para eliminación de ADN genómico contaminante, de Anexos.

Síntesis de ADNc de una hebra

Una vez obtenido el ARN total de *Anopheles albimanus* sin contaminación de ADN genómico se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) de simple hebra utilizando el GoScript Reverse Transcription System con 1ul de primers Oligo(dT)₁₅ (Promega, Wisconsin, USA) para cada cepa y para cada muestra biológica. Se siguieron las indicaciones del fabricante con las modificaciones indicadas en anexos en el procedimiento F, síntesis de ADNc, de Anexos.

PCR con primers degenerados de la familia CYP6

Se realizó un análisis de expresión génica de la familia de citocromo P450 CYP6 de *Anopheles albimanus* mediante la implementación de primers degenerados de CYP6 diseñados por Ranson *et al.* (2002a), utilizados por Amenya *et al.* (2005) y validados por Ramírez (2009) detallados en anexos en el procedimiento G, qPCR con primers degenerados de la familia CYP6, de Anexos. Se realizó un PCR tiempo real (qPCR) con PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (AppliedBiosystems, Florida, USA). Los resultados se visualizaron por medio del equipo de tiempo real, Appliedbiosystems QuantStudio 3, y se analizaron con el programa gratuito de GraphPad Prism 7. Se utilizaron como genes de referencia el gen beta-actina y el gen de la proteína de superficie ribosomal 7 (Rsp7, por sus siglas en inglés). Se prepararon curvas de eficiencia para cada uno de los genes y se obtuvo el porcentaje de eficiencia de cada par de primers con respecto a cada cepa, ver en la sección de anexos el procedimiento H. qPCR con primers degenerados de la familia CYP6. Posteriormente, se amplificaron los tres genes para cada una de las tres réplicas biológicas.

Cuadro 6. Secuencia de primers de CYP6, Actina y Rsp7

| | Primer Forward (5'-3') | Iniciador "Reverse" (5'-3') |
|---------------|-------------------------|-----------------------------|
| CYP6* | TCWSICTGTACGAGCTKGC | GGICCCTCGCCGAACGG |
| Actina | TACAACTCGATCATGAAGTGCGA | CCCGGGTACATGGTGGTACCGCCGGA |
| Rsp7 | AGAACCAGCAGACCACCATC | ACAACCAGCAACGGTTATGT |

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

*Para los primers CYP6 se espera un producto de ADNc de 340pb.

Análisis de secuencias

Usando los genes de referencia para normalizar los resultados de amplificación de CYP6 para todas las muestras, se determinó el nivel de sobre-expresión de estos genes en la cepa RDelta a comparación de la cepa Sanarante mediante el método de Delta Delta CT utilizando la formula a continuación:

$$Ct_{CYP6}^{Sanarante} - Ct_{gen\ de\ referencia}^{Sanarante} = \Delta Ct^{Sanarante}$$

$$Ct_{CYP6}^{RDelta} - Ct_{gen\ de\ referencia}^{RDelta} = \Delta Ct^{RDelta}$$

$$\Delta Ct^{RDelta} - \Delta Ct^{Sanarante} = \Delta \Delta Ct$$

$$\text{Razón de expresión} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

Por último, se realizó el análisis estadístico de la razón de expresión obtenida mediante el método de Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Se inició con una prueba de Shapiro Wilk para verificar la normalidad de los datos para posteriormente determinar la diferencia de medias o de medianas. Se utilizó la prueba T de Welch para datos paramétricos ya que los datos presentaron normalidad pero desviaciones estándar diferentes entre grupos.

VIII. RESULTADOS

A. Extracción de ARN total y cuantificación de ARN total

La extracción de ARN total se realizó a partir de pools de 20 mosquitos. Se extrajo ARN total de tres pools de la cepa Sanarate (S1, S2 y S3) y de tres pools de la cepa RDelta (R1, R2 y R3). En el Cuadro 7 se puede observar la concentración de ARN total, la razón de absorbancia A260/A280 y A260/A230 de cada muestra obtenido mediante la cuantificación con un NanoDrop. Las razones de absorbancia indican la pureza del ARN total. Todas las muestras presentan una concentración similar entre 220-320ng/uL y un rango de razón de absorbancia A260/A280 de 1.89-1.95. La razón ideal de ARN total es de ~2.0, por lo tanto, se puede inferir que las muestras presentan contaminación de ADN genómico. Posteriormente se observa un rango de absorbancia A260/A230 de 0.44-0.95. El rango ideal para muestras de ARN total de alta pureza es de 2.0-2.2. Las muestras al presentar una razón fuera de este rango indica que presentan contaminación con sales o solventes como el fenol. Se considera que la mayor fuente de contaminación fue causada por el método de extracción con TRI Reagent que contiene fenol.

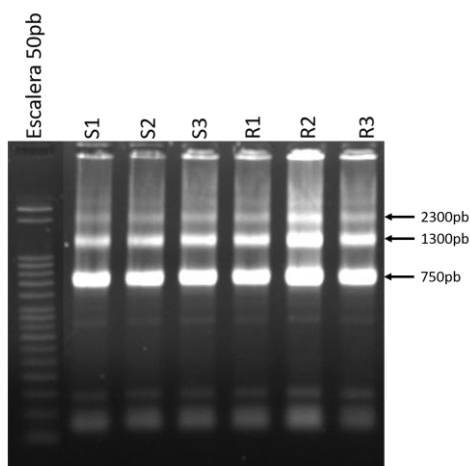
Cuadro 7. Concentración y pureza de ARN total extraído de la cepa Sanarate y RDelta de An. albimanus.

| Muestra | ng/uL | A260/280 | A260/230 |
|----------------|--------------|-----------------|-----------------|
| S1 | 238.4 | 1.89 | 0.54 |
| S2 | 245.7 | 1.92 | 0.68 |
| S3 | 225.6 | 1.9 | 0.44 |
| R1 | 273.2 | 1.92 | 0.73 |
| R2 | 317.9 | 1.95 | 0.76 |
| R3 | 264.3 | 1.91 | 0.95 |

B. Gel de integridad de ARN total

Para evaluar la integridad del ARN total extraído se corrió un gel de agarosa (1.5% p/v y 0.02mg/mL BrEt) con cada muestra, Figura 12. Se pueden observar tres bandas intensas de 2300pb, 1300pb y 750pb. Las bandas intensas y la ausencia de barrido indica que el ARN total se encuentra intacto. Las bandas de 1300pb y 750pb corresponden a las subunidades ARN ribosomal (ARNr) 28S y 18S, respectivamente. La banda de 2300pb corresponde a contaminación de ADN genómico. Por último, las bandas tenues de menor tamaño corresponden a una mínima cantidad de ADN genómico y ARN total degradado.

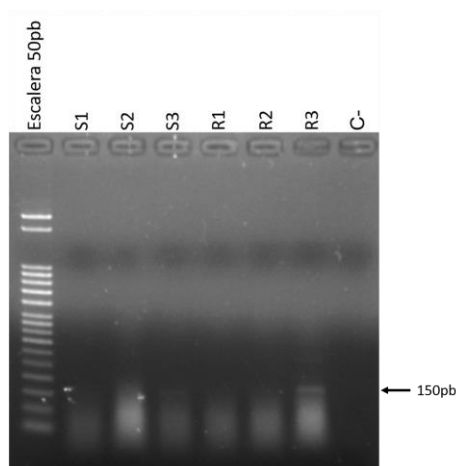
Figura 12. Gel de agarosa para verificar la integridad de ARN total.



C. Verificación de la presencia de ADN contaminante

Se verificó la presencia de ADN genómico contaminante mediante un PCR de actina. La presencia de una banda definida indica la presencia de ADN genómico en el ARN total extraído. La Figura 13 presenta el PCR de actina de todas las muestras de ARN total. Se puede observar que el ARN total extraído de S3 y R3 presentan una banda tenue pero aun así definida de 150pb indicando contaminación por ADN. Esto concuerda con la hipótesis en la Figura 12 que las muestras poseen más bandas en el gel de integridad de ARN total debido a que presentan ADN contaminante. Por lo anterior se procedió a tratar el ARN total con DNasas.

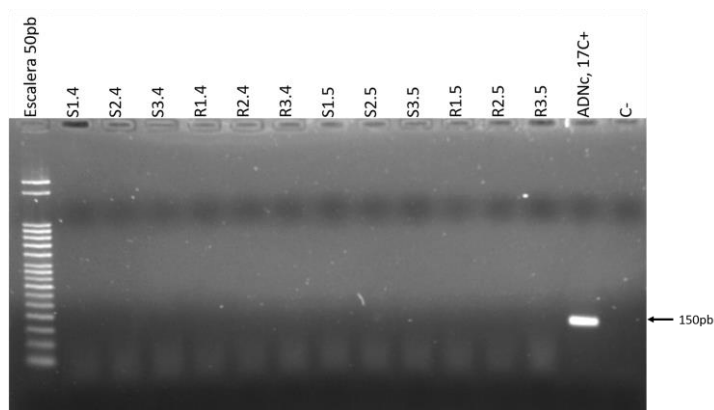
Figura 13. Verificación de la presencia de ADN contaminante en ARN total mediante un PCR de Actina



D. Tratamiento con DNasas

Cada muestra de ARN total se separó en dos alícuotas, utilizando la nomenclatura de la muestra: su lugar de origen (S o R), el número de muestra (1, 2 o 3) y seguida de .4 o .5. Las alícuotas se trataron con DNasas y se realizó un PCR de actina para verificar que las muestras de ARN total se encontraran libres de ADN contaminante. En la Figura 14 se observa una degradación exitosa de ADN contaminante debido a que ninguna de las muestras de ARN total presenta una banda.

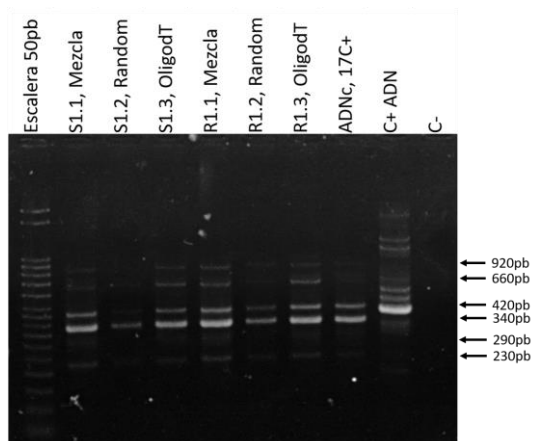
Figura 14. Verificación del tratamiento del ARN total con DNasas para eliminar la contaminación de ADN genómico mediante un PCR de Actina.



E. Optimización de la síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se puede realizar con primers random hexamers, primers Oligo(dT)₁₅ o una mezcla de ambos. Por lo tanto, se estandarizó la síntesis de ADNc con las tres combinaciones de primers para determinar el método más adecuado para los genes amplificados con los primers CYP6. En la Figura 15 se observan bandas de intensidad similar para la síntesis de ADNc con primers Oligo(dT)₁₅ y para la mezcla de primers (random hexamers y Oligo(dT)₁₅). Se eligió procesar todas las muestras con los primers Oligo(dT)₁₅ ya que estos primers permiten sintetizar ADNc únicamente a partir de ARNm. Es importante mencionar que esta optimización se realizó con primers de CYP6 que estaban perdiendo eficiencia, razón por la cual se observan 6 amplicones para cada muestra en lugar de lo esperado, una única banda (340pb). Sin embargo, se logró cumplir con el objetivo de optimizar la síntesis de ADNc.

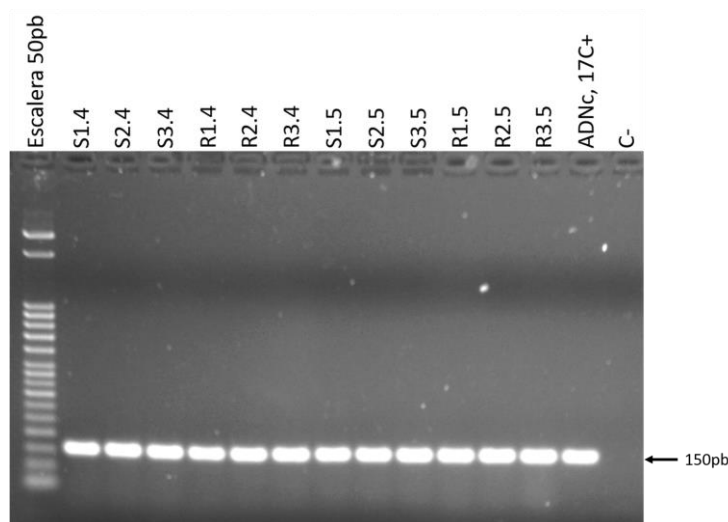
Figura 15. Optimización de la síntesis de ADNc mediante un PCR de CYP6



F. Síntesis de ADNc a partir de ARN total

Para verificar que se haya logrado la síntesis de ADNc con primers oligo(dT)₁₅ se realizó un PCR de Actina. En la Figura 16 se observa que todas las muestras poseen un amplicón de 150pb indicando una síntesis de ADNc exitosa.

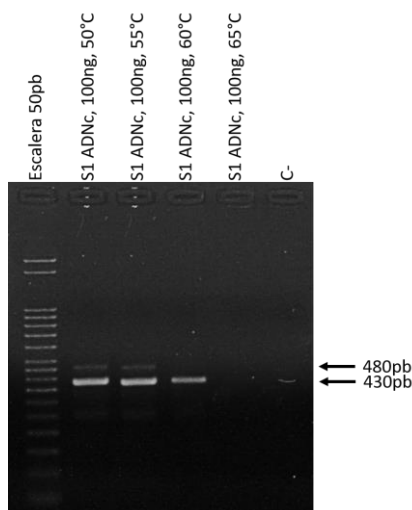
Figura 16. Verificación de síntesis de ADNc mediante un PCR de Actina



G. Optimización de PCR de CYP6 a diferentes temperaturas de anillamiento

Para aumentar la especificidad de los primers degenerados de CYP6 se evaluaron distintas temperaturas de anillamiento (Tms, por sus siglas en inglés) – 50°C, 55°C, 60°C y 65°C – para obtener una amplificación específica. Es importante mencionar que para todas las pruebas se utilizó una concentración final de ADNc de 100ng. En la Figura 17 se pueden observar resultados inespecíficos utilizando Tms de 50°C y 55°C se obtuvieron resultados inespecíficos, dos amplicones de 480pb y 430pb. A un Tm de 65°C no se obtuvo una amplificación. Por último, se obtuvo el resultado más específico a un Tm de 60°C, una única banda de de 430pb. Por lo tanto, esta temperatura es la que se eligió para el resto de PCRs de CYP6.

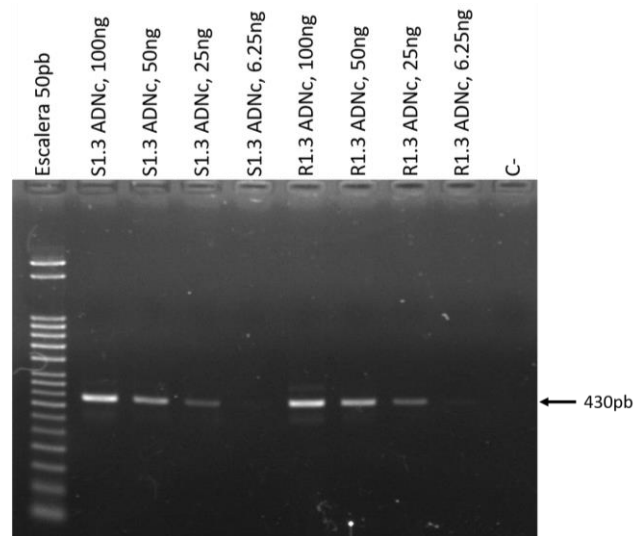
Figura 17. Optimización de PCR de CYP6 con diferentes temperaturas (Tms)



H. Optimización del PCR de CYP6 a diferentes concentraciones de ADNc

Una vez establecido el T_m para el PCR de CYP6 fue necesario identificar la concentración adecuada de ADNc para obtener los mejores resultados de amplificación. En la Figura 18 se puede observar que la mayor especificidad se obtuvo con una concentración de ADNc de 25ng al observarse únicamente una banda de 430pb. Para las demás concentraciones, 100ng y 50ng, se obtuvieron resultados inespecíficos al observarse una banda muy tenue por arriba y por debajo de la banda de interés de 430pb. Para una concentración de 6.25ng de ADNc se observó baja concentración del producto, banda muy tenue. Por lo tanto, las condiciones ideales del PCR de CYP6 se obtuvieron con un T_m de 60°C y una concentración de ADNc de 25ng.

Figura 18. Optimización del PCR de CYP6 con diferentes concentraciones de ADNc



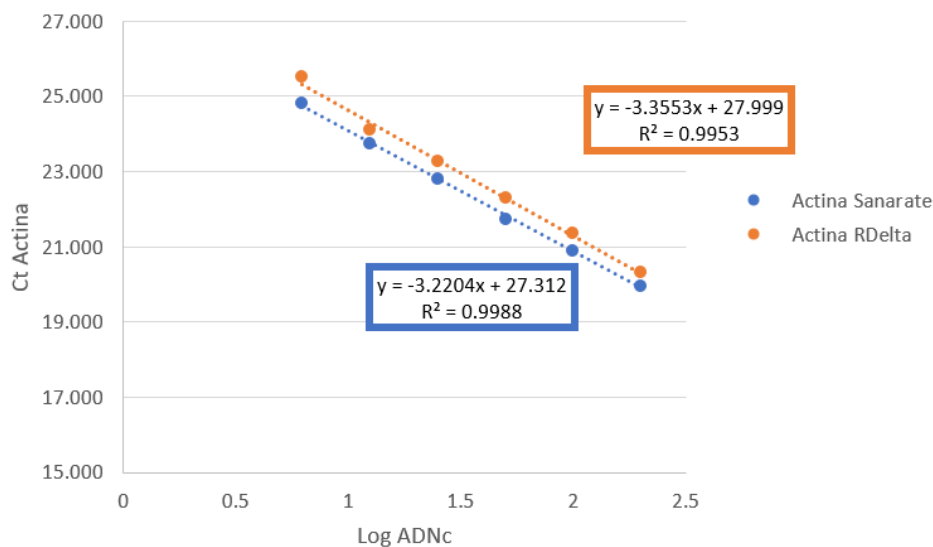
I. Curvas de eficiencia con PCR tiempo real (qPCR)

Al lograr optimizar el PCR de CYP6 para obtener una única banda es posible analizar la expresión de la familia de citocromos P450 CYP6 por medio de qPCR. Para lo anterior, se realizaron curvas de eficiencia para los genes de referencia (Actina y Rsp7) y para el gen de interés CYP6. Todas las curvas de eficiencia se realizaron con 6 puntos que presentaron una concentración final aproximada de ADNc de 200ng, 100ng, 50ng, 25ng, 12.5ng y 6.25ng. Se realizaron curvas para una muestra de ADNc de Sanarate y una de RDelta para verificar que la eficiencia de CYP6 fuera similar para las dos cepas.

Curva de eficiencia de Actina

Se realizó una curva de eficiencia para el gen de referencia de Actina con los puntos descritos previamente. En la Figura 19 se observa una tendencia similar para ambas cepas para la curva de eficiencia de Actina. La ecuación lineal de la curva de eficiencia para Actina de la cepa Sanarate es $y = -3.2204x + 27.312$ con un R^2 de 0.9988. A comparación, la ecuación lineal de la curva de eficiencia para Actina de la cepa RDelta es de $y = -3.3553x + 27.999$ con un R^2 de 0.9953.

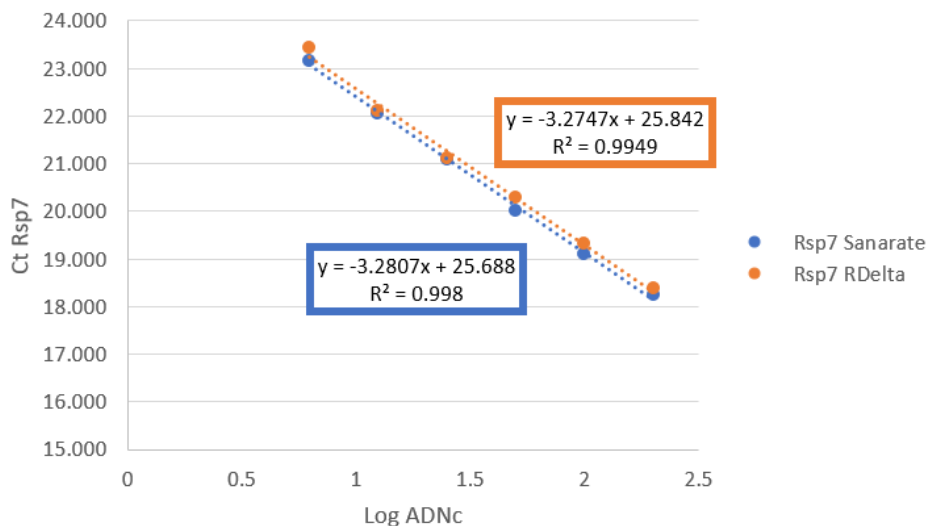
Figura 19. Curva de eficiencia de qPCR del gen de Actina



Curva de eficiencia de Rsp7

Se realizó una curva de eficiencia para el gen de referencia Rsp7 con los puntos descritos previamente. En la Figura 20 se observa una tendencia casi idéntica ya que ambas líneas de tendencia están sobrelapadas en varios puntos. La ecuación lineal de la curva de eficiencia para Rsp7 de la cepa de Sanarate es $y = -3.2807x + 25.688$ con un R^2 de 0.998. A comparación, la ecuación lineal de la curva de eficiencia para Actina de la cepa de RDelta es de $y = -3.2747x + 25.842$ con un R^2 de 0.9949.

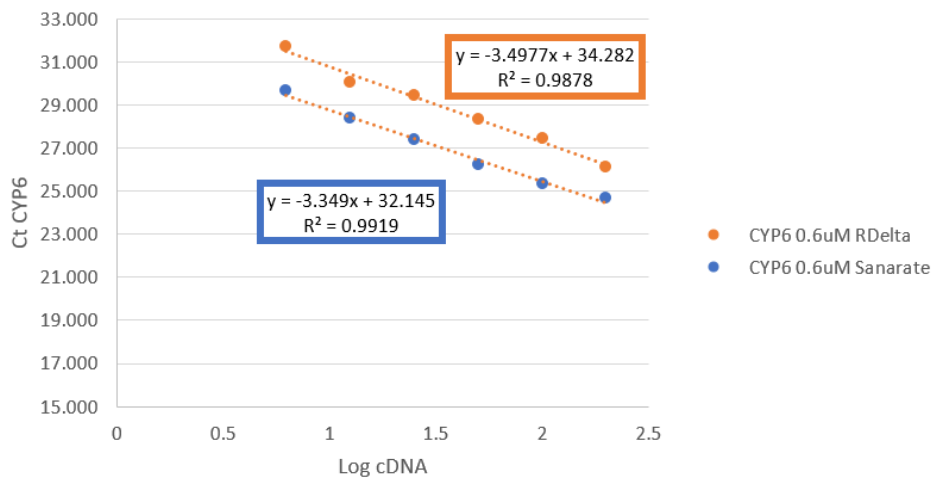
Figura 20. Curva de eficiencia de qPCR del gen Rsp7



Curva de eficiencia de CYP6

Se realizó una curva de eficiencia para CYP6 con los puntos descritos previamente. En la Figura 21 se observa una tendencia levemente similar pero no un traslape entre ambas. La ecuación lineal de la curva de eficiencia para CYP6 de la cepa Sanarate es $y = -3.349x + 32.145$ con un R^2 de 0.9919. A comparación, la ecuación lineal de la curva de eficiencia para CYP6 de la cepa RDelta es de $y = -3.4977x + 34.282$ con un R^2 de 0.9878.

Figura 21. Curva de eficiencia de qPCR de CYP6 (primers a 0.6uM)



J. Porcentajes de eficiencia

Se calculó el porcentaje de eficiencia de los genes (Actina, Rsp7 y CYP6) para la cepa Sanarate y la cepa RDelta. En el Cuadro 7 se observan las diferentes corridas que se realizaron con distintas condiciones para el qPCR de CYP6. Se obtuvo el mejor porcentaje de eficiencia con una concentración de primers de 0.6uM, resultando en un porcentaje de eficiencia de 98.88% y de 93.15% para la cepa Sanarate y la cepa RDelta, respectivamente. En el Cuadro 8 se observa que para el gen de Actina el porcentaje de eficiencia para la cepa Sanarate es de 104.42% mientras que para la cepa RDelta es de 98.63%. También se puede observar que para el gen Rsp7 el porcentaje de eficiencia para la cepa Sanarate es de 101.75% mientras que para la cepa RDelta es de 102.01%.

Cuadro 8. Optimización de la curva de eficiencia y los porcentajes de eficiencia de CYP6

| ADNc | Concentración final de Primers CYP6 | Porcentaje de eficiencia | |
|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------|---------------|
| | | Sanarate (S1.3) | RDelta |
| Sintetizado 2017 | 0.5uM | 100.47% | -- |
| | 0.5uM | 85.50% | 109.42% |
| Sintetizado 2018 | 0.5uM | 116.20% | 106.26% |
| | 0.4uM | 104.07% | 122.06% |
| | 0.6uM* | 98.88% | 93.15% |

*Condiciones utilizadas para el análisis de expresión génico

Cuadro 9. Porcentaje de eficiencia de Actina y Rsp7

| ADNc | Gen de Referencia | Concentración final de Primers | Porcentaje de eficiencia | |
|-------------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------|---------------|
| | | | Sanarate (S1.4) | RDelta (R1.4) |
| Sintetizado 2018 | Actina | 0.33uM | 104.42% | 98.63% |
| | Rsp7 | 0.33uM | 101.75% | 102.01% |

K. Comparación del nivel de expresión de CYP6 en la cepa RDelta y la cepa Sanarate

qPCR de muestras con primers de CYP6, Actina y Rsp7

Luego de realizar una curva de eficiencia para cada primer se procedió a correr un qPCR con cada muestra y cada juego de primers de CYP6, Actina y Rsp7. Esto se realizó en triplicado para cada muestra; se obtuvo la media del ciclo umbral (Ct por sus siglas en inglés) y la desviación estándar para cada muestra, Cuadro 10. Cabe remarcar que este procedimiento se realizó a partir de las dos réplicas de ADNc. La desviación estándar para todas las muestras, exceptuando a una (marcada en negrita), es menor a 0.3 lo cual indica baja variabilidad dentro de la muestra y por lo tanto indica que los resultados son confiables.

Cuadro 10. Valores de Cts de los qPCR de Actina, Rsp7 y CYP6 para cepa la Sanarate y RDelta

| Réplica | Cepa | Muestra | CYP6 | | Actina | | Rsp7 | |
|---------|----------|---------|----------|--------------|----------|------------|----------|------------|
| | | | Media Ct | Desv. Est. | Media Ct | Desv. Est. | Media Ct | Desv. Est. |
| 1 | Sanarate | S1.4 | 27.773 | 0.135 | 22.619 | 0.098 | 18.998 | 0.014 |
| | | S2.4 | 27.272 | 0.248 | 22.746 | 0.137 | 18.298 | 0.236 |
| | | S3.4 | 26.669 | 0.006 | 21.938 | 0.023 | 18.496 | 0.192 |
| | RDelta | R1.4 | 28.647 | 0.138 | 21.856 | 0.006 | 17.642 | 0.188 |
| | | R2.4 | 26.989 | 0.029 | 22.900 | 0.080 | 19.128 | 0.094 |
| | | R3.4 | 27.083 | 0.260 | 23.001 | 0.117 | 19.012 | 0.247 |
| 2 | Sanarate | S1.5 | 26.983 | 0.386 | 21.326 | 0.091 | 18.727 | 0.160 |
| | | S2.5 | 26.938 | 0.241 | 23.041 | 0.109 | 19.116 | 0.056 |
| | | S3.5 | 27.123 | 0.295 | 22.889 | 0.086 | 19.221 | 0.142 |
| | RDelta | R1.5 | 27.219 | 0.019 | 22.950 | 0.040 | 19.292 | 0.078 |
| | | R2.5 | 27.772 | 0.222 | 23.296 | 0.096 | 19.466 | 0.105 |
| | | R3.5 | 25.856 | 0.298 | 21.694 | 0.068 | 18.388 | 0.119 |

Las figuras 22 y 23 presentan las curvas de disociación del qPCR de CYP6 para la cepa Sanarate y la cepa RDelta. Se realizó un triplicado de cada muestra, no obstante, en ciertos gráficos únicamente se observa la presencia de dos curvas debido a que se removió un dato atípico. En las curvas de disociación de los triplicados de las muestras obtenidas a partir del ARN total S1 (S1.4 y S1.5) se observan diferencias leves en temperatura de disociación (T_m por sus siglas en inglés). Esto también se observa para las muestras S3 (S3.4 y S3.5) y para la muestra R2 (R2.4 y R2.5).

Figura 22. Curvas de disociación del qPCR de CYP6 con las cepas Sanarate y RDelta de la primera réplica de ADNc.

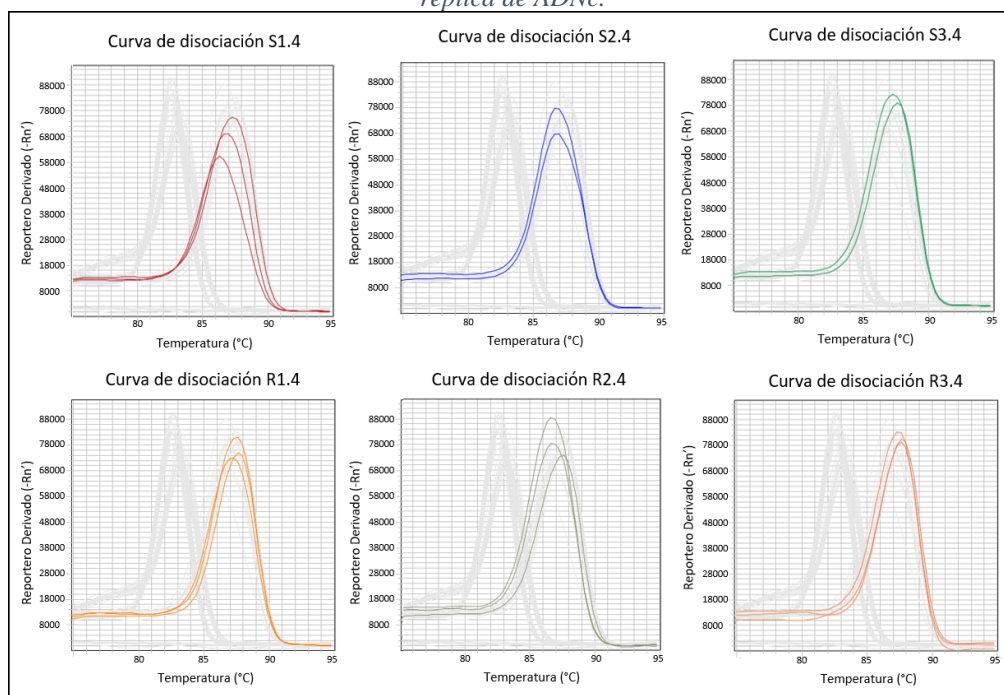
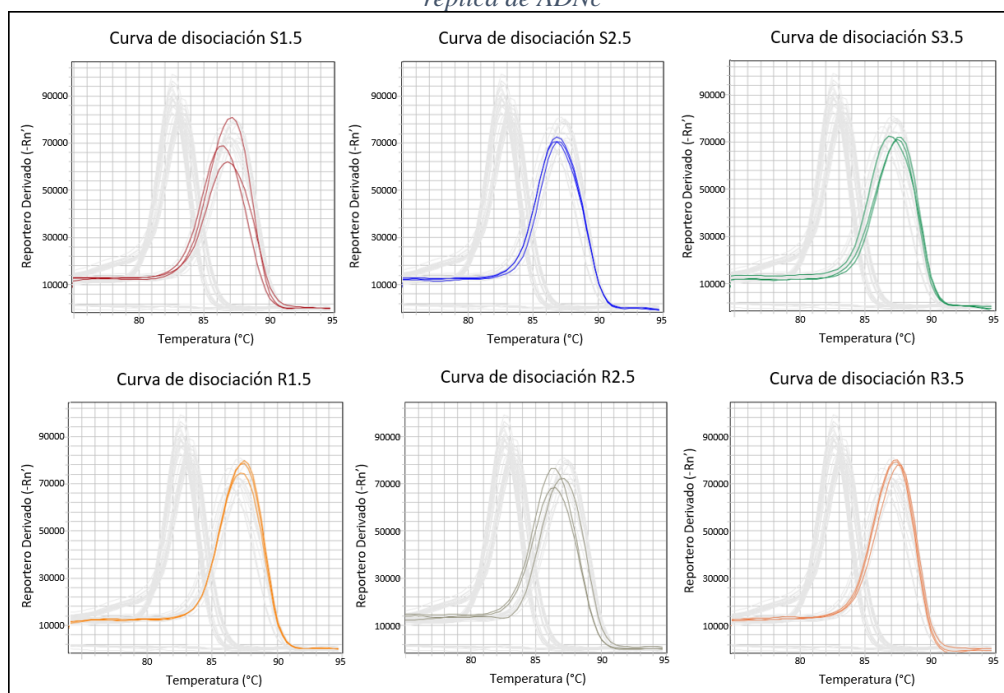


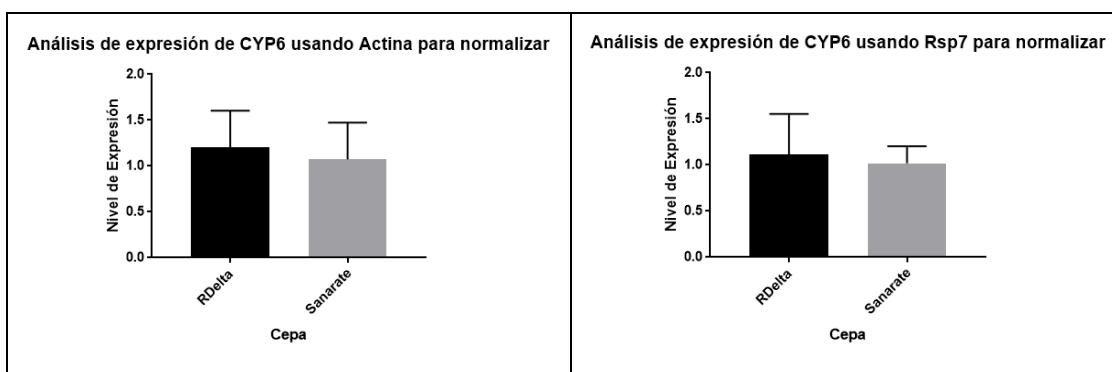
Figura 23. Curvas de disociación del qPCR de CYP6 con las cepas Sanarate y RDelta de la segunda réplica de ADNc.



Análisis de los datos mediante el método $\Delta\Delta Ct$

Para poder realizar el análisis de expresión génica de la familia de citocromo P450 CYP6 se utilizó el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta Ct$ el cual tiene como fundamento y asume que los genes de referencia (Actina y Rsp7) y el gen de interés (CYP6) presentan la misma eficiencia. Se realizó el análisis con los tres diferentes genes para todas las muestras de las dos réplicas de ADNc (S1, S2, S3, R1, R2, R3). La Figura 24 presenta los resultados unificados gráficamente. Se observa que normalizando con ambos genes de referencia (Actina y Rsp7) existe una tendencia de mayor expresión para la familia de citocromos P450 CYP6 en la cepa RDelta en comparación con la cepa Sanarate. No obstante, las barras de error muestran que hay una alta desviación estándar para los datos. Para cada comparación de medias se utilizó la prueba de T de Welch ya que los datos de la réplica 1 y 2 de ADNc son normales, Cuadro 10. Para ambas pruebas realizadas se obtuvo un valor-p mayor a 0.05 por lo que se concluye que no se rechaza la hipótesis nula la cual establece que no existe diferencia significativa en el nivel de expresión constitutiva de los genes de la familia de citocromo P450 CYP6 entre la cepa de *Anopheles albimanus* susceptible (Sanarate) y resistente a deltametrina (RDelta, generación 89).

Figura 24. Análisis de expresión de CYP6.



Cuadro 11. Conclusión de pruebas estadísticas para la comparación de medias para el análisis de expresión de CYP6

| Gen de referencia usado para Normalizar | Sanarate | RDelta | Prueba estadística | Valor-p | Conclusión |
|-----------------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Actina | Presenta Normalidad | Presenta Normalidad | Welch's T-Test, paramétrica, desviación estándar difiere entre grupos | 0.70 | No existe diferencia significativa en el nivel expresión constitutivo de los genes de la familia de P450 CYP6 entre la cepa Sanarate y RDelta (generación 89). |
| Rsp7 | | | | 0.75 | |

Análisis de la temperatura de disociación (T_m) del qPCR de CYP6

Posterior al análisis de cuantificación relativa $\Delta\Delta Ct$, se realizó un análisis de los T_m s obtenidos del qPCR de CYP6. Las muestras se analizaron según cepa y número de réplica (Sanarate réplica 1, Sanarate réplica 2, RDelta réplica 1 y RDelta réplica 2), Cuadro 11. Para la cepa Sanarate réplica 1 y Sanarate réplica 2 se obtuvo un promedio y una desviación estándar de 87.068 ± 0.430 y de 87.321 ± 0.388 , respectivamente. Para la cepa RDelta réplica 1 se obtuvo la media al ser datos paramétricos y para RDelta réplica 2 se obtuvo la mediana al ser datos no paramétricos. Para la primera réplica de la cepa RDelta se obtuvo un promedio de 86.970 ± 0.404 y para la segunda réplica se obtuvo una mediana de 87.316 ± 0.475 .

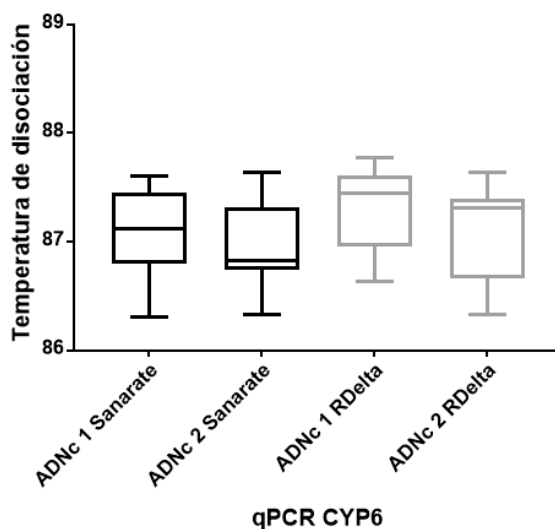
Cuadro 12. Análisis de las temperaturas de disociación del qPCR de CYP6

| Replica | Cepa | Dato | Promedio | Desviación estándar |
|---------|----------|----------------|----------|---------------------|
| 1 | Sanarate | Paramétrico | 87.068 | 0.430 |
| 2 | | Paramétrico | 87.321 | 0.388 |
| 1 | RDelta | Paramétrico | 86.970 | 0.404 |
| 2 | | No paramétrico | 87.316* | 0.475 |

*Mediana debido a que los datos no son paramétricos.

Finalmente, se realizó un análisis de caja y bigote con el cual se pudeo observar que los T_m s de la cepa RDelta (RDelta réplica 1 y RDelta réplica 2), presentan una tendencia levemente mayor a los T_m s de la cepa Sanarate (Sanarate réplica 1 y Sanarate réplica 2), Figura 25.

Figura 25. Gráfico de caja y bigote del análisis de la temperatura de disociación de qPCR de CYP6



IX. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta investigación fue determinar el nivel de expresión constitutivo de genes de la familia de citocromo P450 CYP6 en cepas de laboratorio de *Anopheles albimanus* con resistencia o susceptibilidad a deltametrina. Para cumplir con este objetivo se estandarizó la extracción de ARN total, la síntesis de ADNc, el PCR convencional con respecto a temperaturas y concentración de ADNc y por último la optimización de qPCR para los genes de Actina, Rsp7 y CYP6. El hallazgo principal de este estudio es que no hay diferencia significativa en el nivel de expresión constitutivo de genes de la familia de citocromo P450 CYP6 entre la cepa susceptible, Sanarate, y la cepa resistente a deltametrina, RDelta generación 89.

Optimización del método de qPCR con primers degenerados CYP6

Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó a partir de pools de 20 individuos utilizando TRI Reagent. En el Cuadro 7 se pueden observar los resultados al cuantificar la concentración y la pureza del ARN total extraído mediante un NanoDrop.

La razón A260/A280 aceptable para el ARN es de aproximadamente 2.0. No obstante, las muestras presentan una razón debajo de este valor lo cual indica la presencia de contaminación con proteína, fenol u otros contaminantes. Es importante reconocer que las muestras de ARN total fueron resuspendidas en agua libre de nucleasas, lo cual puede afectar la lectura de pureza. Para mediciones de ARN suspendidas en agua libre de nucleasas se recomienda utilizar agua levemente alcalina, pH 7.5-8.5, para mejorar significativamente dicha razón ya que el pH afecta la lectura de A280. También es importante mencionar que si se obtiene una razón de A260/A280 de 1.8, al cuantificar en agua libre de nucleasas, es posible que el ARN se encuentre puro pero no se puede excluir la contaminación por ADN genómico, proteínas u otros contaminantes (Rna, Nd-, Rna, Nanodrop, & Spectrophotometer, n.d.; Wilfinger, Mackey, & Chomczynski, 1997).

La razón A260/A230 aceptable para el ARN es de 2.0-2.2 y muestras con una razón de A260/A230 menores a 1.0 claramente se encuentran contaminadas con sales, restos de fenol o proteínas, lo cual aplica a las muestras extraídas que presentan un valor entre 0.40-0.95 (Rna *et al.*, n.d.; Wilfinger *et al.*, 1997). Otro factor que puede influir en la razón A260/A230 es el pigmento rojo-morado que presentan los ojos de los mosquitos y aunque este no afecte la pureza del ARN extraído si influye en la medición percibida (Herrmann & Frischauf, 1987).

Para minimizar errores en la cuantificación de ARN total con un Nanodrop se recomienda resuspender el ARN total extraído en buffer TE (pH 8) lo cual resultará en mediciones más confiables (Bonab *et al.*, 2015; Pfaffl, 2006; Wang & Seed, 2016).. Por lo tanto, se puede concluir con alta confianza que muestras con una absorbancia A260 que difiere de 2.0 presentan contaminación (Rna, Nd-, Rna, Nanodrop, & Spectrophotometer, n.d.). Para minimizar errores en la cuantificación de ARN total también se recomienda cuantificar con tintes fluorescentes. The Qubit requiere de pocas cantidades de muestra y es más exacto ya que presenta tintes que se adhieren directamente al ARN (Bonab *et al.*, 2015; Pfaffl, 2006; Wang & Seed, 2016).. A comparación, el NanoDrop, realiza mediciones de absorbancia UV y no tiene la capacidad de distinguir entre ADN, ARN y nucleótidos libres en la misma muestra (Bonab *et al.*, 2015). Por último, The Qubit, tiene la capacidad de reportar la concentración de la molécula de interés sin tomar en cuenta la presencia de contaminantes. A comparación, el NanoDrop no logra restar adecuadamente la presencia de la posible contaminación por lo tanto da resultados de concentración con menor precisión (Bonab *et al.*, 2015; Pfaffl, 2006; Wang & Seed, 2016).

Para mejorar la extracción de ARN total y obtener purezas aceptables con TRI Reagent se recomienda adicionar un paso más de lavado con etanol al 75%, después del que ya describe la metodología original, el cual ayudará a eliminar la presencia de contaminantes como fenol, proteínas u otros contaminantes. Otra opción para la extracción de ARN totales realizarla con el protocolo modificado de Rio *et al.*, 2010. Este recomienda resuspender el pellet de ARN inmediatamente en un buffer de Solubilización de SDS 1X en lugar de secar el pellet y resuspenderlo en agua. Luego de esto se recomienda adicionar NaOAc (3M) y re-extraer la solución con fenol para posteriormente precipitar en etanol y recuperar finalmente el ARN por medio de centrifugación y resuspensión en agua libre de nucleasas. Este protocolo indica que la resuspensión seguida por la extracción con fenol resulta en ARN con mayor pureza (Rio *et al.*, 2010).

Por último, para mejorar la extracción de ARN total se recomienda utilizar un kit específico para la extracción de ARN total o uno para la extracción de ARN mensajero. Es importante mencionar que el uso de kits específicos para la extracción de ARN total y luego la purificación de ARN mensajero mejoran la concentración y la pureza del ARN total. Esto influye en la calidad de todos los análisis posteriores que se deseen realizar (Bonab *et al.*, 2015).

Debido a los resultados finales obtenidos con esta investigación también se recomienda a futuras investigaciones extraer ARN total de pools de 3-7 mosquitos y utilizar más pools para que el análisis de expresión génica realizado sea más representativo y presente mayor significancia y confiabilidad.

Síntesis de ADNc

El kit para la síntesis de ADNc utilizado presenta tres diferentes métodos de síntesis de ADNc los cuales son: el uso de primers denominados random hexamers, Oligo(dT)₁₅, o una mezcla de ambos. Es importante reconocer que los random hexamers son el método más general para la síntesis de ADNc de una gran variedad de plantillas de ARN, pero no son utilizados con alta frecuencia para estudios de expresión génica ya que se sintetiza ADNc a partir de cualquier tipo de ARN lo cual puede diluir la señal obtenida a partir del ARNm (Bonab *et al.*, 2015). A comparación, los primers Oligo(dT)₁₅ son utilizados

únicamente para la síntesis de ADNc de ARN que presenta una cadena poli-adenilada o ARN mensajero, por lo que son mayormente utilizados para estudios de expresión génica. Los primers Oligo(dT)₁₅ son utilizados mayormente cuando se desea utilizar el ADNc sintetizado para un PCR donde la región a amplificar se encuentra cercano a la cadena poli-adenilada asegurando que haya una buena transcripción en esa región (Promega, 2014; ThermoFisherScientific, n.d.).

Debido a que los primers de CYP6 son degenerados se unen en varias regiones del genoma y fueron diseñados para *An. gambiae* (Ranson *et al.*, 2002) no hay conocimiento de la región donde se unen para *An. albimanus*. Por lo tanto, fue necesario realizar una optimización para la síntesis de ADNc con los tres diferentes métodos disponibles para poder identificar el mejor método. En la Figura 15, se observa que se sintetizó ADNc con los tres métodos y se evaluaron los resultados en base al PCR de CYP6. Se observó menor intensidad para las bandas de interés de CYP6 cuando se sintetizó el ADNc únicamente con los random hexamers. Así mismo, se pudo observar que los productos del PCR de CYP6 a partir de ADNc sintetizado con la mezcla de los primers (random hexamers y Oligo(dT)₁₅) y para los primers Oligo(dT)₁₅ fue muy similar. Por lo tanto, debido a las ventajas que presenta el utilizar los primers Oligo(dT)₁₅ para el estudio de expresión génica y que este método presentó un alto rendimiento, se eligió utilizar los primers Oligo(dT)₁₅ para la síntesis de ADNc de todas las muestras y verificar la síntesis mediante un PCR de Actina, Figura 16.

Optimización del PCR de CYP6

Para el PCR de CYP6 se tuvo que realizar una optimización con la temperatura de anillamiento (T_m) y con la concentración de ADNc, Figura 17 y Figura 18. Ameny (2005) utilizó los mismos primers de CYP6 y concluyó que la temperatura ideal de hibridación utilizando ADNc de *An. funestus* es de 50°C. No obstante, al probar dicha temperatura con ADNc de *An. albimanus* no se obtuvieron los mismos resultados. Por lo tanto, se evaluaron distintos T_ms para la reacción: 50°C, 55°C, 60°C y 65°C. En la Figura 17 se pueden observar resultados inespecíficos utilizando T_ms de 50°C y 55°C, dos amplicones de 480pb y 430pb. A un T_m de 65°C no se obtuvo una amplificación. Sin embargo, se obtuvo el resultado más específico a un T_m de 60°C, una única banda de 430pb. Por lo tanto, esta temperatura es la que se eligió para el resto de los PCRs de CYP6.

Luego de determinar la mejor temperatura de anillamiento (T_m) para el PCR de CYP6 se realizó una optimización en base a la concentración final de ADNc agregado, Figura 18. Dicha optimización se realizó con concentraciones de 100ng, 50ng, 25ng y 6.25ng. Se utilizó este rango de concentraciones debido a que Ameny (2005) reportó el uso de una concentración final de ADNc de 50ng. Se puede observar que la mayor especificidad se obtuvo con una concentración de ADNc de 25ng al observarse únicamente una banda de 430pb. Para las demás concentraciones, 100ng y 50ng, se obtuvieron resultados inespecíficos al observarse una banda muy tenue por arriba y por debajo de la banda de interés de 430pb. Para una concentración de 6.25ng de ADNc se observó una banda muy tenue. Por lo tanto, las condiciones ideales del PCR de CYP6 se obtuvieron con un T_m de 60°C y una concentración de ADNc de 25ng.

Optimización de qPCR para los genes de Actina, Rsp7 y CYP6

Al lograr optimizar el PCR de CYP6 para obtener una única banda es posible analizar la expresión de la familia de citocromos P450 CYP6 por medio de qPCR. Para el qPCR se utilizó la tecnología de SYBR Green ya que no se conoce la secuencia del producto obtenido con los primers CYP6 para *An. albimanus* por lo que no era posible diseñar una sonda y utilizar la tecnología de TaqMan. Sin embargo, es importante mencionar que la tecnología SYBR Green no presenta la especificidad de TaqMan. Por lo tanto, es importante no asumir que la presencia de una amplificación indica que la mayoría de la señal es derivada de la amplificación del gen de interés. Por consiguiente, también se debe incluir un análisis de la curva de disociación la cual indicará la amplificación de uno o más productos (Bonab *et al.*, 2015). Es importante mencionar que con un qPCR inicial de prueba de CYP6 se obtuvo una única curva indicando que solo hay un producto de amplificación. No obstante, se recomienda a futuras investigaciones verificar por medio de secuenciación que los primers degenerados de CYP6 amplifican únicamente un producto.

Para el análisis de cuantificación relativa de la expresión génica de la familia de citocromo P450 CYP6 fue necesario el uso de genes de referencia, Actina y el Rsp7. Estos genes han sido reportados como genes de referencia y son utilizados para normalizar los datos obtenidos en estudios de expresión génica. El gen de Actina o B-actina corresponde a un gen del citoesqueleto presente en todos los tejidos de los eucariotas. El gen Rsp7 o gen que corresponde a la proteína ribosomal de superficie 7 también se encuentra presente en todas las células de los tejidos (Amenya *et al.*, 2005; Bonab *et al.*, 2015).

Para poder analizar las muestras y el nivel de expresión génica de la familia de citocromo P450 CYP6 y normalizarlo con genes de referencia es indispensable evaluar la validez del ensayo. Esto se logra por medio de un análisis del porcentaje de eficiencia, al realizar una curva de eficiencia, y optimizar las condiciones de qPCR en caso las eficiencias no sean aceptables. El porcentaje de eficiencia es de gran importancia para el análisis de expresión génica debido a que este debe ser similar entre las cepas utilizadas y entre los diferentes genes a comparar – CYP6, Actina y Rsp7 (Bonab *et al.*, 2015). Para la optimización y determinación de los porcentajes de eficiencia se realizaron curvas de eficiencia con 6 diferentes puntos de concentración de ADNc para la cepa Sanarate y RDelta. Se pueden observar las curvas de eficiencia de Actina, Rsp7 y CYP6 en la Figura 19, Figura 20 y Figura 21, respectivamente. Para las curvas de eficiencia es importante el coeficiente de correlación (R^2) ya que este indica como los datos se aproxima a la regresión lineal. El R^2 de todas las curvas estándar se encuentra en un rango de 0.9988 y 0.9887, lo cual es un valor muy cercano o igual al valor ideal de 1.

A partir de las curvas de eficiencia se obtuvo el porcentaje de eficiencia de cada curva para las dos cepas, Cuadro 7 y Cuadro 8.

En el Cuadro 7 se observa el mejor porcentaje de eficiencia obtenido para el qPCR de CYP6 el cual se obtuvo con una concentración final de primers de 0.6 μ M y presento porcentajes de eficiencia de 98.88% y 93.15% para la cepa Sanarata y la cepa RDelta, respectivamente. Para el qPCR de CYP6 se realizaron varias curvas de eficiencia con diferentes concentraciones de primers para mejorar los porcentajes de eficiencia y disminuir la diferencia del porcentaje de eficiencia entre las cepas Sanarate y

RDelta. Se observó que con incrementar la concentración final de primers de 0.5uM a 0.6uM mejoró significativamente la eficiencia para ambas cepas. Gaby & Buckley (2017) indican que el uso de primers degenerados presentan un sesgo significativo a la hora de realizar estudios de expresión génica, en ciertos casos hasta una estimación errónea de 1000 veces. Ellos reportaron que el incremento en la concentración final de los primers degenerados puede mejorar la eficiencia y disminuir el sesgo, pero no eliminarlo por completo. Por lo tanto, se recomienda realizar más curvas estándar con mayores concentraciones de primers y variando independientemente la concentración del primer forward y el reverse. Con esto se logrará verificar si se logra una mejor eficiencia para los mismos y si se logra disminuir la diferencia de porcentaje de eficiencia que se encuentra entre las cepas Sanarate y RDelta (Bonab *et al.*, 2015; Scientific Thermo Fisher, 2016). Es importante reconocer que la eficiencia también depende de la longitud del producto de PCR. Para qPCR el tamaño recomendado es el de 50-150pb ya que el tener un producto de mayor tamaño tiene un efecto en la eficiencia (Bonab *et al.*, 2015), desventaja del qPCR de CYP6 al ser el producto esperado de 430pb. La ventaja de tener un amplicón grande para los primers degenerados de CYP6 es que se pueden diseñar varios pares de primers para secuencias dentro de la región del amplicón de 430pb y seleccionar el par que presenten los mejores resultados y la mejor eficiencia.

En el Cuadro 8 se observan los porcentajes de eficiencia obtenidos para los genes de referencia de Actina y Rsp7. Para el gen de Actina el porcentaje de eficiencia para la cepa Sanarate es de 104.42% mientras que para la cepa RDelta es de 98.63%. Para mejorar la diferencia del porcentaje de eficiencia de los primers de Actina entre las cepas Sanarate y RDelta se recomienda realizar más curvas estándar variando la concentración de primers. También se puede observar que para el gen Rsp7 el porcentaje de eficiencia para la cepa Sanarate es de 101.75% mientras que para la cepa RDelta es de 102.01%.

No obstante, a partir de las diferencias en los porcentajes de eficiencia para cada gen (Actina, Rsp7 y CYP6) y para cada cepa (Sanarate y RDelta) se obtuvieron porcentajes de eficiencia dentro del rango ideal de 90-110% (Bonab *et al.*, 2015). Por lo tanto, se procedió a realizar el análisis pertinente de las muestras con las condiciones estandarizadas para cada qPCR.

Se recomienda a futuras investigaciones mandar a secuencia el producto amplificado con los primers degenerados de la familia de citocromos P450 CYP6, para identificar el gen o los genes de esta familia que fueron amplificados en *An. albimanus*.

Análisis de expresión génica de la familia de citocromo P450 CYP6

Para poder realizar el análisis de expresión génica de la familia de citocromo P450 CYP6 se utilizó el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta Ct$. Este tiene como fundamento y asume que los genes de referencia y el gen de interés, CYP6, presentan la misma eficiencia. Se eligió este método de cuantificación y análisis debido a que no se podía utilizar el método de cuantificación relativa de curva estándar relativa al no contar con una cepa externa a las dos cepas de mosquitos utilizadas para la investigación (Bonab *et al.*, 2015).

Se realizó el análisis con los tres diferentes genes para todas las muestras de las dos réplicas de ADNc y se unificaron los resultados, Figura 24 y Cuadro 10. Para los dos análisis de expresión de CYP6

usando los genes dos genes de referencia se observa que hay tendencia de mayor expresión constitutivo para la familia de citocromos P450 CYP6 en la cepa RDelta (generación 89) en comparación con la cepa Sanarate, Figura 24. No obstante, por medio de la prueba estadística T de Welch, Cuadro 10, para ambas pruebas realizadas se obtuvo un valor-p mayor a 0.05. Por lo tanto, se concluye que no se rechaza la hipótesis nula la cual establece que no existe diferencia significativa en el nivel de expresión constitutivo de los genes de la familia de citocromo P450 CYP6 entre la cepa de *Anopheles albimanus* susceptible, Sanarate, y resistente a deltametrina, RDelta generación 89.

Análisis de los valores de la curva de disociación

Las figuras 22 y 23 presentan las curvas de disociación de las cepas Sanarate y RDelta para ambas réplicas de ADNc. El triplicado de ciertas muestras, como por ejemplo la S1.4, se presentan curvas con Tms levemente distintos pero esta diferencia no supera 1°C. De igual manera, los valores promedio de Tm de la cepa Sanarate y la cepa RDelta presentan una diferencia en el Tm pero la desviación estándar no supera 1°C. Estos resultados indican que el amplicón resultante presenta la misma secuencia para todas las muestras, independientemente de la cepa – Sanarate o RDelta. No obstante, es posible que esta leve variación de Tms entre las dos cepas se deba a la selección de variantes de alelos. Es importante mencionar que no se han reportado variaciones alélicas en esta familia de citocromo P450 en *Anopheles* (Amenya *et al.*, 2005; Ranson *et al.*, 2002b).

Análisis de los porcentajes de eficiencia del qPCR de CYP6

Los Tms no varían significativamente entre la cepa Sanarate y RDelta, sin embargo, es importante reconocer la diferencia en la eficiencia de qPCR de CYP6 que se observa entre la cepa Sanarate y RDelta, 98.88% y 93.15%, respectivamente. Esta diferencia en eficiencia se puede deber a una diferencia en la unión de los primers degenerados CYP6 según la plantilla de ADNc de la cepa Sanarate o RDelta. Este fenómeno se denomina “mismatch” o unión errónea y puede ocurrir entre diferentes cepas aun utilizando primers reportados previamente en la literatura. Para confirmar o indicar la ausencia de mismatch es importante hacer varias curvas de eficiencia utilizando la misma muestra y las mismas condiciones. Si los resultados dan el mismo porcentaje de eficiencia se puede asegurar que los primers se comportan de la misma forma y no hay presencia de mismatch. Es altamente probable que ocurra mismatching con los primers degenerados de CYP6 debido a la variación en el porcentaje de eficiencia obtenida para las pruebas realizadas con una concentración final de primers de 0.5uM, Cuadro 7. Se observó una variación en el porcentaje de eficiencia en la cepa Sanarate de 100.47% a 85.50% a 116.20% y para RDelta una variación de 109.42% a 106.26%. Sin embargo, no se puede garantizar que la variación se deba a mismatching debido a que se utilizó una muestra de ADNc distinta para cada prueba. Por lo tanto, se recomienda a futuras investigaciones hacer varias curvas de eficiencia utilizando la misma muestra y las mismas condiciones para verificar la ausencia o presencia de mismatching con los primers degenerados de CYP6 (Brankatschk, Bodenhausen, Zeyer, & Burgmann, 2012).

Otra posible explicación de las diferencias en el porcentaje de eficiencia de los primers CYP6 entre la cepa Sanarate y RDelta es que la plantilla de ADNc entre las cepas presente variación de secuencia justamente donde se unen los primers degenerados de CYP6. Es posible que haya una duplicación del

gen con variación alélica en la cepa RDelta que cause que los primers CYP6 degenerados no se unan con tanta eficiencia como con la cepa Sanarate. Los primers utilizados en este estudio se utilizaron para un análisis de expresión génica con *An. funestus* y antes de eso fueron diseñados en un estudio con *An. gambiae* (Amenya *et al.*, 2005; Ranson *et al.*, 2002a). Los primers fueron diseñados en base a 8 genes parciales de CYP6 obtenidos a partir de un estudio que implementó secuenciación automática ABI 377. Luego de determinar la secuencia completa de los genes CYP6 se diseñaron los primers degenerados en base a los codones de inicio y de terminación predichos y se utilizaron para amplificar la región codificante de ADNc de adultos de *An. gambiae*. Estos primers se encuentran en el dominio globular después del sitio de unión de oxígeno y engloban la región conservada del sitio de unión del grupo hemo de los citocromo P450 (Amenya *et al.*, 2005; Ranson *et al.*, 2002a). A pesar de que se encuentren en regiones conservadas cabe la posibilidad de que estas regiones sean diferentes entre las cepas Sanarate y RDelta causando y explicando la diferencia observada en el porcentaje de eficiencia de los primers degenerados de CYP6. Por lo tanto, se recomienda diseñar primers que flanqueen la región de unión de los primers CYP6 degenerados para determinar si la región de unión de los primers CYP6 degenerados varía entre la cepa Sanarate y la cepa RDelta. También se recomienda realizar un qPCR con ADN genómico para poder identificar si hay presencia de duplicación en los genes de la familia de citocromos P450 CYP6 en la cepa RDelta en comparación con la cepa Sanarate.

Es importante mencionar que la eficiencia puede variar debido a un sesgo en la amplificación de un producto sobre otros posibles productos, presentando resultados con un sesgo para dicha secuencia y así resultando en análisis erróneos de expresión (Brankatschk *et al.*, 2012). Este sesgo se observa amplificado con el uso de primers degenerados por lo que da un sesgo en el análisis del nivel de expresión. Gaby & Buckley (2017) indican que el uso de primers degenerados presentan un sesgo significativo a la hora de realizar estudios de expresión génica, en ciertos casos hasta una estimación errónea de 1000 veces. Ellos reportaron que el incremento en la concentración final de los primers degenerados puede mejorar la eficiencia y disminuir el sesgo, pero no eliminarlo por completo.

Por último, es imprescindible mencionar que se ha reportado que la expresión de citocromos P450 se encuentra regulado a lo largo del desarrollo de los mosquitos. De igual manera se ha reportado que cabe la posibilidad de que la expresión o sobreexpresión de citocromos P450 puede encontrarse ligado al sexo. En un estudio en *An. gambiae* con el gen específico de *CYP6Z1* se reportó una sobreexpresión (11x) mayor en machos susceptibles en comparación con hembras resistentes y una sobreexpresión (30X) mayor en machos resistentes en comparación con hembras resistentes (Amenya *et al.*, 2005; Nikou *et al.*, 2003). Por lo tanto, se recomienda a futuras investigaciones realizar el presente análisis de expresión con diferentes estadios y machos de las cepas Sanarate y RDelta.

Análisis de posibles alternativas de la resistencia de la cepa RDelta

Se encuentran varias razones por lo cual no existe diferencia significativa en el nivel de expresión constitutivo de los genes de la familia de citocromo P450 CYP6 entre las cepas de *An. albimanus* con resistencia o susceptibilidad a deltametrina.

Posibles alternativas de la resistencia de la cepa RDelta mediada por la familia de citocromos P450 CYP6

Cabe la posibilidad que la familia de citocromo P450 CYP6 no se encuentre sobre-expresada constitutivamente, sino que sea una sobre-expresión inducida al ser expuestos a deltametrina. Por lo tanto, se recomienda realizar pruebas con adultos sobrevivientes del bioensayo de la botella del CDC. Sin embargo, es importante realizar un estudio previo para determinar los efectos que pueden tener los residuos de insecticida como fuente de contaminación en la extracción de ARN y que sean arrastrados y afectando el procesamiento posterior de las muestras.

Es posible que no exista diferencia significativa en el nivel de expresión constitutivo de los genes de la familia de citocromo P450 CYP6 entre las cepas debido a que la resistencia se deba a otro mecanismo metabólico involucrando a dicha familia, pero siendo indetectable mediante qPCR. El aumento en la actividad enzimática de las familias de enzimas involucradas en la resistencia a insecticidas puede ocurrir por cuatro vías. La primera por la duplicación o triplicación del gen lo cual también resulta en una sobre-expresión del mismo, opción que se estaría evaluando mediante el qPCR de esta investigación. La segunda, por un aumento en la transcripción de una única copia del gen, la cual también se encuentra evaluada mediante qPCR. No obstante, la resistencia metabólica también se puede deber a un incremento en el metabolismo sin un incremento en la expresión cuando la enzima presenta una estructura alterada que permite metabolizar el insecticida a una tasa mucho mayor. Por último, se encuentra la posibilidad de que ocurra una mutación en el sitio blanco de una enzima que previamente no metabolizaba el insecticida que cause que logre metabolizarlo (Coleman & Hemingway, 2007; Corbel & Guessan, 2013). La resistencia causada por las enzimas citocromo P450 también se puede deber a sustituciones de los amino ácidos que posiblemente juegan un rol importante en la estructura y eficiencia de la enzima. (Bergé *et al.*, 1998; Janet Hemingway *et al.*, 2004). Debido a estas posibilidades se recomienda nuevamente trabajar con primers no degenerados para poder asegurar que la resistencia metabólica no se deba a una estructura alterada de una de las citocromo P450 de la familia CYP6.

Resistencia de la cepa RDelta posiblemente mediada por otra familia de citocromo P450

Es posible que no existe diferencia significativa en el nivel de expresión de los genes de la familia de citocromo P450 CYP6 entre las cepas debido a que la resistencia metabólica se deba a otra familia de citocromos P450, como la familia CYP9. En un estudio no publicado, Impoinvil *et al.* (2017), se realizó un análisis de expresión génica de CYP9K1 con cepas de Perú y Guatemala resistentes a deltametrina. Se observó una sobre-expresión dos veces mayor de CYP9K1 en la cepa de Guatemala en comparación con una cepa susceptible. Los citocromos P450 de la familia CYP9 también se encuentra involucrada en la resistencia metabólica de varios mosquitos como lo son *An. gambiae*, *An. aegypti* y *Culex quinquefasciatus* (David *et al.*, 2013). En poblaciones de *An. gambiae* resistentes a permetrina y deltametrina en México, Tailandia y Vietnam se ha observado la sobre-expresión de la enzima CYP9J32 que metaboliza piretroides, con preferencia a deltametrina (David *et al.*, 2013). También se ha reportado que las enzimas CYP9J24, CYP9J26 y CYP9J28 estudiadas en poblaciones de laboratorio de *Ae. aegypti* presentan la capacidad de metabolizar piretroides, por lo que son indicadores claves importantes para

indicar resistencia en poblaciones de campo (David *et al.*, 2013). Por último, en *C. quinquefasciens* se ha reportado la sobre-expresión de CYP9M10 que metaboliza permetrina y deltametrina de forma inducida o constitutiva (David *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2017).

Resistencia de la cepa RDelta se debe a otras enzimas metabólicas

Es posible que no exista diferencia significativa en el nivel de expresión constitutivo de los genes de la familia de citocromo P450 CYP6 entre las cepas si la resistencia metabólica es causada por otras enzimas como las esterasas o las GSTs. La elevación de esterasas y GSTs se puede detectar por medio de una microtitulación que permite cuantificar de manera precisa los niveles de dichas enzimas. En cuanto a la detección de P450s se utiliza la prueba de heme modificado que permite obtener una estimación a grandes rasgos sobre la expresión de P450s, pero este presenta un grado de interpretación alto y únicamente detecta altos niveles de expresión de la enzima (Coleman & Hemingway, 2007).

Es muy probable que la resistencia metabólica de la cepa de *An. albimanus* resistente a deltametrina, RDelta, involucre a las esterasas debido a que se ha reportado previamente en diferentes especies y en *An. albimanus* de Guatemala. En el 2017, en estudios no reportados, (Impoinvil *et al.* 2017), se realizó un análisis de la expresión de CYP6P5 con cepas resistentes a deltametrina de Perú y de Guatemala. Se reportó que dicho gen se encuentra sobre-expresado 68 veces más en la cepa de Perú y no presenta ninguna sobreexpresión en la cepa de Guatemala, indicando que este gen no se encuentra involucrado en la resistencia a deltametrina. No obstante, en un estudio realizado en 2005 con *An. gambiae* utilizando microarreglos se identificó resistencia a permetrina mediada por 77 esterasas diferencialmente expresadas (Vontas *et al.*, 2005). En Guatemala, se reportó que la resistencia a fenitrotion fue causada por la insensibilidad de la enzima acetilcolinesterasa que también es responsable por la resistencia cruzada a organofosforados en 1988 (Beach & Brogdon, 1990; Patton & Liston, 1992). En 1990 se confirmó la presencia de resistencia cruzada a fenitrotion y a deltametrina en *An. albimanus* de tres poblaciones de la costa sur de Guatemala, causada por resistencia metabólica específicamente por B-esterasas y carboxilesterasas (clasificación Aldridge) (Beach *et al.*, 1989). Brogdon *et al.*, 1999, observó que la permetrina, un piretroide, selecciona niveles altos de oxidasas, pero selecciona aún mayor actividad de esterasas. (W G Brogdon *et al.*, 1999; William G Brogdon *et al.*, 1999). Por último, en el 2007 se realizó un estudio en el sur de México para determinar mecanismos de resistencia en *An. albimanus*. Se observó alta resistencia a DDT y alta resistencia a deltametrina mediada por niveles altos de GST, citocromo P450s y esterasas. De igual manera se identificó que la resistencia a deltametrina se ve principalmente mediada por un alto contenido de citocromos P450 y elevados niveles de esterasas (Dzul, 2007).

Resistencia de la cepa RDelta mediada por otro tipo de resistencia no metabólica

Por último, cabe la posibilidad que la resistencia a deltametrina observada en la cepa RDelta no se deba a un mecanismo de resistencia metabólico sino a uno de resistencia en el sitio blanco. Para verificar esto se recomienda realizar el bioensayo de la botella del CDC luego de haber expuesto la población de mosquitos a un sinergista (Coleman & Hemingway, 2007). La ausencia de mortalidad de la mayor parte de la población indica que el mecanismo de resistencia no es metabólico. Los sitios blancos que más

comúnmente sufren una mutación o una modificación para la resistencia a DDT y piretroides son los canales de sodio dando el fenotipo knockdown resistance (*kdr*) (Austin *et al.*, 2011). En el 2013, con muestras de Guatemala, México, Nicaragua, Costa Rica, Ecuador y Colombia, se describió por primera vez la región *kdr* en *An. albimanus* al igual que la presencia de polimorfismos los cuales se encuentran asociados a resistencia a insecticidas, específicamente piretroides (Lol *et al.*, 2013). Desde 1999 se conoce que la resistencia a piretroides en Guatemala era mediada por *kdr* y mecanismos oxidativos (Beach *et al.*, 1989; William G. Brogdon & Barber, 1990).

Información adicional pertinente de la cepa RDelta

A pesar de todas las posibilidades mencionadas anteriormente, es importante reconocer que la generación 89 de la cepa RDelta es la progenie de la última generación seleccionada, generación 88. Las hembras de la generación 87 y 88 fueron seleccionadas con una concentración de 8.827ug/mL de deltametrina. A comparación, los machos de la generación 87 y 88 fueron seleccionados con una concentración de 2.33ug/mL de deltametrina. Se utilizaron estas concentraciones para la selección debido a que fueron los valores del LD 75 recalculados para la generación 87. Con la selección de la generación 88 bajo estas condiciones se observó un porcentaje de mortalidad de 49% y 86% para hembras y machos, respectivamente. La generación seleccionada antes de la 87 fue la generación 83 la cual fue seleccionada con un LD 99 de 14ug/mL. La disminución pronunciada del LD de la generación 83 a la generación 87 podría ser explicada, en caso la resistencia sea mediada por una sobre-expresión de P450 debido a que esta resistencia metabólica se ha reportado como inestable ya que fácilmente se puede perder en la ausencia del factor selectivo, deltametrina (Bergé *et al.*, 1998). Los resultados que indican que no hay diferencia significativa en el nivel de expresión constitutivo de la familia de citocromos P450 CYP6 se obtuvieron con muestras de la generación 89 que presentaron un LD 75 relativamente bajo en comparación con las generaciones anteriores de la misma cepa. Por lo tanto, se recomienda realizar las mismas pruebas de qPCR con los primers CYP6 y realizar el mismo análisis de expresión utilizando individuos de generaciones anteriores que hayan sido almacenados o de generaciones futuras que presenten un grado de resistencia comparable a las generaciones anteriores de RDelta para confirmar los resultados de esta investigación.

X. CONCLUSIONES

A. General

1. Se logró determinar el nivel de expresión constitutivo de genes de la familia de citocromo P450 CYP6 en cepas de laboratorio de *Anopheles albimanus* resistente a deltametrina (RDelta, generación 89) a comparación de la cepa susceptible (Sanarate).

B. Específicas

1. La síntesis de ADNc a partir del ARN total aislado de los genes de la familia de citocromo P450 CYP6 expresados constitutivamente en cepas de laboratorio de *An. albimanus* resistente y susceptible a deltametrina se realizó con primers Oligo(dT)₁₅ del kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega).
2. Por medio de la estandarizar la técnica de qPCR para la familia de citocromo P450 CYP6 de *An. albimanus* se identificaron las condiciones óptimas (T_m 60°C y concentración final de primers de 0.6μM) que resulta en un porcentaje de eficiencia de 98.88% y 93.15% para las cepas Sanarate y RDelta, respectivamente.
3. Por medio de la prueba T de Welch no se pudo rechazar la hipótesis nula la cual establece que no existe una diferencia significativa en el nivel de expresión constitutiva de la familia de citocromo P450 CYP6 entre cepas de laboratorio de *Anopheles albimanus* resistente (RDelta, generación 89) y susceptible (Sanarate) a deltametrina por medio qPCR.
4. Debido a la diferencia que se observa en los porcentajes de eficiencia para el qPCR de CYP6 para las cepas Sanarate y Rdelta es posible que la región de unión de los primers degenerados de CYP6 presenta diferentes secuencias en la cepa Sanarate y la cepa RDelta (generación 89).
5. En base al análisis de T_m de la curva de disociación realizado para las cepas Sanarate y RDelta no hay diferencia significativa en el T_m por lo que se interpreta que el amplicón resultante presenta la misma secuencia para todas las muestras, independientemente de la cepa – Sanarate o RDelta.

XI. RECOMENDACIONES

A. Optimización del método de qPCR con primers degenerados CYP6

1. Extracción de ARN total
 - a. Extraer ARN de pools de 3-7 mosquitos y utilizar más pools para que el análisis de expresión génica realizado sea más representativo y presente mayor significancia y confiabilidad.
 - b. Utilizar un kit específico para la extracción de ARN total o realizar la extracción con TRI Reagent tomando en cuenta las modificaciones de Rio *et al*, 2010 o con el paso extra de lavado con etanol al 75%.
 - c. Cuantificar el ARN total extraído con The Qubit, en lugar de utilizar el NanoDrop.
 - d. Si solo hay disponibilidad del NanoDrop para cuantificación se recomienda diluir las muestras en buffer TE pH 8.
2. Síntesis de ADNc
 - a. Sintetizar el ADNc con una mezcla de primers Oligo(dT)₁₅ y random hexamers para evaluar si mejora la eficiencia de los primers CYP6 para las dos cepas de *An. albimanus*.
3. Optimización de qPCR para los genes de Actina, Rsp7 y CYP6
 - a. Gene de referencia de Actina
 - 1) Realizar varios qPCRs variando la concentración de los primers de Actina para que se obtengan mejores porcentajes de eficiencia y una diferencia menor en los porcentajes de eficiencia para las cepas Sanarate y RDelta.
 - b. qPCR de la familia de citocromos P450 CYP6
 - 1) Verificar por medio de secuenciación que los primers degenerados de CYP6 amplifican únicamente un producto e identificar que genes de la presente familia son amplificados.
 - 2) Realizar más curvas de eficiencia con una sola muestra utilizando mayores concentraciones de primers degenerados CYP6 y variando independientemente la concentración del primer forward y el reverse. Esto permitirá verificar que no haya presencia de mismatching, que se obtenga una mejor eficiencia para las cepas y lograr disminuir la diferencia del porcentaje de eficiencia que se encuentra entre las cepas Sanarate y RDelta.

- 3) Diseñar primers específicos para los genes determinados en la clonación de los amplicones obtenidos del PCR de CYP6. Diseñar varios pares de primers para secuencias dentro de la región del amplicón de 430pb para obtener amplicones de un tamaño recomendado para qPCR (50-150pb) y seleccionar el par que presenten los mejores resultados y eficiencia. Realizar un análisis de expresión mediante qPCR con estos primers.

B. Análisis de expresión génica de la familia citocromo P450 CYP6

1. Cabe la posibilidad de que las regiones de unión de los primers CYP6 sean diferentes entre las cepas Sanarate y RDelta. Por lo tanto, se recomienda diseñar primers que flanqueen los primers CYP6 degenerados para determinar si la región de unión de los primers CYP6 degenerados varía entre la cepa Sanarate y la cepa RDelta.
2. Debido a que se ha reportado que la expresión de citocromos P450 se encuentra regulado a lo largo del desarrollo de los mosquitos y se ha reportado la posibilidad de encontrarse ligado al sexo se recomienda realizar el presente análisis de expresión génica de la familia de citocromo P450 CYP6 con diferentes estadíos y con machos de las cepas Sanarate y RDelta.

C. Análisis de posibles alternativas de la resistencia de la cepa RDelta

1. Cabe la posibilidad que la familia de citocromo P450 CYP6 no se encuentre sobre-expresada constitutivamente, sino que sea una sobre-expresión inducida al ser expuestos a deltametrina. Por lo tanto, se recomienda realizar pruebas con adultos sobrevivientes del bioensayo de la botella del CDC.
2. Es posible que no existe diferencia significativa en el nivel de expresión constitutivo de los genes de la familia de citocromo P450 CYP6 entre las cepas debido a que la resistencia metabólica se deba a otra familia de citocromos P450. Por lo tanto, se recomienda realizar un análisis de expresión génica para la familia de citocromo P450 CYP9 relacionada a resistencia a piretroides.
3. Es posible que no exista diferencia significativa en el nivel de expresión constitutivos de los genes de la familia de citocromo P450 CYP6 entre las cepas si la resistencia metabólica es causada por otras enzimas como las esterasas o las GSTs. Por lo tanto, se recomienda realizar pruebas de la botella del CDC luego de haber expuesto la población de mosquitos a un sinergista para identificar si la resistencia es mediada por un mecanismo metabólico. Si se observa que la resistencia es metabólica se recomienda realizar ensayos bioquímicos para detectar e identificar los sistemas de enzimas (oxidadas, GSTs o esterasas) involucrados.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- <<Deltamethrin General Fact Sheet>>. 2010. *National Pesticide Information Center*. Retrieved from <http://npic.orst.edu/factsheets/DeltaGen.pdf>
- <<National Pesticide Telecommunications Network>>. (n.d.). Retrieved from <http://www.cmmcp.org/factsheet.pdf>
- <<Parasite lifecycle | Medicines for Malaria Venture>>. (n.d.). Retrieved April 25, 2017, from <https://www.mmv.org/malaria-medicines/parasite-lifecycle>
- <<Plasmodium Life cycle>>. 2016. Retrieved May 4, 2017, from <http://www.malwest.gr/en-us/malaria/informationforhealthcareprofessionals/plasmodiumlifecycle.aspx>
- <<WHO | Malaria>>. 2016. Retrieved August 27, 2016, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
- Abdalla, H., Wilding, C. S., Nardini, L., Pignatelli, P., Koekemoer, L. L., Ranson, H., & Coetzee, M. 2014. <<Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* in Sudan: temporal trends and underlying mechanisms>>. *Parasites & Vectors*, 7(1):213. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-213>
- Amenya, D. A., Koekemoer, L. L., Vaughan, A., Morgan, C., Brooke, B. D., Hunt, R. H., ... Coetzee, M. 2005. <<Isolation and sequence analysis of P450 genes from a pyrethroid resistant colony of the major malaria vector *Anopheles funestus*>>, 16(December):437–445. <https://doi.org/10.1080/10425170500356727>
- Anzenbacher, P., & Anzenbacherová, E. 2003. <<Cytochromes P450: Review of their Basic Principles>>. *Proc. Indian Natn Science Academy*.
- Austin, J., Avella, L., Bingham, G., Hopeé, M., Horn, K., Invest, J., ... Porter, A. 2011. *Insecticide Resistance Action Committee Insecticide Resistance Action Committee Resistance Management for Sustainable Agriculture and Improved Public Health Prevention and Management of Insecticide Resistance in Vectors of Public Health Importance*. Retrieved from http://www.irac-online.org/content/uploads/VM-layout-v2.6_LR.pdf
- Balabanidou, V., Kampouraki, A., MacLean, M., Blomquist, G. J., Tittiger, C., Juárez, M. P., ... Vontas, J. 2016. <<Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*>>. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(33):201608295. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608295113>
- Beach, R. F., & Brogdon, W. G. 1990. <<Field evaluation of methods for estimating carbamate resistance in *Anopheles albimanus* mosquitos from a microplate assay for insensitive acetylcholinesterase>>, 66(5078):323–329.
- Beach, R. F., Cordon-Rosales, C., & Brogdon, W. G. 1989. <<Detoxifying Esterases may Limit the use of Pyrethroids for Malaria Vector Control in the Americas>>. *Parasitology Today*, 5(10):326–327. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758\(89\)90126-9](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758(89)90126-9)

- Bergé, J., Feyereisen, R., & Amichot, M. 1998. <<Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects>>. *Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects*, (October):1701–1706. <https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0321>
- BIO-RAD. 2006. <<Real-time PCR: Applications Guide>>. *Bio-Rad Laboratories*,:2–84.
- Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A., Nikbin, B., ... O'Shea, K. S. 2015. <<Realtime PCR Handbook>>. *Lab Chip*,4(2):189–200. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5278>
- Brankatschk, R., Bodenhausen, N., Zeyer, J., & Burgmann, H. 2012. <<Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples>>. *Applied and Environmental Microbiology*,78(12):4481–4489. <https://doi.org/10.1128/AEM.07878-11>
- Brogdon, W. G., & Barber, A. M. 1990. <<Fenitrothion-deltamethrin cross-resistance conferred by esterases in Guatemalan *Anopheles albimanus*>>. *Pesticide Biochemistry and Physiology*,37(2):130–139. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(90\)90118-L](https://doi.org/10.1016/0048-3575(90)90118-L)
- BROGDON, W. G., BEACH, R. F., BARBER, A. M., & CORDON-ROSALES, C. 1992. <<A generalized approach to detection of organophosphate resistance in mosquitoes>>. *Medical and Veterinary Entomology*,6(2):110–114. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1992.tb00585.x>
- Brogdon, W. G., Mcallister, J. C., Corwin, A. M., & Cordon-rosales, C. 1999. <<Oxidase-Based DDT – Pyrethroid Cross-Resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*>>,111:101–111.
- Brogdon, W. G., McAllister, J. C., Corwin, a M., & Cordon-Rosales, C. 1999. <<Independent selection of multiple mechanisms for pyrethroid resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae)>>. *Journal of Economic Entomology*,92(2):298–302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10333749>
- Cáceres, L., Rovira, J., García, A., & Torres, R. 2011. <<Determination of the resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in Panamanian *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes>>. *Biomédica*,31(3):419–427. <https://doi.org/10.1590/s0120-41572011000300014>
- Colanta. 2016. <<Informe Anual>>.
- Coleman, M., & Hemingway, J. 2007. <<Insecticide resistance monitoring and evaluation in disease transmitting mosquitoes>>. *Journal of Pesticide Science*,32(2):69–76. <https://doi.org/10.1584/jpestics.R07-01>
- Corbel, V., & Guesson, R. N. 2013. <<Distribution , Mechanisms , Impact and Management of Insecticide Resistance in Malaria Vectors : A Pragmatic Review>>. *Anopheles Mosquitoes - New Insights into Malaria Vectors*,:813. <https://doi.org/10.5772/3392>
- Croft, A. M., Baker, D., & von Bertele, M. J. 2001. <<An evidence-based vector control strategy for military deployments: the Bristish army experience>>. Retrieved March 21, 2017, from <http://en.calameo.com/read/0002363439f9d041f1a0e>
- Cuamba, N., Morgan, J. C., Irving, H., Steven, A., & Wondji, C. S. 2010. <<High level of pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population of the chokwe district in mozambique>>. *PLoS ONE*,5(6):1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011010>
- David, J.-P., Ismail, H. M., Chandor-Proust, A., & Paine, M. J. I. 2013. <<Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth>>. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*,368(1612):1–12. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0429>
- Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R., & Williamson, M. S. 2007. <<DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels>>. *IUBMB Life*,59(3):151–162. <https://doi.org/10.1080/15216540701352042>

- Djouaka, R. F., Bakare, A. A., Coulibaly, O. N., Akogbeto, M. C., Ranson, H., Hemingway, J., & Strode, C. 2008. <<Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria.>>. *BMC Genomics*,9(1):538. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-538>
- Dzul, F. A. 2007. <<Susceptibilidad y mecanismos de resistencia a insecticidas en *Anopheles albimanus* de sur de la Península de Yucatán, México>>. *Salud Pública de México*,49(3).
- Edi, C. V., Djogbénu, L., Jenkins, A. M., Regna, K., Muskavitch, M. A. T., Poupardin, R., ... Weetman, D. 2014. <<CYP6 P450 Enzymes and ACE-1 Duplication Produce Extreme and Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*>>. *PLoS Genetics*,10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004236>
- Gaby, J. C., & Buckley, D. H. 2017. <<The Use of Degenerate Primers in qPCR Analysis of Functional Genes Can Cause Dramatic Quantification Bias as Revealed by Investigation of nifH Primer Performance>>. *Microbial Ecology*,74(3):701–708. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0968-0>
- García, D. J., Gobern, D. L., Sagastume, M., & Chávez, L. E. 2017. <<Semana Epidemiológica 2016 Departamento de Epidemiología Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social Resumen de eventos priorizados de vigilancia epidemiológica Semana 52 , Guatemala 2016 Evento Área Casos Municipio Casos>>,(40):1–15.
- Georghiou, G. P. 1994. <<Principles of insecticide resistance management>>. *Phytoprotection*,75(4):51. <https://doi.org/10.7202/706071ar>
- Georghiou, G. P., & Taylor, C. E. 1977. <<Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance.>>. *Journal of Economic Entomology*,70(3):319–323. <https://doi.org/10.1093/jee/70.3.319>
- Gong, Y., Li, T., Feng, Y., & Liu, N. 2017. <<The function of two P450s, CYP9M10 and CYP6AA7, in the permethrin resistance of *Culex quinquefasciatus*>>. *Scientific Reports*,(1):1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00486-0>
- Groves, J. T. 2015. <<Cytochrome P450 enzymes: understanding the biochemical hieroglyphs>>. *F1000Research*,178(0):1–7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6314.1>
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., & Ranson, H. 2004. <<The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes>>. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*,34(7):653–665. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>
- Hemingway, J., & Ranson, H. 2000. <<Insecticide resistance in insect vectors of human disease.>>. *Annual Review of Entomology*,45(February):371–91. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.371>
- Herrmann, B. G., & Frischauf, A.-M. 1987. <<Isolation of genomic DNA>>. *Methods in Enzymology*,152(1976):180–183. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)52018-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)52018-3)
- Ibrahim, S. S., Riveron, J. M., Stott, R., Irving, H., & Wondji, C. S. 2016. <<The cytochrome P450 CYP6P4 is responsible for the high pyrethroid resistance in knockdown resistance-free *Anopheles arabiensis*>>. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*,68:23–32. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.10.015>
- Jones, C. M., Haji, K. a, Khatib, B. O., Bagi, J., Mcha, J., Devine, G. J., ... Ranson, H. 2013. <<The dynamics of pyrethroid resistance in *Anopheles arabiensis* from Zanzibar and an assessment of the underlying genetic basis.>>. *Parasites & Vectors*,6:343. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-343>
- Josling, G. a, & Llinás, M. 2015. <<Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit.>>. *Nature Reviews. Microbiology*,13(9):573–87. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3519>
- Lennon, S. E., Miranda, A., Henao, J., Vallejo, A. F., Perez, J., Alvarez, A., ... Herrera, S. 2016. <<Malaria elimination challenges in Mesoamerica: evidence of submicroscopic malaria reservoirs in Guatemala.>>. *Malaria Journal*,15(1):441. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1500-6>

- Liu, N., Li, T., Reid, W. R., Yang, T., & Zhang, L. 2011. <<Multiple cytochrome P450 genes: Their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*>>. *PLoS ONE*,6(8):6–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023403>
- Lol, J. C., Castellanos, M. E., Liebman, K. A., Lenhart, A., Pennington, P. M., & Padilla, N. R. 2013. <<Molecular evidence for historical presence of knock-down resistance in *Anopheles albimanus*, a key malaria vector in Latin America>>.:1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-268>
- Malik Arif, Khalid Mahmud Khan, Muhammad Asif, Hafiz Muhammad Arsalan, Sara Zahid, Abdul Manan, and M. R. 2013. <<Development of Resistance Mechanism in Mosquitoes : Cytochrome P450 , the Ultimate Detoxifier>>. *Journal of Applied and Emerging Sciences*,4(2):100–117.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 2017. <<Ministerio de Salud Pública - Rociamiento intradomiciliar para prevenir la malaria en beneficio de 4 mil 400 personas>>. Retrieved February 12, 2018, from <http://www.mspas.gob.gt/index.php/noticias/noticias-mspas/item/285-rociamiento-intradomiciliar-para-prevenir-la-malaria-en-beneficio-de-4-mil-400-personas>
- Moore, J. H., & Williams, S. M. 2005. <<Traversing the conceptual divide between biological and statistical epistasis: Systems biology and a more modern synthesis>>. *BioEssays*,27(6):637–646. <https://doi.org/10.1002/bies.20236>
- Müller, P., Donnelly, M. J., & Ranson, H. 2007. <<Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana.>>. *BMC Genomics*,8:36. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-36>
- Munhenga, G., & Koekemoer, L. L. 2011. <<Differential expression of cytochrome P450 genes in a laboratory selected *Anopheles arabiensis* colony>>. *African Journal of Biotechnology*,10(59):12711–12716. [https://doi.org/Doi 10.5897/Ajb11.363](https://doi.org/Doi%2010.5897/Ajb11.363)
- Nardini, L., Christian, R. N., Coetzer, N., & Koekemoer, L. L. 2013. <<DDT and pyrethroid resistance in *Anopheles arabiensis* from South Africa.>>. *Parasites & Vectors*,6(1):229. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-229>
- Nikou, D., Ranson, H., & Hemingway, J. 2003. <<An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid- resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*>>. *Gene*,318(1–2):91–102. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00763-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00763-7)
- Obispo, T., Campos, M., Arreaga, H., Sáenz, E., Alvarado, A., Chacón, J., ... Blanco, C. 2011. <<Proyecto Eliminación Gradual del DDT Primera Fase: Diagnóstico Situacional del Uso del DDT y el Control de la Malaria>>. UNEP Facility, Global Environment Publica, Ministerio de salud. Retrieved from <http://www.bvsde.paho.org/bvsdepl/fulltext/ddt/GUT.pdf>
- OMS, & OPHA. 2014. *Informe de la situación de la Malaria en las Américas*.
- Palmquist, K., Salatas, J., & Fairbrother, A. 2012. <<Pyrethroid Insecticides: Use, Environmental Fate, and Ecotoxicology>>. *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*,:251–278. <https://doi.org/10.5772/29495>
- Patton, A., & Liston, A. 1992. <<A generalized approach to detection of organophosphate resistance in mosquitoes>>.:110–114.
- Penilla, R. P., Rodríguez, A. D., Hemingway, J., Torres, J. L., Solis, F., & Rodríguez, M. H. 2006. <<Changes in glutathione S-transferase activity in DDT resistant natural Mexican populations of *Anopheles albimanus* under different insecticide resistance management strategies>>. *Pesticide Biochemistry and Physiology*,86(2):63–71. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.01.006>
- Performance, P. 2013. <<2 : EPIDEMIOLOGICAL CONTEXT AND PROGRAM PERFORMANCE>>,(November):1–15.
- Pfaffl, M. W. 2006. *Relative quantification. Real-time PCR*. <https://doi.org/10.4016/17251.01>
- PREMIER Biosoft. (n.d.). <<TaqMan® Probes | TaqMan® probe design tips | TaqMan® design tutorial>>. Retrieved February 1, 2018, from http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/TaqMan.html

- Prevention, C.-C. for D. C. and. (n.d.-a). <<CDC - Malaria - About Malaria - Biology>>. Retrieved from <https://www.cdc.gov/Malaria/about/biology/index.html>
- Prevention, C.-C. for D. C. and. (n.d.-b). <<CDC - Malaria - About Malaria - Biology - Mosquitoes - Anopheles Mosquitoes>>. Retrieved from <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>
- Promega. 2014. <<ImProm-II™ Reverse Transcription System ImProm-II™ Reverse Transcription System>>.
- Raghavendra, K., Bp, N. R., & Gbks, P. 2012. <<Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae) Cytochrome P450 (P450) Supergene Family: Phylogenetic Analyses and Exon-Intron Organization>>. *Entomology, Ornithology & Herpetology*, 1(1):1–10. <https://doi.org/10.4172/2161-0983.1000102>
- Ranson, H., Nikou, D., Hutchinson, M., Wang, X., Roth, C. W., Hemingway, J., & Collins, F. H. 2002a. <<Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, *Anopheles gambiae*>>. *Insect Molecular Biology*, 11(5):409–418. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00350.x>
- Ranson, H., Nikou, D., Hutchinson, M., Wang, X., Roth, C. W., Hemingway, J., & Collins, F. H. 2002b. <<Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, *Anopheles gambiae*>>. *Insect Mol. Biol.*, 11(5):409–418. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00350.x>
- Rasmussen, R. S., & Morrissey, M. T. 2008. <<Methods for the Commercial Fish and Seafood Species>>. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(3):280–295. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00046.x>
- Richards, F. O., Flores, R. Z., Sexton, J. D., Beach, R. F., Mount, D. L., Cerdón-Rosales, C., ... Klein, R. E. 1994. <<Effects of permethrin-impregnated bed nets on malaria vectors of northern Guatemala>>. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 28(2):112–121.
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. 2010. <<Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent)>>. *Cold Spring Harbor Protocols*, 5(6):2010–2013. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>
- Rna, B., Nd-, N., Rna, P., Nanodrop, T., & Spectrophotometer, U. (n.d.). <<Quality assessment of total RNA>>. *Ratio*,:1–22. Retrieved from [http://w1.iata.csic.es/IATA/usct/geno/Doc/Bibliografia/Quality assessment of total RNA.pdf](http://w1.iata.csic.es/IATA/usct/geno/Doc/Bibliografia/Quality%20assessment%20of%20total%20RNA.pdf)
- Rongnoparut, P., Boonsuepsakul, S., Chareonviriyaphap, T., & Thanomsing, N. 2003. <<Cloning of cytochrome P450, CYP6P5, and CYP6AA2 from *Anopheles minimus* resistant to deltamethrin.>>. *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology*, 28(2):150–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14714662>
- Savolainen, K. M., & Vähäkangas, K. 2009. <<Insecticides>>. *Environmental Toxicology and Human Health*, 1.
- Scientific Thermo Fisher. 2016. <<PowerUp SYBR Green Master Mix User Guide, Pub. no. MAN0013511, Rev. C.0>>.
- Scott, J. G., & Wen, Z. 2001. <<Cytochromes P450 of insects: The tip of the iceberg>>. *Pest Management Science*, 57(10):958–967. <https://doi.org/10.1002/ps.354>
- Stevenson, B. J., Bibby, J., Pignatelli, P., Muangnoicharoen, S., O'Neill, P. M., Lian, L. Y., ... Paine, M. J. I. 2011. <<Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: Sequential metabolism of deltamethrin revealed>>. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7):492–502. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.003>
- ThermoFisherScientific. (n.d.). <<Basic Principles of RT-qPCR>>. Retrieved January 30, 2018, from <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/basic-principles-rt-qpcr.html>

- Vásquez, E. 2016. <<Situación de malaria semana epidemiológica 1 a la 26 del 2016>>.:5. Retrieved from [http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones 2016/Salas Situacionales/Situación de malaria semana epidemiológica 1 a la 26 del 2016.pdf](http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%2016/Salas%20Situacionales/Situación%20de%20malaria%20semana%20epidemiológica%201%20a%20la%2026%20del%202016.pdf)
- Vontas, J., Blass, C., Koutsos, A. C., David, J. P., Kafatos, F. C., Louis, C., ... Ranson, H. 2005. <<Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure>>. *Insect Molecular Biology*,14(5):509–521. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2005.00582.x>
- Wang, X., & Seed, B. 2016. <<Real-time PCR>>. *Real Time PCR*,:93–106. Retrieved from <http://www.gene-quantification.com/dorak-book-real-time-pcr-2006.pdf>
- Werck-Reichhart, D., & Feyereisen, R. 2000. <<Cytochromes P450: a success story.>>. *Genome Biology*,1(6):REVIEWS3003. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003>
- WHO. 2015a. <<Eliminating malaria in Guatemala>>,(March):1–6.
- WHO. 2015b. <<WHO recommended long-lasting insecticidal nets>>,(November):2015. Retrieved from http://www.who.int/whopes/Long-lasting_insecticidal_nets_November_2015.pdf?ua=1
- WHO. 2017. *World Malaria Report 2017*. Geneva. Retrieved from <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259492/1/9789241565523-eng.pdf?ua=1>
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. 1997. <<260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers.>>. *BioTechniques*,22:474–481. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/11821.5896>
- World Health Organization. 2009. <<Global Malaria Programme: Insecticide-Treated Mosquito Nets>>. *WHO Position Statement*,:1–12. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000009>
- World Health Organization. 2015. <<World Malaria Report 2015>>. *Www.Who.Org*.

XIII. ANEXOS

A. Tratamiento de material para eliminación de RNAsas

1. Propósito

- 1.1 Eliminar RNAsas de todo el material que se utilizará para la extracción y manipulación de ARN para asegurar que este se encuentre intacto durante cualquier prueba posterior que se quiera realizar asegurando resultados adecuados.

2. Aplicación

- 2.1 Limpieza de cualquier material para el futuro uso en la extracción o manipulación de ARN. El ARN se puede utilizar para PCR tiempo real, análisis de microarreglos, secuenciación, clonación, análisis de expresión génica, función y estructura de ARN. El PCR en tiempo real se puede utilizar para la cuantificación de la expresión de genes, para diagnosticar enfermedades, y para detectar organismos genéticamente modificados. No obstante, para poder realizar estos procedimientos se debe contar con un área y materiales estériles y libres de RNAsas.

3. Referencias

- 3.1 Roche Diagnostics. 2016. Chapter 2: Working with RNA.
- 3.2 Promega. 2014. RNA Analysis Notebook.
<http://genomics.no/oslo/uploads/PDFs/workingwithrna.pdf>
- 3.3 Life Technologies Corporation. 2012. Working with RNA: the basics: avoiding, detecting and inhibiting RNase.
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/files/dna-rna-purification-analysis/pdfs.par.91610.file.dat/co24813%20-%20rna%20basics1-final-high.pdf>

4. Terminología y abreviaciones

- 4.1 EDTA: Ácido etilendiaminotetracético
- 4.2 DEPC: dietilpirocarbonato
- 4.3 SDS: Dodecil sulfato de sodio

5. Principio

- 5.1 Utilizar diferentes soluciones como NaOH, EDTA, SDS, H₂O₂ y agua tratada con DEPC para eliminar RNAsas de cristalería, material plástico, área de trabajo (mesas), celdas de electroforesis, y electrodo de pHmetro para la adecuada extracción y manipulación de ARN.

6. Documentos asociados

- 6.1 Bioworld. 2012. Material Safety Data Sheet: Diethyl pyrocarbonate, DEPC. <http://www.bio-world.com/msds/40400024/DEPC-Diethyl-pyrocarbonate.html>
- 6.2 Sigma. 1999. Diethyl pyrocarbonate.
https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d5758pis.pdf
- 6.3 Bio-Rad. 2015. Safety Data Sheet: SDS. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/WWMSDS/LSGC/USA/USA_USA_1610327.pdf

- 6.4 Promega. 2016. Sodium Dodecyl Sulfate, Molecular Biology Grade (SDS). https://worldwide.promega.com/products/biochemicals-and-labware/biochemical-buffers-and-reagents/sodium-dodecyl-sulfate_-molecular-biology-grade-_sds_/?activeTab=3
- 6.5 Santa Cruz Biotechnology. 2016. EDTA, disodium salt, dihydrate, for molecular biology (CAS 6381-92-6). <http://www.scbt.com/datasheet-359904.html>

7. Seguridad

- 7.1 NaOH: Base irritante de ojos, piel. Ingesta causa irritación de tracto digestivo y quemaduras. Inhalación causa irritación de mucosas y tracto respiratorio. Neutralizar con vinagre y manejar con guantes.
- 7.2 EDTA: utilizado como un agente quelante de cationes divalentes, tales como Ca^{2+} . EDTA reduce al mínimo el impacto de la contaminación de iones metálicos y también es utilizado para inactivar enzimas tales como las RNAsas. Puede ser tóxico para tracto respiratorio, piel y ojos. Exposición repetida o prolongada puede causar daño a órganos.
- 7.3 SDS: Es un reactivo que desnaturaliza las proteínas por lo que es utilizado para la extracción de ácidos nucleicos para la ruptura de paredes celulares y disociación de ácidos nucleicos y complejos proteicos. Para su manejo utilizar guantes ya que es irritante de piel y mucosas.
- 7.4 DEPC: inactiva RNAsas debido a que modifica covalentemente los residuos de amino ácidos como histidina, lisina, cisteína y tirosina. Se hidroliza con el tiempo formando etanol y dióxido de carbono. Causa irritación del sistema respiratorio, sistema digestivo, piel y ojos.
- 7.5 H_2O_2 : causa la inactivación de RNAsas. A altas concentraciones es corrosivo para piel, ojos, mucosas, tracto digestivo y respiratorio.

8. Equipos, materiales y reactivos:

8.1 Equipo

- 8.1.1 Horno
- 8.1.2 Autoclave
- 8.1.3 Balanza

8.2 Materiales: Para preparación de soluciones de limpieza

- 8.2.1 Beakers o erlenmeyer
- 8.2.2 Espátulas
- 8.2.3 Plástico para pesar
- 8.2.4 Probeta

8.3 Reactivos

- 8.3.1 SDS
- 8.3.2 EDTA
- 8.3.3 NaOH
- 8.3.4 H_2O_2
- 8.3.5 Agua libre de nucleasas
- 8.3.6 Etanol 70%
- 8.3.7 Etanol absoluto

9. Prueba estándar

- 9.1 Asegurar que la autoclave llegue a la temperatura y presión adecuada.
- 9.2 Asegurar que el horno esté a la temperatura que indica.

10. Procedimiento

10.1 Cristalería de vidrio reusable

- 10.1.1 Hornear cristalería a 250°C overnight o por lo menos 4 horas.

10.2 Material de plástico

- 10.2.1 Opción A: Remojar en solución de 0.1N NaOH/1mM EDTA por 2 horas a 37°C o más.
- 10.2.2 Opción B: Remojar en una solución de etanol absoluto con 1% SDS por 2 horas a 37°C o más.
- 10.2.3 Lavar con agua tratada con DEPC o agua desionizada
- 10.2.4 Secar a 100°C por 15 minutos o autoclavear.

10.3 Tubos COREX

10.3.1 Dejar en remojo en solución de 0.05% DEPC overnight.

10.4 Tratamiento de soluciones preparadas para uso en procedimientos con ARN.

10.4.1 Agregar DEPC 0.05% e incubar overnight a temperatura ambiente.

10.4.2 Autoclavear soluciones por 30 minutos a 121°C para remover trazas de DEPC.

10.4.3 NOTA: Buffers a base de Tris no pueden ser tratados con DEPC ya que este reacciona con los grupos amino libres inhibiendo la actividad del buffer.

10.4.4 Para buffers a base de Tris comprar Tris libre de RNAsas y usar agua tratada con DEPC o agua libre de nucleasas.

10.5 Mesas de laboratorio

10.5.1 Limpiar con agentes inactivadores de RNAsas.

10.5.2 Limpiar con 100% etanol.

10.6 Celdas de electroforesis

10.6.1 Lavar con solución SDS 1%.

10.6.2 Lavar con agua y luego lavar con etanol absoluto.

10.6.3 Remojar en solución de H₂O₂ al 3% por 10 minutos.

10.6.4 Lavar con agua tratada con DEPC antes de su uso.

10.7 Electrodo de pHmetro

10.7.1 Incubar por 30 segundos en etanol 70%.

10.7.2 Remojar 5 minutos en NaOH 1M y lavar con agua tratada con DEPC.

11. Cálculos**11.1 0.1N NaOH/1mM EDTA**

$$1000ml \left(\frac{0.1mol NaOH}{1000mL} \right) \left(\frac{39.997 g NaOH}{1 mol} \right) \left(\frac{100}{Pureza} \right) = 3.9997 g NaOH en 1000mL de H_2O.$$

$$1000ml \left(\frac{1mmol EDTA}{1000mL} \right) \left(\frac{1mol}{1000 mmol} \right) \left(\frac{292.24g EDTA}{1 mol EDTA} \right) \left(\frac{100}{Pureza} \right) = 0.29224g EDTA en 1000mL de H_2O.$$

$$1000ml \left(\frac{1mmol EDTA}{1000mL} \right) \left(\frac{1mol}{1000 mmol} \right) \left(\frac{372.24g EDTA+Na+2H_2O}{1 mol EDTA} \right) \left(\frac{100}{Pureza} \right) = 0.37g EDTA en 1000mL de H_2O.$$

11.2 NaOH 1M

$$1000ml \left(\frac{1mol NaOH}{1000mL} \right) \left(\frac{39.997 g NaOH}{1 mol} \right) \left(\frac{100}{Pureza} \right) = 39.997 g NaOH en 1000mL de H_2O.$$

11.3 Etanol absoluto con 1% SDS

$$1000ml \left(\frac{1mL SDS}{100mL sol.} \right) \left(\frac{1.01 g SDS}{1 mL} \right) \left(\frac{100}{Pureza} \right) = 10.1 g SDS en 1000mL de EtOH.$$

11.4 0.05% DEPC

$$1000ml \left(\frac{0.05mL DEPC}{100mL sol.} \right) \left(\frac{100}{Pureza} \right) = 0.50 mL SDS en 1000mL de H_2O.$$

11.5 H₂O₂ al 3%

$$1000ml \left(\frac{3mL H_2O_2}{100mL sol.} \right) \left(\frac{100}{Pureza (30)} \right) = 100 mL H_2O_2 en 1000mL de H_2O.$$

12. Control de calidad y trouble shooting

12.1 Usar guantes en todo momento y material plástico desechable para manipular ARN.

12.2 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.

12.3 Tener un área restringida únicamente para trabajo con ARN que contenga todo el material necesario tratado adecuadamente.

13. Reporte de datos

13.1 Registrar todo en el cuaderno.

B. Extracción de ARN con TRI Reagent® Solution – Applied Biosystems Part Number AM9738

1. Propósito

- 1.1 Aislar o extraer ARN total de mosquitos adultos hembras vírgenes alimentados únicamente con agua miel que tengan tres días de vida de la especie *Anopheles albimanus*, de una cepa resistente a deltametrina y una cepa susceptible a deltametrina.

2. Aplicación

- 2.1 El ARN total se puede utilizar para purificarlo y obtener únicamente ARNm con el cual posteriormente se puede sintetizar ADNc. Con ARN total también se puede realizar un PCR tiempo real, un análisis de microarreglos, secuenciación, clonación, un análisis de expresión génica y determinar la función y estructura de ARN.

3. Referencias

- 3.1 Ambion Applied Biosystems. 2010. TRI Reagent Solution: RNA/DNA/ Protein Isolation Reagent. <http://depts.washington.edu/kellylab/wp-content/uploads/2013/06/Tri-Reagent-Protocol.pdf>

4. Terminología y abreviaciones

- 4.1 BCP: bromocloropropano

5. Principio

- 5.1 El procedimiento se basa en la homogenización de un tejido animal para la extracción de ARN total en la presencia de fenol y guanidina tiocianato que causan la inhibición de RNAsas. Se utiliza BCP o cloroformo para causar una separación de fases en el homogenizado: fase acuosa, interfase y fase orgánica. El ARN total se encuentra en la fase acuosa debido a que es una molécula polar. Mientras tanto las proteínas son desnaturizadas exponiendo los residuos hidrofóbicos por lo que se encuentran en la fase orgánica que contiene el fenol. La guanidina tiocianato es un agente caotrópico el cual interrumpe enlaces de hidrógeno causando la inestabilidad de las proteínas causando así su desnaturalización. Es importante mencionar que el pH de la solución determina qué tipo de ácidos nucleicos serán aislados. En condiciones ácidas (pH 4-6), el ADN se encuentra en la fase orgánica mientras que el ARN permanece en la fase acuosa.

6. Documentos asociados

- 6.1 Amibion. 2010. TRI Reagen Solution: RNA/DNA/ Protein Isolation Reagent. <http://depts.washington.edu/kellylab/wp-content/uploads/2013/06/Tri-Reagent-Protocol.pdf>
- 6.2 Chomczynski, P.; Sacchi, N. 2006. "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on". Nature Prot. 1 (2): 581–585. doi:10.1038/nprot.2006.83. PMID 17406285.
- 6.3 Oswald, Nick. 2016. The Basics: How Phenol Extraction of DNA Works. <http://bitesizebio.com/384/the-basics-how-phenol-extraction-works/>
- 6.4 Material Safety Data Sheet: Chloroform MSDS. Science Lab. <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927133>
- 6.5 Material Safety Data Sheet: Isopropyl alcohol MSDS. Science Lab. <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924412>
- 6.6 Material Safety Data Sheet: Ethyl alcohol MSDS. Science Lab. <https://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9923955>

7. Seguridad

- 7.1 TRI Reagent solution: contiene fenol que es tóxico y guanidina tiocianato que es un irritante por lo que sí es inhalado, ingerido y absorbido por la piel, absorción causa quemaduras. Siempre utilizar guantes, bata y zapatos cerrados. Este reactivo rápidamente inhibe la actividad de RNAsas.
- 7.2 Cloroformo: por absorción presenta irritación y quemaduras. Por inhalación irrita el tracto respiratorio, puede afectar el sistema nervioso, causar coma o la muerte. Al ser

ingerido puede irritación del tracto gastrointestinal, náusea, vómitos, daño a riñones, sistema nervioso y corazón.

7.3 Isopropanol: por absorción puede causar irritación. Por inhalación en grandes cantidades causa irritación de membranas mucosas, dolor de cabeza, mareo. Por ingestión en grandes cantidades causa daño al hígado, irritación al tracto digestivo, náusea, vómitos, diarrea.

7.4 Etanol: por absorción puede causar irritación. Por inhalación en grandes cantidades causa irritación de membranas mucosas, dolor de cabeza, mareo. Por ingestión en grandes cantidades causa daño al hígado, irritación al tracto digestivo, náusea, vómitos, diarrea.

7.5 Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

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

7.5.2 Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.

7.5.3 Limitar el acceso al laboratorio.

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

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

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

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

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

7.5.9 Ser precavido al usar objetos punzantes.

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

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

8. Equipos, materiales y reactivos:

8.1 Equipos

8.1.1 Centrífuga refrigerada

8.1.2 Vortex

8.2 Materiales

8.2.1 Micropipetas: 1000uL, 200uL

8.2.2 Puntas bloqueadas libres de RNAsas: 1000uL, 200uL

8.2.3 Beaker para desechos

8.2.4 Tubos ependorf de 1.5mL estériles y libres de RNAsas

8.2.5 Pistilos estériles y libres de RNAsas

8.2.6 Pinzas entomológicas estériles y libres de RNAsas

8.2.7 Kimwipes o papel absorbente

8.3 Reactivos

8.3.1 TRI Reagent Solution (Ambion, AM9738)

8.3.2 BCP o Cloroformo

8.3.3 Isopropanol 100%

8.3.4 Etanol75%

8.3.5 RNase free solution

9. Prueba estándar

9.1 Centrífuga: El equipo se encuentra trabajando de manera adecuada, este no ha sido revisado ninguna vez debido a que es nuevo. Tiene aproximadamente 1 año.

10. Procedimiento

10.1 Notas antes de trabajar

10.1.1 Trabajar a temperatura ambiente.

10.1.2 Es preferible trabajar con BCP en lugar de cloroformo. El BCP (bromocloropropanol) reduce la posibilidad de contaminación de ARN con ADN.

- 10.1.3** Si se usa cloroformo asegurar que no tenga ningún otro aditivo (alcohol isoamílico).
- 10.2** Colocar 20 mosquitos hembras vírgenes de 3 días de vida únicamente alimentadas con agua miel en una pinta, esto corresponde a 20mg de tejido. Colocar la pinta en un refrigerador de -20°C por 2 minutos para inmovilizar a los mosquitos.
- 10.3** Colocar los 20 mosquitos inmediatamente en un tubo de 1.5mL utilizando pinzas entomológicas y macerar con pistilo en 300uL de TRI Reagent Solution, luego agregar 700uL de TRI Reagent Solution, llegando a un volumen final de 1 mL de TRI Reagent Solution.
- 10.4** Incubar homogenizado por 5 minutos a temperatura ambiente. *Esto permite que se disocien completamente los complejos de nucleoproteínas.*
- 10.5** Centrifugar a 12,000xg por 10 minutos a 4°C y traspasar sobrenadante a un nuevo tubo. *Esto se realiza para remover material insoluble: proteínas, grasa, polisacáridos, material extracelular. El ARN se queda en el sobrenadante.*
- 10.6** Agregar 100uL de cloroformo. Mezclar vigorosamente por 15 segundos e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. *El cloroformo separa la solución en fase acuosa (conteniendo el ARN), interfase (conteniendo ADN) y fase orgánica (conteniendo proteínas).*
- 10.7** Centrifugar a 12,000xg por 15 minutos a 4°C. Transferir fase acuosa, fase incolora, a un nuevo tubo rotulado de 1.5mL. *El ARN se queda en fase acuosa mientras que el ADN y proteínas se quedan en la interfase y fase orgánica. La interfase y fase orgánica pueden refrigerarse a 4°C para posterior extracción de ADN o proteína.*
- 10.8** Agregar 500uL de isopropanol. Vortexear por 10 segundos e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. *El isopropanol causa la precipitación del ARN.*
- 10.9** Centrifugar a 12,000xg por 8 minutos a 4-25°C. Descartar sobrenadante. *ARN precipitado forma un pellet blanco en el fondo del tubo.*
- 10.10** Agregar 1mL de etanol 75%. *El etanol sirve para lavar el pellet de ARN.*
- 10.11** Centrifugar a 7,500xg por 5 minutos. Remover el etanol con una pipeta. Volver a centrifugar a 7,500xg por 1 minuto y remover nuevamente etanol con una pipeta y secar al aire el pellet de ARN por 5 min. *En caso que el pellet flote o no se encuentre compacto centrifugar a 12,000xg por 5 minutos. Eliminación de todo el etanol es necesario para pruebas posteriores. Asegurar que no se sobre seque el pellet de ARN ya que esto disminuirá su solubilidad.*
- 10.12** Resuspender pellet de ARN en 300uL de agua libre de nucleasas. *Para mejorar resuspensión disolver pellet a 55-60°C.*
- 10.13** Almacenar a 4°C para análisis inmediato. Almacenar a -80°C para almacenamiento a largo plazo.

11. Cálculos

- 11.1** Solución de etanol al 75%.

$$1000uL \left(\frac{75mL \text{ etanol}}{100mL \text{ solución}} \right) \\ = 750uL \text{ etanol al } 100\% + 250uL \text{ de agua libre de nucleasas}$$

12. Control de calidad

- 13.2** Verificar rendimiento, concentración y pureza por medio de cuantificación con NanoDrop.
- 13.3** Utilizar RNase free Solución para limpiar superficies y equipos con los que se trabajará el ARN.
- 13.4** Usar guantes en todo momento.
- 13.5** En cualquier momento posible utilizar material plástico desechable para manipular ARN.
- 13.6** Utilizar únicamente agua desionizada o DEPC, 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.

- 13.7 Tener un área restringida únicamente para trabajo con ARN que contenga todo el material necesario tratado adecuadamente.
14. **Troubleshooting**
- 14.1 Bajo rendimiento: depende de la muestra de tejido. Es posible que no se haya homogenizado ni lisado adecuadamente o que no se haya resuspendido el pellet de ARN totalmente. También es posible contaminación por parte de ARNasas antes o durante la precipitación o pasos de lavado.
- 14.2 Baja razón de A260/A280 (<1.6): El volumen de TRI Reagent Solution fue muy baja para la homogenización del tejido (1mL TRI Reagent Solution por cada 50-100mg de tejido). Es posible que no se hayan disociado por completo las nucleoproteínas del ARN. Es posible que la fase acuosa se haya contaminado con la fase de fenol. Por último, es posible que no se haya disuelto o resuspendido completamente el pellet.
- 14.3 Degradación de ARN: No se realizó el procedimiento inmediatamente del tejido aislado. Es posible que los reactivos o los tubos ependorff utilizados no hayan estado libres de ARNasas.
13. **Reporte de datos**
- 13.1 Se cuantifica por NanoDrop la concentración y la pureza del ARN total extraído y se anota en el cuaderno.

C. Integridad del ARN por medio NanoDrop

1. Propósito

- 1.1. Determinar la concentración y pureza del ARN total extraído de mosquitos anofelinos

2. Aplicación

- 2.1. El NanoDrop es un equipo que tiene como función medir la concentración y la pureza de varias moléculas como ADN, ARN, ARN poli A+, proteínas, etc. La concentración y pureza es importante para cualquier procedimiento a realizar con la muestra.

3. Referencias

- 3.1. Thermo Scientific. 2015. Nanodrop One: user guide.
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-Help-UG-en.pdf>

4. Terminología y abreviaciones

- 4.1. ARN total: ARN que incluye ARN mensajero, ARN ribosomal y ARN transferencia.
- 4.2. NanoDrop: espectrofotómetro que tiene la capacidad de cuantificar ácidos nucleicos en 1ul de muestra, requiriendo poco tiempo y material de limpieza.
- 4.3. Blanco: solución con la cual se resuspende el ARN, en este caso agua libre de nucleasas.

5. Principio: Para cuantificar la concentración y pureza del ARN se mide la absorbancia de la muestra a 260nm y a 280nm. La concentración se determina utilizando la ley de Beer-Lambert la cual establece que hay un cambio lineal entre la absorbancia y la concentración de la muestra. Una lectura de absorbancia de 1.0 a 260nm es equivalente a una concentración de aproximadamente 40ug/mL de ARN de simple hebra. Es importante mencionar que también se debe considerar la pureza de la muestra la cual se evalúa según la razón de absorbancia A260/A280, esta razón debe encontrarse entre 1.8-2.1.

6. Documentos asociados

- 6.1. ThermoFisher Scientific. RNA quantitation is an important and necessary step prior to most RNA analysis methods.
<https://www.thermofisher.com/gt/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/quantitating-rna.html>

7. Seguridad

- 7.1. NA

8. Equipo, materiales y reactivos

8.1. Equipo

- 8.1.1. Baño de hielo
- 8.1.2. NanoDrop One Thermo Scientific

8.2. Materiales

- 8.2.1. Micropipeta de 10uL
- 8.2.2. Puntas bloqueadas libres de RNAsas de 10uL
- 8.2.3. Kimwipes

8.3. Reactivos

- 8.3.1. Agua libre de nucleasas

9. Prueba estándar

- 9.1. NanoDrop: El equipo se encuentra trabajando de manera adecuada, este no ha sido revisado ninguna vez debido a que es nuevo. Tiene menos de 1 año de uso.

10. Procedimiento

- 10.1. Si el ARN fue almacenado a -80°C o a -20°C dejar derretir en un baño de hielo.
- 10.2. En NanoDrop cuantificar ARN total.
- 10.3. Colocar 1uL de blanco sobre el pedestal. Colocar como blanco solución utilizado para resuspender pellet de ARN, agua libre de nucleasas.
- 10.4. Limpiar el pedestal y colocar 1uL de la solución de ARN total sobre el pedestal.
- 10.5. Limpiar el pedestal, y luego anotar los resultados.
 - 10.5.1. La concentración: se espera una concentración mayor a 2,000ng/uL

10.5.2. La razón A_{260}/A_{280} que indica la pureza del ARN, debe encontrarse entre 1.8-2.1

10.5.3. La razón A_{260}/A_{230} que indica la contaminación de la muestra, debe encontrarse entre 2.0-2.2. La contaminación se puede deber a contaminación de la muestra con guanidina, fenol, TRIzol, o EDTA.

11. Cálculos

11.1. No aplica.

12. Control de calidad

12.1. Usar guantes en todo momento.

12.2. Limpiar todo el material a utilizar con RNase free solution.

12.3. Utilizar únicamente agua DEPC para disolver el pellet de ARN y emplear la misma agua DEPC como el blanco.

12.4. Asegurar de limpiar el pedestal del NanoDrop antes y después de colocar el blanco y cada muestra con un Kimwipe.

12.5. Asegurar que al cargar el microlitro de muestra este no presente ninguna burbuja.

13. Reporte de datos

13.1. Anotar la pureza y la concentración en el cuaderno.

D. Verificación de contaminación del ARN total extraído con ADN genómico mediante un PCR con primers de actina

1. Propósito

- 1.1 Realizar PCR con primers de actina con las muestras de ARN total a trabajar.
- 1.2 Realizar las corridas de electroforesis pertinentes para determinar contaminación con ADN genómico mediante la presencia o ausencia de bandas.

2. Aplicación

- 2.1 Un PCR convencional presenta una gran variedad de aplicaciones incluyendo: amplificación de pequeños fragmentos de ADN, estudio de patrones de expresión de genes según células o tejidos, expresión de un gen específicamente, para el estudio de mutaciones genéticas y sus implicaciones, como pruebas de diagnóstico, clonación, identificación de genes que confieren resistencia, identificación de especies, identificación de criminales, identificación de patógenos en agua potable, etc (Valones, 2009 y Cheriyeath, 2016).

3. Referencias

- 3.1 PROMEGA. (2007). GoTaq® DNA Polymerase. *Promega*, (6), 7–8.
<https://worldwide.promega.com/products/pcr/endpoint-pcr/gotaq-dna-polymerase/?catNum=M3001>

4. Terminología y abreviaciones

- 4.1 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, reacción en la que se amplifica una secuencia específica de ADN.
- 4.2 ADN polimerasa: Enzima principal del proceso de replicación que parte de una cadena inicial o primer.
- 4.3 Buffer TBE: Tris, ácido bórico y EDTA, buffer de corrida para electroforesis.

5. Principio

- 5.1 El principio de PCR es la amplificación de ADN mediante el uso de una ADN polimerasa la cual sintetiza nuevo ADN a partir de una hebra de ADN complementario utilizándolo como una plantilla. Se requiere de primers forward y reverse los cuales permiten que la ADN polimerasa agregue nucleótidos al grupo OH 3' preexistente. La ADN polimerasa luego es capaz de realizar la elongación al agregar más nucleótidos creando una región de doble hebra (Giri, 2015).

6. Documentos asociados

- 6.1 Cheriyeath, Susha. 2016. Polymerase Chain Reaction Applications. *News Medical Life Sciences*. <http://www.news-medical.net/life-sciences/Polymerase-Chain-Reaction-Applications.aspx>
- 6.2 Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., de Souza, P. R. E., de Albuquerque Tavares Carvalho, A., & Crovela, S. 2009. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 1–11. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>
- 6.3 Qiagen. 2017. Nested PCR. http://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/650/Nested_PCR.html
- 6.4 Giri, Dhurba. 2015. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle, Procedure, Components, Types and Applications. *Microbiology, Virolog*. <http://laboratoryinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr/>

7. Seguridad

- 7.1 Trabajar todo con guantes asegurando que todos los materiales se encuentren libres de nucleasas para evitar la contaminación de la muestra.
- 7.2 Buffer TBE: Absorción, inhalación e ingesta es irritante. Utilizar bata, guantes y lentes.

8. Equipo, Materiales y Reactivos

8.1 Equipo

- 8.1.1 Campana de flujo laminar
- 8.1.2 Termociclador
- 8.1.3 Mini centrífuga
- 8.1.4 Vortex

8.2 Materiales

- 8.2.1 Micropipetas: 20uL, 10uL
- 8.2.2 Puntas bloqueadas libres de RNAsas: 20uL, 10uL
- 8.2.3 Beaker para desechos
- 8.2.4 Tubos ependorf de 1.5mL estériles y libres de RNAsas

8.3 Reactivos

- 8.3.1 Go Taq master mix
- 8.3.2 Primer forward de actina y boule (10mM)
- 8.3.3 Primer reverse de actina y boule (10mM)
- 8.3.4 Agua libre de nucleasas

9. Prueba estándar

- 9.1 Termociclador: Presenta un lector de temperatura para asegurar que se llegue a la temperatura indicada necesaria para el procedimiento.

10. Procedimiento

- 10.1 Secuencia de iniciadores de actina y de boule.

| Gen | Iniciador "Forward" | Iniciador "Reverse" |
|---------|----------------------------|----------------------------|
| Actina* | 5'-CCATGTACCCAGGTATTGCT-3' | 5'-ATCTGTTGGAAGGTGGACAG-3' |

*Se espera un producto de 148pb.

- 10.2 Realizar una reacción para cada muestra, un control positivo y un control negativo.
- 10.3 Preparar el master mix del PCR de actina al agregar a un tubo ependorff libre de nucleasas los siguientes reactivos: Descongelar y vortexear cada reactivo antes de su uso.

| Reactivo | 1X |
|-------------------------|--------|
| Agua libre de nucleasas | 5.5 µL |
| Go Taq master mix | 7.5 µL |
| Primer Actina F (10mM) | 0.5 µL |
| Primer Actina R (10mM) | 0.5 µL |
| ARN | 1 µL |
| VOLUMEN FINAL | 15 µL |

- 10.4 Alicuotar 14uL de Master Mix por cada reacción a preparar en tubos de 0.2mL. Pasar cada reacción a una gradilla fría.
- 10.5 Agregar ARN correspondiente a cada reacción en campana distinta. Protocolo indica ADN: <0.5µg/50µl.
- 10.6 Pasar cada reacción a una gradilla no enfriada, asegurar que estén descongeladas y darle un spindown en una minicentrifugadora.
- 10.7 Colocar reacciones en el termociclador con el siguiente programa:

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------------|-------------|------------|--------|
| Iniciación de desnaturalización | 95°C | 2min. | 1 |
| Desnaturalización | 95°C | 30seg | 35 |
| Anillamiento | 56°C | 30seg | |
| Extensión | 72°C | 30seg | |
| Extensión final | 72°C | 5min. | 1 |
| | 4°C | Indefinido | 1 |

11. Cálculos

- 11.1** Determinar cuánto volumen de ARN total agregar para llegar a $<0.5\mu\text{g}/50\mu\text{l}$.

12. Control de calidad**12.1** Electroforesis para verificar la amplificación

- 12.1.1** Realizar un gel de agarosa de 1.5% con 0.45g de agarosa y 30ml de buffer TBE 1X, colocándolo en el microondas hasta que se haya disuelto por completo la agarosa.

12.1.1.1 Agregar 1ul de bromuro de etidio 100X.

- 12.1.2** Dejar que el gel se solidifique

- 12.1.3** Colocar gel en cámara de electroforesis conteniendo buffer TBE 1X, asegurando que el gel se encuentre sumergido y cargar el gel.

- 12.1.4** Cargar el gel con 7ul de muestra con loading dye (6x) marca Novagen y escalera de 100bp marca perfect DNA ladder.

- 12.1.5** Correr el gel por 30-60 minutos a 100 voltios.

- 12.1.6** Visualizar el gel utilizando transiluminador.

12.2 Resultados esperados

- 12.2.1** Presencia de bandas indica contaminación de ADN genómico debido a que la polimerasa utilizada se une a ADN únicamente.

- 12.2.2** Ausencia de bandas indica ausencia de contaminación de ADN genómico.

12.3 Cuidados para tratar ARN

- 12.3.1** Utilizar RNase Free Solution para limpiar superficies y equipos con los que se trabajará el ARN. Usar guantes en todo momento.

- 12.3.2** En cualquier momento posible utilizar material plástico desechable para manipular ARN.

- 12.3.3** Utilizar únicamente agua desionizada o DEPC, no obstante, hay una baja probabilidad que esta esté contaminada con RNAsas.

- 12.3.4** Tener un área restringida únicamente para trabajo con ARN que contenga todo el material necesario tratado adecuadamente.

13. Troubleshooting

- 13.1.1** Asegurar que el control positivo presente amplificación. La ausencia de bandas del control positivo de ADN puede indicar contaminación por nucleasas, la adición de reactivos con concentraciones inadecuadas, o la pérdida de actividad de la polimerasa de ADN.

- 13.1.2** Presencia de bandas en el control negativo indica contaminación por lo que es necesario volver a preparar el master mix, agregar el ARN (realizar bajo campana para evitar aerosoles) y cargar el gel de agarosa de forma cuidadosa cambiando de punta entre muestras así evitando su contaminación.

14. Reporte de datos

- 14.1** Colocar una foto del gel de agarosa en el cuaderno indicando los resultados de forma escrita indicando presencia o ausencia de contaminación.

E. Tratamiento de ARN total con RQ1 RNase-Free DNase para eliminación de ADN genómico contaminante

1. Propósito

- 1.1 Tratamiento de ARN con RQ1 RNase-Free DNase

2. Aplicación

- 2.1 El tratamiento de ARN con RQ1 RNase-Free DNase puede ser utilizada para muchas aplicaciones en las cuales sea importante mantener la integridad del ARN. Estas aplicaciones incluyen la eliminación de ADN de muestras de ARN para su posterior uso en PCR transcriptasa reversa, la eliminación de la plantilla de ADN luego de transcripción *in vitro* del ARN, la producción de fragmentos aleatorios, traducción de Nick y DNase footprinting assay en el cual se identifica el sitio de unión de una proteína al ADN, ya que esta protege el ADN de degradación cuando se le adiciona ADNasa.

3. Referencias

- 3.1 Promega. 2016. <<RQ1 RNase-Free DNase (Cat.# M6101).
<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/rq1-rnase-free-dnase-protocol.pdf?la=en>

4. Terminología y abreviaciones

- 4.1 RQ1: RNA-Qualified
 4.2 DNase: Enzima endonucleasa que degrada ADN de simple y de doble hebra.

5. Principio

- 5.1 La enzima RQ1 RNase-Free DNase es una endonucleasa ADNasa I la cual tiene la capacidad de degradar ADN de simple hebra o de doble hebra produciendo oligonucleótidos 3-OH.

6. Documentos asociados

- 6.1 ScienceLab. 2013. Tris(hydroxymethyl)amino methane HCl MSDS.
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9925348>
- 6.2 ScienceLab. 2013. Magnesium sulfate anhydrous MSDS.
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927218>
- 6.3 Sigma. 2012. Ethylene Glycol-Bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid (E0396).
http://sydney.edu.au/medicine/medsci/whs/msds/e/EGTA_Sigma_20120719.pdf
- 6.4 ScienceLab. 2013. HEPES MSDS.
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927186>
- 6.5 ScienceLab. 2013. Glycerol Formal MSDS.
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924168>
- 6.6 ScienceLab. 2013. Calcium chloride, Anhydrous MSDS.
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9923251>
- 6.7 ScienceLab. 2013. Magnesium chloride hexahydrate MSDS.
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927214>

7. Seguridad

- 7.1 RQ1 DNase 10X Reaction Buffer (M198A): 400mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM MgSO₄ y 10mM CaCl₂.
- 7.2 Stop Solution (M199A): 20mM EGTA (pH 8.0)
- 7.3 Enzyme Storage Buffer: RQ1 DNase presenta 10mM HEPES (pH 7.5), 50% glycerol (v/v), 10mM CaCl₂ y 10mM MgCl₂.
- 7.4 Tris-HCl: levemente irritante con absorción, inhalación e ingesta. Nausea, diarrea, vómitos si ingerido.
- 7.5 MgSO₄: levemente irritante con absorción e inhalación.
- 7.6 EGTA: levemente irritante con absorción, inhalación e ingesta. Irritante por absorción causa dolor, enrojecimiento. Irritante por inhalación causa irritación de tracto respiratorio, tos. Irritante por ingesta causa nausea, diarrea, vómitos.
- 7.7 HEPES: levemente irritante por absorción e inhalación.

- 7.8 Glicerol: irritante por absorción, ingestión e inhalación. Causa irritación de tracto respiratorio y el tracto digestivo.
- 7.9 CaCl_2 : irritante en por absorción, ingestión e inhalación. Puede causar quemaduras serias o irritación leve e inflamación. Irrita el tracto gastrointestinal causando nausea y vómitos. Puede afectar el sistema cardiovascular y el metabolismo.
- 7.10 MgCl_2 : irritación por absorción, ingestión e inhalación. Irrita las mucosas membranas del tracto respiratorio.
- 8. Equipo, materiales y reactivos**
- 8.1 Equipo**
- 8.1.1 Campana de flujo laminar
- 8.1.2 Termociclador (37°C y 65°C)
- 8.1.3 (centrifuga si se hace extracción fenol:cloroformo)
- 8.2 Materiales**
- 8.2.1 Tubos ependorff 0.2 (y 1.5 si se hace extracción fenol:cloroformo)
- 8.2.2 Micropipetas de 10uL y 20uL
- 8.2.3 Puntas bloqueadas de 10uL y 20uL
- 8.3 Reactivos**
- 8.3.1 RQ1 DNase
- 8.3.2 Buffer RQ1 DNase
- 8.3.3 Agua DEPC
- 8.3.4 RQ1 DNase Stop Solution
- 9. Prueba estándar**
- 9.1 Termociclador: Presenta un lector de temperatura para asegurar que se llegue a la temperatura indicada necesaria para el procedimiento.
- 10. Procedimiento**
- 10.1 Agregar a un tubo ependorff estéril libre de ARNasas los siguientes reactivos en el orden indicado: (Esto no se hace bajo campana)
- | Reactivo | 1X |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| ARN | Volumen para 1µg de ARN |
| Agua DEPC | Volumen para ajustar a volumen final de 10 µL |
| RQ1 DNasa (1 unidad de RQ1 por µg de ARN) | 1 µL |
| Buffer RQ1 DNasa | 1 µL |
| VOLUMEN FINAL | |
| | 10 µL |
- 10.2 Incubar a 37°C por 1 hora en termociclador (kit menciona 30 mins).
- 10.3 Agregar 1µl de RQ1 ADNasa Stop Solution para terminar la reacción.
- 10.4 Incubar a 65°C por 10 min para inactivar la DNasa.
- 11. Cálculos**
- 11.1 Determinación del volumen de ARN agregar de cada muestra para obtener 1ug de ARN total para cada reacción pertinente.
- 12. Control de calidad**
- 12.1 PCR de actina con su respectivo gel de agarosa.
- 12.2 Resultados esperados
- 12.2.1 Presencia de bandas indica contaminación de ADN genómico debido a que la polimerasa utilizada se une a ADN.
- 12.2.2 Ausencia de bandas indica ausencia de contaminación de ADN genómico.
- 12.3 Cuidados para tratar ARN
- 12.3.1 Utilizar RNase Free Solution para limpiar superficies y equipos con los que se trabajará el ARN. Usar guantes en todo momento.
- 12.3.2 En cualquier momento posible utilizar material plástico desechable para manipular ARN.
- 12.3.3 Utilizar únicamente agua desionizada o DEPC, no obstante, hay una baja probabilidad que esta esté contaminada con RNAsas.

12.3.4 Tener un área restringida únicamente para trabajo con ARN que contenga todo el material necesario tratado adecuadamente.

13. Troubleshooting

13.1 Asegurar que el control positivo presente amplificación. La ausencia de bandas del control positivo de ADN puede indicar contaminación por nucleasas, la adición de reactivos con concentraciones inadecuadas, o la pérdida de actividad de la polimerasa de ADN.

13.2 Presencia de bandas en el control negativo indica contaminación por lo que es necesario volver a preparar el master mix, agregar el ARN (realizar bajo campana para evitar aerosoles) y cargar el gel de agarosa de forma cuidadosa cambiando de punta entre muestras así evitando su contaminación.

13.3 La presencia de bandas para las muestras, indicando contaminación por ADN genómico, puede deberse a la pérdida de actividad de la ADNasa o a que la muestra estaba altamente contaminada y requiere más tiempo de incubación a 37 °C para asegurar que la enzima degrade todo el ADN contaminante.

14. Reporte de datos

14.1 Documentar la foto del gel de digestión de las muestras tester y driver en el cuaderno de laboratorio.

F. Síntesis de ADNc

1. Propósito

- 1.1 Realizar la síntesis de ADNc a partir del ARN total de la cepa susceptible y la cepa resistente a deltametrina.

2. Aplicación

- 2.1 El ADN complementario constituye parte del transcriptoma de un organismo. Es utilizado esencialmente para la clonación de genes eucarióticos dentro de procariontes. El ADNc es utilizado cuando se quiere expresar una proteína dentro de una célula que normalmente no expresa dicha proteína lo cual es conocido como expresión heteróloga. El ADNc también puede ser utilizada para crear bibliotecas. La ventaja principal de una biblioteca de ADNc es que los productos son genes que presentan una identificación relativamente fácil. Otra aplicación importante es el estudio de expresión génica por medio de ADNc. El ADNc es utilizado cuando se quiere expresar una proteína dentro de una célula que normalmente no expresa dicha proteína lo cual es conocido como expresión heteróloga. Los genes de eucariotas presentan exones e intrones mientras que los genes de los procariontes solo tienen exones. Es por esto que se debe usar ARNm de eucariotas, ya que este ya sufrió corte y empalme y ya no contiene intrones, para poder crear el ADNc que no presente intrones y así colocarlo en el genoma de procariontes que no presenta intrones.

3. Referencias

- 3.1 Promega. 2016. GoScript Reverse Transcription System A5000 y A5001. <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/goscript-reverse-transcription-system-protocol.pdf>

4. Terminología y abreviaciones

- 4.1 ADNc: ADN complementario
4.2 dNTP's: Desoxinucleótido trifosfatos

5. Principio

- 5.1 La síntesis del ADNc se lleva a cabo por medio de la enzima transcriptasa reversa la cual sintetiza ADN a partir de ARN por medio de transcripción reversa. Esto produce una hebra de ADN complementaria a la plantilla de ARN utilizada. La enzima transcriptasa reversa requiere de un primer complementario a la región 3' del ARN para iniciar la síntesis. Para generar la segunda hebra del ADN complementario se utiliza una polimerasa que sintetice una hebra de ADN complementaria a la primera hebra de ADNc sintetizada por la transcriptasa reversa.

6. Documentos asociados

- 6.1 ThermoFisher Scientific. 2016. Reverse Transcription – Six Most Common Applications. <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-applications.html>
- 6.2 New England BioLabs. 2017. Reverse Transcription (cDNA Synthesis). <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-preparation/reverse-transcription-cdna-synthesis>

7. Seguridad

- 7.1 MgCl₂: Irritante a altas concentraciones para el sistema respiratorio, el sistema digestivo y mediante absorción.

8. Equipo, materiales y reactivos

- 8.1 **Equipo**
- 8.1.1 Campana de flujo laminar
8.1.2 Termociclador
8.1.3 Microcentrífuga
8.1.4 Vortex

8.1.5 Bloque térmico

8.2 Materiales

8.2.1 Tubos eppendorff de 0.2mL

8.2.2 Micropipetas de 10uL y 20uL

8.2.3 Puntas bloqueadas de 10uL y 20uL

8.3 Reactivos

8.3.1 Hielo

8.3.2 Random Primers

8.3.3 Agua libre de nucleasas

8.3.4 GoScript 5X Reaction Buffer

8.3.5 MgCl₂

8.3.6 dNTPs

8.3.7 Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor

8.3.8 GoScript Reverse Transcriptase

9. Prueba estándar

9.1 Termociclador: Presenta un lector de temperatura para asegurar que se llegue a la temperatura indicada necesaria para el procedimiento.

10. Procedimiento

10.1 Agregar en un nuevo tubo eppendorff de 0.2mL estéril y libre de ARNasas (Realizar esto en el bench)

| Reactivo | 1X |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ARN experimental (hasta 5ug por reacción) (Adicionar 10ul de ARN tratado con DNasas) | 10 µL |
| Oligo (dT)₁₅ (0.5ug/reacción) | 1 µL |
| Agua libre de nucleasas | -- |
| VOLUMEN FINAL | 11 µL |

10.2 Colocar en termociclador a 70°C por 5 minutos para desnaturalizar la estructura secundaria del ARN.

10.3 Enfriar inmediatamente en hielo por lo menos 5 minutos, revisar que tubos estén bien cerrados.

10.4 Centrifugar por 10 segundos en microcentrífuga.

10.5 Colocar en hielo hasta agregar transcriptasa reversa a la reacción.

10.6 Descongelar reactivos para master mix de transcriptasa en hielo.

10.7 Preparar el master mix reacción de transcriptasa reversa (en hielo si son muchas muestras) en campana de PCR.

| Reactivo | Concentración final | 1X |
|------------------------------------------------------|---------------------|-------|
| GoScript 5X Reaction Buffer | | 4 µL |
| MgCl₂ | 1.5-5.0mM | 2 µL |
| dNTPs | 0.5mM | 1 µL |
| Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor | | 1 µL |
| GoScript Reverse Transcriptase | -- | 1 µL |
| Agua libre de nucleasas | -- | -- |
| ARN | -- | 11 µL |
| VOLUMEN FINAL | -- | 20 µL |

10.8 En campana de ARN o ADN agregar los 11uL de ARN (con Random primers) con los 9uL de master mix de transcriptasa reversa.

10.9 Programa de termociclador (programa dura 1hora 50 minutos con preheating)

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|-------------------------------------------------|-------------|------------|--------|
| Anillamiento | 25°C | 5 minutos | 1 |
| Extensión | 42°C | 1.5 horas | 1 |
| Inactivación de la transcriptasa reversa | 70°C | 15 minutos | 1 |

- 10.10** Hacer alícuotas de ADNc (se degrada con ser descongelado más de 1 vez).
- 10.10.1** Alicuotar en alícuotas de 2uL.
- 10.11** Almacenar ADNc a -80°C.
- 11. Cálculos**
- 11.1** No aplica.
- 12. Control de calidad**
- 12.1** Realizar un PCR de actina y el gel de agarosa respectivo.
- 12.2** Verificar rendimiento, concentración y pureza por medio de cuantificación con NanoDrop.
- 12.3** Utilizar RNase Free Solución para limpiar superficies y equipos con los que se trabajará el ARN.
- 12.4** Usar guantes en todo momento. Al mover reactivos, tocar espátulas para realizar mediciones de reactivos y tocar papel para pesar.
- 12.5** Utilizar material plástico desechable para manipular ARN.
- 12.6** Utilizar únicamente agua desionizada o DEPC, 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.
- 12.7** Tener un área restringida únicamente para trabajo con ARN que contenga todo el material necesario tratado adecuadamente.
- 13. Troubleshooting**
- 13.1** Bajo rendimiento de la primera hebra de ADNc
- 13.1.1** Es posible la degradación del ADNc ya que puede haber ADNasas residuales al haber empleado esta enzima para eliminar la contaminación de ADN.
- 13.1.2** Es posible la degradación de ARN debido a uso de tubos ependorff no libres de nucleasas.
- 13.1.3** Es posible que el ARN sea muy bajo debido al uso de tubos ependorff de mala calidad lo cual causa que el ARN se adhiera a las paredes de los tubos y haya perdidas de ARN. Esto es un problema especialmente con muestras con bajas concentraciones o que se encuentren diluidas.
- 13.1.4** La presencia de inhibidores acareados de otras reacciones como: SDS, EDTA, polisacáridos, heparina, tiocianato de guanidina u otras sales.
- 13.1.5** Es posible que la temperatura de anillamiento haya sido muy alta
- 13.1.6** La composición del ARN también puede tener un efecto si este presenta un alto grado de estructuras secundarias compuestas de GC. En este caso hay que calentar el ARN blanco y el primer a 70°C por 5 minutos y luego colocarlo en hielo inmediatamente para asegurar la senaturalización del ARN y del primer y minimizar el replegamiento. También se pueden adicionar agentes para ayudar a desnaturalizar la estructura secundaria del ARN incluyendo: betaina 1M, DMSO al 2% o formamida desionizada al 5%. En caso que el primer de ADNc sea específico para un gen y presente un Tm mayor a 50°C se puede adicionar el blanco y el primer después de calentar a 70°C a reacciones
- 13.1.7** precalentadas a 45-55°C para minimizar la formación de estructuras secundarias.
- 13.1.8** Es posible que se haya trabajado con la ración de primer:ARN incorrecto.
- 13.1.9** Es posible que la concentración de dNTPs haya sido muy alta.
- 13.1.10** Una concentración inadecuada de magnesio puede ocasionar la degradación de ADNc.
- 14. Reporte de datos**
- 14.1** Documentar la foto del gel de los productos de amplificación de las muestras tester y driver en el cuaderno de laboratorio.

G. Optimización de PCR con primers degenerados de la familia CYP6

1. Propósito

- 1.1 Realizar un PCR con primers degenerados de CYP6 con las muestras de ARN total de Sanarate y de RDelta.

2. Aplicación

- 2.1 Un PCR convencional presenta una gran variedad de aplicaciones incluyendo: amplificación de pequeños fragmentos de ADN, estudio de patrones de expresión de genes según células o tejidos, expresión de un gen específicamente, para el estudio de mutaciones genéticas y sus implicaciones, como pruebas de diagnóstico, clonación, identificación de genes que confieren resistencia, identificación de especies, identificación de criminales, identificación de patógenos en agua potable, etc (Valones, 2009 y Cheriyaedath, 2016).

3. Referencias

- 3.1 PROMEGA. (2007). GoTaq® DNA Polymerase. *Promega*, (6), 7–8.
<https://worldwide.promega.com/products/pcr/endpoint-pcr/gotaq-dna-polymerase/?catNum=M3001>

4. Terminología y abreviaciones

- 4.1 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, reacción en la que se amplifica una secuencia específica de ADN.
 4.2 ADN polimerasa: Enzima principal del proceso de replicación que parte de una cadena inicial o primer.
 4.3 Buffer TBE: Tris, ácido bórico y EDTA, buffer de corrida para electroforesis.

5. Principio

- 5.1 El principio de PCR es la amplificación de ADN mediante el uso de una ADN polimerasa la cual sintetiza nuevo ADN a partir de una hebra de ADN complementario utilizándolo como una plantilla. Se requiere de primers forward y reverse los cuales permiten que la ADN polimerasa agregue nucleótidos al grupo OH 3' preexistente. La ADN polimerasa luego es capaz de realizar la elongación al agregar más nucleótidos creando una región de doble hebra (Giri, 2015).

6. Documentos asociados

- 6.1 Cheriyaedath, Susha. 2016. Polymerase Chain Reaction Applications. News Medical Life Sciences. <http://www.news-medical.net/life-sciences/Polymerase-Chain-Reaction-Applications.aspx>
 6.2 Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., de Souza, P. R. E., de Albuquerque Tavares Carvalho, A., & Crovela, S. 2009. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 1–11. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>
 6.3 Qiagen. 2017. Nested PCR. http://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/650/Nested_PCR.html
 6.4 Giri, Dhurba. 2015. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle, Procedure, Components, Types and Applications. *Microbiology, Virology*. <http://laboratoryinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr/>

7. Seguridad

- 7.1 Trabajar todo con guantes asegurando que todos los materiales se encuentren libres de nucleasas para evitar la contaminación de la muestra.
 7.2 Buffer TBE: Absorción, inhalación e ingesta es irritante. Utilizar bata, guantes y lentes.

8. Equipo, Materiales y Reactivos

8.1 Equipo

- 8.1.1 Campana de flujo laminar
 8.1.2 Termociclador
 8.1.3 Mini centrífuga

8.1.4 Vortex

8.2 Materiales

8.2.1 Micropipetas: 20uL, 10uL

8.2.2 Puntas bloqueadas libres de RNAsas: 20uL, 10uL

8.2.3 Beaker para desechos

8.2.4 Tubos ependorf de 1.5mL estériles y libres de RNAsas

8.3 Reactivos

8.3.1 Go Taq master mix

8.3.2 Primer forward de actina(10mM)

8.3.3 Primer reverse de actina(10mM)

8.3.4 Agua libre de nucleasas

9. Prueba estándar

9.1 Termociclador: Presenta un lector de temperatura para asegurar que se llegue a la temperatura indicada necesaria para el procedimiento.

10. Procedimiento

10.1 Secuencia de los iniciadores degenerados para la amplificación de genes de la familia CYP6.

| Familia | Primer Forward (5'-3') | Iniciador "Reverse" (5'-3') |
|---------|------------------------|-----------------------------|
| CYP6* | TCWSICTGTACGAGCTKGC | GGICCCTCGCCGAACGG |

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

*Para los primers CYP6 se espera un producto de ADN de 432-512pb.

10.2 Realizar una reacción para cada muestra, un control positivo y un control negativo.

10.3 Preparar el master mix del PCR de actina al agregar a un tubo ependorff libre de nucleasas los siguientes reactivos: Descongelar y vortexear cada reactivo antes de su uso.

10.4 En un tubo eppendorff de 0.2mL estéril y libre de nucleasas mezclar

| Reactivo | Concentración inicial | Concentración final | 1X |
|----------------------------------------------------|-----------------------|---------------------|--------|
| Agua DEPC | -- | -- | 4.5 µL |
| GoTaq Hot Start Colorless Master Mix, 2X (Promega) | 2X | 1X | 7.5 µL |
| CYP6_F | 15uM | 0.5Uμm | 0.5 µL |
| CYP6_R | 15uM | 0.5Uμm | 0.5 µL |
| *ADNc | | | 2 µL |
| | | VOLUMEN FINAL | 15µL |

*Agregar ADNc en otra campana.

10.5 Alicuotar 13uL de Master Mix por cada reacción a preparar en tubos de 0.2mL. Pasar cada reacción a una gradilla fría.

10.6 Pasar cada reacción a una gradilla no enfriada, asegurar que estén descongeladas y darle un spindown en una minicentrifugadora.

10.7 Colocar reacciones en el termociclador con el siguiente programa:

| Pasos | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-------------------------|-------------|--------|
| Desnaturalización inicial | 94°C | 15 minutos | 1 |
| Desnaturalización | 94°C | 1 minuto | 35 |
| Hibridación* | 50°C, 55°C, 60°C o 65°C | 30 segundos | |
| Extensión | 72°C | 2 minutos | |
| Extensión final | 72°C | 10 minutos | 1 |
| Hold | 4°C | Indefinido | 1 |

*Se probaron diferentes temperaturas de hibridación para identificar en que temperatura eran más específicos los primers CYP6.

11. Cálculos

11.1 No aplica.

12. Control de calidad

12.1 Electroforesis para verificar la amplificación

12.1.1 Realizar un gel de agarosa de 1.5% con 0.45g de agarosa y 30ml de buffer TBE 1X, colocándolo en el microondas hasta que se haya disuelto por completo la agarosa.

12.1.1.1 Agregar 1ul de bromuro de etidio 100X.

12.1.2 Dejar que el gel se solidifique

12.1.3 Colocar gel en cámara de electroforesis conteniendo buffer TBE 1X, asegurando que el gel se encuentre sumergido y cargar el gel.

12.1.4 Cargar el gel con 7ul de muestra con loading dye (6x) marca Novagen y escalera de 100bp marca perfect DNA ladder.

12.1.5 Correr el gel por 30-60 minutos a 100 voltios.

12.1.6 Visualizar el gel utilizando transiluminador.

13. Troubleshooting

13.1 El producto obtenido tiene un peso molecular mayor al esperado.

13.1.1 Contaminación con ADN genómico relacionado a la plantilla de ARN.

13.1.2 Los primers diseñados se encuentran únicamente en intrones para eliminar la oportunidad de amplificación de ADN genómico.

13.2 El producto presenta varios tamaños inesperados.

13.2.1 Es posible la contaminación por otras muestras de ARN o ADN. Asegurar el uso de pipetas que sean resistentes a la formación de aerosoles. Utilizar el flujo de trabajo a favor para asegurar que se trabaje en un área libre de contaminación. Utilizar guantes y cambiarlos regularmente.

13.2.2 También es posible que haya varios sitios blanco presentes en el ARN por lo que a veces es necesario diseñar primers con mayor especificidad.

13.2.3 Es posible que los primers presenten anillamiento no específico.

13.2.4 También es posible que la concentración de magnesio fue menor a la necesaria.

13.3 Bajo rendimiento del producto de PCR de la transcriptasa reversa

13.3.1 Se utilizó muy poco ADNc a la amplificación de PCR.

13.3.2 La molécula híbrida de ARN:ADNc previene la amplificación eficiente por lo que se puede remover o degradar el ARN antes del PCR al adicionar ARNasa H.

13.3.3 Es posible que los primers hayan sido diseñados inadecuadamente al haber primer-dimers. También es importante revisar la longitud y el Tm de los primers.

13.3.4 Una adición muy pequeña de ADN polimerasa.

13.3.5 La concentración de magnesio fue menor a la óptima para la amplificación del gen de interés.

13.3.6 Los nucleótidos utilizados se encontraban degenerados.

13.3.7 La temperatura de anillamiento se encontraba por debajo de lo óptimo. Realizar pruebas al amplificar con diferentes temperaturas de anillamiento incrementando o decreciendo dicha temperatura por 1°C.

13.3.8 El tiempo de extensión fue muy poca para la extensión del tamaño de amplicon. Programar un tiempo de extensión mayor.

13.3.9 Incrementar los ciclos de PCR si los genes blanco son poco frecuentes o difíciles de amplificar. Incrementar a 40 ciclos para maximizar la sensibilidad.

13.3.10 En caso de utilizar aceite mineral asegurar de utilizar únicamente aceite de alta calidad libre de nucleasas. No utilizar aceite mineral autoclaveado.

13.3.11 Es posible que la secuencia blanco no haya estado presente en el ARN utilizado.

14. Reporte de datos

14.1 Colocar la foto del gel de electroforesis en el cuaderno.

H. qPCR con primers degenerados de la familia CYP6

1. Propósito

- 1.1 Realizar curvas de eficiencia con qPCR para determinar el porcentaje de eficiencia de los primers degenerados CYP6 y los primers de los genes referencia de Actina y Rsp7.
- 1.2 Realizar un qPCR con primers degenerados de CYP6, primers de Actina y Rsp7 con las muestras de ARN total de Sanarate y de RDelta.

2. Aplicación

- 2.1 Un qPCR presenta una gran variedad de aplicaciones incluyendo: amplificación de pequeños fragmentos de ADN o ADNc, estudio de patrones de expresión de genes según células o tejidos, expresión de un gen específicamente, para el estudio de mutaciones genéticas y sus implicaciones, como pruebas de diagnóstico, identificación de genes que confieren resistencia, identificación de especies, identificación de patógenos en agua potable, etc (Bonab, 2015).

3. Referencias

- 3.1 Scientific Thermo Fisher. 2016. <<PowerUp SYBR Green Master Mix User Guide, Pub. no. MAN0013511, Rev. C.0>>.

4. Terminología y abreviaciones

- 4.1 qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, reacción en la que se amplifica una secuencia específica de ADN y se puede observar *in vivo* la amplificación exponencial.
- 4.2 ADN polimerasa: Enzima principal del proceso de replicación que parte de una cadena inicial o primer.

5. Principio

- 5.1 El principio de qPCR es la amplificación de ADN mediante el uso de una ADN polimerasa la cual sintetiza nuevo ADN a partir de una hebra de ADN complementario utilizándolo como una plantilla. Se requiere de primers forward y reverse los cuales permiten que la ADN polimerasa agregue nucleótidos al grupo OH 3' preexistente. La ADN polimerasa luego es capaz de realizar la elongación al agregar más nucleótidos creando una región de doble hebra. Es importante mencionar que el qPCR permite la visualización de la amplificación en tiempo real debido a la presencia de tintes fluorescentes que indican la cantidad de amplicón producido en cada ciclo. En base a esto, se puede determinar con alta precisión la concentración inicial de un gen presente en una muestra o el nivel de expresión de un gen en una muestra en comparación con otra (Bonab, 2015).

6. Documentos asociados

- 6.1 Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A., Nikbin, B., ... O'Shea, K. S. 2015. <<Realtime PCR Handbook>>. *Lab Chip*, 4(2):189–200. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5278>

7. Seguridad

- 7.1 Trabajar todo con guantes asegurando que todos los materiales se encuentren libres de nucleasas para evitar la contaminación de la muestra.

8. Equipo, Materiales y Reactivos

8.1 Equipo

- 8.1.1 Campana de flujo laminar
- 8.1.2 Termociclador Tiempo Real, QuantStudio3 AppliedBiosystems
- 8.1.3 Mini centrífuga de placa
- 8.1.4 Vortex

8.2 Materiales

- 8.2.1 Micropipetas: 20uL, 10uL
- 8.2.2 Puntas bloqueadas libres de RNAsas: 20uL, 10uL
- 8.2.3 Beaker para desechos

- 8.2.4 Tubos eppendorf de 1.5mL estériles y libres de RNAsas
- 8.2.5 Tubos eppendorf de 0.2mL estériles y libres de RNAsas
- 8.2.6 Placa de qPCR de 96 pozos con respectivo adhesivo
- 8.2.7 Gradilla fría
- 8.2.8 Papel aluminio

8.3 Reactivos

- 8.3.1 PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (AppliedBiosystems)
- 8.3.2 Primer forward: CYP6F (10mM), ActinaF (6mM), Rsp7F (6mM)
- 8.3.3 Primer reverse: CYP6R (10mM), ActinaR (6mM), Rsp7R (6mM)
- 8.3.4 Agua libre de nucleasas

9. Prueba estándar

- 9.1 Termociclador: Presenta un lector de temperatura para asegurar que se llegue a la temperatura indicada necesaria para el procedimiento.

10. Procedimiento

- 10.1 Secuencia de los iniciadores degenerados para la amplificación de genes de la familia CYP6 y los genes de referencia de Actina y Rsp7.

| | Primer Forward (5'-3') | Iniciador "Reverse" (5'-3') |
|---------------|------------------------|-----------------------------|
| CYP6* | TCWSICTGTACGAGCTKGC | GGICCCTCGCCGAACGG |
| Actina | TCAACTCGATCATGAAGTGCGA | CCCGGGTACATGGTGGTACCGCCGGA |
| Rsp7 | AGAACCAGCAGACCACCATC | ACAACCAGCAACGGTTATGT |

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

*Para los primers CYP6 se espera un producto de ADNc de 375pb.

- 10.2 Realizar una reacción para cada muestra, un control positivo y un control negativo.
- 10.3 Preparar el master mix del PCR al agregar a un tubo eppendorff libre de nucleasas los siguientes reactivos: Descongelar y vortexear cada reactivo antes de su uso.
- 10.4 En un tubo eppendorff de 0.2mL estéril y libre de nucleasas mezclar

10.4.1 qPCR CYP6

| Reactivo | [Stock] | [Final] | 1X |
|------------------------------|-----------|-----------|--------|
| Agua DEPC* | -- | -- | 0.2 µL |
| SYBER Green | 2X | 1X | 5 µL |
| Primer CYP6 F** | 10uM | 0.4uM | 0.4 µL |
| | 10uM | 0.5uM | 0.5 µL |
| | 15uM | 0.6uM* | 0.4 µL |
| Primer CYP6 R** | 10uM | 0.4uM | 0.4 µL |
| | 10uM | 0.5uM | 0.5 µL |
| | 15uM | 0.6uM* | 0.4 µL |
| Volumen de master mix | | | 6 µL |
| ADNc*** | | | 4 µL |
| VOLUMEN FINAL | | | 10 µL |

*Se adicionó 0.2uL de agua por reacción únicamente para las pruebas que se realizaron con una concentración de primers final de 0.4uM y 0.6uM.

**Se varió la concentración final de primers para mejorar el porcentaje de eficiencia. Dependiendo de la concentración final se utilizó un stock de primers de 10uM o uno de 15uM y se adicionó el volumen pertinente indicado según la concentración final que se deseaba.

***Agregar ADNc en otra campana.

10.4.2 qPCR Actina

| Reactivo | [Stock] | [Final] | 1X |
|-----------------------|-----------|-----------|--------|
| SYBER Green | 2X | 1X | 5 µL |
| Primer Actina F | 6.6uM | 0.33Um | 0.5 µL |
| Primer Actina R | 6.6uM | 0.33Um | 0.5 µL |
| Volumen de master mix | | | 6 µL |
| ADNc* | | | 4 µL |
| VOLUMEN FINAL | | | 10 µL |

*Agregar ADNc en otra campana.

10.4.3 qPCR Rsp7

| Reactivo | [Stock] | [Final] | 1X |
|-----------------------|-----------|-----------|--------|
| SYBER Green | 2X | 1X | 5 µL |
| Primer Rsp7 F | 6.6uM | 0.33Um | 0.5 µL |
| Primer Rsp7 R | 6.6uM | 0.33Um | 0.5 µL |
| Volumen de master mix | | | 6 µL |
| ADNc | | | 4 µL |
| VOLUMEN FINAL | | | 10 µL |

*Agregar ADNc en otra campana.

10.5 Alicuotar 6uL de Master Mix por cada reacción a preparar en tubos de 0.2mL en tira o a una placa de pozos colocado sobre una gradilla fría.

10.6 Darle un spindown a la placa o a las tiras en una minicentrifugadora.

10.7 Colocar reacciones en el termociclador con el siguiente programa:

| Pasos | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|--------------------------|-------------|-------------|--------|
| UDG Activation | 50°C | 2 minutos | 1 |
| Dual-Lock DNA pol | 95°C | 2 minuto | 1 |
| Desnaturalización | 95°C | 15 segundos | |
| Anillamiento y Extensión | 60°C | 1 minuto | 40 |

*Se probaron diferentes temperaturas de hibridación para identificar en que temperatura eran más específicos los primers CYP6.

11. Mapas de carga para las curvas de eficiencia

Para cada curva de calibración se utilizaron 6 puntos, cada punto con diferente concentración final de ADNc – 200ng, 100ng, 50ng, 25ng, 12.5ng y 6.25ng. Cada punto se corrió en triplicado para poder discernir y eliminar cualquier valor atípico.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| A | CYP6 Sanarate 200ng | CYP6 Sanarate 200ng | CYP6 Sanarate 200ng | CYP6 Sanarate 100ng | CYP6 Sanarate 100ng | CYP6 Sanarate 100ng | CYP6 Sanarate 50ng | CYP6 Sanarate 50ng | CYP6 Sanarate 50ng | CYP6 Sanarate 25ng | CYP6 Sanarate 25ng | CYP6 Sanarate 25ng |
| B | CYP6 Sanarate 12.5ng | CYP6 Sanarate 12.5ng | CYP6 Sanarate 12.5ng | CYP6 Sanarate 6.25ng | CYP6 Sanarate 6.25ng | CYP6 Sanarate 6.25ng | CYP6 RDelta 200ng | CYP6 RDelta 200ng | CYP6 RDelta 200ng | CYP6 RDelta 100ng | CYP6 RDelta 100ng | CYP6 RDelta 100ng |
| C | CYP6 RDelta 50ng | CYP6 RDelta 50ng | CYP6 RDelta 50ng | CYP6 RDelta 25ng | CYP6 RDelta 25ng | CYP6 RDelta 25ng | CYP6 RDelta 12.5ng | CYP6 RDelta 12.5ng | CYP6 RDelta 12.5ng | CYP6 RDelta 6.25ng | CYP6 RDelta 6.25ng | CYP6 RDelta 6.25ng |
| D | Gen Ref.* Sanarate 200ng | Gen Ref. Sanarate 200ng | Gen Ref. Sanarate 200ng | Gen Ref. Sanarate 100ng | Gen Ref. Sanarate 100ng | Gen Ref. Sanarate 100ng | Gen Ref. Sanarate 50ng | Gen Ref. Sanarate 50ng | Gen Ref. Sanarate 50ng | Gen Ref. Sanarate 25ng | Gen Ref. Sanarate 25ng | Gen Ref. Sanarate 25ng |
| E | Gen Ref. Sanarate 12.5ng | Gen Ref. Sanarate 12.5ng | Gen Ref. Sanarate 12.5ng | Gen Ref. Sanarate 6.25ng | Gen Ref. Sanarate 6.25ng | Gen Ref. Sanarate 6.25ng | Gen Ref. RDelta 200ng | Gen Ref. RDelta 200ng | Gen Ref. RDelta 200ng | Gen Ref. RDelta 100ng | Gen Ref. RDelta 100ng | Gen Ref. RDelta 100ng |
| F | Gen Ref. RDelta 50ng | Gen Ref. RDelta 50ng | Gen Ref. RDelta 50ng | Gen Ref. RDelta 25ng | Gen Ref. RDelta 25ng | Gen Ref. RDelta 25ng | Gen Ref. RDelta 12.5ng | Gen Ref. RDelta 12.5ng | Gen Ref. RDelta 12.5ng | Gen Ref. RDelta 6.25ng | Gen Ref. RDelta 6.25ng | Gen Ref. RDelta 6.25ng |
| H | CYP6 C- | CYP6 C- | CYP6 C- | Gen Ref. C- | Gen Ref. C- | Gen Ref. C- | | | | | | |

*Gen de Referencia: gen de actina y Rsp7.

12. Mapa de carga para muestras

Se corrió un PCR para cada muestra con los primers CYP6, actina y Rsp7. Para cada muestra – S1, S2, S3 y R1, R2, R3- se sintetizó ADNc en duplicado. Por lo tanto, el duplicado se rotuló como S1.4 y S1.5, R1.4 y R1.5 y así sucesivamente para cada muestra de ADNc. Para todas las muestras se utilizó una concentración final de ADNc de 100ng. La concentración de primers utilizado fue la misma que el utilizado para la curva de eficiencia – 0.33uM para los primers de los genes de referencia y 0.6uM para los primers degenerados de CYP6 (ya que esta concentración presentó el mejor porcentaje de eficiencia).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| A | CYP6 S1.4 | CYP6 S1.4 | CYP6 S1.4 | CYP6 S2.4 | CYP6 S2.4 | CYP6 S2.4 | CYP6 S3.4 | CYP6 S3.4 | CYP6 S3.4 | CYP6 R1.4 | CYP6 R1.4 | CYP6 R1.4 |
| B | CYP6 R2.4 | CYP6 R2.4 | CYP6 R2.4 | CYP6 R3.4 | CYP6 R3.4 | CYP6 R3.4 | CYP6 S1.5 | CYP6 S1.5 | CYP6 S1.5 | CYP6 S2.5 | CYP6 S2.5 | CYP6 S2.5 |
| C | CYP6 S3.5 | CYP6 S3.5 | CYP6 S3.5 | CYP6 R1.5 | CYP6 R1.5 | CYP6 R1.5 | CYP6 R2.5 | CYP6 R2.5 | CYP6 R2.5 | CYP6 R3.5 | CYP6 R3.5 | CYP6 R3.5 |
| D | Gen Ref S1.4 | Gen Ref S1.4 | Gen Ref S1.4 | Gen Ref S2.4 | Gen Ref S2.4 | Gen Ref S2.4 | Gen Ref S3.4 | Gen Ref S3.4 | Gen Ref S3.4 | Gen Ref R1.4 | Gen Ref R1.4 | Gen Ref R1.4 |
| E | Gen Ref R2.4 | Gen Ref R2.4 | Gen Ref R2.4 | Gen Ref R3.4 | Gen Ref R3.4 | Gen Ref R3.4 | Gen Ref S1.5 | Gen Ref S1.5 | Gen Ref S1.5 | Gen Ref S2.5 | Gen Ref S2.5 | Gen Ref S2.5 |
| F | Gen Ref S3.5 | Gen Ref S3.5 | Gen Ref S3.5 | Gen Ref R1.5 | Gen Ref R1.5 | Gen Ref R1.5 | Gen Ref R2.5 | Gen Ref R2.5 | Gen Ref R2.5 | Gen Ref R3.5 | Gen Ref R3.5 | Gen Ref R3.5 |
| G | C- | C- | C- | Gen Ref C- | Gen Ref C- | Gen Ref C- | | | | | | |

13. Cálculos

13.1 No aplica.

14. Control de calidad

14.1 El triplicado que se realizó para cada punto de las curvas de eficiencia y el triplicado que se realizó para cada muestra.

15. Troubleshooting

15.1.1 Valores de Ct son muy altos, hay poca precisión o falló la reacción

15.1.1.1 Se adicionó muy poco ADNc. Agregar de 1-10ng de aDNc o de 10-100ng de ADN por cada 20uL de reacción.

15.1.1.2 La calidad del ADN plantilla utilizado es baja. Es importante cuantificar la concentración del ADN o ADNc plantilla.

15.1.1.3 Se ha degradado la muestra. Preparar nuevo ADNc o ADN genómico y repetir el experimento.

15.1.1.4 Volúmenes incorrectos pipeteados. Volver a preparar el master mix y las reacciones pertinentes con mayor cuidado.

15.1.1.5 Se utilizaron muy pocos ciclos para la reacción. Incrementar el número de ciclos hasta 40.

15.1.1.6 Formación de primer-dimer o actividad residual de la polimerasa. Optimizar las temperaturas de los ciclos, reducir la concentración de primers o rediseñar los primers.

15.1.2 Alta variación en cuantificación a lo largo de la placa. Es posible que se haya evaporado la reacción, por lo tanto, asegurar que la placa se encuentre bien sellada.

15.1.3 Alta variabilidad entre réplicas. No se agitó el master mix adecuadamente antes de colocar en la placa o no se centrifugó la placa luego de adicionar el ADN. Mezclar suavemente en vortex o por inversión el master mix antes de adicionar a la placa. Siempre centrifugar la placa luego de agregar el ADN.

16. Reporte de datos

16.1 Colocar la foto de las curvas de eficiencia y las curvas de disociación en el cuaderno.

