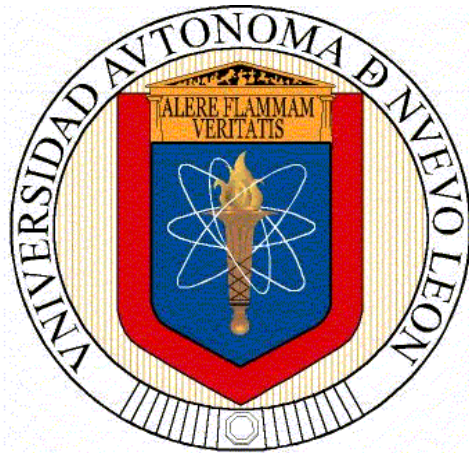


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**Niveles de expresión de citocromos P450 (*CYP6AA7*, *CYP4C52v1*,
CYP6BY3, *CYP9J34*, *CYP9M10*, *CYP9J40* y *CYP9AL1*)
determinados por RT-qPCR en larvas de *Culex quinquefasciatus*
expuestas a diversos insecticidas**

POR

IRÁM PABLO RODRÍGUEZ SÁNCHEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA**

JUNIO 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**Niveles de expresión de citocromos P450 (*CYP6AA7*, *CYP4C52v1*,
CYP6BY3, *CYP9J34*, *CYP9M10*, *CYP9J40* y *CYP9AL1*)
determinados por RT-qPCR en larvas de *Culex quinquefasciatus*
expuestas a diversas insecticidas**

**POR
IRÁM PABLO RODRÍGUEZ SÁNCHEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA**

JUNIO 2015

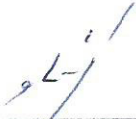
Niveles de expresión de citocromos P450 (CYP6AA7, CYP4C52v1,

CYP6BY3, CYP9J34, CYP9M10, CYP9J40 y CYP9AL1)

determinados por RT-qPCR en larvas de

***Culex quinquefasciatus* expuestas**

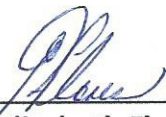
a diversos insecticidas



Dr. Gustavo Ponce García
PRESIDENTE



Dra. Beatriz López Monroy
VOCAL



Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez
VOCAL



MC. Olga Karina Villanueva Segura
VOCAL



Dra. Susana Favela Lara
SECRETARIO

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue posible gracias al apoyo brindado al proyecto “Interacciones Multiplicativas Entre los mecanismos de resistencia Kdr y Citocromo P450 *Culex quinquefasciatus*” auspiciado por el CONACyT con clave 152564.

DEDICATORIA

La realización de este trabajo fue gracias al incondicional apoyo de familiares, profesores, compañero y amigos.

RESUMEN

En el presente trabajo, se describen los niveles de expresión de siete transcritos de *Culex quinquefasciatus* que codifican para citocromos P450, estos medidos por qPCR en larvas expuestas a dos concentraciones del insecticida permetrina (0.51 y 0.71 mg) comparadas con un grupo control sin exponer, las cuales fueron colectadas en distintas localidades del noreste de México. Debido a que los genes analizados no se encontraban reportados, fue necesario diseñar oligonucleótidos utilizando secuencias trazas producto de la secuenciación del genoma del mosquito antes mencionado. Con los oligonucleótidos diseñados y utilizando DNA complementario, sintetizado a partir de RNA total de las larvas fueron amplificados por PCR los mensajeros, se procedió a clonar cada uno de estos genes en nueve poblaciones analizadas, posteriormente fueron secuenciados y éstas fueron comparadas para deducir los porcentajes de similitud. Se diseñaron sondas taqman en segmentos conservados, y utilizando el DNA complementario previamente sintetizado fueron deducidos los niveles de expresión de cada uno de los genes analizados bajo las condiciones citadas anteriormente para las poblaciones. Con el trabajo realizado, reportamos las secuencias nucleótídicas y aminoacídicas de cada uno de los genes analizados de cada una de las poblaciones estudiadas y sus niveles de expresión. Concluimos que los genes analizados son una herramienta potente para ahondar en el estatus de resistencia que han desarrollado las poblaciones silvestres de *Culex quinquefasciatus* en localidades del noreste de México.

ABSTRACT

In this Word we described the expression levels of seven transcripts of *Culex quinquefasciatus* to codified for P450 cytochromes, this measure by qPCR in larvae exposed to two permethrin insecticide concentrations (0.51 y 0.71 mg) compared with a control group without insecticide exposition, this specimens were collected from distinct places from northeaster of Mexico. Because the genes analyzed are not reported, it was necessary design oligonucleotide using traces sequences product of sequencing the genome *Culex quinquefasciatus*. With oligonucleotides designed and complementary DNA synthesized from total RNA from larvae were amplified by PCR messengers, then were proceeded to clone each product of these genes in from nine places analyzed were subsequently sequenced and these were compared to derive the percentages similarity. TaqMan probes were designed in conserved segments, and using the previously synthesized complementary DNA to deducted expression levels of each analyzed genes. We report the nucleotidic and amino acidic sequences of each from each population studied and levels of gene expression. We conclude that the analyzed genes are a powerful way to delve into the status of resistance that have developed wild populations of *Culex quinquefasciatus* in northeastern Mexico localities tool.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	2
2.1	Genealogía de <i>Culex quinquefasciatus</i>	2
2.2	Sinonimia	2
2.3	Distribución	2
2.4	Ciclo de desarrollo	2
2.4.1	Adultos	2
2.4.2	Larvas	3
2.4.3	Huevos	3
2.4.4	Pupas	3
2.4.5	Ciclo de Vida	4
2.5	Importancia Médica	5
2.6	Control Poblacional de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	6
2.6.1	Control Cultural	6
2.6.2	Control Químico	7
2.6.2.1	Insecticida Permetrina	7
2.7	Genoma	8
2.8	Transcriptoma	9
2.9	Expresión génica	9
2.10	Mecanismos de desintoxicación y Citocromo P450 (CYP450)	10
3	JUSTIFICACIÓN	14
4	HIPÓTESIS	15
5	OBJETIVOS	16
5.1	Objetivo general	16
5.2	Objetivos específicos	16
6	MATERIAL Y METODOS	17
6.1	Diseño	17
6.2	Exposición	17
6.3	Extracción	17
6.4	Amplificación	17
6.5	Clonación y secuenciación	17
6.6	Cuantificación	17
6.7	Infraestructura	17
6.8	Origen de los reactivos y consumibles	19
6.9	Recursos bioinformáticos	20
6.9.1	Software	20
6.9.2	INTERNET	20
6.10	Antecedentes de los especímenes utilizados	20
6.11	Muestras biológicas	21
6.12	Extracción de RNA total	22
6.13	Síntesis de DNAc	23
6.14	Amplificación de transcritos por PCR	24

6.15	Clonación molecular	26
6.16	Secuenciación nucleotídica	27
6.17	Análisis filogenético	28
6.18	PCR cuantitativa	28
6.18.1	Preparación de reacciones	28
6.18.2	Diseño de sondas fluorescentes para qPCR y oligos para PCR	29
6.18.3	Análisis de resultados de qPCR	30
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
7.1	Productos amplificados por PCR	31
7.2	Alineamientos de aminoácidos	31
7.2.1	CYP4C52V1	32
7.2.2	CYP6BY3	33
7.2.3	CYP9M10	34
7.2.4	CYP9AL1	35
7.2.5	CYP9J34	36
7.2.6	CYP9J40	37
7.2.7	CYP6AA7	38
7.3	Porcentajes de similitudes en aminoácidos	39
7.3.1	CYP4C52V1	39
7.3.2	CYP6BY3	40
7.3.3	CYP9M10	41
7.3.4	CYP9AL1	42
7.3.5	CYP9J34	43
7.3.6	CYP9J40	44
7.3.7	CYP6AA7	44
7.4	Arboles filogenético	45
7.4.1	CYP4C52V1	45
7.4.2	CYP6BY3	46
7.4.3	CYP9M10	47
7.4.4	CYP9AL1	48
7.4.5	CYP9J34	49
7.4.6	CYP9J40	50
7.4.7	CYP6AA7	51
7.5	Niveles de expresión génica por gen	52
7.5.1	CYP4C52V1	52
7.5.2	CYP6BY3	53
7.5.3	CYP9M10	54
7.5.4	CYP9AL1	55
7.5.5	CYP9J34	56
7.5.6	CYP9J40	57
7.5.7	CYP6AA7	58
7.6	Niveles de expresión génica por localidad	59
7.6.1	Monclova	59
7.6.2	Guadalupe	60
7.6.3	San Nicolás	61
7.6.4	Hidalgo	62

7.6.5	Laredo	63
7.6.6	Montemorelos	64
7.6.7	Monterrey	65
7.6.8	Sabinas	66
7.6.9	Villa Juárez	67
8	CONCLUSIONES	68
9	PERSPECTIVAS	69
10	REFERENCIAS	70

1 INTRODUCCIÓN

Culex quinquefasciatus Say, es un mosquito de coloración café; que existe a lo largo de los trópicos y en las latitudes más bajas de las regiones templadas. Este mosquito es hematófago, activo principalmente durante la noche, aunque también es considerado como un mosquito oportunista; es vector de varios agentes patógenos, dentro de los cuales algunos de éstos, afectan al humano. En gran parte de Estados Unidos de Norteamérica, *Cx. quinquefasciatus* es considerado el vector principal del Virus de la encefalitis de San Luis, así como también del virus del Oeste del Nilo. (Hill y Connelly 2013).

La exposición constante de los insectos a insecticidas ejerce una presión selectiva sobre los organismos que da como resultado mutaciones en regiones promotoras de control transcripcional y/o en las unidades estructurales de los genes, tales cambios son los responsables de proporcionar resistencia como mecanismo de supervivencia, esto al expresar niveles mayores de genes relacionados con el metabolismo de desintoxicación o al modificar la estereoquímica de receptores blanco de los insecticidas.

Algunos genes de la familia de los citocromos P450 han sido relacionados con el metabolismo de permetrina, a mayores niveles de expresión de los genes que codifican para los citocromos, mayor es la resistencia que presentan los organismos a permetrina.

En la familia multigénica de los CYP450 en *Culex quinquefasciatus* se han identificado 204 potenciales unidades génicas (196 genes y 8 pseudogenes). En la presente investigación se determinaron las secuencias y los niveles de expresión génica de diferentes citocromos P450s (CYP6AA7, CYP4C52v1, CYP6BY3, CYP9J34, CYP9M10, CYP9J40, CYP9AL1, CYP6P14 y CYP9J45) en larvas de *Cx. quinquefasciatus* expuestas a diferentes concentraciones del insecticida permetrina, de manera semi-cuantitativa utilizando SYBER GREEN de todos los citocromos P450 en larvas y adultos expuestos y sin exponer a diferentes dosis del insecticida antes mencionado.

2 ANTECEDENTES

2.1 Genealogía de *Culex quinquefasciatus*

Reino: Animalia
Filum: Artropoda
Clase: Insecta
Orden: Diptera
Suborden: Nematocera
Familia: Culicidae
Subfamilia: Culicinae
Género: *Culex*
Especie: *Culex quinquefasciatus*

2.2 Sinonimia

Culex quinquefasciatus Say, 1823
Culex pungens Wiedemann, 1828
Culex fatigans Wiedemann, 1828
Culex aestuans Wiedemann, 1828
Culex acer Walker, 1848
Culex cingulatus Doleschall, 1856

2.3 Distribución

Cx. quinquefasciatus es una especie sub-tropical encontrada usualmente dentro de las latitudes 36° N y 36° S, es encontrado en Norteamérica, Suramérica, Australia, Asia, África, y Nueva Zelanda.

En los Estados Unidos, esta especie se extiende por Virginia, California, Iowa, sur de Texas y Florida, hay reportes de *Cx. quinquefasciatus* hasta el norte de Indiana, también ha sido colectada en Hawaii (Barr 1957). Se ha reportado abundantemente en el noreste de México (Elizonondo-Quiroga 2002).

2.4 Ciclo de desarrollo

2.4.1 Adultos

El adulto de *Cx. quinquefasciatus* varía de 3.96 a 4.25 mm de longitud (Lima et al. 2003). El mosquito es de color café con la probóscide, tórax, alas y los tarsos más

oscuros que el resto del cuerpo. La cabeza es color café claro con la porción más clara en el centro. Las antenas y la probóscide tienen aproximadamente la misma longitud, pero en algunos casos las antenas son ligeramente más cortas que la probóscide. El flagelo tiene trece segmentos que tienen pocos o ninguna escamas (Sirivanakam et al. 1978). Las escalas del tórax son estrechas y curvas. El abdomen tiene bandas pálidas, estrechas y redondeadas, en el lado basal de cada terguito. Las bandas apenas tocan las manchas basolaterales que toman forma de media luna (Darsie y Ward 2005).

2.4.2 Larvas

La cabeza de la larva es corta y robusta, llegando a ser muy oscura hacia la base. Los pelos bucales son largos filamentos que son usados para filtrar materia orgánica. El abdomen consiste de 8 segmentos, el sifón, y el “segmento 10”. Cada segmento tiene un único patrón de setas (Sirivanakarn y White 1978). El sifón está en el lado dorsal del abdomen, y en *Cx. quinquefasciatus* el sifón es cuatro veces más largo que ancho con múltiples mechones de setas (Darsie y Morris 2000). El segmento 10 tiene forma de barril y está localizado en el lado ventral del abdomen con cuatro papilas anales largas que sobresalen del extremo posterior (Sirivanakarn y White 1978).

2.4.3 Huevos

Como ocurre en el género *Culex*, los huevos de *Cx. quinquefasciatus* son depositados en barquillas ovals pobremente cementados con 100 o más huevos, que normalmente eclosionan de 24 a 30 horas después de que fueron depositados (Bates 1949).

2.4.4 Pupas

Similar a otras especies de mosquitos, en *Cx. quinquefasciatus*, las pupas tienen forma de coma, y consisten de una cabeza y tórax fusionados (cefalotórax y un abdomen). El color del cefalotórax varía con el hábitat y oscuridad del lado posterior. La estructura que se utiliza para respirar, es un tubo que se amplía y se extiende lejos del cuerpo, llega a ser más claro en color. El abdomen tiene 8 segmentos. Los cuatro primeros segmentos son los más oscuros y el color se va aclarando hacia la parte posterior. La “aleta”, en el ápice del abdomen, es translúcida y robusta con dos pequeños pelos en el extremo posterior (Sirivanakarn y White 1978).

2.4.5 Ciclo de Vida

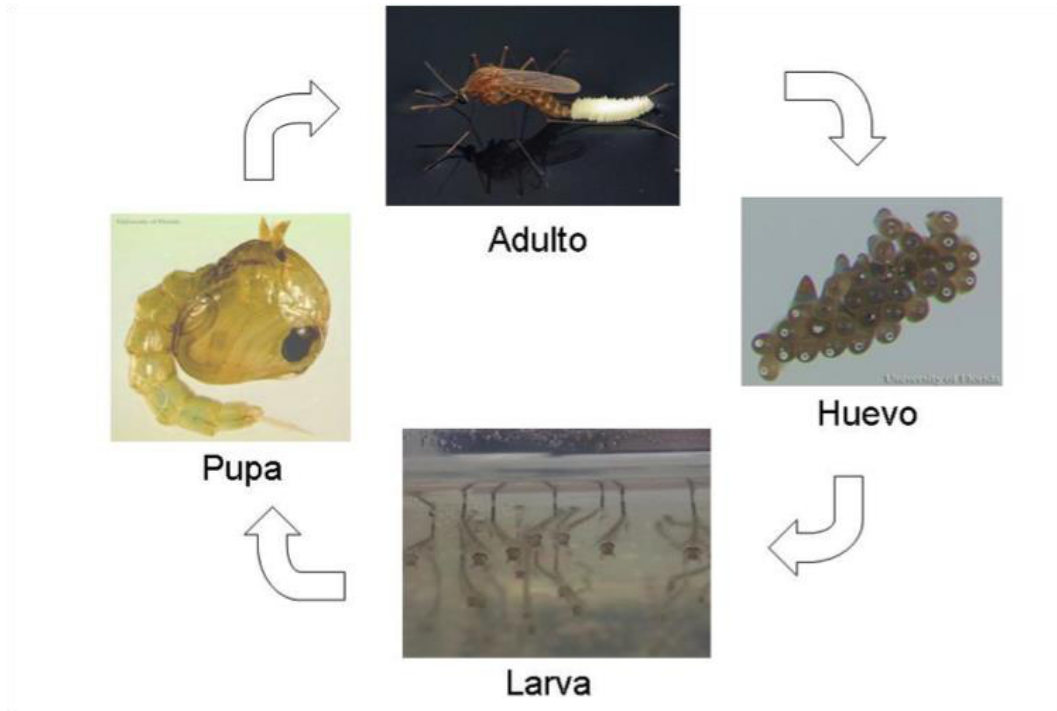


Figura 1. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* (Say). Modificado de la Universidad de Florida.

Las hembras gravidas de *Cx. quinquefasciatus* vuelan durante la noche para buscar agua estancada rica en nutrientes donde podrán oviponer sus huevos. Ellas ovipositan en aguas que van desde zonas de aguas residuales, a los baños de aves, llantas viejas o cualquier recipiente que contenga agua. Si el agua se evapora antes de que los huevos eclosionen o las larvas completen su ciclo de vida (figura 1), morirán (Mosquito Information website 2009).

Las larvas se alimentan de material orgánico en el agua y requieren entre 5 a 8 días para completar su desarrollo a 30°C (Gerberg et al. 1994). Las larvas pasan por cuatro estadios larvales y hacia el final del cuarto estadio dejan de comer y mudan a la etapa de pupa. Pasadas 36 horas a 27°C, los adultos finalmente emergen. El tiempo del desarrollo bajo condiciones naturales para todas las etapas es variable y es dependiente de la temperatura.

Ambos, machos y hembras toman azúcar de las plantas como fuente de alimento. Después del apareamiento, la hembra se alimentará de sangre. *Cx. quinquefasciatus* es un consumidor oportunista, alimentándose de mamíferos y/o aves durante toda la noche. Los machos solo sobreviven con ingesta de azúcar; mientras que las hembras,

podrán tomar múltiples alimentaciones sanguíneas. Después de que un mosquito hembra digiere la sangre, los huevos se empiezan a desarrollar, por lo que encontrará un lugar apropiado para oviponer sus huevos, y el ciclo empezará nuevamente. Una sola hembra puede colocar arriba de cinco barquillas de huevos a lo largo de su vida (Gerberg et al. 1994). El número de huevos por barquilla varía con las condiciones climáticas.

2.5 Importancia Médica

Cx. quinquefasciatus es un vector de diversos patógenos humanos, de animales domésticos y silvestres. Los virus transmitidos por esta especie incluyen virus del oeste del Nilo, virus de la encefalitis de San Luis, y el virus de la encefalitis equina del este. *Cx. quinquefasciatus* es el vector principal del virus de la encefalitis de San Luis en el sur de los Estados Unidos. Los virus se replican en aves y entonces infectan a los mosquitos al alimentarse de aves infectadas durante la etapa de anidación en la primavera, el mosquito puede entonces transmitir el virus a humanos. La encefalitis de San Luis, es dependiente de la edad, afectando más a personas adultas que a jóvenes. Los síntomas de la enfermedad son similares a la gripe y puede variar de fiebre y dolor de cabeza a la rigidez y la confusión.

Después de un periodo de varios días el cerebro puede empezar a hincharse, acompañado de depresión, extrema excitación, somnolencia o insomnio (CDC 2007). Los humanos no desarrollan altos títulos del virus en sangre, y son considerados hospederos finales incapaces de infectar mosquitos (Foster y Walker 2002). En Florida, las mayores epidemias de encefalitis de San Luis ocurrieron en 1959, 1961, 1962, 1977, y 1990 (Day y Stark 2000) y 2004 (Shroyer 2004). Otras epidemias en Estados Unidos incluyen Colorado en 1985, Arkansas 1991, Nueva York 1999 y Louisiana 2001 (CDC, 2007). Del periodo 2004-2013 se han presentado 92 casos de encefalitis en Estados Unidos (CDC 2015). El periodo de incubación para el virus de la encefalitis equina del este se encuentra en un rango de 4 a 10 días. La infección puede resultar en dos tipos de enfermedades; sistémica o encefalítica (que implica la inflamación del cerebro); el tipo que se presente depende de la edad de la persona y otros factores del huésped. El virus de la encefalitis de equina del este es transmitido a aves principalmente por *Culiseta melanura*; la transmisión a humanos requiere a especies capaces de crear un puente entre aves infectadas y mamíferos sanos como

por ejemplo algunos *Aedes*, *Coquillettidia* y especies de *Culex*. En Estados Unidos, en promedio existen 8 casos anuales en humanos reportados.

Aunque *Cx. quinquefasciatus* no es considerado el vector principal del virus del oeste del Nilo, tiene un importante papel en el mantenimiento del virus en las poblaciones de aves, y es capaz de transmitir a los humanos. Enero del 2015, se reportó que un total de 47 estados, en estados unidos, han reportado infecciones por el virus del oeste del nilo en humanos, aves y mosquitos durante el 2014 (CDC 2015).

Cx. quinquefasciatus es responsable por transmitir el nemátodo filarial *Wuchereria bancrofti* en América, en África el vector más común es *Anopheles*. *Aedes* y *Mansonia* pueden transmitir la infección en el Pacífico y Asia. *Wuchereria bancrofti* es un nemátodo filarial que puede causar filariasis linfática. En Asia, la filariasis puede ser causada también por *Brugia malayi* y *Brugia timori*. Actualmente, en el mundo hay 1200 millones de casos de filariasis linfática, repartidos en 73 países, a través de los trópicos y subtropicos en Asia, África, en el Pacífico Occidental, en el Caribe y en el sur de América. El mosquito recoge las microfilarias de un vertebrado infectado, al alimentarse; el nemátodo se desarrolla hasta larva tres dentro del mosquito, y migra a la probóscide. Finalmente, a través de una picadura es pasado al humano u otros vertebrados, completando su ciclo de desarrollo (CDC 2013). Ha sido reportado que *Cx. quinquefasciatus* transmite el virus de la fiebre del valle del Rift, aunque el vector principal es *Aedes* (Foster y Walker 2002). El virus de la fiebre del valle del Rift ha sido responsable de las mayores epidemias en Asia y África. La Organización Mundial de la Salud monitorea los brotes en Kenia, Madagascar, Arabia Saudita, Somalia, Sudán, Tanzania y Yemen (WHO 2010).

2.6 Control Poblacional de *Cx. quinquefasciatus*

2.6.1 Control Cultural

Protección personal, reducción de hábitats larvales, y control químico son las mejores estrategias para reducir las picaduras de mosquitos y por lo tanto la transmisión de patógenos diseminados por mosquitos. Debido a que *Cx. quinquefasciatus* se alimenta de noche, se recomienda que se usen camisas de manga larga y repelente de insectos para salir a realizar actividad nocturna. Reduciendo la cantidad de actividades al aire libre, se disminuye también el riesgo de picaduras de *Cx. quinquefasciatus*.

Cx. quinquefasciatus es dependiente de los seres humanos, para la creación de sus hábitats ricos en nutrientes. Es esencial reducir o eliminar este tipo de ambiente acuático. Alrededor de la casa, esto se puede hacer al no exceder la cantidad de agua en las plantas, el cambio de agua, al menos una vez a la semana, de los platos para mascotas y los baños de aves, la eliminación de agua en estanques (Kern 2007). Los tanques de agua estancada que no se pueden desechar pueden ser cubiertas o colocarlas volteadas, las llantas viejas necesitan ser removidas y las zanjas de drenaje deben mantenerse libres de desechos para evitar obstruir el flujo. Las cuencas para la captura de aguas pluviales y contenedores de agua sucia pueden ser eliminados o reducidos (O'Meara 2003).

2.6.2 Control Químico

Los insecticidas pueden ser usados para el control de larvas y adultos. Los larvicidas son aplicados en cuerpos de agua cercanos donde las larvas están concentradas. Este método reduce los grandes números de mosquitos inmaduros con la menor cantidad de plaguicida. Los adulticidas son usados para reducir rápidamente la población de mosquitos adultos en un área. En general, la resistencia en mosquitos a insecticidas específicos puede reducir la efectividad del control químico (Hill y Connelly 2013). En México, de acuerdo a la NOM-032-SSA-2014(NORMA Oficial Mexicana 2014), para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores; recomiendan aplicar insecticidas de acción efímera, larvicidas y control físico de criaderos; de acuerdo a la lista de insumos recomendados por la CENAPRECE (Cenaprece 2014) para el combate de insectos vectores de enfermedades en el 2014, mencionan el uso de alcohol etoxilado, temefos 1%, cuatro moléculas piretroides, y dos organofosforados, en caso de que se presente resistencia a piretroides.

2.6.2.1 Insecticida Permetrina

La exposición constante de los insectos a insecticidas ejerce una presión selectiva sobre los organismos que da como resultado mutaciones en regiones promotoras de control transcripcional y/o en las unidades estructurales de los genes, tales cambios son los responsables de proporcionar resistencia como mecanismo de supervivencia, esto al expresar niveles mayores de genes relacionados con el metabolismo de

desintoxicación o al modificar la estereoquímica de receptores blanco de los insecticidas.

La permetrina es una sustancia química sintética que se utiliza mundialmente como insecticida, esta molécula pertenece a la familia de compuestos denominados piretroides cuyo mecanismo de acción es la neurotoxicidad por prolongación de la activación de los canales de sodio causando una despolarización. El constante uso de esta molécula ha permitido el desarrollo de poblaciones mutantes que resisten mayores dosis del insecticida.

2.7 Genoma

Se realizaron experimentos donde se mapeo el 9% de los genes de *Cx. quinquefasciatus* (1768 genes) en los tres cromosomas usando marcadores nuevos y probados de *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti*. De estos genes mapeados 803 eran ortólogos con *An. gambiae* y 641 con *Drosophila melanogaster*. Análisis de correlación entre brazos cromosomales indican conservación entre *Cx. quinquefasciatus*, *An. Gambiae* y *D. melanogaster*, mientras que con *Ae. aegypti* parece haber experimentado un intercambio en los brazos de los cromosomas después de la divergencia de las especies *Aedes/Culex*. Una significativa fracción del genoma ensamblando (29%) fue compuesto de elementos transponibles. Esta cantidad es menor que la fracción de elementos transponibles de *Ae. aegypti* (42-47%), pero más grande que en *An. Gambiae* (11 a 16%).

Los genes codificantes a proteínas en *Culex quinquefasciatus* fueron un total de 18,882; es decir, un 22% más que los genes encontrados en *Ae. aegypti* (15,419 genes reportados en esta especie) y un 52% mayor que en *An. gambiae* (12,457 genes), el número estimado de combinaciones *ab initio* y las predicciones basadas en similaridad de tres métodos independientes, optimizaron la identificación. Los análisis revelaron incrementos en las glutathion transferasas citosólicas y un sustancial incremento de los citocromos P450. Un largo repertorio de citocromos P450 pueden reflejar adaptaciones de hábitats larvarios contaminados, y puede haber jugado un papel en la prestación de esta especie particularmente adaptable a la evasión de los programas de control basados en insecticidas, con varios P450's en *Cx. quinquefasciatus* asociados a resistencia. La consecuente diversidad en muchos diferentes genes puede ser importante factor que dejaría una amplia distribución geográfica de *Cx. quinquefasciatus* (Arensburger et al. 2010).

2.8 Transcriptoma

Para obtener un análisis del transcriptoma y del proteoma de las glándulas salivales de hembras del mosquito *Cx. quinquefasciatus*, una librería de cDNA fue secuenciada al azar, y se obtuvo la información del aminoterminal para las proteínas. Los grupos de secuencias de cDNA's que transcriben para proteínas secretadas fueron analizadas al azar. El análisis reveló mensajeros codificantes para varias proteínas de familias conocidas previamente reportadas en glándulas salivales de otros insectos que se alimentan de sangre, así como productos relacionados a sistema inmunológico, como son lectina tipo C, gambicina, y miembros de la cascada profenol oxidasa.

Adicionalmente, varios transcritos codifican para proteínas de baja complejidad, algunas claramente codifican para mucinas. Nuevos transcritos fueron encontrados, incluyendo una endonucleasa previamente descrita en cangrejos y camarones pero no en insectos; una hialuronidasa, no descrita antes en glándulas salivales de mosquito pero encontrada en glándulas de veneno y salivales de jejenes y moscas negras; varios péptidos ricos en cisteína con posible función contra la coagulación, incluyendo una similar a una previamente descrita en la familia de antiproteasas de nematodos; además una proteína rica en cisteína y triptofano (familia CWRC). También se describieron proteínas y péptidos con función desconocida. En total, 54 transcritos que codifican para proteínas completas fueron descritos. Varias de estas proteínas fueron confirmadas por que se encontró el correspondiente aminoterminal en experimentos de SDS-PAGE/degradación de Edman (Ribeiro 2004).

2.9 Expresión génica

La regulación de la expresión génica es un proceso complejo e involucra una gran cantidad de distintas moléculas. Las mutaciones en sitio de unión al factor de transcripción (SUFT) pueden afectar la unión del factores de transcripción (FT) (activador o represor) y en algunos casos pueden incluso impedir esta unión. Si la mutación se produce en la región codificante del gen, puede conducir a un cambio nucleotídico sinónimo o no sinónimo, dependiendo del sitio del cambio y del codón en cuestión. Un cambio sinónimo se refiere a que el codón sigue codificando para el mismo aminoácido, ya que estos son codificados por varios tripletes de nucleótidos o codones. Las mutaciones no sinónimas resultan en un codón codificante para otro aminoácido (mutación con sentido equivocado) o también pueden resultar en un

codón de terminación prematura (mutación sin sentido), lo que a su vez conduce a una proteína trunca (la mayoría de las veces disfuncional). También existen las inserciones o deleciones, que en ambos casos alteran el marco de lectura, resultando en una proteína aberrante. Otro factor que influencia a la expresión génica es la epigenética, que se refiere principalmente a la metilación del DNA y a cambios en la cromatina (Bird 2007). La metilación se produce generalmente en sitios CpG donde las citosinas se convierten en 5-metilcitosina. En general, las regiones del DNA altamente metiladas tienden a ser transcripcionalmente menos activas, aunque el mecanismo no se ha sido dilucidado por completo. Tales cambios epigenéticos han demostrado ser propensos a la exposición ambiental. La cromatina es el complejo de proteínas (histonas) y DNA; si la asociación entre el DNA y las histonas cambia, la expresión de genes puede cambiar también. Modificaciones epigenéticas de las histonas ocurren sobre todo en sus extremos aminoterminales (llamados colas de las histonas) e incluyen además de la acetilación, a la metilación, la fosforilación, la ubiquitinación y la sumoylación (Bruce y Cagampang 2011). El efecto transcripcional de la modificación es ejemplificado por la acetilación, que al contrario que la metilación del DNA, suele estar relacionada con la propensión a la transcripción (Robison y Nestler 2011).

2.10 Mecanismos de desintoxicación y Citocromo P450 (CYP450)

A lo largo del tiempo, los organismos han estado expuestos a un número creciente de retos que resolverían de acuerdo a su constitución genética, adaptabilidad y evolución, permitiéndoles desarrollar sistemas de defensa. El de defensa a las sustancias químicas extrañas que, a través del sistema enzimático actúa es el del citocromo P450 (CYP450) que se encarga de eliminar y neutralizar aquellos compuestos químicos que acceden al organismo y no forman parte de la composición habitual de los organismos, conocidos como xenobióticos; algunos de ellos son de origen natural, destacando las micotoxinas y los alcaloides, pero la mayoría de éstos son compuestos sintéticos, productos del desarrollo de la industria química. En las últimas décadas se ha incrementado de forma excepcional el número de compuestos, con ello el correspondiente aumento del riesgo de contacto con los mismos, se estima que el número de xenobióticos o compuestos extraños que existen en el planeta es alrededor de los millones (Hong 1987). Estimaciones elevan a varios miles el número de moléculas nuevas introducidas cada año y agrandan la larga lista de xenobióticos,

entre ellos los fármacos, a los cuales la mayoría de los seres vivos se enfrentan y muchas veces genéticamente no están preparados, de aquí que la farmacogenética (término acuñado en 1950 por Fredrich Vogel) que está cobrando gran auge pues es la disciplina que se encarga de estudiar los desordenes concernientes a la respuesta del organismo a los fármacos, que a diferencia de los errores congénitos del metabolismo, no se manifiestan desde el nacimiento y quizás nunca se presenten en la vida a menos que el organismo se exponga al compuesto, la cual precipitará la respuesta idiosincrática por el carácter inducible que caracteriza a este sistema de defensa químico estudiado desde los años 60's (Hong J 1987; Huerta-Bustamante et al. 2003). La respuesta modular en las acciones toxicológicas de los organismos a los distintos xenobióticos que se exponen, se deben, en gran parte, al polimorfismo genético; no obstante, los factores ambientales juegan un papel muy importante en la respuesta.

Los mecanismos de defensa química a los xenobióticos han evolucionado, con la finalidad de permitirles a los organismos adaptarse y sobrevivir a diferentes hábitats, con disponibilidades dietarias muy diversas. De tal manera que, los organismos han desarrollado sistemas metabólicos complejos, capaces de acelerar su eliminación, debido a que la mayoría de éstos son de naturaleza liposoluble, es decir, poseen baja solubilidad en agua, lo que les impide ser eliminados por los fluidos corporales; por ello la finalidad de los sistemas metabolizantes es transformarlos a compuestos más polares, utilizando una serie de enzimas fuera del metabolismo energético o intermediario del organismo, de entre las que destacan las enzimas de la familia de los CYP450. Se estima que el complejo de CYP450 es una superfamilia de hace un billón de años, encontrándose en todos los reinos biológicos (Hong et al. 1987; Galli y Feijoo 2002).

A este proceso, donde sustancias ajenas al organismo son modificadas por el complejo enzimático del CYP450, se le conoce como biotransformación, el cual convierte un fármaco o una molécula xenobiótica ambiental, en un metabolito altamente polar, no obstante en la mayoría de las veces estos metabolitos son altamente reactivos con alta afinidad para unirse, covalentemente al ADN, formando aductos (Autrup H et al. 1999), a proteínas alterando su función, causando modificaciones en su actividad o en la expresión genética (Hong et al. 1987; Guengerich 1994). Las reacciones de biotransformación del sistema de CYP450 son del tipo de monooxigenasas (Morales-Olivas 2005), por su baja especificidad, son

capaces de actuar sobre numerosos xenobióticos. Por lo que acceden generalmente a nuestro organismo mediante la ingestión, inhalación y/o tópica. Entre estos compuestos se incluyen fármacos, cosméticos, pesticidas, aditivos alimentarios, productos de uso doméstico (desinfectantes), derivados de la combustión de carburantes, residuos procedentes de la industria química, entre otros.

Una característica significativa del CYP450 es su inducibilidad por el propio sustrato, en este caso el xenobiótico, es decir, su actividad sólo se pone de manifiesto después de que el organismo estuvo en contacto con el compuesto externo.

Las primeras alusiones en este sentido se remontan a los años 50 y 60, al observar que organismos que eran tratados con ciertos compuestos químicos desarrollaban una tolerancia al mismo (Donato-Martin 2005), promoviendo un incremento de la síntesis de RNA mensajero responsable de la síntesis de proteínas de la supefamilia de los CYP450.

El sistema metabolizante (CYP450) no es exclusivo para las reacciones de biotransformación de xenobióticos, participa también en el metabolismo de sustratos endógenos de naturaleza lipídica, de gran importancia biológica ya que algunos actúan como mediadores hormonales, como el colesterol, ácidos biliares, feromonas, aminas biogénicas, leucotrienos, hormonas esteroidales, ácido retinoico y ácidos grasos; en cuyo metabolismo participan diferentes miembros de la familia CYP450 que se localizan en la mitocondria y su deficiencia genética es incompatible con la vida, por participar en la integridad y regulación celular (Galli y Feijoo 2002; Orella y Guajardo 2004; Elizondo-Azuela 2004), mientras que los miembros de la familia de CYP450 que participan en el metabolismo de xenobióticos, se localizan en el retículo endoplásmico de varias células, su deficiencia genética no es incompatible con la vida, sólo cuando el organismo se exponga a éste y su efecto tóxico dependerá de las dosis.

La familia enzimática de CYP450 puede inducir o inhibir la actividad toxicológica de compuestos al producirse una reacción de combinación entre compuestos, propios o ajenos al organismo (Zand et al. 1993; Ekstrom y Ingelman-Sudberg 1989; Morales-Olivas 2005).

La mayoría de los compuestos químicos (fármacos, plaguicidas, hidrocarburos policíclicos) se comportan como sustratos para las enzimas del CYP450, actuando algunos como inductores y/o como inhibidores para algunas familias. De tal manera que un compuesto inductor, aumenta la actividad del sistema enzimático y por tanto

la velocidad de formación de metabolitos y por el contrario, si la sustancia que interactúa se comporta como inhibidor, se reduce la actividad enzimática y disminuye la velocidad de formación de metabolitos, como consecuencia de ello se producirá un aumento de la concentración del fármaco, lo que no sólo aumentará la duración de éste, sino también su toxicidad.

Por consiguiente, la mayor o menor acción del complejo enzimático CYP450 tiene como consecuencia que las sustancias exógenas que lleguen al organismo resulten inocuas o tengan un efecto tóxico o un efecto benéfico y eficaz (Santiago et al. 2002; Koop, 2005). De aquí la importancia de conocer el polimorfismo genético de esta familia de enzimas, ya que de ello dependerá la habilidad de metabolizar xenobióticos en diversos grados, debido a las diferencias en la capacidad y función enzimática programadas genéticamente (Galli y Feijoo 2002; Koop 2005).

Los miembros de la superfamilia de enzimas del CYP450, se encuentran en bacterias, plantas y en casi todas las especies animales. Los CYP450 se utilizan como marcadores moleculares de alta sensibilidad para evaluar perturbaciones ambientales en los organismos, en especial se le ha considerado como un indicador de la exposición a contaminantes dentro del organismo. Algunos autores mencionan su especial utilidad como marcadores toxicológicos, incluso a nivel comunidad para el análisis de contaminantes. Actualmente, los estudios de polimorfismo genético de la familia de CYP450 también son utilizados, para la creación de tratamientos farmacológicos personalizados (Gutiérrez 2004), ya que no sólo la tolerancia está relacionada a estas enzimas sino que la deficiencia de éstas, está involucrada con procesos de toxicidad y acumulación, por tanto el compuesto resulta ser tóxico, pero si se metaboliza muy rápido será tolerado sin presentar el efecto deseado.

3 JUSTIFICACIÓN

Conocer los niveles de expresión de genes (citocromos) involucrados en la desintoxicación de insecticidas dará luz sobre el manejo de control que han recibido las poblaciones analizadas y perspectivas de qué tipo de control se deba utilizar para futuros abordajes.

4 HIPÓTESIS

Los citocromos P450s (CYP6AA7, CYP4C52v1, CYP6BY3, CYP9J34, CYP9M10, CYP9J40 y CYP9AL1) en larvas de *Cx. quinquefasciatus* varían en sus niveles de expresión al ser expuestas a distintas concentraciones del insecticida permetrina.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar las secuencias y los niveles de expresión génica de diferentes citocromos P450s (*CYP6AA7*, *CYP4C52v1*, *CYP6BY3*, *CYP9J34*, *CYP9M10*, *CYP9J40*, *CYP9AL1*, *CYP6P14* y *CYP9J45*) en larvas de *Cx. quinquefasciatus* expuestas a diferentes concentraciones del insecticida permetrina.

5.2 Objetivos específicos

Conocer la variabilidad en la secuencia nucleotídica de siete diferentes citocromos P450s (*CYP6AA7*, *CYP4C52v1*, *CYP6BY3*, *CYP9J34*, *CYP9M10*, *CYP9J40*, *CYP9AL1*, *CYP6P14* y *CYP9J45*) en nueve distintas poblaciones y una cepa de referencia (susceptible) de larvas de *Cx. quinquefasciatus*.

Determinar la variabilidad en la expresión de siete diferentes citocromos P450s (*CYP6AA7*, *CYP4C52v1*, *CYP6BY3*, *CYP9J34*, *CYP9M10*, *CYP9J40*, *CYP9AL1*, *CYP6P14* y *CYP9J45*) en nueve distintas poblaciones de larvas y una cepa de referencia (susceptible) de *Cx. quinquefasciatus* expuestas a distintas dosis de insecticidas.

Asociar la variabilidad de la expresión genética de los siete diferentes citocromos P450s (*CYP6AA7*, *CYP4C52v1*, *CYP6BY3*, *CYP9J34*, *CYP9M10*, *CYP9J40*, *CYP9AL1*, *CYP6P14* y *CYP9J45*) en nueve distintas poblaciones y una cepa de referencia (susceptible) de larvas de *Cx. quinquefasciatus* expuestas a distintas dosis de insecticidas con la correspondiente secuencia de cada uno de los genes en cada una de las poblaciones.

6 MATERIAL Y METODOS

6.1 Diseño

Diseñar oligos consensos en los *Und translate Region* (UTR)s para amplificar transcritos de diferentes citocromos P450s (*CYP6AA7*, *CYP4C52v1*, *CYP6BY3*, *CYP9J34*, *CYP9M10*, *CYP9J40* y *CYP9AL1*).

6.2 Exposición

Exponer larvas de nueve distintas localidades y una cepa de referencia (susceptible) a dos distintas dosis de insecticidas (0.51 y 0.71 mg de permetrina).

6.3 Extracción

Extraer RNA total de larvas de *Cx. quinquefasciatus* de distintas poblaciones y sintetizar DNAc por Transcripción Reversa (RT) a partir de RNA total.

6.4 Amplificación

Amplificar por PCR punto final siete citocromos P450s (*CYP6AA7*, *CYP4C52v1*, *CYP6BY3*, *CYP9J34*, *CYP9M10*, *CYP9J40* y *CYP9AL1*) de *Cx. quinquefasciatus*.

6.5 Clonación y secuenciación

5.- Clonar y secuenciar Productos Amplificados (PA) por PCR de los siete citocromos de las larvas aisladas de las nueve localidades y de la cepa de referencia (susceptible).

6.6 Cuantificación

Diseñar oligos para qPCR y medir los niveles de expresión de siete citocromos P450s (*CYP6AA7*, *CYP4C52v1*, *CYP6BY3*, *CYP9J34*, *CYP9M10*, *CYP9J40* y *CYP9AL1*) en larvas aisladas de nueve distintas localidades y de una cepa de referencia (suceptible) de *Cx. quinquefasciatus*.

6.7 Infraestructura

Los diferentes procedimientos empleados se apoyaran en el uso de aparatos y equipos disponibles en el laboratorio de Entomología Médica del Departamento de Zoología de Invertebrados de la Facultad de Ciencias Biológicas y el Laboratorio

Multidisciplinario del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) en Monterrey, N. L., México (cuadro 1).

Cuadro 1. Lista de equipos involucrados en el desarrollo del estudio

Equipo	Modelo	Marca	Origen
Bioanalizador	2100	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA.
Fuentes de Poder	EC600	Aparates Corp.	St. P, FL, USA.
Secuenciador Automático	3110	Applied Biosystems	Santa Clara, CA, USA.
PCR en Tiempo Real	ABI PRISM 7500	Applied Biosystems	Santa Clara, CA, USA.
Termociclador	Veriti	Applied Biosystems	Santa Clara, CA, USA.
Vórtex	S8223-1	BAXTER	México, DF, MX.
Centrifuga	TM21R	Beckman	Brea, CA, USA.
Centrifuga	12-M1	Beckman	Brea, CA, USA.
Fuente de Poder	Power Pac 1000	BIO-RAD	Hercules, CA, USA.
Electroporador	165-2100	BIO-RAD	Hercules, CA, USA.
Celdas de 20 mm	Gene Pulser II	BIO-RAD	Hercules, CA, USA.
MicroPulser Electroporator	165-2100	BIO-RAD	Hercules, CA, USA.
Cámara Vertical de Electroforesis	MINI PROTEAN 3	BIO-RAD	Hercules, CA, USA.
UVP Mini Dark Room	95-0072-07	Bioluming Systems	Upland, CA, USA.
Lector de ELISA	ELX800	BIOTRAK	Piscata, NJ, USA.
Placa Agitadora	PC320	Corning	NYC, NY, USA.
Balanza Analítica	APX-203	DAIGER	Vernon Hills, IL, USA.
Timer	TM-6	DAIGER	Vernon Hills, IL, USA.
Balanza analítica	APX-203	DAIGER	Vernon Hills, IL, USA.
Pipetor	TX20391D	Drummond	Broomall, PA, USA.
Congelador SoLow	U80-30	Environmental	Cincinnati, OH, USA.
Biofotómetro	5475D	Eppendorf	Westbury, NY, USA.
Termociclador	Mastercycler	Eppendorf	Westbury, NY, USA.
Microcentrifugas	5402	Eppendorf	Westbury, NY, USA.
Microcentrifugas	5415	Eppendorf	Westbury, NY, USA.
Termomixer	Compact	Eppendorf	Westbury, NY, USA.
Biofotómetro	S4751	Eppendorf	Westbury, NY, USA.
Microcentrifuga	5415D	Eppendorf	Westbury, NY, USA.
Refrigerador	MCO-19AIC	General Electric	México, DF, MX.
Illumina BeadArray 500GX.	300-2143	Illumina Inc	San Diego, CA, USA.
Fuentes de Poder	494	ISCO	ISCO, NE, USA.
Freezerless Refrigerator	6072	Kenmore	Boston, MA, USA.
POLYTRON	System PT 1200 E	Kinematica	Littau-Luzern, Suiza.
Placa Agitadora	135952	LAB-LINE	Melrose Pk, IL, USA.
Campana de Bioseguridad Nivel II	36208-00	LABCONCO	Kansas, MO, USA.
Juegos de Micropipetas	Bio Pette	Labnet	Edison, NJ, USA.
Microcentrifuga	Spetrafuge 16M	Labnet	Edison, NJ, USA.
Termomixer	VorTemp 56	Labnet	Edison, NJ, USA.
Horno de Microondas	MS-701C	LG	México, DF, MX.
Frigobar	RM04Y04	MABE	Guadalupe, NL, MX
Espectrofotómetro	ND-1000	NanoPro	Carlsbad, CA, USA.
Ultracongelador -80°C	NU-6617A36	NUAIRE	Plymouth, MN, USA.
Balanza analítica	API IOS	OHUAS	Miami, FL, USA.
Microscopio Invertido	CKX41SF	Olympus	México, DF, MX.
Cámara de Electroforesis	B1	OWL	Cornelius, OR, USA.
Cámara de Electroforesis	B2	OWL	Cornelius, OR, USA.
Horno de Microondas	NN-S754WM	Panasonic	Secaucus, NJ, USA.
Baño María	180	PRECISION	Surrley, CL, USA.
Micropipeta Multicanal 1200 ul	L8-1200	RAININ	México, DF, MX.
Balanza Granataria	1206MP	Sartorius	Gottingen, Alemania.
Incubadora	1525	Shell Lab	Cornelius, OR, USA.
Centrifuga Refrigerada	Biofuge primoR	SORVALL-HERAEUS	Neddham, MA, USA.
Centrifuga Clínica	Centra CL2	Thermo Tec	Neddham, MA, USA.
Nano Drop	ND-100	Thermo Scientific	Wilmington, DE, USA.
Placa de Calentamiento	SP131325	Thermolyne	Bobuque, IA, USA.
Agitador de Tubos Barnstead	Maxi Mix	Thermolyne	Bobuque, IA, USA.

6.8 Origen de los reactivos y consumibles

Los reactivos y materiales diversos empleados para la realización del estudio se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Reactivos y materiales especializados utilizados en la investigación

Reactivo	Clave de Catalogo	Marca	Origen
Arreglo de nano ensayo-6000	G2938-90035	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA.
MagMAX-96	AM1830	Ambion/ABS	Austin, TX, USA
Tubos conicos de 15 ml	AM12500	Ambion/ABS	Austin, TX, USA.
Tubos conicos de 50 ml	AM12501	Ambion/ABS	Austin, TX, USA.
Tiras de tubos conicos de 0.2 ml	AM12230	Ambion/ABS	Austin, TX, USA.
Tubos conicos de 2.0 ml.	AM12425	Ambion/ABS	Austin, TX, USA.
Tubos conicos de 1.5 ml	AM12300	Ambion/ABS	Austin, TX, USA.
Tubos conicos de 0.6 ml	AM12400	Ambion/ABS	Austin, TX, USA.
Puntillas de 1000 µl	AM12660	Ambion/ABS	Austin, TX, USA.
Puntillas de 200 µl	AM12650	Ambion/ABS	Austin, TX, USA.
Agua libre de nucleasas	4387936	Ambion/ABS	Austin, TX, USA.
MessageAmp-II	AM1819	Ambion/ABS	Austin, TX, USA.
TaqMan	AM1729M	Applied Biosystems	Foster City, Ca, USA.
BigDye Terminator-v3.1.	4337458	Applied Biosystems	Foster City, Ca, USA.
High-Capacity cDNA	4375575	Applied Biosystems	Foster City, Ca, USA.
Formamida de alta densidad	PN 4311320	Applied Biosystems	Foster City, Ca, USA.
Cubetas de 0.2 cm	165-2092	BIO-RAD	Hercules, CA, USA.
Cajas Petri de 100 x 15 mm	0165-101	Corning	New York City, NY,USA.
Illumina BeadChip 6 x 2	WG-311-1105	Illumina Inc	San Diego, CA, USA
RnaseZap.	AM9784	Illumina Inc	San Diego, CA, USA
RNAlater	AM7001	Illumina Inc	San Diego, CA, USA
TOPO XL-3.5	K4700-20	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA.
TRIzol	15596-018	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA.
OneShot-TOP10	C4040-50	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA.
Kanamicina	15160-054	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA.
Oligos	varios	MWG-Operon	Huntsville, AL, USA.
2X-PCR Master Mix	M7505	Promega Corporation	Madison, WI, USA.
Wizard DNA Clean-Up	A7280	Promega Corporation	Madison, WI, USA.
Enzima RQ1-RNase.	9PIM610	Promega Corporation	Madison, WI, USA.
Enzima RNase A	A7973	Promega Corporation	Madison, WI, USA.
Rneasy-96	N2511	QIAGEN	Valencia, CA, USA.
Etanol	E7023	Sigma-Aldrich Co	St. Louis, MO, USA.
2-Propanol	I9516	Sigma-Aldrich Co	St. Louis, MO, USA.
Cloroformo	496189	Sigma-Aldrich Co	St. Louis, MO, USA.
ExoSAP-IT	78201	USB Corporation	Cleveland, OH, USA.

6.9 Recursos bioinformáticos

6.9.1 Software

Los programas computacionales requeridos en el estudio variaron dependiendo de las necesidades de sus distintas etapas, empleándose para hacer posible la realización de tareas bioinformáticas específicas (cuadro 3).

Cuadro 3. Programas computacionales específicos

Programa	Propósito	Liga	Origen
OLIGO versión 6.71.	Diseño de oligos y sondas	http://www.oligo.net/index.html	Cascade, CO, USA.
DNAMAN versión 5.2.2.	Ensamble de genes.	http://www.lynnon.com	Québec, Canadá.
MEGA 4.0.	Inferencias evolutivas.	http://www.megasoftware.net/megamac.php	Tempe, AZ, USA.
UVP, versión 4.5.00.0.	Visualización y documentación de genes.	http://www.uvp.com	Cambridge, Reino Unido.
Vector NTi.	Ensamble de vectores.	http://www.invitrogen.com	Carlsbad, CA, USA.
Genestudio.	Ensamble de contigs.	http://www.genestudio.com	Suwanee, GA, USA.
Expert 2100 software.	Electroforesis <i>in silico</i>	http://www.agilent.com	Santa Clara, CA, USA.
The R Projec.	Análisis estadístico.	http://www.r-project.org	Coventry, UK.
Amplify versión 3.1.	Simulaciones de PCR.	http://engels.genetics.wisc.edu/amplify	Madison, WI, USA.
Illumina BeadScan image.	Tamiz de fluorescencia.	http://microarray.imb.uq.edu.au/docs/BeadReader.pdf	San Diego, CA, USA.

6.9.2 INTERNET

Los recursos en la red de INTERNET a los que se recurrieron para la realización del trabajo fueron variados, dependiendo de la necesidad a cubrir, siendo los principales los que se resumen en el cuadro 4.

Cuadro 4. Programas computacionales consultados vía INTERNET

Programa	Liga	Propósito
zPicture	http://zpicture.dcode.org/	Identificar dominios estructurales.
VISTA	http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2	Herramientas de Genómica Comparativa.
In silico	http://insilico.ehu.es/	PCR virtual.
RepeatMasker	http://www.repeatmasker.org/	Programa para detectar secuencias repetitivas.
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi	Comparar secuencias.
Genscan	http://genes.mit.edu/GENSCAN.html	Identificación de las estructuras de genes.
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html	Alineación de múltiples secuencias.
NEBcutter V2.0	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php	Identifica y predice sitios de corte de enzimas.
Pubgene	http://www.pubgene.org/	Relaciona genes gráficamente.
Biogps	https://biogps.org	Anatomía de la expresión génica.
Transeq	http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/	Traducción de nucleótidos a aminoácidos.
UNAFold	http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/	Analiza la estructura secundaria de amplicones.

6.10 Antecedentes de los especímenes utilizados

Los bioespecímenes fueron colectados en distintas localidades de tres estados del noreste de México. Los municipios muestreados del estado de Nuevo León fueron 7

(Guadalupe, Hidalgo, Montemorelos, Monterrey, Sabinas, San Nicolás y Villa Juárez), del estado de Coahuila fue 1 (Monclova) y del estado de Tamaulipas fue 1 (Laredo) (figura 2).

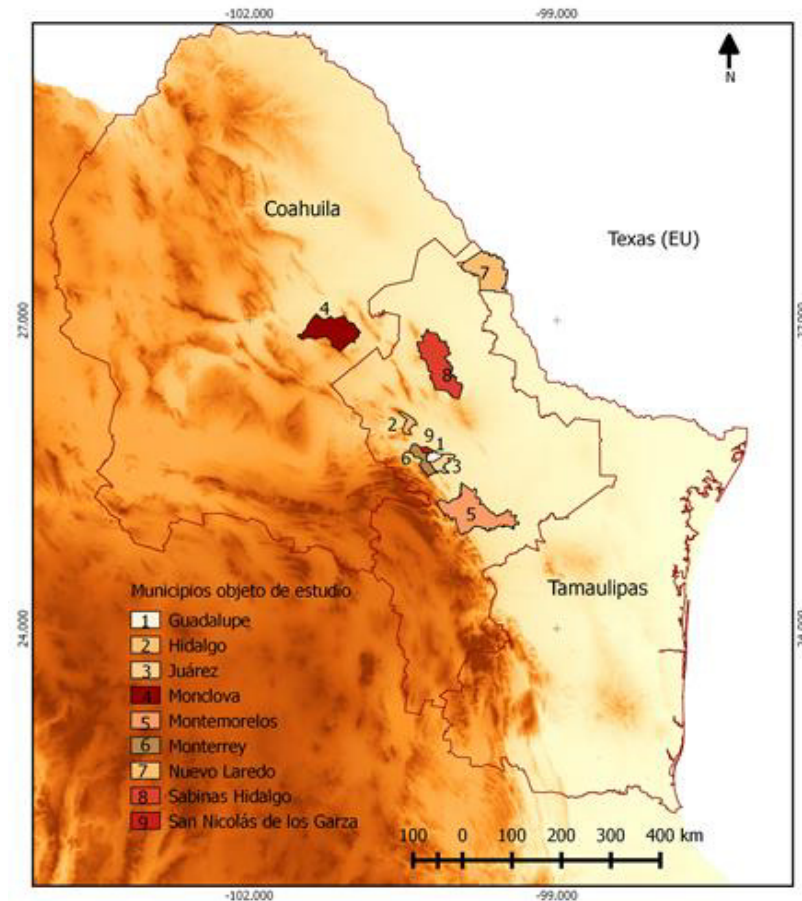


Figura 2. Mapa de localidades muestreadas. Los mapas se realizaron utilizando el software ArcGIS 9.6 Environmental Systems-Research Institute ESRI., Inc.

6.11 Muestras biológicas

Los especímenes hembras de *Cx. quinquefasciatus* fueron recolectados en diferentes Municipios del Noroeste de México (figura 2); estos fueron transferidos al laboratorio donde se mantuvieron en el insectario bajo condiciones controladas de humedad (del 70 al 80% de humedad relativa), temperatura (27 ± 2) y luz (12/12 L:O). Una vez estandarizadas las condiciones del mantenimiento de las colonias, un total de 100 larvas fueron expuestas a 2 diferentes dosis (0.51 y 0.71 mg) de insecticida (permetrina), a las 24 horas, las larvas vivas y muertas fueron recolectadas en viales distintos (10 larvas por vial) y transferidas al laboratorio para su almacenamiento a -80°C hasta su utilización.

6.12 Extracción de RNA total

Se procedió a realizar la extracción de RNA a partir de los distintos pulcs de larvas expuestas a los distintos insecticidas (10 larvas por pul, 2 dosis de insecticida por población, nueve poblaciones y la cepa de referencia). Para la extracción se utilizó el reactivo de TRIzol, y éste se adiciono (0.1 ml) al material biológico en un tubo cónico de 1.5 ml y macerara con pistilo. El lisado se incubo 5 min a temperatura ambiente con el propósito de favorecer la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Posteriormente, se adicionaron 40.0 μ l de cloroformo (CHCl_3), se mezclaron por vórtex durante 15 segundos, se incubo en hielo por ~3 min, se centrifugo a 12,000 rpm por 15 min a 4°C y la fase acuosa se recuperó y transfirió a un tubo de 2.0 ml. Posteriormente, se adicionaron 50.0 μ l de isopropanol e incubo a -70°C por 15 min. Se centrifugo nuevamente a 12,000 rpm por 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla de RNA se lavó con 0.1 ml de etanol al 75% frio. Enseguida se mezcló en el vórtex, se centrifugo a 12,000 rpm por 10 min a 4°C, se desechó el resto del líquido, para por último secar la pastilla de RNA por 10 min a temperatura ambiente y para finalmente re-suspenderla en 100 μ l de agua libre de RNAsas. El RNA fue tratado con RQ1 DNase durante 15 min a 37°C para eliminar trazas de DNA. La pureza y la integridad del RNA se evaluo utilizando métodos estándares de espectrofotometría (NanoDrop) y su integridad será verificada utilizando el estuche comercial y las laminillas de nano ensayo-6000, en el Bioanalizador 2100 con el paquete bioinformático Expert 2100.

6.13 Síntesis de DNAc

La RT se llevó a cabo con el estuche comercial High-Capacity cDNA y oligo (dT) 12–18. Los volúmenes de RNAs totales fueron ajustados para realizar las reacciones de retro transcripción con la misma cantidad, para lo que se igualen todas las concentraciones de RNA a ~1000 ng re-suspendidos en un volumen de ~10 μ l. La transcripción reversa se realizó en un volumen final de 50 μ l de la mezcla de reacción descrita en el cuadro 5.

Cuadro 5. Concentraciones y diluciones de RNA para qPCR

Muestra	Variable	Concentración de insecticidas	Concentración de RNA en ng/ul	Relación
Guadalupe	Muertas	0.051	1069.9	1.83
Guadalupe	vivas	0.051	1077.7	1.82
Guadalupe	vivas	0.071	941.6	1.84
Guadalupe	Muertas	0.071	1103.9	1.83
Guadalupe	Sin Exponer	0	1804	1.7
Hidalgo	vivas	0.071	1106.9	1.83
Hidalgo	Muertas	0.051	1113.4	1.83
Hidalgo	Muertas	0.051	1164	1.82
Hidalgo	Vivas	0.051	1147.1	1.82
Hidalgo	Sin Exponer	0	1528.5	1.8
Laredo	Vivas	0.071	605.9	1.83
Laredo	Muertas	0.071	1069.5	1.81
Laredo	vivas	0.051	1191.5	1.81
Laredo	Sin Exponer	0	1639.7	1.79
Laredo	Muertas	0.051	1039.9	1.8
Monclova	Muertas	0.071	963.1	1.83
Monclova	vivas	0.071	1393.2	1.81
Monclova	Muertas	0.051	1486.6	1.82
Monclova	vivas	0.051	2155.3	1.79
Monclova	Sin Exponer	0	1336.06	1.79
Montemorelos	vivas	0.071	1379.7	1.81
Montemorelos	Muertas	0.071	1161.7	1.81
Montemorelos	vivas	0.051	1136.2	1.82
Montemorelos	Muertas	0.051	1606.8	1.77
Montemorelos	Sin Exponer	0	1666	1.79
Monterrey	Muertas	0.071	1809.8	1.76
Monterrey	Muertas	0.051	1196	1.81
Monterrey	Vivas	0.071	1143.6	1.82
Monterrey	vivas	0.051	894	1.83
Monterrey	Sin Exponer	0	1474.3	1.8
Sabinas	vivas	0.071	1053.2	1.82
Sabinas	Muertas	0.071	1211.8	1.82
Sabinas	Muertas	0.051	1119.3	1.82
Sabinas	Sin Exponer	0	1149.3	1.81
Sabinas	Vivas	0.051	1144.3	1.82
San Nicolás	vivas	0.051	1101.5	1.83
San Nicolás	Muertas	0.071	1533.7	1.8
San Nicolás	Sin Exponer	0	1130.1	1.32
San Nicolás	Muertas	0.051	1195	1.8
San Nicolás	vivas	0.071	1651.2	1.78
Villa Juárez	Muertas	0.071	952.6	1.83
Villa Juárez	vivas	0.051	1608.9	1.83
Villa Juárez	Muertas	0.051	1080.3	1.83
Villa Juárez	vivas	0.071	712.9	1.84
Villa Juárez	Sin Exponer	0	1336.9	1.79

NOTA: De los RNAs concentrados se realizaron diluciones en agua para conseguir concentraciones homogéneas de RNA a una concentración final de 10 µg/µl.

La transcripción reversa se realizó en un volumen final de 50 µl de la mezcla de reacción descrita en el cuadro 6.

Cuadro 6. Composición de la mezcla de reacción para la transcripción reversa (RT)

Reactivo	Concentración	Volumen
Amortiguador	10X	5.0 µl
dNTPs	25x	2.0 µl
Oligo de T	10x	5.0 µl
Enzima	50 U/µl	2.5 µl
H ₂ O	-----	25.5 µl
RNA	4 µg	10 µl
Total	-----	50 µl

La mezcla fue incubada en un termociclador y la síntesis resultante cuantificada en un NanoDrop. Las condiciones para la RT fueron las indicadas por el proveedor (cuadro7).

Cuadro 7. Programa de incubación de la transcripción reversa

Temperatura	Tiempo
25°C	010
37°C	120
85°C	005
04°C	∞

6.14 Amplificación de transcritos por PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés: *Polymerase Chain Reaction*) en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR, del inglés: *Quantitative PCR*), que es ampliamente utilizadas dada su versatilidad. La qPCR se considera una variante de la PCR, siendo capaz de amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta o relativa el producto de la amplificación. Para ello emplea un molde de DNA genómico (DNA_g) o DNA complementario (DNA_c), un par de cebadores/oligos/primers específicos, una sonda estrictamente específica [marcada tanto con una molécula fluorescente, como con una molécula que absorba la fluorescencia (*quencher*) al estar unidas ambas a la sonda], la mezcla (dNTPs) de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dGTP, dATP, dTTP y dCTP), el tampón y

una DNA polimerasa termoestable. Una vez mezclados los ingredientes, la reacción se lleva a un termociclador capaz de amplificar la región génica flanqueada por los oligos y de medir la fluorescencia (tras excitar un rayo láser al fluoróforo a la longitud de onda apropiada, dependiendo de la molécula fluorescente) emitida en cada ciclo de la amplificación (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña 1990). Las PCRs se realizaron utilizando el estuche comercial *PCR Master Mix 2X* (cuadro 8).

Cuadro 8. Reactivos, concentraciones y volúmenes utilizados en las PCRs

Reactivo	Concentración	Volumen
Amortiguador	10x	5 µl
Primer NP	20x	10 µl
dNTPs	2.5 mM	4 µl
Enzima	5 U/ µl	0.2 µl
DNA	~1 µg	3 µl
H ₂ O	-----	27.8 µl
Total		50 µl

El proceso de amplificación se realizó en un Veriti *Thermal Cycler* (cuadro 9).

Cuadro 9. Temperaturas, tiempos y ciclos típicamente utilizados en las PCRs

Tiempo	Temperatura °C	Proceso	Ciclos
04 min	94°C	Desnaturalización inicial	1
45 seg	94°C	Desnaturalización	35
30 seg	60°C	Alineamiento	
01 min	72°C	Extensión	
10 min	72°C	Elongación final	1
∞	04°C		1

Los oligos (cuadro 10) fueron diseñados utilizando secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes ortólogos de otros mosquitos. Los diseños fueron sobre las regiones no traducibles o UTRs, para no afectar/modificar los marcos de lectura codificados en los transcritos. Se procuró que en estos diseños, el contenido de GC oscilara entre 40-60%, las secuencias no contuvieran cuatro o más guaninas continuas, las Tms fueran entre 58-60°C o Tms con valores cercanos entre sí, las condiciones de amplificación fueron estándares, y que los últimos cinco nucleótidos del extremo 3' no tengan más de dos Guaninas y/o Citosinas (para evitar la formación de dímeros de oligos o “*primers dimers*”).

Cuadro 10. Oligonucleótidos diseñados y utilizados para PCR

Símbolo	Tamaño del amplicon	Oligos	
		5'	3'
<i>CYP6AA7</i>	1675	CCTGTGTTTGTACCGGAAT	GCGGATAATCCCAGACTCAA
<i>CYP4C52v1</i>	1577	GGGGGCATCGTTTCTAAT	TTTCTCATCCTTGCCAACC
<i>CYP6BY3</i>	1607	GAGGTAGCTGTGCCAGTTCA	AGAACCTGGCTCCATCTGTG
<i>CYP9J34</i>	1576	GCGAAGGCTTGCAAATCTC	TGTGAGCTGCACCCTATCAG
<i>CYP9M10</i>	1823	TCTGCAGTTTCTCGTGGTG	CGGCCTGTAATTGGTCTCAT
<i>CYP9J40</i>	1837	CCCCTGCTCTACCTCCTAGC	CCGAAAACACAACCACCTCT
<i>CYP9AL1</i>	1883	CTGGCATCGGTGGTTTTACT	CCAACGGCTTGGTAAACACT
<i>SLCO3A1</i>	1776	AGCTGTGCCTTCCACCTCT	AACAGTAACCCAGCCACAG

6.15 Clonación molecular

La clonación molecular de productos de PCR fue llevada a cabo usando el estuche comercial PCR-XL-TOPO 3.5kb, con el vector de clonación pCR 3.5. La relación molar utilizada de vector/inserto fue 1/3. Los productos de la ligación de los amplicones con el vector, fueron transformados en bacterias *E. coli* de la cepa Top 10 electro-competentes. La electroporación se realizó en un MicroPulser *electroporator* con cubetas de 0.2 cm. La reacción de ligación junto con las bacterias competentes electroporadas fueron sembradas en cajas Petri de 100 x 15 mm con medio Luria Bertani (LB) (10 g de Bacto-tryptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, disueltos en un litro de H₂O)/agar + 50 µg/ml de kanamicina. De las colonias observadas se seleccionaron algunas y fueron crecidas individualmente durante 18 h en tubos de 15 ml que contenían 4 ml de caldo L.B. + kanamicina a 37°C, con agitación constante de 240 rpm. Transcurrido este periodo, se recolecto el paquete celular existente por centrifugación a 10000 rpm durante 5 min, en un tubo de 2 ml. Posteriormente, se decantó el medio de cultivo y las células adheridas al tubo fueron resuspendidas en 100 µl de solución I (50 mM glucosa, 10 mM EDTA y 25 mM Tris pH 8.0). Se agito suavemente para su homogenización y la mezcla se incubo durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se agregaron 200 µl de solución II recién preparada (0.4 M NaOH y 2% SDS) y se mezcló inmediatamente por inversión 10 veces. Posteriormente, se incubo por 6 min en hielo y se agregaron, también mezclando de inmediato, 150 µl de solución III (para 100 ml se mezclan: 60 ml 5M KOAc, 11.5 ml de ácido acético al 96% y 28.5 ml H₂O). Se incubo 6 min nuevamente en hielo y se agregó 1/4 un volumen de fenol (C₆H₅OH) saturado con Tris-HCl pH 8 + otro 1/4 de volumen de Sevag (24 partes de cloroformo más una parte de alcohol isoamilico). Se mezcló vigorosamente por 1 min en vórtex y se

centrifugo durante 5 min a 12000 rpm. Posteriormente, la fase líquida (superior) fue extraída y transferida a un micro tubo nuevo. A ésta se le adiciono 2.5 volúmenes de etanol al 100% frío, se agito y centrifugo durante 10 min a 12000 rpm. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y a la pastilla se agregó 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugo por 10 min a 12000 rpm y decanto el alcohol. El etanol remanente se extrajo por aspiración y la pastilla se secó durante 15 min a temperatura ambiente. Se agregaron 100µl de TE 1X (Tris pH 8.0 0.01 M y EDTA 0.001 M) con RNAsa RQ1 (20µg/ml) y se incubo a 37°C por 30 min primero y 15 min a 65°C después, para inactivar DNAsas endógenas.

6.16 Secuenciación nucleotídica

Los insertos de las clonas que resultaron positivas en la clonación fueron secuenciados usando el estuche de terminadores Big Dye y oligonucleótidos, ya sea específicos o universales (M13). Para la reacción de secuenciación fueron requeridos de cada clona 100 ng de DNA plasmídico resuspendidos en 1 µl de H₂O. En el caso de secuenciación de productos amplificados (PA), se realizó una reacción previa para deshacer oligos y dNTPs remanentes. Ésta consistió en mezclar 5µl de PA y 2 µl de ExoSAP-IT, seguido de una incubación a 37°C/15 min y 80°C/15 min. Transcurrido este tiempo, la mezcla fue dividida en dos partes iguales y cada una por separado sirvió como templado de reacción; en ambos casos se agregó 1 µl de Big Dye y 1 µl del oligo correspondiente, a una concentración de 3.5 µM/µl. Se aforo a un volumen final de 10 µl y las mezclas de reacción fueron incubadas en un termociclador (Veriti *Thermal Cycler*) a distintas temperaturas por variados periodos de tiempo (cuadro 11).

Cuadro 11.- Condiciones para la realización de la reacción de secuenciación

Tiempo	Temperatura °C	Proceso	Ciclos
1 min	96°C	Desnaturalización inicial	1
10 seg	96°C	Desnaturalización	25
05 seg	50°C	Alineamiento	
4 min	60°C	Extensión	
∞	04°C		1

Transcurrido el tiempo de reacción, las muestras fueron purificadas adicionándoles 1 μ l de EDTA (0.5 mM) y 30 μ l de alcohol etílico al 100%. Se incubaron por 20 min a temperatura ambiente en oscuridad y se centrifugaron a 3500 rpm x 25 min. Transcurrido el tiempo, se retiró el etanol por decantación y la placa fue invertida, seguido de una breve centrifugación (10 seg) sobre papel secante para vaciar el remanente de alcohol. Realizado esto, se adicionaron 20 μ l de etanol al 75%, se centrifugó a 3500 rpm x 20 min, se decantó el etanol e invirtió la placa para dar otra breve centrifugación y eliminar el alcohol remanente. Luego se secó a temperatura ambiente por 20 min en oscuridad y se agregarán 10 μ l de formamida de alta densidad (HDF) para resuspender. Las reacciones fueron analizadas en el instrumento ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer y con el software del mismo (Applied Biosystems).

6.17 Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas de los amplicones clonados y secuenciadas, fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL W(EMBL-EBI), seguido de correcciones manuales (si el caso lo amerita). De estas secuencias fueron deducidos los marcos de lectura abierta [del inglés: *open reading frame* (ORF)] y la predicción de las secuencias aminoacídicas fueron realizada en el programa TRANSEQ (EMBL-EBI). Tanto las secuencias de nucleótidos, como las de aminoácidos, servirán para realizar comparaciones con los genes ortólogos de otros mosquitos y así deducir los porcentajes de similitud y la relación Ka/Ks (dN/dS), que se refiere al número de sustituciones nucleotídicas no-sinónimo (Ka) sobre el número de sustituciones sinónimas (Ks), que se pueden utilizarse como un indicador de la presión selectiva ejercida sobre la región codificante (CDS del inglés: *Coding DNA Sequence*) de un gen.

6.18 PCR cuantitativa

6.18.1 Preparación de reacciones

La medición de la expresión génica por medio de transcripción reversa (RT del inglés: *Reverse Transcription*)-qPCR es una cuantificación relativa, en la que entre diferentes muestras se compara la expresión del gen que varía para las condiciones fisiológicas o patológicas de las que provienen las muestras (niveles de su RNAm a través de DNAc) objeto de estudio, respecto a la de un gen cuya expresión no varía

considerablemente en dichas condiciones (gen control endógeno de expresión constitutiva). Esto es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen experimental, o normalizar respecto a variaciones en la concentración de DNAc en cada muestra, ya que si la cantidad de control endógeno variase, sería debido sobre todo a cambios en la cantidad del RNA total empleado en la síntesis de DNAc y no necesariamente a cambios en la expresión.

La mezcla de reacción para la qPCR constó de 2.5 µl de DNAc (~1 µg), 1 µl de la mezcla de ambos oligonucleótidos y sonda, 5 µl de 2X PCR Master Mix y 1.5 µl de H₂O. La mezcla de reacción se incubó a 50°C por 2 min y 95°C por 10 min 1 ciclo, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min; esto en un ABI PRISM 7500.

6.18.2 Diseño de sondas fluorescentes para qPCR y oligos para PCR

Los oligos y sondas fueron diseñados utilizando secuencias nucleotídicas previamente reportadas (ncbi /) (cuadro 12).

Cuadro 12. Sondas utilizadas para la qPCR.

Gen	Diseño	Secuencia
CYP6AA7	Oligo sentido	TCCGGAGATTCAGGAAAAGGT
	Oligo antisentido	TGCCGCGCCAAAACA
	Sonda	CGGGTTGAAGTCAGC
CYP4C52v1	Oligo sentido	TTCGGATTGAGGCGATTGA
	Oligo antisentido	CACCAAATCCCCAGCAA
	Sonda	CGGAGGGAGGATGTG
CYP9M10	Oligo sentido	GTGCCGATCAAGCTGAACAA
	Oligo antisentido	CCAGAACCCACTCAACGTATCC
	Sonda	CGCTCGGTTTCGC
CYP9AL1	Oligo sentido	GCTGAAGCAAGGTGACACAATTT
	Oligo antisentido	GCGAGGATCTCGGTGCATA
	Sonda	ATCCCGGCTCTTC
CYP9J34	Oligo sentido	CCCTGTTGATGCGCTTCAC
	Oligo antisentido	CGAATTCGCCGATTG
	Sonda	ATGACCCCTCAATATTC
CYP9J40	Oligo sentido	AGAAGCTCACGGAATCATTG
	Oligo antisentido	TCCTGGCTGCATCAACA
	Sonda	CCGGACATGATCAA
CYP6BY3	Oligo sentido	TGTATCGGATTGCGTTTTGG
	Oligo antisentido	TCAGCACCGTCGCAAGTC
	Sonda	ATGCTTCAATCCAGAGTC

6.18.3 Análisis de resultados de qPCR

Existen dos métodos principales de cuantificación: 1).- el método *delta-delta-cycle threshold* ($\Delta\Delta Ct$) compara directamente los Ct s del DNAc analizado y del DNAc de referencia (ΔCt) en cada muestra, para posteriormente, comparar los ΔCt de la muestra experimental con respecto a la muestra control. Para aplicar dicho método es necesario que las eficiencias de amplificación para ambos DNacs sean similares (Scheffe et al. 2006). 2).- El otro método se basa en la utilización de una recta estándar a partir de DNacs de concentraciones conocidas y la extrapolación de la concentración del DNAc en la muestra experimental a partir del Ct obtenido. Posteriormente, se calcularía la relación entre la cantidad del transcrito analizado y el transcrito de referencia, comparándose dichas relaciones entre las diferentes muestras (Bauhs, 2008).

El análisis de la cuantificación de los transcritos se realizó por el método de $\Delta\Delta Ct$, el cual consistió en determinar el valor del transcrito experimental (Ct) restando la constante de un transcrito control endógeno ($1^a\Delta$) y a esto restándole nuevamente la constante de referencia ($2^a\Delta$).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Larvas de *Cx. quinquefasciatus* fueron recolectados en diferentes distintas localidades del noreste de México (figura 2), y fueron trasladadas al laboratorio de Entomología Medica, UANL para su reproducción. Larvas F1 fueron expuestas a dos distintas concentraciones de permtrina (0.51 y 0.71 mg), de estos bioensayos fueron separadas las vivas y las muertas, de ellas se extrajo el RNA total (cuadro 5 de calidad y cantidad). El cual sirvió como sustrato para la síntesis de DNAc y en conjunto con los primers diseñados (cuadro 10) fueron amplificados los siete transcritos de organismos de cada una de las poblaciones de estudio, en todos los casos las PCR funcionaron dando bandas únicas de amplificación por PCR. Los productos amplificados de cada uno de los siete citocromos de organismos de cada una de las poblaciones fueron clonados y secuenciados. Las secuencias de cada uno de los siete genes fueron alineadas y de ahí deducido el porcentaje de similitud (ver cuadro 13).

7.1 Productos amplificados por PCR

Se logró la amplificación de los trascritos de los siete citocromos de *Cx. Quinquefasciatus*. Los amplicones tuvieron los tamaños esperados (cuadro 10).

7.2 Alineamientos de aminoácidos

De la secuencia nucleotídica obtenida de la secuenciación de los trascritos amplificados y clonados de cada una de las nueve poblaciones analizadas y comparadas con la cepa susceptible de la cepa susceptible se dedujo la secuencia aminoacidica y estas fueron alineadas.

7.2.1 CYP4C52V1

Las secuencias aminoacídicas deducidas para el gen CYP4C52V1 en mosquitos de *Cx. quinquefasciatus* mostraron alta homología; interesantemente, se encontró un cambio en la posición 365. En la población susceptible se reportó ácido glutámico, en cambio en las poblaciones de Guadalupe, Hidalgo, San Nicolás, Monclova, Villa de Juárez, Laredo y Montemorel se encontró ácido aspártico, pero ambos se agrupan en estructuras de aminoácidos del tipo acídica. Las poblaciones de Sabinas y Monterrey a diferencia de las anteriores se observó la presencia de valina, un aminoácido del tipo hidrófobo.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Cq-CYP4C52v1-Susceptibl	MDVHLVAAKI	ANLLSVLSPV	TTIILVMIVG	AYVTRYKRRLA	KLEYHINKLP	GPYSLPLIGN	GLQVSLGSKD	DFLDRVVSQAQ	KMYGRRIGLS	RAWNGPPFYV
Cq-CYP4C52v1-Guadalupe
Cq-CYP4C52v1-Hidalgo
Cq-CYP4C52v1-SanNicolas
Cq-CYP4C52v1-Monclova
Cq-CYP4C52v1-VillaJurae
Cq-CYP4C52v1-Laredo
Cq-CYP4C52v1-Montemorel
Cq-CYP4C52v1-Sabinas
Cq-CYP4C52v1-Monterrey
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Cq-CYP4C52v1-Susceptibl	LISKASAAEP	ILSNRFQVEK	SADYDFLKFW	LGNGLLTSPA	SIWHPRKRTL	TPAFHFKILS	DFIPIFHRNA	LILAELKEEQ	LGNRGTGPDVV	PLTTLCALDV
Cq-CYP4C52v1-Guadalupe
Cq-CYP4C52v1-Hidalgo
Cq-CYP4C52v1-SanNicolas
Cq-CYP4C52v1-Monclova
Cq-CYP4C52v1-VillaJurae
Cq-CYP4C52v1-Laredo
Cq-CYP4C52v1-Montemorel
Cq-CYP4C52v1-Sabinas
Cq-CYP4C52v1-Monterrey
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Cq-CYP4C52v1-Susceptibl	FCETAMGIFV	NAQRNSDSEY	VRAHQDLIGKI	IRNRVQKFWL	QPDALFKLTD	EYRQHQECLQ	VLHFSFSDRVI	RDRHESLLKR	RQAADLNANN	DPADDQPFRR
Cq-CYP4C52v1-Guadalupe
Cq-CYP4C52v1-Hidalgo
Cq-CYP4C52v1-SanNicolas
Cq-CYP4C52v1-VillaJurae
Cq-CYP4C52v1-Laredo
Cq-CYP4C52v1-Montemorel
Cq-CYP4C52v1-Sabinas
Cq-CYP4C52v1-Monterrey
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Cq-CYP4C52v1-Susceptibl	KQLAFLDLLI	EGALDGNGLT	LLDVREEVDT	FVIGGHDTTA	AAMAWLLLLL	GTDQTIQERC	FAEIEQIMGG	DRDRMPTLHE	LNEMKYLELC	LKETLRLYPS
Cq-CYP4C52v1-GuadalupeD.....
Cq-CYP4C52v1-HidalgoD.....
Cq-CYP4C52v1-SanNicolasD.....
Cq-CYP4C52v1-MonclovaH.....D.....
Cq-CYP4C52v1-VillaJuraeH.L.....D.....
Cq-CYP4C52v1-LaredoH.L.....D.....
Cq-CYP4C52v1-MontemorelG.D.....D.....
Cq-CYP4C52v1-SabinasG.V.....D.....
Cq-CYP4C52v1-MonterreyV.....D.....
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Cq-CYP4C52v1-Susceptibl	IPMIARKLAE	DVKIHNQVTI	PAGTNVMIVV	YQLHRDPAVF	PNPEKFNPDN	FLPENSAGRH	PYAYIPFSAG	ARNCIGQKFA	VLEEKTVLST	ILRKFRIEAI
Cq-CYP4C52v1-Guadalupe
Cq-CYP4C52v1-Hidalgo
Cq-CYP4C52v1-SanNicolas
Cq-CYP4C52v1-Monclova
Cq-CYP4C52v1-VillaJurae
Cq-CYP4C52v1-Laredo
Cq-CYP4C52v1-Montemorel
Cq-CYP4C52v1-Sabinas
Cq-CYP4C52v1-Monterrey
	510	520								
Cq-CYP4C52v1-Susceptibl	ERREDVSLLG	DLVLRPRDGL	RIRVSRRV	528						
Cq-CYP4C52v1-Guadalupe	528						
Cq-CYP4C52v1-Hidalgo	528						
Cq-CYP4C52v1-SanNicolas	528						
Cq-CYP4C52v1-Monclova	528						
Cq-CYP4C52v1-VillaJurae	528						
Cq-CYP4C52v1-Laredo	528						
Cq-CYP4C52v1-Montemorel	528						
Cq-CYP4C52v1-Sabinas	528						
Cq-CYP4C52v1-Monterrey	528						

7.2.2 CYP6BY3

El gen CYP6BY3 en las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* mostró igualmente alta homología; se determinó dos cambios en las posiciones 416 y 424. En la región 416 el cambio observado fue de Isoleucina; presente en la cepa susceptible y en la población de villa de Juárez, por Metionina; presente en las poblaciones Guadalupe, Hidalgo, Laredo, Monclova, Montemorelos, Monterrey, Sabinas y San Nicolás. En la región 424 se presentó un cambio en aminoácidos aromáticos, en la población susceptible y Laredo se observó Tirosina; en las poblaciones de Guadalupe, Hidalgo, Monclova, Montemorelos, Monterrey, Sabinas, San Nicolás y Villa de Juárez se reportó Fenilalanina.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Cq-CYP6BY3-Susceptible	MSLVLVVLLV	TVLLLCIGVV	KHKYSYWARQ	NAPFIEPQPF	YGNFKDSNKT	SIADLSIQQY	NAMKDCGSPF	GLYFFLQPLL	MITDLDLIKT	IFIKDFNYFP
Cq-CYP6BY3-Guadalupe
Cq-CYP6BY3-Hidalgo
Cq-CYP6BY3-Laredo	Q.....
Cq-CYP6BY3-Monclova	Q.....
Cq-CYP6BY3-Montemorelos
Cq-CYP6BY3-Monterrey
Cq-CYP6BY3-Sabinas
Cq-CYP6BY3-SanNicolás
Cq-CYP6BY3-VillaJuarez
Cq-CYP6BY3-Susceptible	DRGIYHNERD	EPLSGHLFSI	EGNKWRSLRT	RLTPTFTSGK	MKMMFPTLKA	VGDNFAEYLT	NMVGSGAEIE	VKDGVARFTT	DVIGSCAFGI	ECNTFLEPKS
Cq-CYP6BY3-Guadalupe
Cq-CYP6BY3-Hidalgo
Cq-CYP6BY3-Laredo
Cq-CYP6BY3-Monclova
Cq-CYP6BY3-Montemorelos
Cq-CYP6BY3-Monterrey
Cq-CYP6BY3-Sabinas
Cq-CYP6BY3-SanNicolás
Cq-CYP6BY3-VillaJuarez
Cq-CYP6BY3-Susceptible	QFREFGIQVF	DDPLHSGMVR	MFLRLFPELG	RKLRIKVFRE	EAAKFFHKLK	ADTIAYRETN	SVERNDFMSL	LIAMKNGDGL	TLDETAQSF	IFFLAGFETS
Cq-CYP6BY3-Guadalupe
Cq-CYP6BY3-Hidalgo
Cq-CYP6BY3-Laredo
Cq-CYP6BY3-Monclova
Cq-CYP6BY3-Montemorelos
Cq-CYP6BY3-Monterrey
Cq-CYP6BY3-Sabinas
Cq-CYP6BY3-SanNicolás
Cq-CYP6BY3-VillaJuarez
Cq-CYP6BY3-Susceptible	SSNQTYCLYE	LAFKPEYQEK	ARACVLKAME	KHGGLTYEAV	NDMQYLDQCI	NETLRLYPSV	PVLERKTPQD	YRIPNSDVII	PKGMKVQIPV	FAIQRDEQYY
Cq-CYP6BY3-Guadalupe
Cq-CYP6BY3-Hidalgo
Cq-CYP6BY3-Laredo
Cq-CYP6BY3-Monclova
Cq-CYP6BY3-Montemorelos
Cq-CYP6BY3-Monterrey
Cq-CYP6BY3-Sabinas
Cq-CYP6BY3-SanNicolás
Cq-CYP6BY3-VillaJuarez
Cq-CYP6BY3-Susceptible	ENPTVFNDR	FHPDEIAKRH	MCTYLSFGEG	PRICIGLRFG	MLQSRVGLAT	VLSKYRISPC	SRTAIPLEFS	VKSGVLQPKK	GLWLKVEPL	489
Cq-CYP6BY3-Guadalupe	M.....	F.....	489
Cq-CYP6BY3-Hidalgo	M.....	F.....	489
Cq-CYP6BY3-Laredo	M.....	F.....	489
Cq-CYP6BY3-Monclova	M.....	F.....	489
Cq-CYP6BY3-Montemorelos	M.....	F.....	489
Cq-CYP6BY3-Monterrey	M.....	F.....	489
Cq-CYP6BY3-Sabinas	M.....	F.....	489
Cq-CYP6BY3-SanNicolás	M.....	F.....	489
Cq-CYP6BY3-VillaJuarez	M.....	F.....	489

7.2.3 CYP9M10

El gen CYP9M10 presentó un solo cambio en la posición 407 de la secuencia aminoacídica deducida, el aminoácido presente en la población susceptible y Villa de Juárez fue Fenilalanina; en las poblaciones Laredo, Monclova, Guadalupe, Hidalgo, Montemorelos, Sabinas y San Nicolás presentaron el aminoácido nucleofílico Cisteína.

Cq-CYP9M10-Susceptible	MTSLEWLLLL	VPAAYLFYR	WSVATFDYFE	KRGVPFVKPV	PLGGGMNFF	SGKMHMVDAG	SLGYEMFPDS	RFSGGFAFRK	PGYLIHDPDL	VKQITIKDFD
Cq-CYP9M10-Laredo
Cq-CYP9M10-Monclova
Cq-CYP9M10-Guadalupe
Cq-CYP9M10-Hidalgo
Cq-CYP9M10-Montemorelos
Cq-CYP9M10-Monterrey
Cq-CYP9M10-Sabinas
Cq-CYP9M10-SanNicolas
Cq-CYP9M10-VillaJuarez
Cq-CYP9M10-Susceptible	HFADHTNVVP	IEADPVLGRA	LPFTEGTRWK	HGRSGLSPAF	TGSKMRNMPA	LLSNYTEGAM	GRLVDDARRD	GGLELEMRDL	FQKLGNDVTT	SLSFGVEIDS
Cq-CYP9M10-Laredo
Cq-CYP9M10-Monclova
Cq-CYP9M10-Guadalupe
Cq-CYP9M10-Hidalgo
Cq-CYP9M10-Montemorelos
Cq-CYP9M10-Monterrey
Cq-CYP9M10-Sabinas
Cq-CYP9M10-SanNicolas
Cq-CYP9M10-VillaJuarez
Cq-CYP9M10-Susceptible	VHNPNEFMR	RKELIATDG	IQGLKFLILT	VLPKSFRTL	RIRIPPKEAT	DFYVDVISKT	IKQREEHNIV	RPDFIHLVQ	GRKNELKMEQ	ADDQLKSAGF
Cq-CYP9M10-Laredo
Cq-CYP9M10-Monclova
Cq-CYP9M10-Guadalupe
Cq-CYP9M10-Hidalgo
Cq-CYP9M10-Montemorelos
Cq-CYP9M10-Monterrey
Cq-CYP9M10-Sabinas
Cq-CYP9M10-SanNicolas
Cq-CYP9M10-VillaJuarez
Cq-CYP9M10-Susceptible	STVEEHLQSS	TENSQYSDLD	ITAAAASFFF	GGLETTTIVL	CFALYEMSON	PNVKQKLQAE	IDQVKEQLST	TDSKLSYEVV	QNMKYLDVVV	SETLRRWAPL
Cq-CYP9M10-Laredo
Cq-CYP9M10-Monclova
Cq-CYP9M10-Guadalupe
Cq-CYP9M10-Hidalgo
Cq-CYP9M10-Montemorelos
Cq-CYP9M10-Monterrey
Cq-CYP9M10-Sabinas
Cq-CYP9M10-SanNicolas
Cq-CYP9M10-VillaJuarez
Cq-CYP9M10-Susceptible	GLTNRATKPK	YTIEDNNGTK	VTIQVGDLLQ	IPIQSIHRDH	RFYFNPYKFD	PERFSEENKA	NINRSAPLFP	GSGPRNCIGS	RLALMQTKCF	LYYTLANFEL
Cq-CYP9M10-Laredo
Cq-CYP9M10-Monclova
Cq-CYP9M10-Guadalupe
Cq-CYP9M10-Hidalgo
Cq-CYP9M10-Montemorelos
Cq-CYP9M10-Monterrey
Cq-CYP9M10-Sabinas
Cq-CYP9M10-SanNicolas
Cq-CYP9M10-VillaJuarez
Cq-CYP9M10-Susceptible	ELCPKTDVPI	KLNKRSVSLD	TLSGFWRMV	PRGEMKK	537					
Cq-CYP9M10-Laredo	537					
Cq-CYP9M10-Monclova	537					
Cq-CYP9M10-Guadalupe	537					
Cq-CYP9M10-Hidalgo	537					
Cq-CYP9M10-Montemorelos	537					
Cq-CYP9M10-Monterrey	537					
Cq-CYP9M10-Sabinas	537					
Cq-CYP9M10-SanNicolas	537					
Cq-CYP9M10-VillaJuarez	537					

7.2.4 CYP9AL1

En el gen CYP9AL1 el cambio observado en la posición 2 de la secuencia deducida de aminoácidos fue de Leucina a isoleucina, ambos aminoácidos hidrofóbicos.

Cq-CYP9AL1-Susceptible	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Cq-CYP9AL1-Sabinas	MLTDVLCALC	SWIVSSNLVW	LICLALVLAY	RFGSHNHDFP	TSKGIPIGPRP	LPFVGNWQW	LLGKVSFFDV	FQELYQSPKE	HKLFGLDFDM	GPVYVLRDFD
Cq-CYP9AL1-SanNicolas	.I.....
Cq-CYP9AL1-Guadalupe	.I.V.....
Cq-CYP9AL1-Hidalgo	.I.V.....
Cq-CYP9AL1-Laredo	.I.....
Cq-CYP9AL1-Monclova	.I.....
Cq-CYP9AL1-Montemorelos	.I.....
Cq-CYP9AL1-Monterrey	.I.....
Cq-CYP9AL1-VillaJuarez	.I.....
Cq-CYP9AL1-Susceptible	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Cq-CYP9AL1-Sabinas	LVKQVCIKDF	DSFTDRRFQF	NEESDPLFSN	ALFAIKGTRW	RNMRALISPA	FTGSKMRGMF	QFITDYCQKA	NDTVKEIVGS	TGAKEVDIRD	IFNKYSNDII
Cq-CYP9AL1-SanNicolas
Cq-CYP9AL1-Guadalupe
Cq-CYP9AL1-Hidalgo
Cq-CYP9AL1-Laredo
Cq-CYP9AL1-Monclova
Cq-CYP9AL1-Montemorelos
Cq-CYP9AL1-Monterrey
Cq-CYP9AL1-VillaJuarez
Cq-CYP9AL1-Susceptible	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Cq-CYP9AL1-Sabinas	ASCAFGEWNN	VLRDGENEYF	RQAKHMTHLN	TWQWVKFMMF	SSPRLAKIL	RIRLFDQMTT	DFMREAVRIV	IEQREKNNVV	RPDLIHLIMQ	ARDQKLFPGD
Cq-CYP9AL1-SanNicolas
Cq-CYP9AL1-Guadalupe
Cq-CYP9AL1-Hidalgo
Cq-CYP9AL1-Laredo
Cq-CYP9AL1-Monclova
Cq-CYP9AL1-Montemorelos
Cq-CYP9AL1-Monterrey
Cq-CYP9AL1-VillaJuarez
Cq-CYP9AL1-Susceptible	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Cq-CYP9AL1-Sabinas	FDRESEVNTV	EEVSYTFNWT	HDDFVSQCAV	FVFGGLDVT	NIASPMAMEL	AINQHVVQKL	REEIESILND	RDGQSVTYDI	HSMVYLDQVL	TETLRKWPQA
Cq-CYP9AL1-SanNicolas
Cq-CYP9AL1-Guadalupe
Cq-CYP9AL1-Hidalgo
Cq-CYP9AL1-Laredo
Cq-CYP9AL1-Monclova
Cq-CYP9AL1-Montemorelos
Cq-CYP9AL1-Monterrey
Cq-CYP9AL1-VillaJuarez
Cq-CYP9AL1-Susceptible	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Cq-CYP9AL1-Sabinas	IFIDRVCTKP	YDLNVDRMI	SLKQGDITIWI	PALEMRDRP	YFSDPEVDFP	DRFASDRRDD	LGDFVLMAPG	IGPRLCLGNNR	FALMEIKTMF	FWLLTKFELT
Cq-CYP9AL1-SanNicolas
Cq-CYP9AL1-Guadalupe
Cq-CYP9AL1-Hidalgo
Cq-CYP9AL1-Laredo
Cq-CYP9AL1-Monclova
Cq-CYP9AL1-Montemorelos
Cq-CYP9AL1-Monterrey
Cq-CYP9AL1-VillaJuarez
Cq-CYP9AL1-Susceptible	510	520	530							
Cq-CYP9AL1-Sabinas	RSDKTQHPPK	LGKSLMIEPV	KDGYWLNKLR	532						
Cq-CYP9AL1-SanNicolas	532						
Cq-CYP9AL1-Guadalupe	532						
Cq-CYP9AL1-Hidalgo	532						
Cq-CYP9AL1-Laredo	532						
Cq-CYP9AL1-Monclova	532						
Cq-CYP9AL1-Montemorelos	532						
Cq-CYP9AL1-Monterrey	532						
Cq-CYP9AL1-VillaJuarez	532						

7.2.5 CYP9J34

En las poblaciones estudiadas de *Culex quinquefasciatus*, el gen CYP9J34, presentó un cambio importante en la posición 371. En la población susceptible e Hidalgo se presentó el aminoácido básico Histidina, en el resto de las poblaciones se observó la presencia del aminoácido hidrofóbico Leucina; en futuros experimentos se determinará la relevancia de este cambio debido a la diferencia de carga en esa posición.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Cq-CYP9J34-Susceptible	MQIDLAYAVP	IVAILGFLYY	WITRNDYFH	EKPIPSMAVK	PIVGSTWPLM	FKKIAFSEFV	QNSYDKYANA	KVFGMMDMTR	PIFVIRDEL	IKQVGVKDFE
Cq-CYP9J34-Monterrey										
Cq-CYP9J34-Sabinas										
Cq-CYP9J34-Guadalupe										
Cq-CYP9J34-Hidalgo										
Cq-CYP9J34-Laredo		.F.		Q.						Q.
Cq-CYP9J34-Monclova		.F.		Q.						Q.
Cq-CYP9J34-Montemorelos										
Cq-CYP9J34-SanNicolas										
Cq-CYP9J34-VillaJuarez										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Cq-CYP9J34-Susceptible	HFMDHQPVFG	NPEYDHNLL	VGKSLFTLAG	QRWYTRATL	SPAFTGSKMR	QMFELIVECS	ERMATYYREE	AKSKGPPQEYE	MKDVFSRFAN	DVVATCAFGL
Cq-CYP9J34-Monterrey										
Cq-CYP9J34-Sabinas										
Cq-CYP9J34-Guadalupe										
Cq-CYP9J34-Hidalgo										
Cq-CYP9J34-Laredo										
Cq-CYP9J34-Monclova										
Cq-CYP9J34-Montemorelos										
Cq-CYP9J34-SanNicolas										
Cq-CYP9J34-VillaJuarez										
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Cq-CYP9J34-Susceptible	AVDSVKDKDN	EFYVNGKMM	NFGFRFVILR	MIGYQLFPAL	MGRLGIDMID	EEQNSYFSSL	ILSAVKDRNE	KGIVRPMIN	LLIQARKGTL	KHQQEKQNE
Cq-CYP9J34-Monterrey										
Cq-CYP9J34-Sabinas										
Cq-CYP9J34-Guadalupe										
Cq-CYP9J34-Hidalgo										
Cq-CYP9J34-Laredo										
Cq-CYP9J34-Monclova										
Cq-CYP9J34-Montemorelos										
Cq-CYP9J34-SanNicolas										
Cq-CYP9J34-VillaJuarez										
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Cq-CYP9J34-Susceptible	GFATVDESIV	GKVQVSTDMT	DTEMVAQCLI	FFLAGFDTVS	TCLLFLTYEL	AINPEVQNKL	YKEVQDTQES	HGGK-LTYDA	LQKMKYLLMV	VSETLRRWPP
Cq-CYP9J34-Monterrey								L..S.		
Cq-CYP9J34-Sabinas								L..S.		
Cq-CYP9J34-Guadalupe								L..S.		
Cq-CYP9J34-Hidalgo								L..S.		
Cq-CYP9J34-Laredo								L..S.		
Cq-CYP9J34-Monclova							R.	L..S.		
Cq-CYP9J34-Montemorelos							R.	G.	L..S.	
Cq-CYP9J34-SanNicolas							R.	G.	L..SF.	
Cq-CYP9J34-VillaJuarez								L..S.		
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Cq-CYP9J34-Susceptible	APAI DRICVK	DYQLDDGNGL	SFKIDKDTAL	WFPVHALHND	PQYFNPAPK	DPERFSDDRK	GSIKPGTYLP	FGIGPRNCIG	SRFALSEVKT	IYYMQGFS
Cq-CYP9J34-Monterrey										
Cq-CYP9J34-Sabinas										
Cq-CYP9J34-Guadalupe										
Cq-CYP9J34-Hidalgo										
Cq-CYP9J34-Laredo										
Cq-CYP9J34-Monclova										
Cq-CYP9J34-Montemorelos										
Cq-CYP9J34-SanNicolas										
Cq-CYP9J34-VillaJuarez										
	510	520	530							
Cq-CYP9J34-Susceptible	FERTSKTEVP	LVLIKSMTDV	IPEKGVHLEF	RPRK	533					
Cq-CYP9J34-Monterrey					534					
Cq-CYP9J34-Sabinas					534					
Cq-CYP9J34-Guadalupe					534					
Cq-CYP9J34-Hidalgo					534					
Cq-CYP9J34-Laredo					534					
Cq-CYP9J34-Monclova					534					
Cq-CYP9J34-Montemorelos					534					
Cq-CYP9J34-SanNicolas					534					
Cq-CYP9J34-VillaJuarez					533					

7.2.6 CYP9J40

En el gen CYP9J40 se observaron varios cambios antes de los primeros cincuenta aminoácidos. Interesantemente, estos cambios van de aminoácidos pequeños como alanina, en la posición 23 por Tirosina; ó de aminoácidos nucleofílicos como Serina en la posición 49, a hidrofóbicos como Leucina. En la región 21 se cambia de Lisina a Isoleucina. Estas mutaciones, queda por determinar la relevancia de las mismas en la proteína completa y así como en su función.

Cq-CYP9J40-Susceptible	MEVNIVVLLA	FIAVIAWFYR	KLTKNNDYFH	GKPIPSMAVK	PLFGSTAPSM	LKKYSFTDYI	KMIYDKYEGV	KVFGLFDTTQ	AMFVLRD PEL	IKKVAVKDFD
Cq-CYP9J40-Monterrey										
Cq-CYP9J40-Sabinas										
Cq-CYP9J40-Guadalupe		.V.								
Cq-CYP9J40-Hidalgo		.V.	I.A.							
Cq-CYP9J40-Laredo			I.A.							
Cq-CYP9J40-Monclova			.A.	H.						
Cq-c-Montemorelos										
Cq-CYP9J40-SanNicolas										
Cq-CYP9J40-VillaJuarez										
Cq-CYP9J40-Susceptible	HFVDRRPVFG	DNANQMSNVL	FSKTLVGMTD	QKWRDMRATL	SPAFTGSKMR	AMFDLMEYTT	GQMDIVRSE	ATGTGVDQE	LKDFPFRIRAN	DIATCAFGL
Cq-CYP9J40-Monterrey										
Cq-CYP9J40-Sabinas										
Cq-CYP9J40-Guadalupe										
Cq-CYP9J40-Hidalgo										
Cq-CYP9J40-Laredo										
Cq-CYP9J40-Monclova										
Cq-c-Montemorelos										
Cq-CYP9J40-SanNicolas										
Cq-CYP9J40-VillaJuarez										
Cq-CYP9J40-Susceptible	KVESVQDRDN	EFYTMGKMM	NFNRLIVLLR	VFAFRFFPGI	MGRKLGVDIMD	REQLQYFSKI	IRDTVGTREA	HGIIRPDMIQ	LLMQARKGTL	KHQEETTES
Cq-CYP9J40-Monterrey										
Cq-CYP9J40-Sabinas										
Cq-CYP9J40-Guadalupe										
Cq-CYP9J40-Hidalgo										
Cq-CYP9J40-Laredo										
Cq-CYP9J40-Monclova										
Cq-c-Montemorelos										
Cq-CYP9J40-SanNicolas										
Cq-CYP9J40-VillaJuarez										
Cq-CYP9J40-Susceptible	AGFATVEESH	VGKVATGKAM	TEPEPIAQCCL	IFFLAGFDTI	STGFMFMAYE	LALNQDVQOK	LYEEAVEVTKN	QLGGKPLTYD	ALQNMITYMDM	VVSESLRVMP
Cq-CYP9J40-Monterrey										
Cq-CYP9J40-Sabinas										
Cq-CYP9J40-Guadalupe										
Cq-CYP9J40-Hidalgo										
Cq-CYP9J40-Laredo										
Cq-CYP9J40-Monclova										
Cq-c-Montemorelos										
Cq-CYP9J40-SanNicolas										
Cq-CYP9J40-VillaJuarez										
Cq-CYP9J40-Susceptible	VPAIDRLCVR	DVLLDDGGL	KFTIDKGSVCV	WFPVHGIHHD	EKYVNPNGKF	DPERFSEANK	GNINPAAYLP	FGVGPNCIG	SRFALMEIKA	IMYQLMLNFS
Cq-CYP9J40-Monterrey										
Cq-CYP9J40-Sabinas										
Cq-CYP9J40-Guadalupe										
Cq-CYP9J40-Hidalgo										
Cq-CYP9J40-Laredo										
Cq-CYP9J40-Monclova										
Cq-c-Montemorelos										
Cq-CYP9J40-SanNicolas										
Cq-CYP9J40-VillaJuarez										
Cq-CYP9J40-Susceptible	FERTEKTQVP	IQLTRGFVGL	AGEKGVHLRL	KLRK	534					
Cq-CYP9J40-Monterrey					534					
Cq-CYP9J40-Sabinas					534					
Cq-CYP9J40-Guadalupe					534					
Cq-CYP9J40-Hidalgo					534					
Cq-CYP9J40-Laredo					534					
Cq-CYP9J40-Monclova					534					
Cq-c-Montemorelos					534					
Cq-CYP9J40-SanNicolas					534					
Cq-CYP9J40-VillaJuarez					534					

7.2.7 CYP6AA7

Finalmente, en el gen CYP6AA7 se observaron varios cambios de aminoácidos en las posiciones, 12, 14, 21, 22, 31, 33, 86, 95, 169, 347, 354, 357, 363, 364, 372, 426, 495. En todos los genes reportados en ese estudio será necesario determinar la importancia de las mutaciones encontradas.

Cq-CYP6AA7-Susceptible	MSLLNTLLYL	VQFFAALIYL	IMWR-LSYWA	VRTVPHAPGS	FFMGSLLQMG	TKYHMSHILE	RIYQQFKNES	PAVGFYLTMK	FTLMVTINLEL	VKQVSVKDFN
Cq-CYP6AA7-HidalgoL.V.....	FVR.K.....	D.N.....D.....L.....
Cq-CYP6AA7-LaredoL.V.....	FVR.K.....	D.N.....D.....L.....
Cq-CYP6AA7-GuadalupeL.V.....	.VR.K.....	D.....D.....L.....
Cq-CYP6AA7-MonclovaV.....	.VR.K.....	D.....D.....L.....
Cq-CYP6AA7-MontemorelosV.....	.VR.K.....	D.....D.....L.....
Cq-CYP6AA7-MonterreyV.....	.VR.....	D.....D.....L.....
Cq-CYP6AA7-SabinasV.....	.V.....	D.....D.....L.....
Cq-CYP6AA7-SanNicolasD.....L.....
Cq-CYP6AA7-VillaJuarezD.....L.....
Cq-CYP6AA7-Susceptible	SFRDRGVYYN	EKDDPVSAHL	FAIDGERWRF	LRNKLSPFT	SGKIKYMFNT	MQEIGDEFVE	CFGRYEERQE	AVDVKTLCGW	FTCDVIGSCA	FGLNCNSLKN
Cq-CYP6AA7-HidalgoE.....
Cq-CYP6AA7-LaredoE.....
Cq-CYP6AA7-GuadalupeE.....
Cq-CYP6AA7-MonclovaE.....
Cq-CYP6AA7-MontemorelosE.....
Cq-CYP6AA7-MonterreyE.....
Cq-CYP6AA7-SabinasE.....
Cq-CYP6AA7-SanNicolasE.....
Cq-CYP6AA7-VillaJuarezE.....
Cq-CYP6AA7-Susceptible	EESELITIAN	RLFKPSPIDA	MWQFFMMSFR	DLAKLRLLI	LPRDIKRYFM	TLIPETVYR	EQNNVTRPDF	LQLLIQLKKN	GTVDGAEQES	SGETLTMNQV
Cq-CYP6AA7-Hidalgo
Cq-CYP6AA7-Laredo
Cq-CYP6AA7-Guadalupe
Cq-CYP6AA7-Monclova
Cq-CYP6AA7-Montemorelos
Cq-CYP6AA7-Monterrey
Cq-CYP6AA7-Sabinas
Cq-CYP6AA7-SanNicolas
Cq-CYP6AA7-VillaJuarez
Cq-CYP6AA7-Susceptible	VAQSFVFMGLG	GFETTSTALT	FALFELANNP	EIQEKVREIV	SSVLARHGKG	ITYVALREMT	YLKKVNETL	RIYPPVPEVA	RNSNHSYHIT	HPDVTLDADT
Cq-CYP6AA7-HidalgoD.....D.....E.....M.....
Cq-CYP6AA7-LaredoD.....D.....E.....M.....
Cq-CYP6AA7-GuadalupeD.....D.....E.....M.....
Cq-CYP6AA7-MonclovaD.....D.....E.....M.....
Cq-CYP6AA7-MontemorelosD.....D.....E.....M.....
Cq-CYP6AA7-MonterreyD.....D.....E.....M.....
Cq-CYP6AA7-SabinasD.....D.....E.....M.....
Cq-CYP6AA7-SanNicolas
Cq-CYP6AA7-VillaJuarez
Cq-CYP6AA7-Susceptible	MVLVPVYAIH	YDDPIYQNP	RFDPPRITPE	ATQARHTHAF	LPPFGDPRNC	IGLRFALLEV	KFGIAVLLSK	FRFSTSARKMI	LPLELDISAP	MMAANGGWL
Cq-CYP6AA7-HidalgoF.....K.....
Cq-CYP6AA7-LaredoF.....K.....
Cq-CYP6AA7-GuadalupeF.....K.....
Cq-CYP6AA7-MonclovaF.....K.....
Cq-CYP6AA7-MontemorelosF.....K.....
Cq-CYP6AA7-MonterreyF.....K.....
Cq-CYP6AA7-SabinasF.....K.....
Cq-CYP6AA7-SanNicolasF.....K.....
Cq-CYP6AA7-VillaJuarezK.....
Cq-CYP6AA7-Susceptible	DVNKINSKE	508
Cq-CYP6AA7-Hidalgo	509
Cq-CYP6AA7-Laredo	509
Cq-CYP6AA7-Guadalupe	509
Cq-CYP6AA7-Monclova	509
Cq-CYP6AA7-Montemorelos	509
Cq-CYP6AA7-Monterrey	508
Cq-CYP6AA7-Sabinas	508
Cq-CYP6AA7-SanNicolas	508
Cq-CYP6AA7-VillaJuarez	508

7.3 Porcentajes de similitudes en aminoácidos

7.3.1 CYP4C52V1

En el transcrito CYP4C52V1, las larvas provenientes de Hidalgo y Guadalupe conservan un 100% de similitudes, estas dos localidades conservan un 99.94% de homología con San Nicolás, Monterrey, Monclova y la susceptible, todas las anteriores conservan un 99.87% con Laredo, Sabinas, Montemorelos y Villa de Juárez.

Nombre	Nombre	Porcentaje de similitud
Cq-CYP4C52v1-Guadalupe	Cq-CYP4C52v1-Hidalgo	100
Cq-CYP4C52v1-Guadalupe	Cq-CYP4C52v1-SanNicolas	99.94
Cq-CYP4C52v1-Guadalupe	Cq-CYP4C52v1-Susceptible	
Cq-CYP4C52v1-Hidalgo	Cq-CYP4C52v1-SanNicolas	
Cq-CYP4C52v1-Hidalgo	Cq-CYP4C52v1-Susceptible	
Cq-CYP4C52v1-SanNicolas	Cq-CYP4C52v1-Monclova	
Cq-CYP4C52v1-Monterrey	Cq-CYP4C52v1-Susceptible	
Cq-CYP4C52v1-Guadalupe	Cq-CYP4C52v1-Monclova	
Cq-CYP4C52v1-Guadalupe	Cq-CYP4C52v1-VillaJuraez	99.87
Cq-CYP4C52v1-Guadalupe	Cq-CYP4C52v1-Laredo	
Cq-CYP4C52v1-Guadalupe	Cq-CYP4C52v1-Montemorelos	
Cq-CYP4C52v1-Guadalupe	Cq-CYP4C52v1-Sabinas	
Cq-CYP4C52v1-Guadalupe	Cq-CYP4C52v1-Monterrey	
Cq-CYP4C52v1-Hidalgo	Cq-CYP4C52v1-Monclova	
Cq-CYP4C52v1-Hidalgo	Cq-CYP4C52v1-VillaJuraez	
Cq-CYP4C52v1-Hidalgo	Cq-CYP4C52v1-Laredo	
Cq-CYP4C52v1-Hidalgo	Cq-CYP4C52v1-Montemorelos	
Cq-CYP4C52v1-Hidalgo	Cq-CYP4C52v1-Sabinas	
Cq-CYP4C52v1-Hidalgo	Cq-CYP4C52v1-Monterrey	
Cq-CYP4C52v1-SanNicolas	Cq-CYP4C52v1-Susceptible	
Cq-CYP4C52v1-Monclova	Cq-CYP4C52v1-VillaJuraez	
Cq-CYP4C52v1-VillaJuraez	Cq-CYP4C52v1-Laredo	
Cq-CYP4C52v1-Laredo	Cq-CYP4C52v1-Montemorelos	
Cq-CYP4C52v1-Montemorelos	Cq-CYP4C52v1-Sabinas	
Cq-CYP4C52v1-Sabinas	Cq-CYP4C52v1-Monterrey	

7.3.2 CYP6BY3

En el transcrito CYP6BY3, las larvas provenientes de Hidalgo y Guadalupe conservan un 100% de similitudes, estas dos localidades conservan un 99.86% de homología con San Nicolás, Monterrey, Monclova, Montemorelos, Sabinas, Villa de Juárez, Laredo y la susceptible.

Nombre	Nombre	Porcentaje de similitud
Cq-CYP6BY3-Guadalupe	Cq-CYP6BY3-Hidalgo	100
Cq-CYP6BY3-Guadalupe	Cq-CYP6BY3-Laredo	99.86
Cq-CYP6BY3-Guadalupe	Cq-CYP6BY3-Monclova	
Cq-CYP6BY3-Guadalupe	Cq-CYP6BY3-Montemorelos	
Cq-CYP6BY3-Guadalupe	Cq-CYP6BY3-Monterrey	
Cq-CYP6BY3-Guadalupe	Cq-CYP6BY3-Sabinas	
Cq-CYP6BY3-Guadalupe	Cq-CYP6BY3-SanNicolas	
Cq-CYP6BY3-Guadalupe	Cq-CYP6BY3-VillaJuarez	
Cq-CYP6BY3-Guadalupe	Cq-CYP6BY3-Susceptible	
Cq-CYP6BY3-Hidalgo	Cq-CYP6BY3-Laredo	
Cq-CYP6BY3-Hidalgo	Cq-CYP6BY3-Monclova	
Cq-CYP6BY3-Hidalgo	Cq-CYP6BY3-Montemorelos	
Cq-CYP6BY3-Hidalgo	Cq-CYP6BY3-Monterrey	
Cq-CYP6BY3-Hidalgo	Cq-CYP6BY3-Sabinas	
Cq-CYP6BY3-Hidalgo	Cq-CYP6BY3-SanNicolas	
Cq-CYP6BY3-Hidalgo	Cq-CYP6BY3-VillaJuarez	
Cq-CYP6BY3-Hidalgo	Cq-CYP6BY3-Susceptible	
Cq-CYP6BY3-Laredo	Cq-CYP6BY3-Monclova	
Cq-CYP6BY3-Laredo	Cq-CYP6BY3-Susceptible	
Cq-CYP6BY3-Monclova	Cq-CYP6BY3-Montemorelos	
Cq-CYP6BY3-Montemorelos	Cq-CYP6BY3-Monterrey	
Cq-CYP6BY3-Monterrey	Cq-CYP6BY3-Sabinas	
Cq-CYP6BY3-Sabinas	Cq-CYP6BY3-SanNicolas	
Cq-CYP6BY3-SanNicolas	Cq-CYP6BY3-VillaJuarez	
Cq-CYP6BY3-VillaJuarez	Cq-CYP6BY3-Susceptible	

7.3.3 CYP9M10

En el transcrito CYP9M10, las larvas provenientes de Hidalgo y Monclova conservan un 100% de similitudes, estas dos localidades conservan un 99.94% de homología con Guadalupe, Monclova, Villa de Juárez y la susceptible.

Nombre	Nombre	Porcentaje
Cq-CYP9M10-Laredo	Cq-CYP9M10-Monclova	100
Cq-CYP9M10-Laredo	Cq-CYP9M10-Guadalupe	99.94
Cq-CYP9M10-Laredo	Cq-CYP9M10-Susceptible	
Cq-CYP9M10-Monclova	Cq-CYP9M10-Guadalupe	
Cq-CYP9M10-Monclova	Cq-CYP9M10-Susceptible	
Cq-CYP9M10-Guadalupe	Cq-CYP9M10-Hidalgo	
Cq-CYP9M10-VillaJuarez	Cq-CYP9M10-Susceptible	

7.3.4 CYP9AL1

En el transcrito CYP9AL1, las larvas provenientes de Sabinas y San Nicolás conservan un 100% de similitudes, estas dos localidades conservan un 99.88% de homología con Guadalupe, Hidalgo, Laredo, Monclova, Montemorelos, Monterrey, Villa de Juárez y la susceptible.

Nombre	Nombre	Porcentaje de similitud
Cq-CYP9AL1-Sabinas	Cq-CYP9AL1-SanNicolas	100
Cq-CYP9AL1-Sabinas	Cq-CYP9AL1-Guadalupe	99.88
Cq-CYP9AL1-Sabinas	Cq-CYP9AL1-Hidalgo	
Cq-CYP9AL1-Sabinas	Cq-CYP9AL1-Laredo	
Cq-CYP9AL1-Sabinas	Cq-CYP9AL1-Monclova	
Cq-CYP9AL1-Sabinas	Cq-CYP9AL1-Montemorelos	
Cq-CYP9AL1-Sabinas	Cq-CYP9AL1-Monterrey	
Cq-CYP9AL1-Sabinas	Cq-CYP9AL1-VillaJuarez	
Cq-CYP9AL1-Sabinas	Cq-CYP9AL1-Susceptible	
Cq-CYP9AL1-SanNicolas	Cq-CYP9AL1-Guadalupe	
Cq-CYP9AL1-SanNicolas	Cq-CYP9AL1-Hidalgo	
Cq-CYP9AL1-SanNicolas	Cq-CYP9AL1-Laredo	
Cq-CYP9AL1-SanNicolas	Cq-CYP9AL1-Monclova	
Cq-CYP9AL1-SanNicolas	Cq-CYP9AL1-Montemorelos	
Cq-CYP9AL1-SanNicolas	Cq-CYP9AL1-Monterrey	
Cq-CYP9AL1-SanNicolas	Cq-CYP9AL1-VillaJuarez	
Cq-CYP9AL1-SanNicolas	Cq-CYP9AL1-Susceptible	
Cq-CYP9AL1-Guadalupe	Cq-CYP9AL1-Hidalgo	
Cq-CYP9AL1-Guadalupe	Cq-CYP9AL1-Susceptible	
Cq-CYP9AL1-Hidalgo	Cq-CYP9AL1-Laredo	
Cq-CYP9AL1-Laredo	Cq-CYP9AL1-Monclova	
Cq-CYP9AL1-Monclova	Cq-CYP9AL1-Montemorelos	
Cq-CYP9AL1-Montemorelos	Cq-CYP9AL1-Monterrey	
Cq-CYP9AL1-Monterrey	Cq-CYP9AL1-VillaJuarez	
Cq-CYP9AL1-VillaJuarez	Cq-CYP9AL1-Susceptible	

7.3.5 CYP9J34

En el transcrito CYP9J34, las larvas provenientes de Guadalupe, Sabinas y Monterrey conservan un 100% de similitudes, estas dos localidades conservan un 99.88% de homología con Hidalgo, Laredo, Monclova, Montemorelos, San Nicolás, Villa de Juárez y la susceptible.

Nombre	Nombre	Porcentaje de similitud
Cq-CYP9J34-Monterrey	Cq-CYP9J34-Sabinas	100
Cq-CYP9J34-Monterrey	Cq-CYP9J34-Guadalupe	100
Cq-CYP9J34-Sabinas	Cq-CYP9J34-Guadalupe	100
Cq-CYP9J34-Monterrey	Cq-CYP9J34-Hidalgo	99.88
Cq-CYP9J34-Monterrey	Cq-CYP9J34-Laredo	
Cq-CYP9J34-Monterrey	Cq-CYP9J34-Monclova	
Cq-CYP9J34-Monterrey	Cq-CYP9J34-Montemorelos	
Cq-CYP9J34-Monterrey	Cq-CYP9J34-SanNicolas	
Cq-CYP9J34-Monterrey	Cq-CYP9J34-VillaJuarez	
Cq-CYP9J34-Monterrey	Cq-CYP9J34-Susceptible	
Cq-CYP9J34-Sabinas	Cq-CYP9J34-Hidalgo	
Cq-CYP9J34-Sabinas	Cq-CYP9J34-Laredo	
Cq-CYP9J34-Sabinas	Cq-CYP9J34-Monclova	
Cq-CYP9J34-Sabinas	Cq-CYP9J34-Montemorelos	
Cq-CYP9J34-Sabinas	Cq-CYP9J34-SanNicolas	
Cq-CYP9J34-Sabinas	Cq-CYP9J34-VillaJuarez	
Cq-CYP9J34-Sabinas	Cq-CYP9J34-Susceptible	
Cq-CYP9J34-Guadalupe	Cq-CYP9J34-Hidalgo	
Cq-CYP9J34-Guadalupe	Cq-CYP9J34-Laredo	
Cq-CYP9J34-Guadalupe	Cq-CYP9J34-Monclova	
Cq-CYP9J34-Guadalupe	Cq-CYP9J34-Montemorelos	
Cq-CYP9J34-Guadalupe	Cq-CYP9J34-SanNicolas	
Cq-CYP9J34-Guadalupe	Cq-CYP9J34-VillaJuarez	
Cq-CYP9J34-Guadalupe	Cq-CYP9J34-Susceptible	
Cq-CYP9J34-Hidalgo	Cq-CYP9J34-Laredo	
Cq-CYP9J34-Hidalgo	Cq-CYP9J34-Susceptible	
Cq-CYP9J34-Laredo	Cq-CYP9J34-Monclova	
Cq-CYP9J34-Monclova	Cq-CYP9J34-Montemorelos	
Cq-CYP9J34-Montemorelos	Cq-CYP9J34-SanNicolas	
Cq-CYP9J34-VillaJuarez	Cq-CYP9J34-Susceptible	

7.3.6 CYP9J40

En el transcrito CYP9J40, las larvas provenientes de Sabinas y Monterrey conservan un 100% de similitudes, estas dos localidades conservan un 99.94% de homología con Guadalupe, Hidalgo, Laredo, Monclova, Montemorelos, San Nicolás, Villa de Juárez y la susceptible.

Nombre	Nombre	Porcentaje de similitud
Cq-CYP9J40-Monterrey	Cq-CYP9J40-Sabinas	100
Cq-CYP9J40-Monterrey	Cq-CYP9J40-Susceptible	99.94
Cq-CYP9J40-Sabinas	Cq-CYP9J40-Susceptible	
Cq-CYP9J40-Guadalupe	Cq-CYP9J40-Hidalgo	
Cq-CYP9J40-VillaJuarez	Cq-CYP9J40-Susceptible	

7.3.7 CYP6AA7

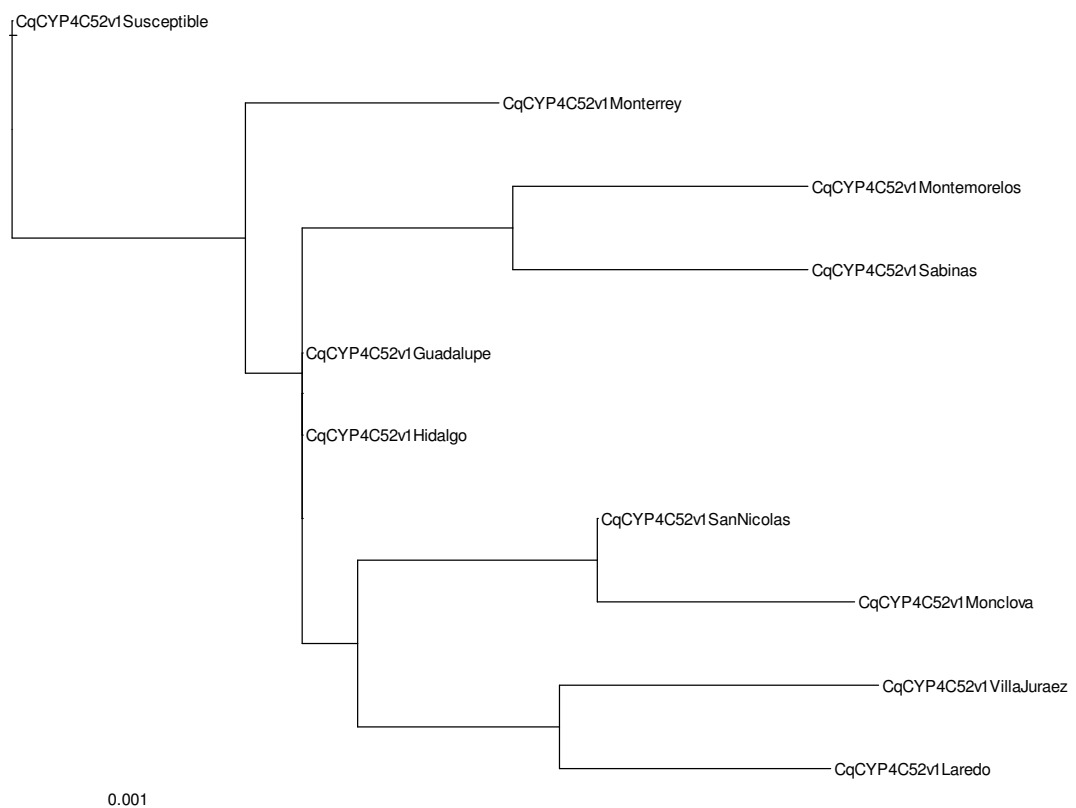
En el transcrito CYP6AA7, las larvas provenientes de Sabinas y San Nicolás conservan un 100% de similitudes, estas dos localidades conservan un 99.88% de homología con Guadalupe, Hidalgo, Laredo, Monclova, Montemorelos, Monterrey, Villa de Juárez y la susceptible.

Nombre	Nombre	Porcentaje de similitud
Cq-CYP6AA7-Hidalgo	Cq-CYP6AA7-Laredo	100
Cq-CYP6AA7-Hidalgo	Cq-CYP6AA7-Guadalupe	99.8
Cq-CYP6AA7-Laredo	Cq-CYP6AA7-Guadalupe	
Cq-CYP6AA7-Guadalupe	Cq-CYP6AA7-Monclova	
Cq-CYP6AA7-Monclova	Cq-CYP6AA7-Montemorelos	
Cq-CYP6AA7-Montemorelos	Cq-CYP6AA7-Monterrey	
Cq-CYP6AA7-Monterrey	Cq-CYP6AA7-Sabinas	
Cq-CYP6AA7-Sabinas	Cq-CYP6AA7-SanNicolas	
Cq-CYP6AA7-SanNicolas	Cq-CYP6AA7-VillaJuarez	
Cq-CYP6AA7-VillaJuarez	Cq-CYP6AA7-Susceptible	

7.4 Árboles filogenético

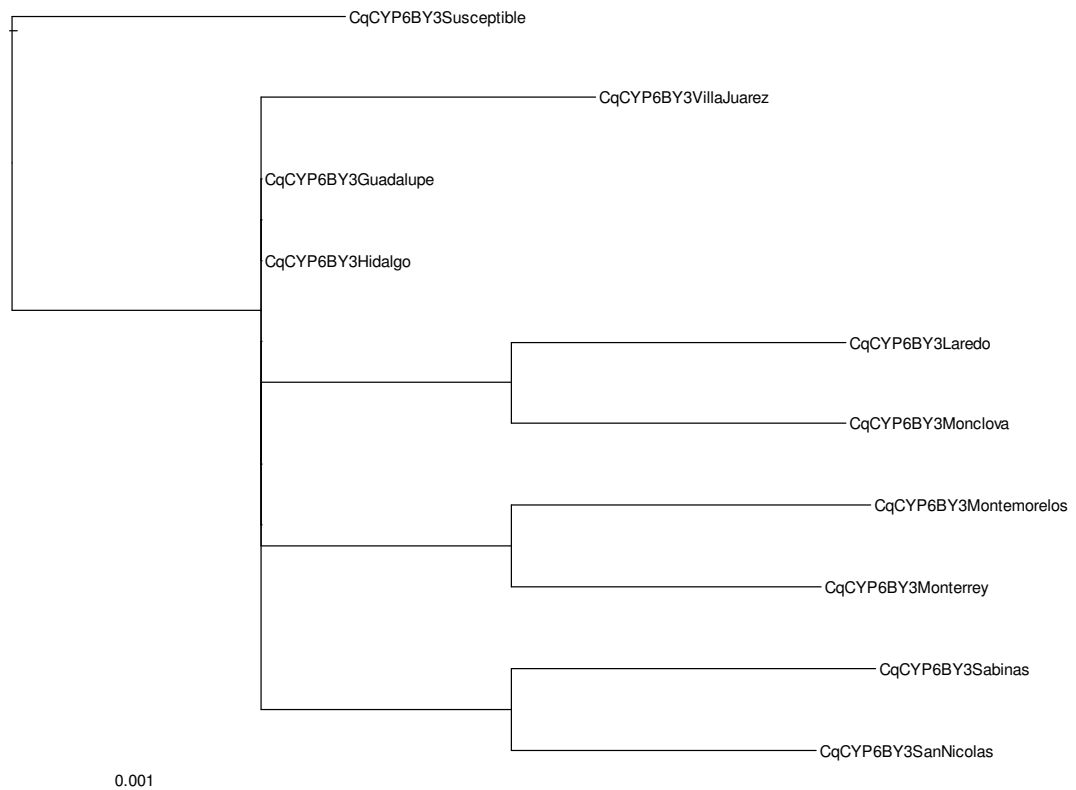
7.4.1 CYP4C52V1

La susceptible es la secuencia más ancestral, se comporta como el grupo fuera. Mientras que el resto de las especies forman dos clados bien definidos. Los cuales no se agrupan siguiendo un patrón geográfico. Este comportamiento puede obedecer a ruta migratorias erráticas. El primer clado lo forman: Laredo, Villa Juárez, Monclova y San Nicolás. El segundo: Monterrey, Montemorelos, Sabinas, Guadalupe e Hidalgo. Estas dos últimas secuencias son las más emparentadas entre sí, así lo demuestran sus ramas cortas de dicho árbol.



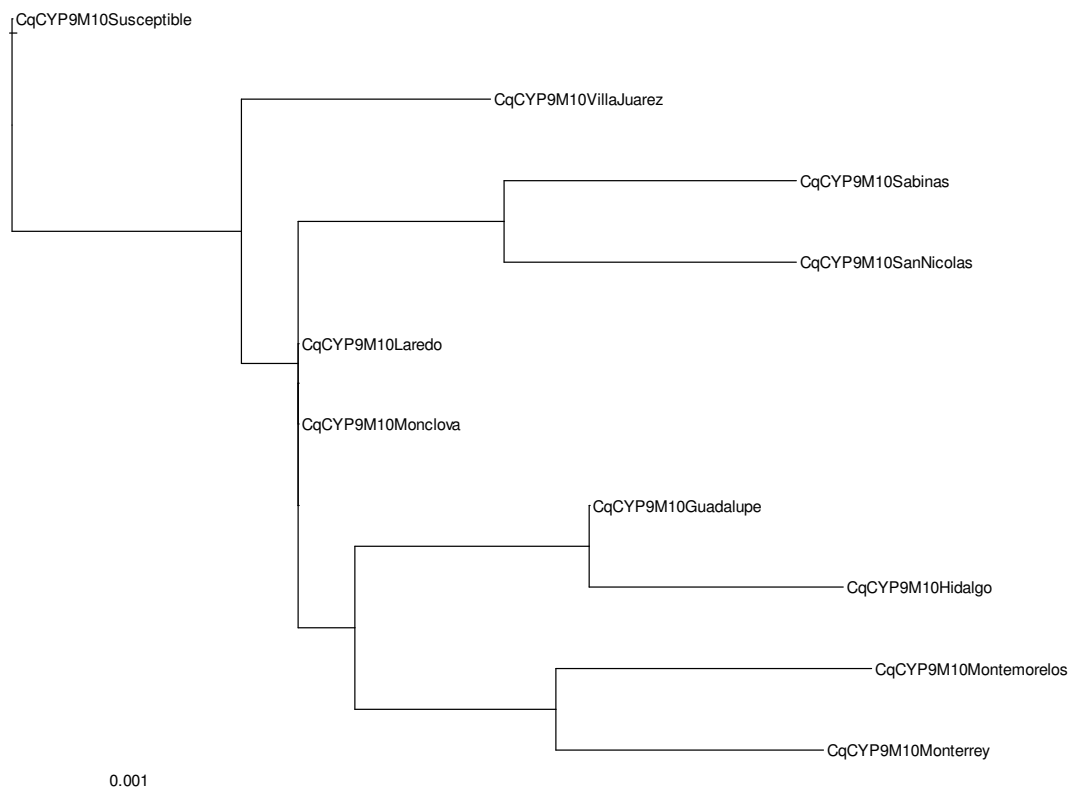
7.4.2 CYP6BY3

La susceptible es la secuencia más ancestral, se comporta como grupo fuera. Mientras que el resto de las secuencias se agrupan en pares; San Nicolás – Sabinas, Monterrey – Montemorelos, Monclova – Laredo y Guadalupe – Hidalgo; quienes al igual que en el árbol 1, son las secuencias más emparentadas entre sí. La formación de estos pares indica la homología de las secuencias pareadas.



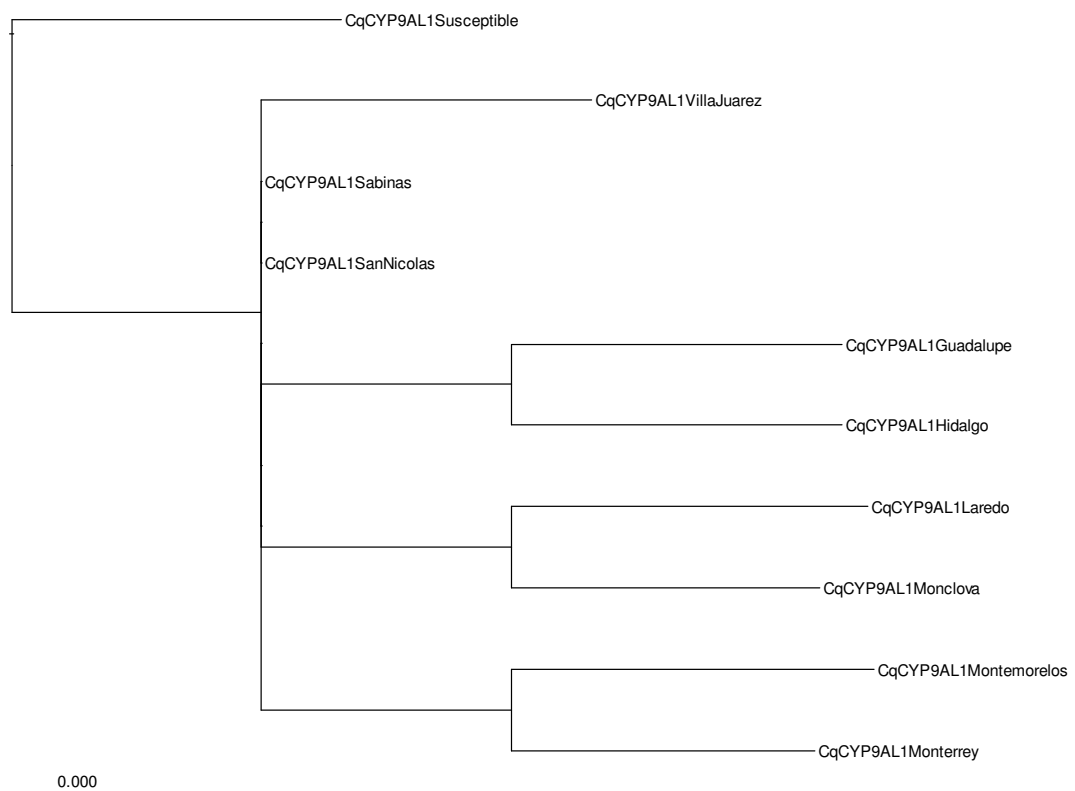
7.4.3 CYP9M10

La susceptible es la secuencia más ancestral, se comporta como el grupo fuera. Mientras que el resto de las especies forman dos clados bien definidos. Los cuales no se agrupan siguiendo un patrón geográfico. Este comportamiento puede obedecer a ruta migratorias erráticas. El primer clado lo forman: Monterrey, Montemorelos, Hidalgo y Guadalupe. El segundo: Juárez, Sabinas, San Nicolás, Laredo y Monclova. Estas dos últimas secuencias son las más emparentadas entre sí, así lo demuestran sus ramas cortas de dicho árbol.



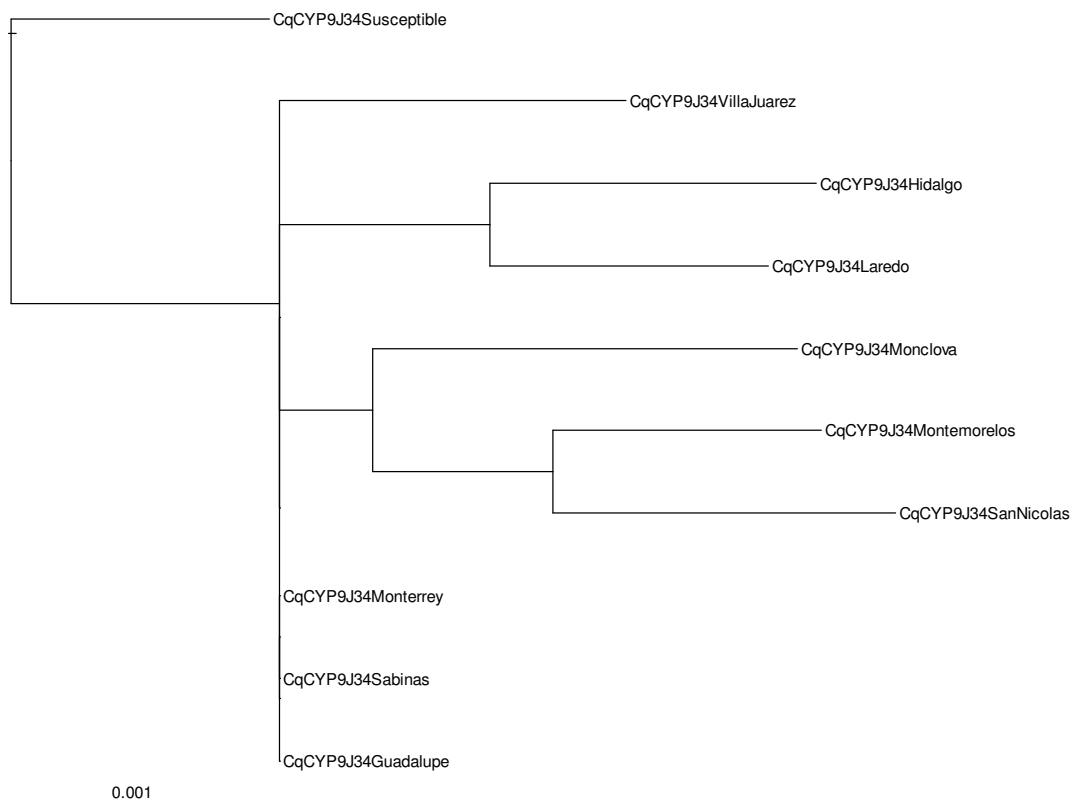
7.4.4 CYP9AL1

La susceptible es la secuencia más ancestral, se comporta como grupo fuera. Mientras que el resto de las secuencias se agrupan en pares; San Nicolás – Sabinas, Monterrey – Montemorelos, Monclova – Laredo, Guadalupe – Hidalgo, San Nicolás – Sabinas quienes son las secuencias más emparentadas entre sí. Villa Juárez queda sin formar pareja, pero sin ser parte del grupo fuera. La formación de estos pares indica la homología de las secuencias pareadas.



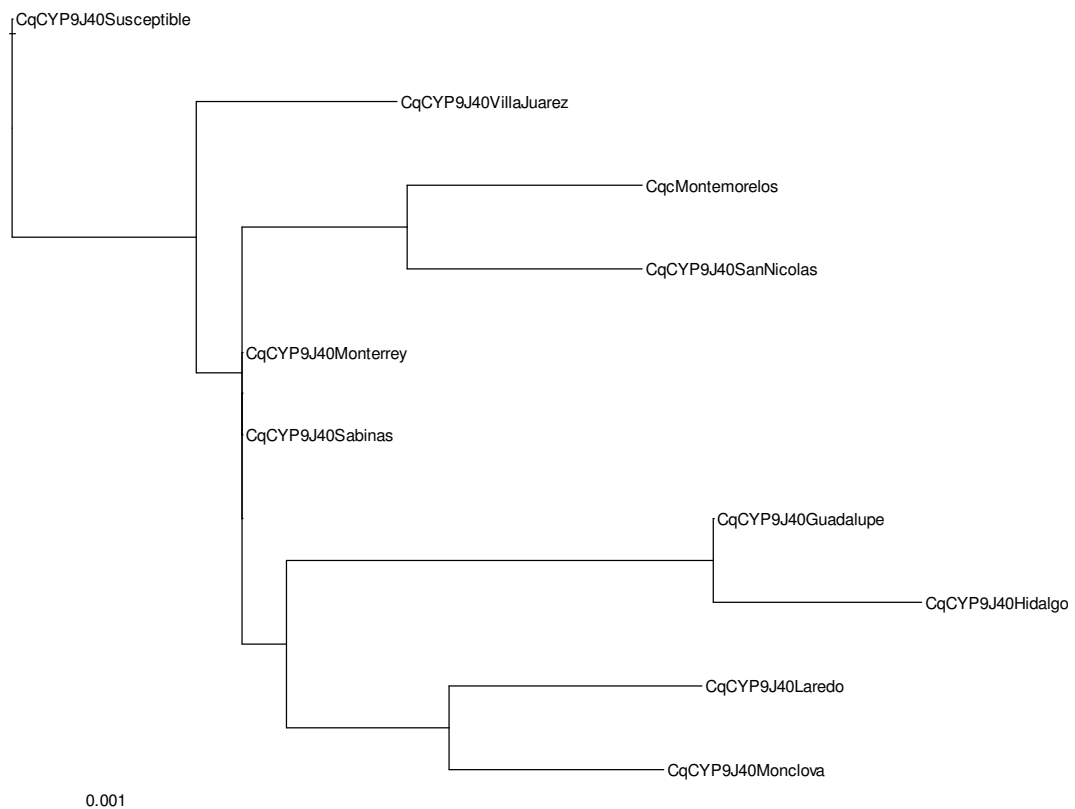
7.4.5 CYP9J34

La susceptible es la secuencia más ancestral, se comporta como el grupo fuera. Mientras que el resto de las especies forman dos clados bien definidos. Los cuales no se agrupan siguiendo un patrón geográfico. Este comportamiento puede obedecer a ruta migratorias erráticas. El primer clado lo forman: Guadalupe, Sabinas y Monterrey; quienes son las secuencias más emparentadas entre sí, así lo demuestran sus ramas cortas de dicho árbol. El segundo: San Nicolás, Montemorelos, Monclova, Laredo, Hidalgo y Villa Juárez.



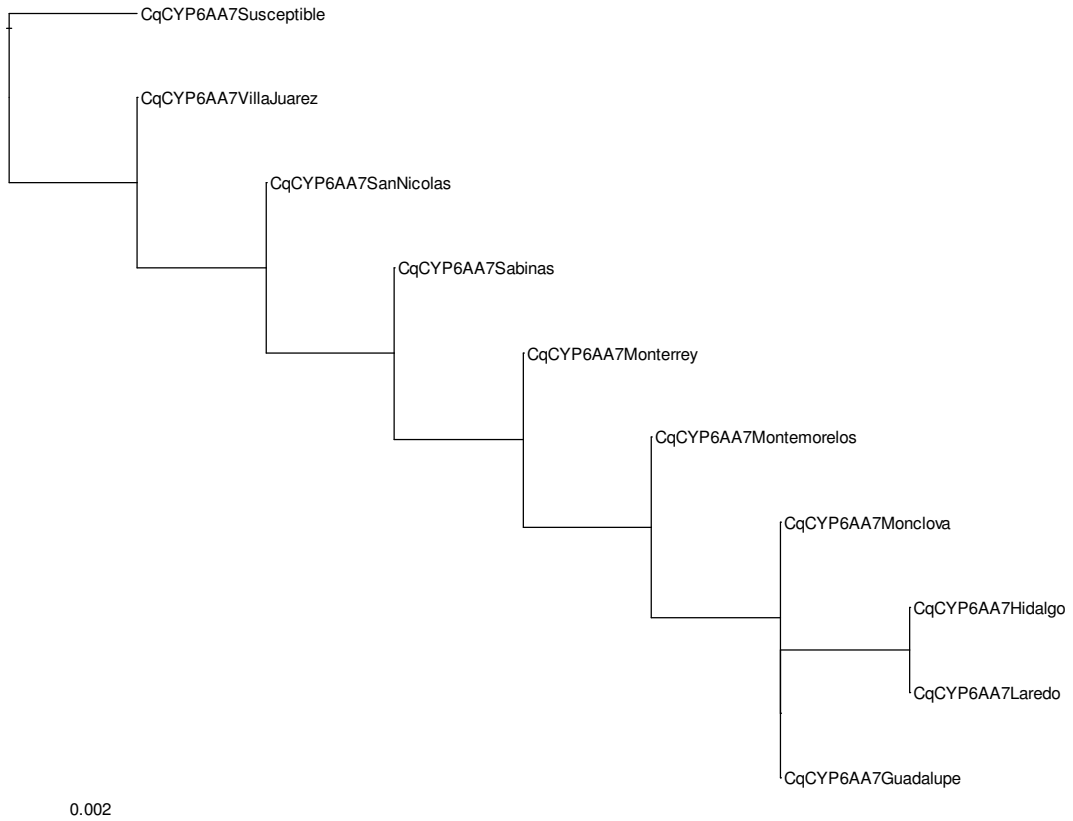
7.4.6 CYP9J40

La susceptible es la secuencia más ancestral, se comporta como el grupo fuera. Mientras que el resto de las especies forman dos clados bien definidos. Los cuales no se agrupan siguiendo un patrón geográfico. Este comportamiento puede obedecer a ruta migratorias erráticas. El primer clado lo forman: Monclova, Laredo, Hidalgo y Guadalupe. El segundo: Villa Juárez, Montemorelos, San Nicolas, Monterrey y Sabinas, quienes son las secuencias más emparentadas entre sí, así lo demuestran sus ramas cortas de dicho árbol.



7.4.7 CYP6AA7

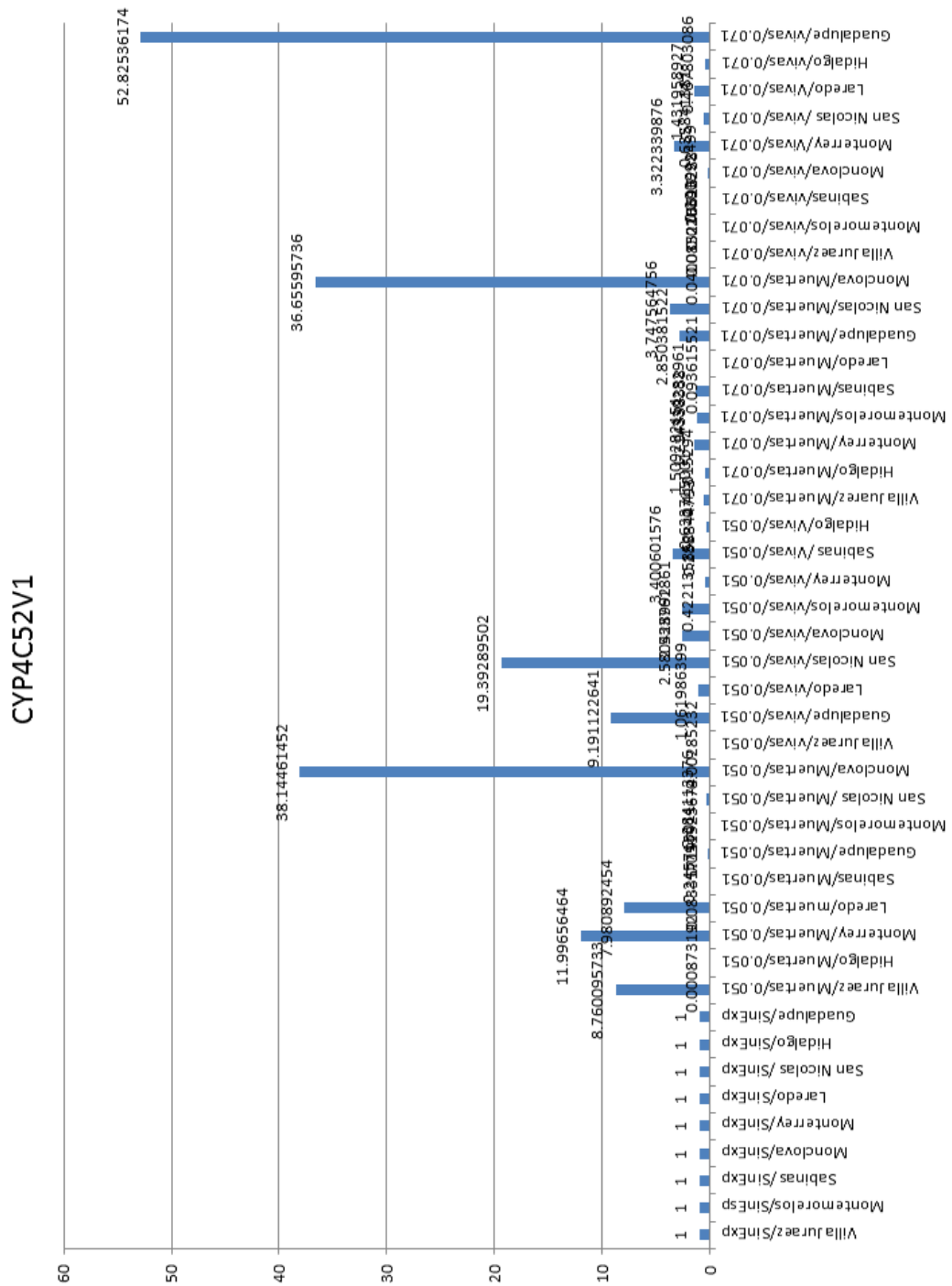
No forma ningún clado. Se observa una forma escalonada que denota ancestría en orden descendente. Por tanto la secuencia más ancestral es la Susceptible y las más reciente es Guadalupe.



7.5 Niveles de expresión génica por gen

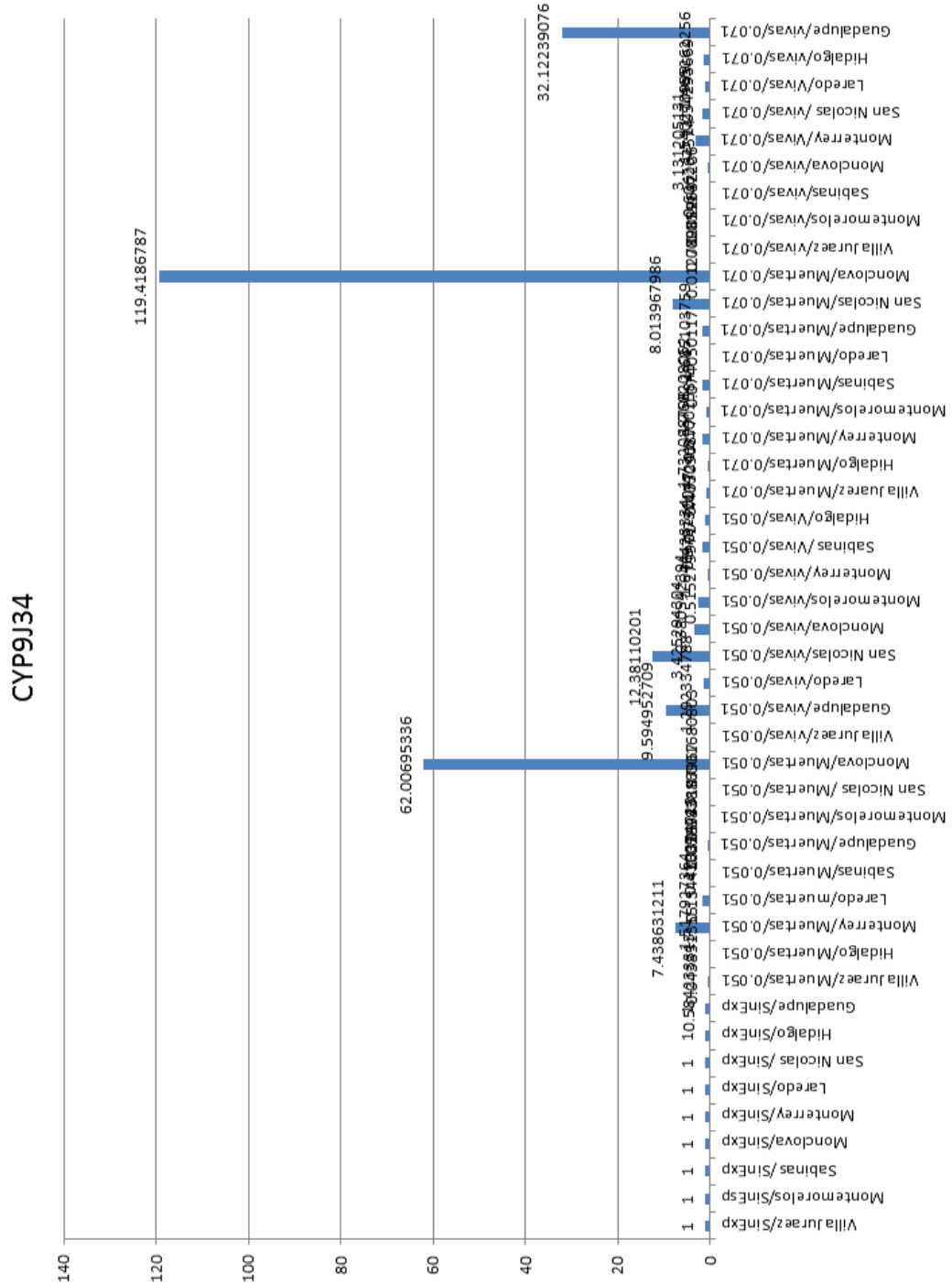
7.5.1 CYP4C52V1

La mayor expresión del transcrito CYP4C52V1 se observó en las larvas vivas expuestas a la concentración de 0.71 mg. De todas las localidades, Guadalupe y Monclova fue donde se observaron los niveles más altos.



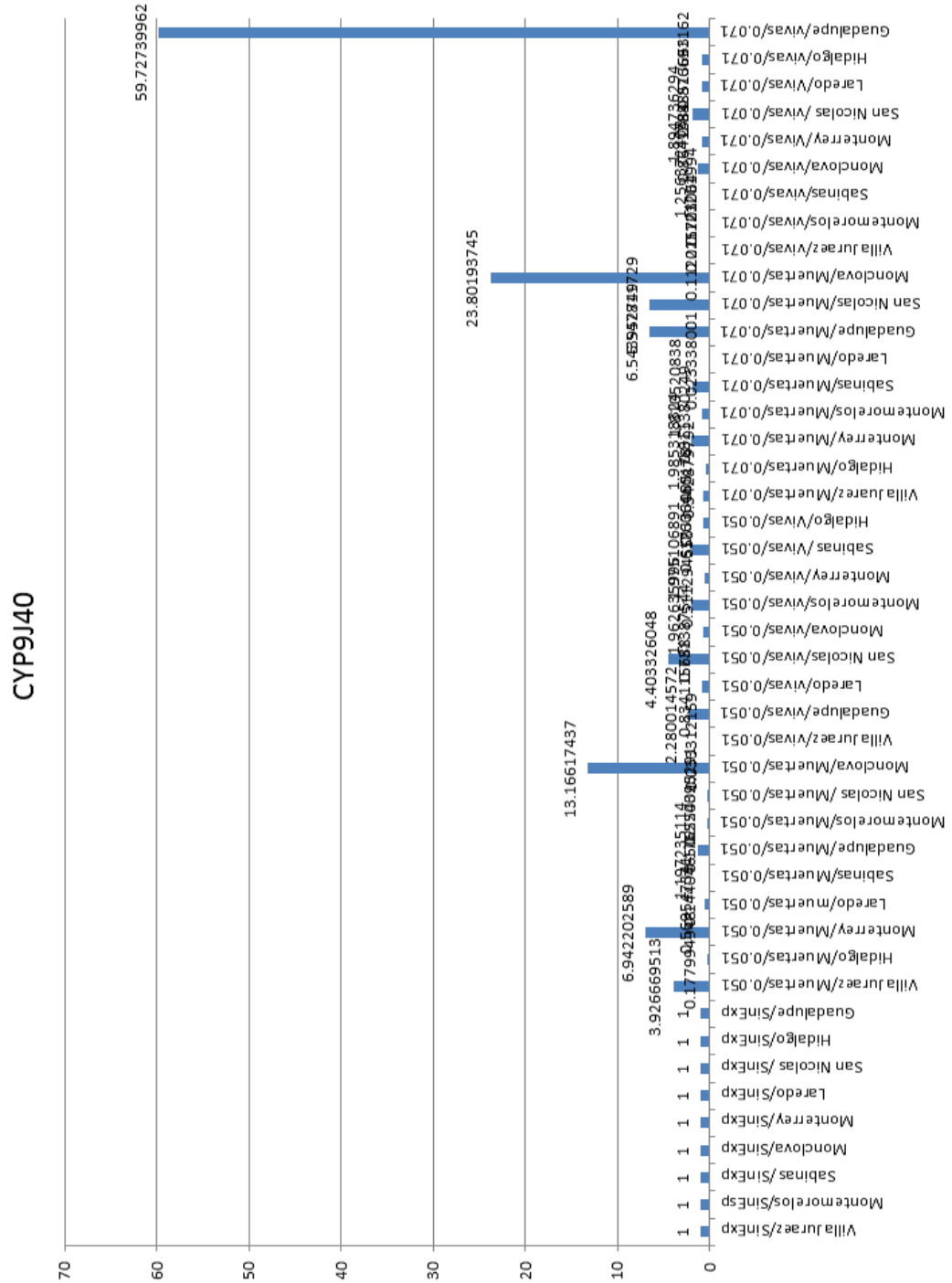
7.5.5 CYP9J34

La expresión de CYP9J34 fue mayor en larvas muertas que en vivas, estas de las localidades de Monclova.



7.5.6 CYP9J40

Las larvas provenientes de Guadalupe y Monclova fueron las que expresaron mas el transcrito que codifica para el CYP9J40.



7.6 Niveles de expresión génica por localidad

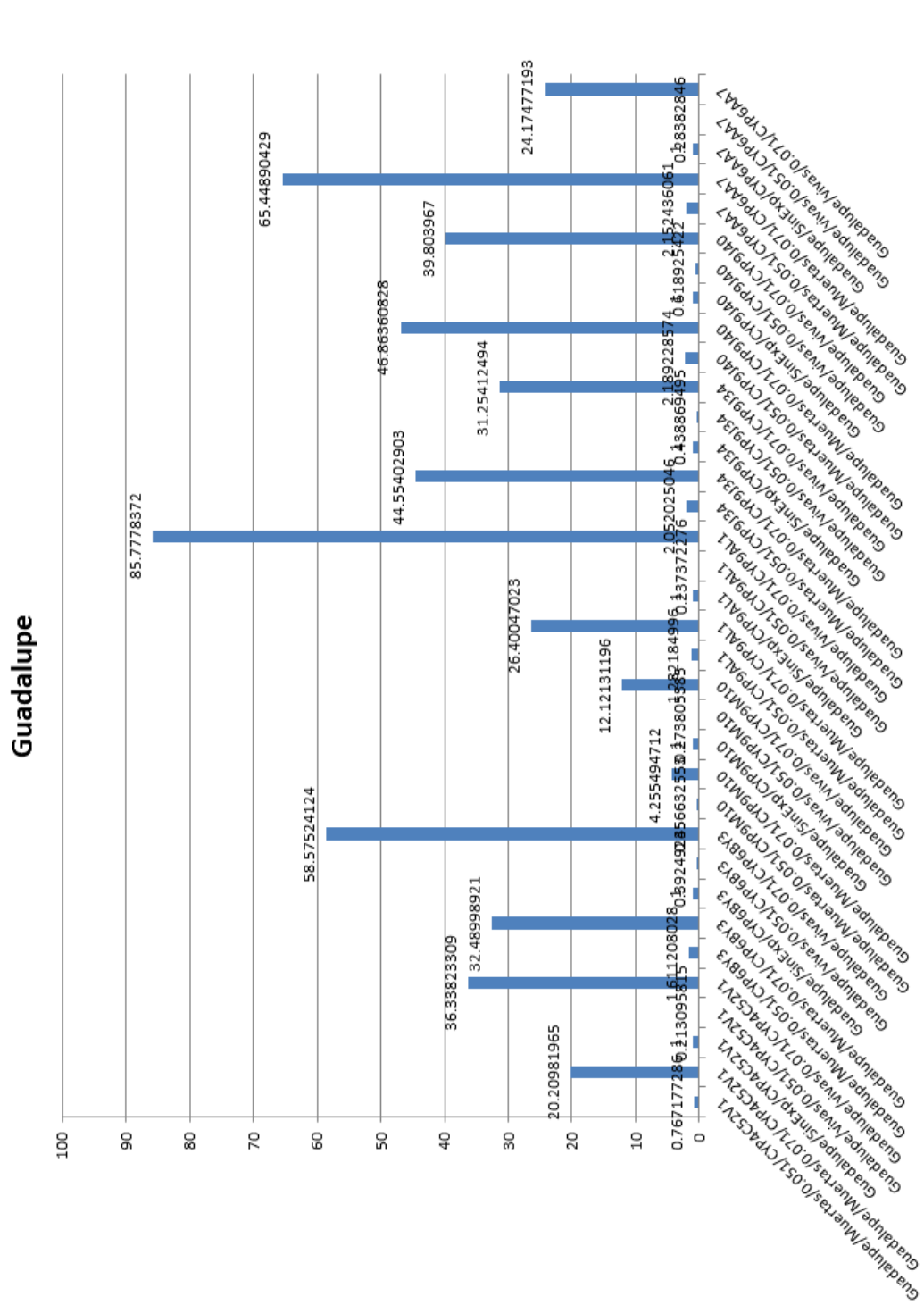
7.6.1 Monclova

En larvas de Monclova el citocromo mayormente expresado fue el CYP6AA7.



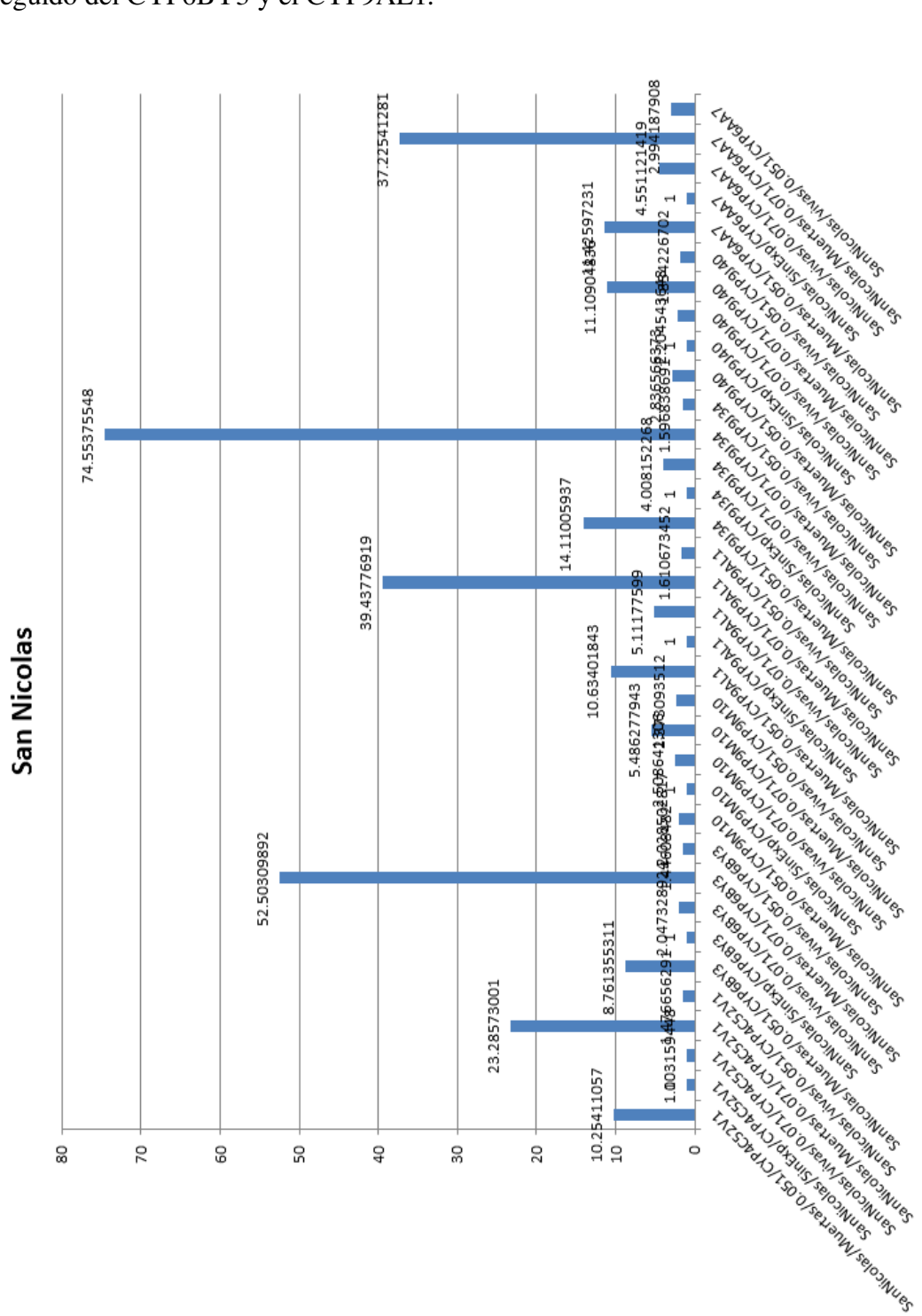
7.6.2 Guadalupe

En larvas de Guadalupe todos los citocromos se expresaron, siempre mayormente en larvas expuestas a la concentración de 0.71 mg de permetrina.



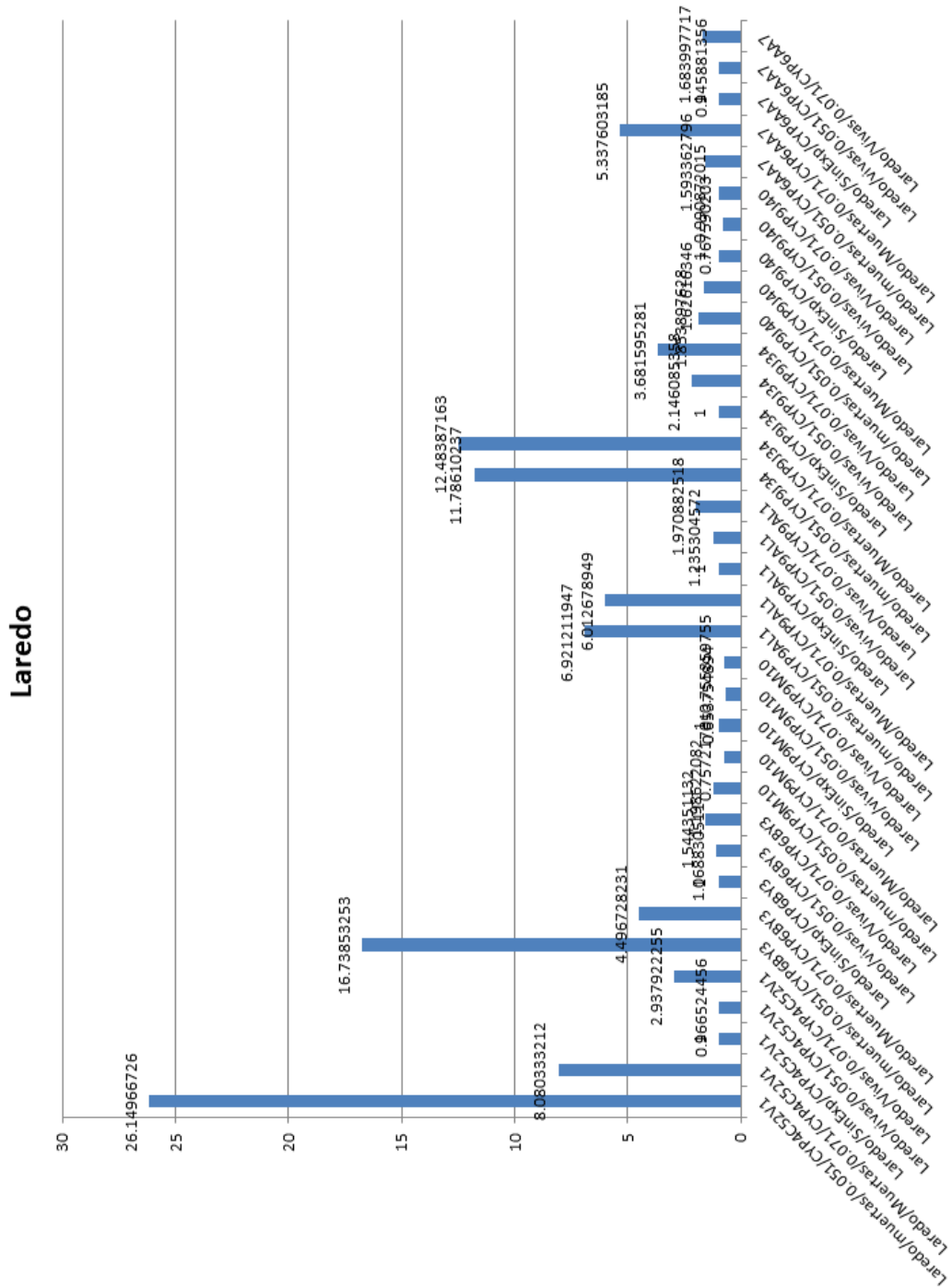
7.6.3 San Nicolás

En las larvas de San Nicolás el citocromo que más se expresó fue el CYP9J34, seguido del CYP6BY3 y el CYP9AL1.



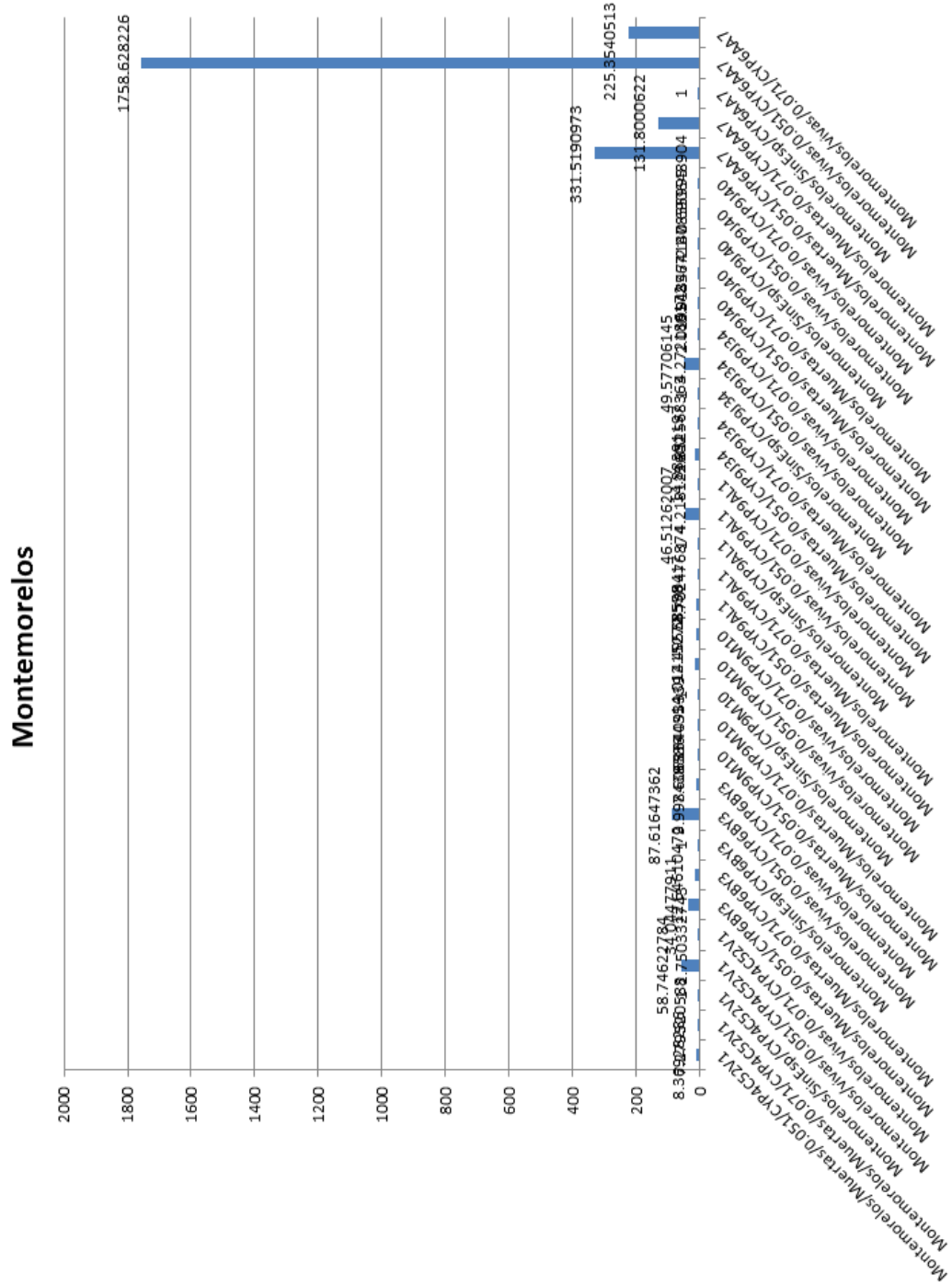
7.6.5 Laredo

En las larvas de Laredo el citocromo que se expreso más fue CYP52V1 seguido del CYP6BY3 y del CYP9J34. El resto de los transcritos se expresaron de manera muy similar.



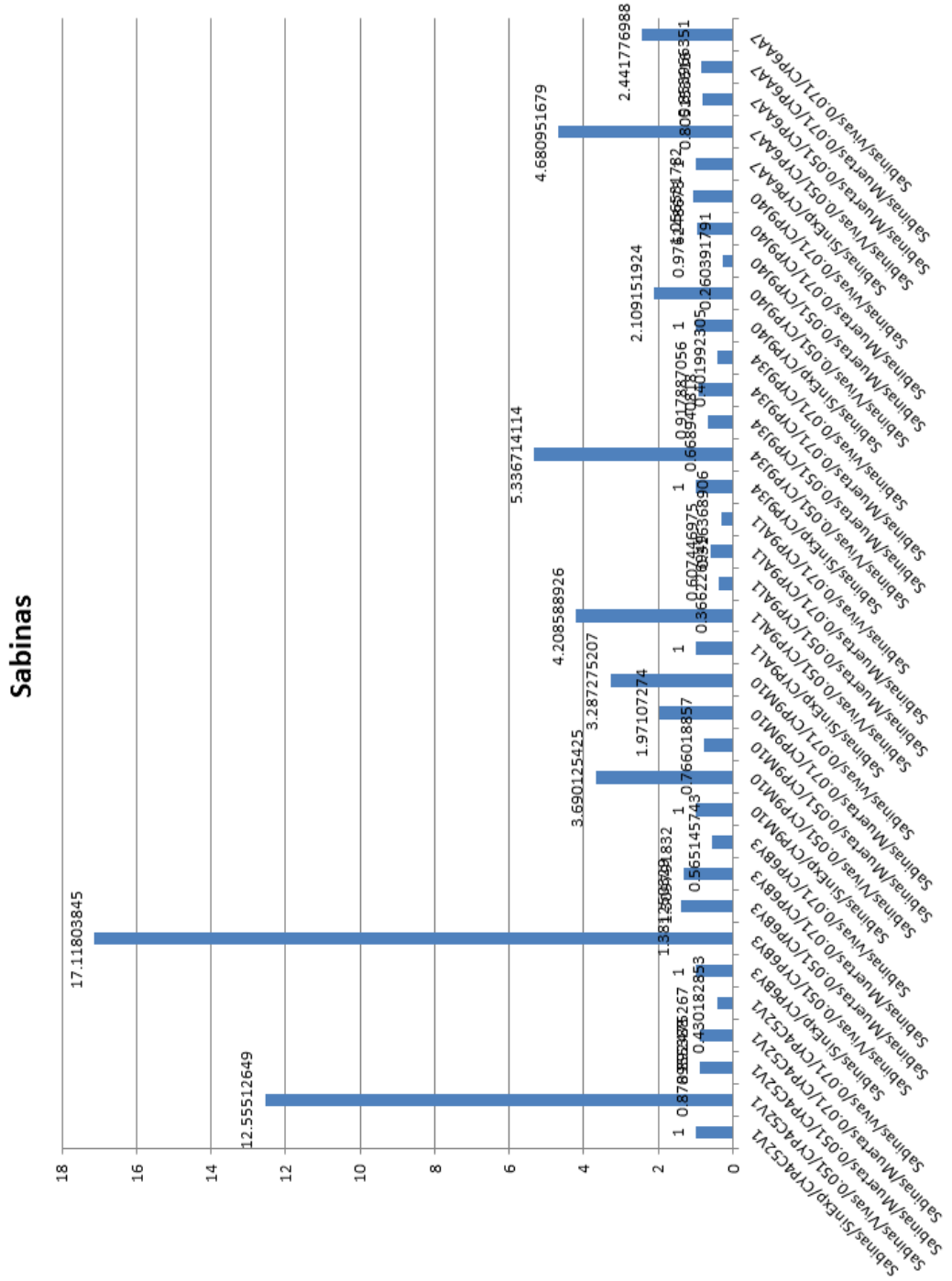
7.6.6 Montemorelos

El transcrito CYP6AA7 fue el más expresado en larvas de Montemorelos.



7.6.8 Sabinas

Los transcritos CYP6BY3 y CYP52V1 fueron los más expresados en muestras de Sabinas.



8 CONCLUSIONES

En esta tesis se dilucidó la secuencia nucleotídica y el perfil de expresión de transcritos que codifican para citocromos en larvas de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de localidades del noreste de México expuestas y sin exponer a permetrina. Su comparación reveló genes diferencialmente expresados entre larvas expuestas y sin exponer así como también entre localidades. El nivel de información que cada uno de los transcritos arroja sobre la fisiología de las larvas por localidad es distinto.

El insecto *Cx. quinquefasciatus* resultó ser un buen modelo experimental para ahondar en la génesis de la resistencia a insecticidas, al poder criarles en las mismas condiciones ambientales y recibiendo la misma dieta, lo que permite minimizar la mayor parte de la variación debida al medio ambiente y así enfocarse en la carga genética.

9 PERSPECTIVAS

El control biológico de insectos vectores mediante la utilización de insecticidas químicos promulga la resistencia a los mismos por distintos mecanismos fisiológicos, uno de ellos es el sistema citocromo P450 que reconoce estructuras químicas presentes en las moléculas insecticidas. Factores medioambientales como la contaminación contienen estructuras químicas similares a las presentes en los insecticidas, realizar un estudio de correlación entre componentes ambientales, el uso de insecticidas y el desarrollo de resistencia promovería nuevas estrategias de control basadas en otro tipo de moléculas y así evitar el impacto cruzado.

10 REFERENCIAS

- Arensburger, P., K. Megy, R. M. Waterhouse, J. Abrudan, P. Amedeo, B. Antelo, L. Bartholomay, S. Bidwell, E. Caler, F. Camara, C. L. Campbell, K. S. Campbell, C. Casola, M. T. Castro, I. Chandramouliswaran, S. B. Chapman, S. Christley, J. Costas, E. Eisenstadt, C. Feschotte, C. Fraser-Liggett, R. Guigo, B. Haas, M. Hammond, B. S. Hansson, J. Hemingway, S. R. Hill, C. Howarth, R. Ignell, R. C. Kennedy, C. D. Kodira, N. F. Lobo, C. Mao, G. Mayhew, K. Michel, A. Mori, N. Liu, H. Naveira, V. Nene, N. Nguyen, M. D. Pearson, E. J. Pritham, D. Puiu, Y. Qi, H. Ranson, J. M. Ribeiro, H. M. Roberston, D. W. Severson, M. Shumway, M. Stanke, R. L. Strausberg, C. Sun, G. Sutton, Z. J. Tu, J. M. Tubio, M. F. Unger, D. L. Vanlandingham, A. J. Vilella, O. White, J. R. White, C. S. Wondji, J. Wortman, E. M. Zdobnov, B. Birren, B. M. Christensen, F. H. Collins, A. Cornel, G. Dimopoulos, L. I. Hannick, S. Higgs, G. C. Lanzaro, D. Lawson, N. H. Lee, M. A. Muskavitch, A. S. Raikhel, and P. W. Atkinson. 2010. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. *Science* 330: 86-88.
- Astrup H, Daneshvar B, Dragsted LO, Gamborg M, Hansen M, Loft S, Okkels H, Nielsen F, Nielsen PS, Raffn E, Wallin H, Ehlert Knudsen L. 1999. Biomarkers for exposure to ambient air pollution--comparison of carcinogen-DNA adduct levels with other exposure markers and markers for oxidative stress. *Environ Health Perspect* 107:233-238.
- Barr AR. 1957. The distribution of *Culex p. pipiens* and *C. p. quinquefasciatus* in North America. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 6: 153-165.
- Bates M. 1949. *The Natural History of Mosquitoes*. Macmillian Company. New York, NY. 379 pp.
- Bauhs JA, Vrieze TJ, Primak AN, Bruesewitz MR, McCollough CH: CT dosimetry: comparison of measurement techniques and devices. 2008. *Radiographics*. 28(1):245-253.
- Bird A. 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447(7143):396-398.

Bruce KD, Cagampang FR. 2011. Epigenetic priming of the metabolic syndrome. *Toxicol Mech Methods* , 21(4):353-361.

CDC (February 2015). Preliminary Maps and data 2014. <http://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/preliminarymapsdata/index.html>

CDC (January 2015). Epidemiology and Geographic distribution. Eastern Equine Encephalitis. <http://www.cdc.gov/EasternEquineEncephalitis/tech/epi.html>

CDC (June 2013). Epidemiology and risk factors. Center for Disease Control. <http://www.cdc.gov/parasites/lymphaticfilariasis/epi.html> (14 June 2013).

CDC. (June 2007). CDC answers your questions about St. Louis encephalitis. Center for Disease Control. <http://www.cdc.gov/sle/technical/fact.html> (2 June 2009).

CDC. (October 2007). Saint Louis Encephalitis. Center for Disease Control. <http://www.cdc.gov/sle/> (2 June 2009).

CENAPRECE. Lista actualizada de insumos recomendados por el CENAPRECE para el combate de insectos vectores de enfermedades a partir de 2014. www.cenaprece.salud.gob.mx

Darsie Jr RF, Morris CD. 2000. Keys to the adult females and fourth-instar larvae of the mosquitoes of Florida (Diptera: Culicidae). *Technical Bulletin of the Florida Mosquito Control Association* 1: 148-155.

Darsie Jr RF, Ward RA. 2005. Identification and Geographical Distribution of the Mosquitoes of North America, North of Mexico. University of Florida Press. Gainesville, FL. 300 pp.

Day JF, Stark LM. 2000. Frequency of Saint Louis encephalitis virus in humans from Florida, USA: 1990-1999. *Journal of Medical Entomology* 37: 626-633.

Donato-Martin T. 2005. ¿Que es el citocromo y cómo funciona? http://www.uv.es/jcastell/citocromo_P450.pdf.

Ekstrom G, Ingelman-Sudberg M .1989. Rat liver microsomal NADH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependet on ethanol-inducible cytochrome P450. *Biochem Pharmacol* 38:1313-1319.

Elizondo-Azuela G. 2004. Use of gene knockout and transgenic mouse models to understanding cyp450 regulation and function applications on pharmacology and toxicology.

http://74.125.155.132/scholar?q=cache:OU1cW71vbX0J:scholar.google.com/&hl=es&as_sdt=2000.

Elizonondo-Quiroga A. 2002. Taxonomy and distribution of mosquitoes (Diptera:Culicidae) of Nuevo Leon estate, Mexico. M.Sc. dissertation. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. San Nicolás de los Garza, Nuevo León. 110 p.

EMBL-EBI [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>]

Foster WA, Walker ED. 2002. Mosquitoes (Culicidae), pp. 245-249. In Mullen G, Durden L. (editors). *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press. New York, NY.

Foster WA, Walker ED. 2002. Mosquitoes (Culicidae), pp. 245-249. In Mullen G, Durden L. (editors). *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press. New York, NY.

Galli E, Feijoo L .2002. Citocromo P450 y su importancia clínica *Revista de Neuro-Psiquiatría*, 65:187-202.

Gerberg EJ, Barnard DR, Ward RA. 1994. Manual for Mosquito Rearing and Experimental Techniques. *American Mosquito Control Association Bulletin No. 5*: 61-62. ITIS. 2009. *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. Integrated Taxonomic Information System. http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=126490 (2 June 2009).

Guengerich FP.1994. Catalytic selectivity of human cytochrome P450 enzymes: relevance to drug metabolism and toxicity. *Toxicol Lett* 70:133-138.

Gutierrez R .2004. Farmacogenética personalizada. *Revista Cubana de Farmacia* 38(3):1-5.

Hill S, Connelly R. 2013. Southern House Mosquito *Culex quinquefasciatus* Say. EENY-457. <http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures>.

Hong JP, GF, Gelboi HV, Yang CS. 1987. The induction of specific form of cytochrome P450 by fasting. *Biochem Biophys Res Commun* 142:1077-1083.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Huerta-Bustamante PA, Henríquez Huerta PA, Castillo Peñaloza RL, Carrasco Loza RA, Orellana M, Rodrigo Salinas MA. 2003. Estudio comparativo del consumo crónico de vino tinto sobre la expresión y la actividad del citocromo P450 en el hígado y riñón de rata. *Med UNAB* 6:4-9.3.

Kern WH. 2007. Some small native freshwater fish recommended for mosquito and midge control in ornamental ponds. EDIS. <http://edis.ifas.ufl.edu/IN456> (2June 2009).

Koop R. 2005. Combinatorial biomarkers: from early toxicology assays to patient population profiling. *Reviews DDT* 10: 781-788.

Lima CA, Almeida WR, Hurd H, Albuquerque CM. 2003. Reproductive aspects of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98: 217-222.

Morales-Olivas FJ. 2005. Interacciones farmacológicas de los fármacos antihipertensivos. *Med Clin Esp* 124:782-789.

Mosquito Information website. (2009). University of Florida, Florida Medical Entomology Laboratory. <http://mosquito.ifas.ufl.edu/Index.htm> (2 June 2009).

NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. DOF 16/04/2015.

O'Meara GF. 2003. Mosquito associated with stormwater detention/retention areas. EDIS. <http://edis.ifas.ufl.edu/mg338> (2 June 2009).

Orella M, Guajardo V. 2004. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista Médica de Chile* 132:85-94.
P450 by fasting. *Biochem Biophys Res Commun*, 142:1077-1083.
profiling. *Reviews DDT* 10: 781-788.

Ribeiro JMC., Charlab R., Pham VM., Garfield M., Valenzuela JG. 2004. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34:543-563.

Robison AJ, Nestler EJ. 2011. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* 12(11):623-637.

Rodríguez-Sánchez IP, Barrera-Saldaña HA: La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL* 1990, VII(3):323-335.

Santiago C, Bandres F, Gómez-Gallego F. 2002. Polimorfismo del citocromo P450: Papel como marcador biológico. *Medicina del Trabajo* 11:130-140.

Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl)*, 84(11):901-910.

Shroyer DA. 2004. Saint Louis encephalitis: a Florida problem. EDIS. <http://edis.ifas.ufl.edu/MG337> (2 June 2009).

Sirivanakarn and White. 1978. Mosquito Systematics vol. 10(4) 1978 461, *Culex* & *ulex*) *apiens* *pziens* Linnaeus and *Culex* (C&m), *apiens* *quinquefasciatus* Say in South Africa: Morphological and Reproductive Evidence in Favour of Their Status as Two

Sirivanakarn S, White GB. 1978. Neotype designation of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Proceedings of the Entomological Society of Washington 80: 360-372.

WHO (May 2010). Rift Valley fever. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/en/>.

Zand R, Nelson SD, Slattery JT, Thummel KE, Kalhorn TF, Adams SP, Wright JM. 1993. Inhibition and induction of cytochrome P4502E1-catalyzed oxidation by isoniazid in humans. Clin Pharmacol Ther 54:142-149.

A. Anexos

A.1 Artículos publicador relacionados con la tesis

ORIGINAL ARTICLE

First report of L1014F kdr mutation in *Culex quinquefasciatus* in Mexico

Gustavo Ponce¹, Iram P. Sanchez¹, Selene M. García¹, Jose M. Torrado¹, Saúl Lozano-Fuentes², Beatriz Lopez-Monroy¹ and Adriana E. Flores¹

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Universidad sin Cd. Universitaria San Nicolás de los Garza, N.L. 66455, Mexico and ²Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA

Abstract The L1014F mutation in the voltage-sodium channel gene has been associated with resistance to DDT and pyrethroids in various arthropod species including mosquitoes. We determined the frequency of the L1014F kdr mutation in 16 field populations of *Culex quinquefasciatus* from Northeastern Mexico collected between 2008 and 2013. The L1014F was present in all populations analyzed with the lowest frequency (3.33%) corresponding to the population from Monclova collected in 2012, and the highest frequency (63.63%) from the Monterrey population collected in 2012. The presence of a kdr mutation in populations of *Cx. quinquefasciatus* from northeastern Mexico provides evidence of pyrethroid resistance. This requires a special attention, considering that pyrethroid-based insecticides are commonly used in vector-control campaigns, especially against *Aedes aegypti* (L.).

Key words *Culex quinquefasciatus*; insecticide resistance; kdr; L1014F mutation

Introduction

Culex quinquefasciatus Say is a global species, with abundant populations that cause serious nuisance as well as health problems in humans and domestic animals (Shahjahan *et al.*, 2010). *Cx. quinquefasciatus* is a vector for West Nile virus (WNV), St. Louis encephalitis virus (SLEV), and other arboviruses. It is also the most important vector of *Wuchereria bancrofti*, the causative agent of lymphatic filariasis (Sardelis *et al.*, 2001; Arensburger *et al.*, 2010; Sarkar *et al.*, 2011) and *Plasmodium relictum*, an avian malaria parasite. Despite its public-health importance, the knowledge of *Cx. quinquefasciatus* responsiveness to this broad range of pathogens is limited (Bartholomay *et al.*, 2010).

Correspondence: Gustavo Ponce-García, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Universidad s/n Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. 66455 Mexico. Tel: +52 8183324714; email: gustavo.poncegc@uanl.edu.mx gponcealfa@gmail.com

Mexico has suitable climatic conditions and vertebrate species susceptible to WNV, but there is no surveillance program for the potential vectors of WNV, including *Cx. quinquefasciatus*.

Most vector control programs around the world face operational challenges caused by selection of insecticide resistance. The use of insecticides in Mexico is regulated by the Health Department through regulations which are revised and adapted over time. The NOM-032-SSA2–2014 (DOF, 2015) established the characteristics for insecticides used in disease-vector control programs. However, these standards do not specify particular agents to be used, stating instead that specific insecticides should be chosen based on proven effectiveness, resistance, and safety characteristics related to exposure. Pyrethroids currently registered in Mexico are deltamethrin, alpha-cypermethrin, d-phenothrin, bifenthrin, lambda-cyhalothrin and cyfluthrin. The permethrin, although not approved currently for vector control has been one of the most used pyrethroids in Mexico officially since 1999 up to 2010 (Flores *et al.*, 2013), but in some places its use was continued until 2014 (personal communication)

Molecular Cloning, Sequence Analysis, and Gene Expression of the Circadian Clock Gene *Period* in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae)

Rafael González-Alvarez¹, Olga Karina Villanueva-Segura², Gustavo Ponce-García², Margarita de la Luz Martínez-Fierro³, Iván Delgado-Enciso⁴, Adriana Elizabeth Flores-Suárez², Raquel Garza-Guajardo⁵, Michelle de Jesús Zamudio Osuna⁶, Hugo Alberto Barrera-Saldaña⁷, Oralia Barboza-Quintana⁵, Laura Elia Martínez-de-Villarreal⁶, Antonio Guzmán-Velasco⁸, and Irám Pablo Rodríguez-Sánchez^{6*}

Abstract. In prokaryotes and eukaryotes, the *Period* (*PER*) gene is important for the circadian clock that regulates some rhythmic biochemical, physiological, and behavioral processes. *PER* messenger amplification was done by RT-PCR from southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say, larvae collected at three locations in the State of Nuevo Leon, northeastern Mexico. The amplified products were cloned, sequenced, and compared/analyzed with those of other species of mosquitoes. A 3,093-bp amplified product was synthesized by PCR, which is the complete coding DNA sequence (3,027 bp) of *PER* encoding an open reading frame of 996 amino acid residues and much smaller than the orthologous in other mosquitoes analyzed. No other simultaneous amplification was visualized; thus, possible alternative splicings were discarded or at least not detected by the method. Because *PER* is a widely conserved gene in prokaryotes and eukaryotes and maintaining colonies of southern house mosquitoes is relatively easy, determining the sequence of the gene in the mosquito provides the possibility of using the gene as a model and generating data on the role in the circadian clock.

¹Universidad Autónoma de Guadalajara. Av. Patria 1201, Colonia Lomas del Valle, CP 45129, Zapopan, Jalisco, México.

²Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Entomología Médica, Av. Pedro de Alba, Ciudad Universitaria, CP 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

³Molecular Medicine Laboratory, Unidad Académica de Medicina Humana y Ciencias de la Salud, Carretera Zacatecas-Guadalajara Km.6. Ejido la Escondida, Zacatecas, México.

⁴Universidad de Colima, Facultad de Medicina. Av. Universidad 333, Colonia Las Víboras, CP 38040, Colima, Colima, México.

⁵Universidad Autónoma de Nuevo León, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", Departamento de Anatomía Patológica y Citopatología, Madero and Gonzalitos S/N, Col. Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, 64460, México.

⁶Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Departamento de Genética. Av. Madero y Gonzalitos s/n, Colonia Mitras Centro, CP 64460, Monterrey, Nuevo León, México.

⁷Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Monterrey, Nuevo León, México. Av. Madero y Gonzalitos s/n, Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León 64460, México.

⁸Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ecología, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66451, México.

*Corresponding author: iramrodriguez@gmail.com

Molecular Cloning and Characterization of the Circadian Clock *Timeless* Gene in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae)

Irám Pablo Rodríguez-Sánchez¹, Olga Karina Villanueva-Segura², Rafael González-Alvarez³, Adriana Elizabeth Flores-Suárez², María de Lourdes Garza-Rodríguez⁴, Iván Delgado-Enciso⁵, Laura Elia Martínez-de-Villarreal¹, Ricardo Canales del Castillo⁶, Susana Favela-Lara⁶, Raquel Garza-Guajardo⁷, Ángel Lugo-Trampe⁸, Karina del Carmen Trujillo-Murillo³, Oralia Barboza-Quintana⁷, José Ignacio González-Rojas⁵, Hugo Alberto Barrera-Saldaña⁴, and Gustavo Ponce-García^{2,9}

Abstract. In eukaryotes, the *timeless* (*TIM*) gene plays a fundamental role in the control of the circadian clock by regulating several biochemical, physiological, and behavioral processes. RT-PCR was used to amplify *TIM* mRNA from larval southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say, from three locations in the State of Nuevo Leon in northeastern Mexico. The 3062 bp *TIM* cDNA was assembled from three overlapping PCRs that were cloned and sequenced. DNA sequence analysis used amplified cDNA fragments to complete coding the DNA sequence (2991 bp). Tim ORF consisting of 996 codons was shorter than the orthologous genes from other mosquito species. A series of deletions in the core sequence of *TIM* were detected. No other amplification products were visualized, and thus, the possibility of alternative spliced mRNA species was discarded. Because *TIM* is a widely conserved gene in eukaryotes, and maintaining colonies of *Cx. quinquefasciatus* is easy, determining the sequence of the *TIM* gene in the mosquito provides the possibility of its use as a model for circadian clock experimentation.

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Genética, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", Monterrey, Nuevo León 64460, Mexico.

²Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Av. Universidad s/n Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. 66451 Mexico.

³Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, campus Guadalajara. Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Ingeniería, Arquitectura y Salud. Av. General Ramón Corona, # 2514, Zapopan, Jalisco 45201, Mexico.

⁴Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular. Av. Madero y Gonzalitos s/n, Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, C.P. 64460, Mexico.

⁵Universidad de Colima, Facultad de Medicina. Av. Universidad 333, Colonia Las Víboras, CP 38040, Colima, Colima, México.

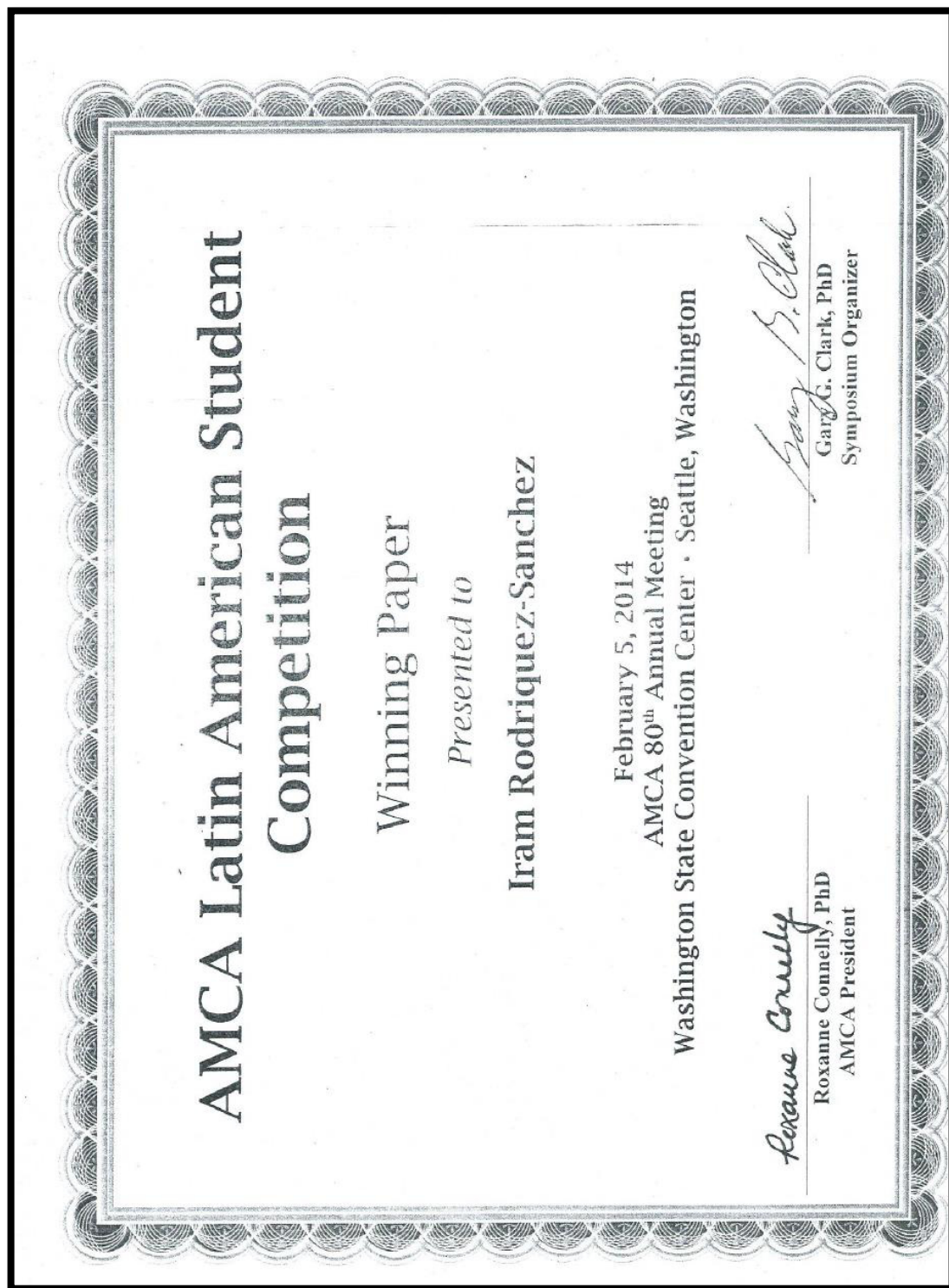
⁶Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ecología, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66451, México.

⁷Universidad Autónoma de Nuevo León, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", Departamento de Anatomía Patológica y Citopatología, Madero and Gonzalitos S/N, Col. Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, 64460, Mexico.

⁸Centro Mesoamericano de Estudios en Salud Pública y Desastres (CEMESAD), Universidad Autónoma de Chiapas. CP. 30798.

⁹Corresponding author: gponcealfa@gmail.com

A.2 Premios recibidos



A.3 Presentaciones en congresos relacionados con la tesis

AMCA
THE AMERICAN MOSQUITO CONTROL ASSOCIATION

THE AMERICAN MOSQUITO CONTROL ASSOCIATION
CERTIFIES THAT

**Molecular cloning and characterization of the circadian clock timeless gene in
Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae)**

AUTHORED BY

**Iram Rodriguez-Sanchez, Olga Villanueva-Segura, Rafael González-Alvarez,
Adriana Flores-Suarez, Laura Martínez-de-Villarreal, Hugo Barrera-Saldaña
and Gustavo Ponce-García**




WAS PRESENTED AT

**The 24th Latin American Symposium at the 80th AMCA Annual Meeting
February 2-6, 2014 • Seattle, Washington, USA**

Roxanne Connelly
Roxanne Connelly, PhD
AMCA President

Gary G. Clark
Gary G. Clark, PhD
Symposium Organizer

Ildefonso Fernández Salas
Ildefonso Fernández Salas, PhD
Directora Regional para
América Latina y el Caribe





Seventh International Symposium on Molecular Insect Science
13-16 July 2014
NH Grand Krasnapolsky, Amsterdam, The Netherland

Certificate of Attendance

We hereby confirm that

IRAM PABLO RODRIGUEZ-SANCHEZ

Attended the Seventh International Symposium on Molecular Insect
Science

13-16 July 2014, NH Grand Krasnapolsky, Amsterdam, The Netherlands

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Laura Copeland".

Laura Copeland, on behalf of Elsevier Ltd

A.4 Estancias académicas realizadas relacionadas con la tesis



Knowledge to Go Places

College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences
Department of Microbiology, Immunology and Pathology
1690 Campus Delivery
Fort Collins, Colorado 80523-1690
(970) 491-8530
FAX: (970) 491-1815
www.cvmb.colostate.edu/mip/

July 25, 2014

To Whom It May Concern:

This letter is to confirm that Mr. Iram Rodriguez Sanchez received four weeks of training at Colorado State University, from May 31st to June 28th, 2014. This training was funded by the Fogarty International Training Grant "Training in Dengue Prevention and Control". Mr. Sanchez designed gene silencing systems to interfere with *Aedes aegypti* mosquito development and insecticide resistance. Specifically, he studied three systems, including the sodium channel gene, esterase CCE3a and a juvenile hormone precursor. Mr. Sanchez performed techniques such as reverse transcription, double-stranded RNA production, larval bioassays and intrathoracic injections.

It was very pleasant to work with Iram and we hope this training will be helpful for future insecticide resistance research in *Ae. aegypti*. We expect to keep our collaboration with him in México.

Best of luck,

A handwritten signature in black ink that reads "William C. Black IV".

William C. Black IV
Professor - Medical Entomology
Colorado State University
Fort Collins, CO 80523
Phone: (970) 491-1081
e-mail: wcb4@lamar.colostate.edu

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Irám Pablo Rodríguez Sánchez

Candidato para el grado de
Maestro en Ciencias con Acentuación en Entomología Médica

Tesis: Niveles de expresión de citocromos P450 (CYP6AA7, CYP4C52v1, CYP6BY3, CYP9J34, CYP9M10, CYP9J40 y CYP9AL1) determinados por RT-qPCR en larvas de *Culex quinquefasciatus* expuestas a diversos insecticidas

Campo de estudio: Ciencias de la Vida.

Datos personales: Nacido en Monterrey; Nuevo León el 30 de enero de 1980, hijo de Armando Rodríguez Mercado y Silvia Ruth Sánchez Sanmiguel.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo e 2012.

Experiencia Profesional: Profesor Investigador del Departamento de Genética de la Facultad De Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2013.

