



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

**“MAPEO DE REGIONES REGULADORAS EN LA
REGIÓN 5' DEL GEN DE LA
PROFENOLOXIDASA 6 DE *Anopheles gambiae*
EN LA LÍNEA CELULAR TIPO HEMOCITO 4a3B”**

TESIS

**QUE QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD CON
ÁREA DE CONCENTRACION EN
ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

PRESENTA:

BIOL. TAYDE SEPORI SALGADO HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS:

VERÓNICA VALVERDE GARDUÑO, D. Phil: (oxon.)

CUERNAVACA, MORELOS, ABRIL 2013

Agradecimientos:

Agradezco a Mario y Bastiani por brindarme todo su apoyo y amor incondicional que fue mi motor durante la maestría. Gracias a mis papás, Tayde Hernández y Gilberto Salgado por darme las herramientas y el amor para superar todos los retos que me pone la vida y ser constante en todo lo que hago. Esta tesis tiene parte de cada uno de ustedes.

Agradezco a la Dra. Verónica Valverde Garduño por brindarme siempre su apoyo y sus enseñanzas en el tiempo que estuve en su grupo de investigación realizando este trabajo, las cuales tuvieron un gran impacto para mi formación.

Al Dr. José Ramos Castañeda y al Dr. Jesús Martínez Barnetche por las aportaciones que dieron a este trabajo, así como el apoyo que me brindaron durante el transcurso de mi maestría.

A mis sinodales, las doctoras Lourdes Millán Pérez Peña y Viviana Valadez Graham, y los doctores Fidel de la Cruz Hernández Hernández y Oscar Peralta Zaragoza por las aportaciones enriquecedoras que realizaron a mi trabajo.

A mis compañeras de laboratorio, la Biol. Zita Becerra, la Mtra. Alejandra Cabrera y la Dra. Sandra Rosas por todo el apoyo que me brindaron y por hacer divertido y agradable el tiempo que estuve en el laboratorio.

También agradezco a los laboratorios 1 y 4 planta baja, 3, 4 y 5 planta alta, por el préstamo de reactivos y equipos , así como la ayuda brindada.

A mis compañeras Elizabeth, Gloria, Graciela, Yvette, Yvonne, Flor y Violeta, y a mis compañeros Andreu, Abraham, Oswaldo y Jonathan, los cuales hicieron mas amenas y divertidas las clases, los trabajos y los exámenes durante toda la maestría.

INDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 <i>MALARIA</i>	2
1.1.1 Historia.....	2
1.1.2 Epidemiología.....	3
1.2 <i>VECTOR</i>	8
1.2.1 Anofelinos.....	8
1.2.2 Sistema inmune del mosquito durante infección por patógenos.....	8
1.2.3 Melanización por profenoloxidasas y su participación en el sistema inmune del mosquito.....	12
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1 <i>Perfil de expresión de las profenoloxidasas de Anopheles gambiae</i>	14
<i>Gen</i>	14
2.2 <i>Regulación transcripcional de profenoloxidasas en An. gambiae</i>	15
1.3 <i>Función de la profenoloxidasa 6 en hemolinfa</i>	16
2.3 <i>Estructura y organización del gen de la PPO6</i>	167
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVO GENERAL.....	19
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
7. METODOLOGÍA.....	19
7.1 <i>Obtención de secuencias del genoma de Anopheles gambiae</i>	19
7.2 <i>Diseño de oligonucleótidos por métodos bioinformáticos</i>	19
7.2.1 Confirmación del tamaño, funcionalidad y especificidad de los oligonucleótidos...20	
7.2.2 Especificidad de los oligonucleótidos por qPCR.....	21
7.3 <i>Cultivo celular</i>	22
7.4 <i>Estimulación con 20 hidroxiecdisona</i>	22
7.5 <i>Extracción de RNA de células 4a3B estimuladas</i>	22
7.5.1 Síntesis del cDNA de células 4a3B estimuladas.....	23
7.5.2 Diseño de oligonucleótidos para cDNA de la profenoloxidasa 6.....	23
7.6 <i>Aislamiento de regiones reguladoras asistida por formaldehído “FAIRE”</i>	24
7.7 <i>Ensayos de digestión limitada con DNasa I</i>	26
7.8 <i>Extracción Fenol/Cloroformo del ADN</i>	27
7.9 <i>Precipitación de ADN</i>	27
7.10 <i>PCR en tiempo real (qPCR) para detección enriquecimiento por FAIRE y de sitios hipersensibles por DNasa I</i>	28
8. RESULTADOS.....	29
8.1 <i>Diseño de oligonucleótidos</i>	29
8.1.1 Tamaño, funcionalidad y especificidad de los oligonucleótidos.....	31
8.2 <i>FAIRE</i>	33
8.2.1 <i>FAIRE de controles (región promotora y codificante del gen Def1)</i>	33

8.2.2 FAIRE de región 5' y parte del exón 1 del gen de la PPO6.....	34
8.3 Cuantificación del mensajero de la PPO6 de células estimuladas con 20 hidroxiecdisona.	36
8.4 FAIRE de células estimuladas con 20 hidroxiecdisona.	37
8.5 Ensayos de digestión limitada con DNasa I en células 4a3B.	40
8.6 Alineamiento de secuencias de elementos de respuesta tipo ISRE en el gen de la PPO1 y tipo EcRE en el gen Fbp1 de <i>Drosophila melanogaster</i> con la secuencia del gen de la PPO6.	42
9. DISCUSIÓN.....	44
10. CONCLUSIONES	50
11. PERSPECTIVAS.....	51
12. ANEXOS.....	52
12.1 Anexo 1.....	52
12.2 Anexo 2.....	55
12.3 Anexo 3.....	59
12.4 Anexo 4.....	61
12.5 Anexo 5.....	61
13. GLOSARIO	63
14. BIBLIOGRAFÍA.....	64

RESUMEN

La malaria es una infección causada por parásitos del género *Plasmodium*, que se transmite de manera natural por la picadura del mosquito *Anopheles*, siendo la especie *A. gambiae* el mayor vector de la transmisión de esta enfermedad. La transmisión del parásito requiere de dos ciclos el asexual (esquizogónico) en los humanos y el sexual (esporogónico) en los mosquitos. Un factor importante para que el ciclo (asexual y sexual) del parásito se lleve a cabo y se pueda transmitir de un hospedero a otro (humano-mosquito), es la respuesta inmune innata del mosquito, la cual consta de diversos componentes. El primero son las barreras físicas como la membrana peritrófica del intestino medio, la cutícula del exoesqueleto y el revestimiento del sistema respiratorio. El segundo es el sistema inmune interno en el cual participan los hemocitos, los cuales se encuentran en la hemolinfa y el cuerpo graso. Ejemplos de esta respuesta son la fagocitosis, la secreción de péptidos antimicrobianos, formación de nódulos, aglutinación, encapsulación y melanización. Igualmente existen diversas moléculas dentro de este sistema, una de estas son las profenoloxidasas (PPO), denominadas así cuando se encuentran inactivas y fenoloxidasas (PO) cuando se encuentran activas. Éstas son enzimas que sirven para múltiples propósitos en el mosquito, incluyendo la pigmentación de la cutícula y la esclerotización, pero la función más importante de estas enzimas es la de la melanización de patógenos. En *A. gambiae* existen 9 genes que codifican para 9 PPOs (PPO1-9), las cuales se expresan naturalmente en diferentes estadios del desarrollo del mosquito y durante ciertos procesos como la alimentación o la producción de ciertas hormonas. El gen de la PPO6 es expresado mayormente en mosquitos adultos y las regiones reguladoras de éste son desconocidas aún. En este trabajo se identificó una región libre de nucleosomas en el gen de la PPO6, abarcada por el amplicón PPO6 AE1 y parte de la región abarcada por el amplicón PPO6 5'A1 mediante la caracterización de la estructura de la cromatina en la región de su extremo 5'. Esta región libre de nucleosomas podría ser una región reguladora de este gen, como su promotor. El conocimiento de estas secuencias reguladoras permitirá comprender los mecanismos moleculares que controlan la expresión de este gen.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MALARIA

1.1.1 Historia.

La malaria es una de las infecciones parasitarias más importantes en el mundo, causada por protozoarios parásitos del género *Plasmodium*, que se transmite a los humanos por la picadura de los mosquitos hembras infectados del género *Anopheles* (Rodríguez *et al.*, 2008, Marangi *et al.*, 2009, Secretaría de Salud, 2007, Beier, 1998 y Escalante *et al.*, 1998), siendo la especie *A. gambiae* el mayor vector de la transmisión de esta enfermedad (Osta *et al.*, 2004). Esta enfermedad es encontrada en regiones tropicales de África, Asia y América del Sur, al igual que en Europa; donde han incrementado los casos en los últimos años (Marangi *et al.*, 2009). En la actualidad se considera que la malaria surgió de ancestros primates, en África (Escalante *et al.*, 1998), la cual ha evolucionado junto con los humanos. La fiebre característica de esta enfermedad se ha registrado en todas las sociedades civilizadas de China en el 2700 a.C. Las primeras descripciones detalladas fueron las de Hipócrates en el siglo V a.C., quien reconoció el paludismo y detalló los síntomas en sus escritos. El nombre “*malaria*” proviene de las palabras italianas *mal*, que significa "mal" y *aria*, que significa "aire", ya que los romanos creían que esta enfermedad se daba por malos aires. A partir de entonces existe un número mayor de referencias de esta enfermedad en Grecia e Italia; su aparición en el Imperio Romano se convirtió en algo común al igual que en otros lugares de Europa y el Mundo. La comprensión científica de la malaria al igual que los esfuerzos para controlarla y eliminarla a gran escala comenzaron hasta finales del siglo XIX (Cox, 2002), con el descubrimiento del parásito *Plasmodium* y su transmisión por el mosquito *Anopheles*. Durante la primera mitad del siglo XX, cuando 178 países tenían malaria endémica, se avanzó poco, en parte porque los esfuerzos se vieron interrumpidos por las dos guerras mundiales. Entre 1945 y 2010, 79 países eliminaron la malaria. A pesar del crecimiento exponencial de la población en las zonas endémicas de malaria durante los últimos 60 años, se estima que 50% de la población mundial vive en zonas libres de paludismo, en comparación con 1950 donde sólo era el 30%. Este éxito notable fue impulsado por el Programa Mundial de Erradicación de la Malaria,

lanzado por la OMS en todas partes del mundo en 1955. El programa se basó en el control de vectores, rociado residual principalmente en interiores y la detección sistemática y el tratamiento de los casos. Sin embargo, debido a problemas administrativos, financieros y técnicos, este programa fue abandonado en 1969 (Feachem *et. al.*, 2010).

1.1.2 Epidemiología.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor 104 países se encuentran en la fase de control de esta enfermedad, 10 están en la fase de eliminación. Se detectó un descenso superior al 50% de número de casos confirmados de esta enfermedad entre 2000 y 2009 en 32 de los 56 países con paludismo endémico no africanos, y en otros ocho países se observaron reducciones de entre el 25% y el 50%. Se estima que el número de casos de paludismo aumentó desde 233 millones en 2000 a 244 millones en 2005, pero descendió a 225 millones en 2009 y en el 2010 a 219 millones. El número de muertes debidas al paludismo disminuyó desde 985,000 en 2000 a 660,000 en 2010. Se han observado descensos en la carga del paludismo en todas las Regiones de la OMS; las mayores reducciones proporcionales se han registrado en la Región de Europa, seguida por la de las Américas. Los mayores descensos de muertes en términos absolutos se han computado en África (OMS, 2012). Las especies que causan esta enfermedad son *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum* y *P. vivax*, siendo estas últimas dos las de mayor distribución en el mundo y *P. falciparum* el causante de la malaria más severa, ocasionando más de un millón de muertes al año (Müller, *et. al.*, 1999, Rodríguez *et al.*, 2008 y Marangi *et al.*, 2009). La prevalencia de la malaria causada por *P. falciparum* en estos países está cayendo a un ritmo más rápido que la prevalencia de la malaria por *P. vivax*, y, por tanto, la proporción de malaria por *P. vivax* es cada vez mayor, esto podría deberse a que el programa global de eliminación de la malaria está mayormente enfocado a la eliminación de *P. falciparum* debido a que hay una mayor tasa de mortalidad asociada a esta especie, aunque la malaria por *P. vivax* es más difícil de prevenir, diagnosticar y tratar (Carlton *et. al.*, 2011). La mayoría de los países que han logrado la eliminación (aplicación de medidas poblacionales para que deje de haber casos, aunque persistan los factores que potencialmente pueden producirla) y el

mantenimiento de su estatus libre de malaria de la OMS con certificación, como Italia o USA., tienen brotes ocasionales (Feachem *et. al.*, 2010).

En América, en el 2011 el número de casos reportados fue inferior a 490 mil y el número de muertes fue de 113 (OMS, 2012). Esta mortalidad es más frecuente en niños menores de cinco años de edad, en embarazadas y en personas con enfermedades inmunosupresoras como el VIH/ SIDA y la tuberculosis (Rodríguez *et al.*, 2008 y Secretaría de Salud, 2001). Argentina, El Salvador, México y Paraguay se encuentran en la fase de pre-eliminación. Los otros 15 países endémicos se encuentran en la fase de control (OMS, 2012). En México, en los años 1999 al 2001, el paludismo tuvo un incremento constante con más de 1 200 000 casos anuales. La tasa continental de morbilidad se mantenía por encima de 5 casos por 100 mil habitantes en los años de 1959 a 1999, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). El número de casos en México hasta el 30 de septiembre del 2012 fue de 529, donde el principal agente etiológico es *P. vivax* con un 99% de los casos, y algunos casos de *P. falciparum* en estados de la frontera sur. Estos casos se localizan en Chiapas con 229, Chihuahua con 91, Durango con 79, Jalisco con 4, Nayarit con 52, Oaxaca con 2, Quintana Roo con 9, Sinaloa con 59, Sonora con 1 y Tabasco con 3 (CENAPRECE, 2012).

La presente alarma de prevalencia de la malaria es atribuida principalmente, a la ausencia de una vacuna proactiva y a la rápida resistencia que generan los parásitos a las drogas, y los mosquitos a los insecticidas (Carlton *et. al.*, 2011 y OMS, 2012).

1.1.3 Transmisión

La transmisión del paludismo se lleva a cabo en ambientes donde las condiciones climáticas favorecen el desarrollo y supervivencia de los mosquitos anofelinos (Rodríguez. *et. al.*, 2008). Los parásitos causantes de la malaria son esporozoarios del orden Eucoccidia, familia Plasmodiidae, género *Plasmodium*, el cual incluye más de 100 especies de las cuales 22 infectan a monos y 82 son agentes patógenos para reptiles y aves. Cuatro especies parasitan al hombre: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale* (Wellems *et. al.*, 2009). Además, las especies de *Plasmodium* presentan una

fuerte especificidad a determinadas especies (Garnham, 1966), generándose ocasionalmente saltos entre especies hospederas (Wellems *et. al.*, 2009). El ciclo de vida de este parásito incluye dos hospederos, las hembras de los mosquitos del género *Anopheles*, en las cuales estos parásitos efectúan el ciclo esporogónico o sexuado, siendo los hospederos definitivos. Y el hombre, donde efectúan el ciclo esquizogónico o asexual y que es el hospedero intermediario (Fig. 1) (Llop *et. al.*, 2001, OMS, 2010 y Wellems, 2009). El ciclo sexual o esporogónico comienza cuando una hembra de mosquito *Anopheles* pica a una persona con malaria y, junto con la sangre, succiona gametocitos indiferenciados (formas sexuales) del parásito de una persona infectada (Fig. 1a). En el tracto digestivo del mosquito, los gametos se diferencian en masculino (microgameto) y femenino (macrogameto) (Fig. 1b), y ocurre la fecundación formando un cigoto (Fig. 1c). A partir de los cigotos se desarrollan estructuras multinucleadas llamadas oocinetos los cuales son móviles (Fig. 1d), e invaden y traspasan el epitelio del intestino medio del mosquito para pasar al lado basal donde se desarrollan los ooquistes (Fig. 1e). En los ooquistes en pocos días se desarrollan miles de esporozoitos, los cuales son células fusiformes muy pequeñas. Éstos migran luego a las glándulas salivales del mosquito (Fig. 1f), donde permanecen hasta ser inyectados con la saliva, cuando la hembra mosquito se alimenta de nuevo con sangre (Fig. 1g). La transmisión del parásito *Plasmodium* al mosquito *Anopheles* está ligada a la hematofagia, la cual es esencial para la producción de huevos. El ciclo sexual o esquizogónico comienza cuando los esporozoitos entran a las células hepáticas (Fig. 1h), donde sufren divisiones múltiples. Los parásitos hepáticos se dividen y diferencian en merozoitos los cuales entran a los glóbulos rojos o eritrocitos (Fig. 1i), donde nuevamente se dividen en forma repetida (esquizontes) (Fig. 1j), y rompen los glóbulos rojos, a intervalos regulares de aproximadamente 48 horas y liberan un nuevo grupo de parásitos (Fig. 1k); estos eventos provocan episodios febriles recurrentes que son característicos de esta enfermedad. Después de un período de reproducción asexual, una población de los parásitos dentro de los eritrocitos se transforman en gametocitos indiferenciados (Fig. 1m) y, si son ingeridos por un mosquito en este estadio, el ciclo comienza nuevamente (Rodríguez *et. al.*, 2008, Cox, 2002, Llop *et. al.*, 2001, Dong *et. al.*, 2010 y Wellems *et. al.*, 2009).

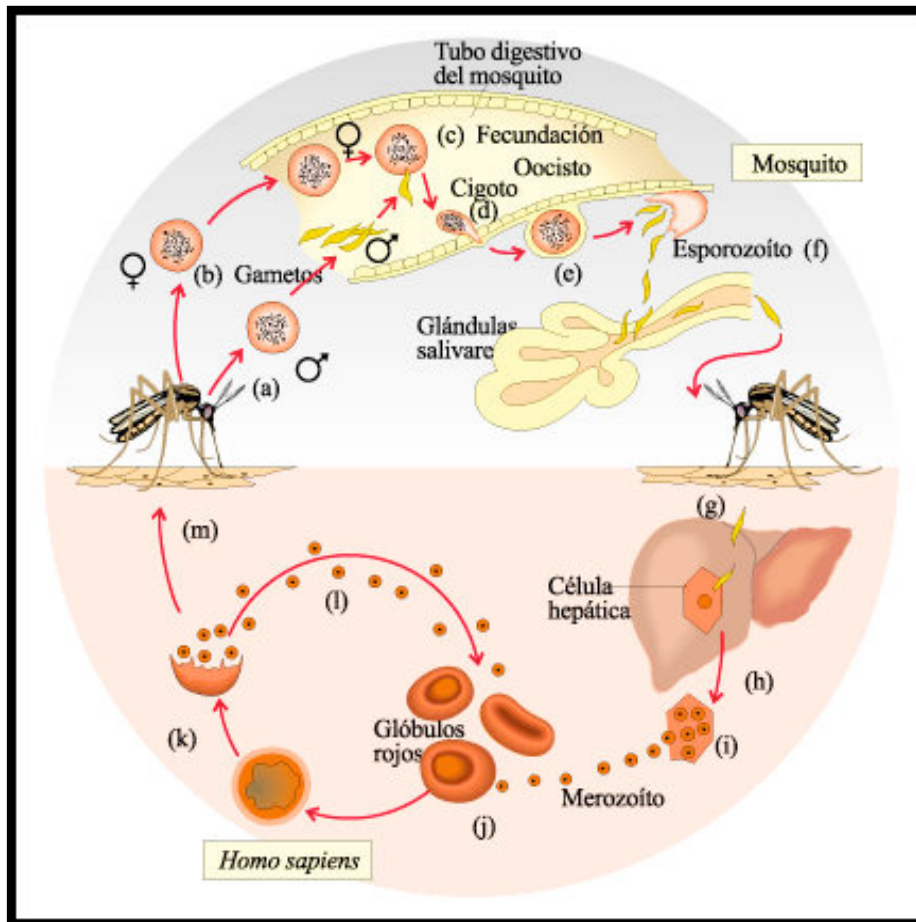


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium*

(Modificado de <http://www.OMS.int/tdr/diseases/paludismo/lifecycle.htm>)

Muchos factores determinan el resultado de las manifestaciones que mostrará el hospedero, estos factores incluyen la tasa de inoculación de los mosquitos, la dosis de esporozoitos, la inmunidad adquirida a la anterior exposición del parásito, la virulencia de éste, los polimorfismos genéticos del hospedero, la nutrición y las condiciones de vivienda del hospedero (Llop *et. al.*, 2001 y Wellem *et. al.*, 2009). Los síntomas del paludismo se desencadenan como resultado de la rotura de los glóbulos rojos saturados de parásitos. El cuadro clínico característico es básicamente malestar general, dolor muscular, escalofrío, fiebre, sudoración, asociados a anemia, leucopenia y posteriormente esplenomegalia. La enfermedad tiende hacia la cronicidad, estado que se caracteriza por periodos de latencia.

Esta enfermedad suele tener una fase aguda, la cual inicia con una serie de ataques febriles, precedidos por escalofríos. La persona que se encuentra en la

fase aguda, con frecuencia tiene sensación de calor intenso, esto coincide con el inicio del aumento de la temperatura (40°C como máximo) (Rodríguez *et. al.*, 2008 y Llop *et. al.*, 2001). Una de las complicaciones de la malaria es la malaria severa, la cual implica una infección por *P. falciparum* con manifestaciones clínicas y complicaciones que son potencialmente fatales. La edad y el estado inmunológico afectan significativamente el pronóstico de la enfermedad. Una o más de las siguientes manifestaciones clínicas pueden ocurrir en la malaria severa: 1) hiperparasitemia (15% de los eritrocitos parasitados o más de 100 000 parásitos/mm³), 2) malaria cerebral, 3) anemia severa (hemoglobina por debajo de 7.1 g/dL), 4) malaria con ictericia, 5) desequilibrio electrolítico, 6) fallo renal, 7) hipertermia, 8) colapso, 9) paro respiratorio, 10) alteración de la coagulación, 11) infección asociada, 12) edema pulmonar, 13) hipoglucemia y 14) hemoglobinuria (Llop *et. al.*, 2001).

Una de las complicaciones más frecuentes de la malaria severa es la malaria cerebral. Esta enfermedad llega a ser fatal hasta un 80% de los casos, especialmente en los niños (Fumadó *et. al.*, 2000). Las manifestaciones cerebrales de la malaria son causadas, tanto por el daño directo de *Plasmodium*, como por la propia respuesta fisiopatológica que desata el organismo ante una infección grave. Algunos síntomas constituyen una consecuencia de la multiplicación del parásito y del daño en los capilares viscerales así como la lisis y aglutinación de hematíes que liberan una sustancia fosfolipídica la cual interviene en el proceso de coagulación intravascular diseminado y formación de microtrombos. Dentro de los síntomas de la malaria cerebral, se puede presentar cefalea intensa, cambios en la conducta y más tarde manifestaciones neurológicas diversas, posteriormente el enfermo entra en coma, la cual puede llegar a ser irreversible y causar la muerte (Llop *et. al.*, 2001 y Padrón *et. al.*, 2001).

La malaria en los niños suele ser más grave que en los adultos y la evolución de la enfermedad es más rápida. Este veloz deterioro se puede relacionar con el aumento de la densidad del parásito, que a su vez se relaciona con el menor número de hematíes y la inmadurez inmunológica de los niños. La enfermedad en los niños es muy polimorfa y diferente del adulto, a lo que hay que sumar que los niños presentan con mayor frecuencia síndromes febriles que pueden confundir el

diagnóstico. Los picos febriles en los niños se acompañan frecuentemente de vómitos e hipoglucemia (Wellems *et. al.*, 2009 y Fumadó *et. al.*, 2000).

1.2 VECTOR

1.2.1 Anofelinos

El género *Anopheles* es el vector que participa en los ciclos de transmisión de la malaria humana a nivel mundial (Robert *et. al.*, 2011). En todo el mundo existen alrededor de 400 especies, de las cuales 85 son las consideradas como transmisores de los agentes infecciosos causantes de esta enfermedad (Rodríguez *et. al.*, 2008). Estos mosquitos pertenecen al orden *Diptera*, suborden *Nematóccera*, familia *Culicidae*, subfamilia *Anophelinae*, tribu *Anophelini* y género *Anopheles* (Rodríguez *et. al.*, 2008 y Systematic Catalog of Culicidae, 2001).

Los anofelinos tienen 4 etapas de desarrollo en su ciclo de vida, estas etapas son: a) huevo, b) mudas, c) pupa y d) adulto. Las etapas de huevo, larva y pupa se desarrollan en sistemas acuáticos, los cuales pueden ser variados, mientras que la etapa adulta vive en un ambiente terrestre (Rodríguez *et. al.*, 2008).

Anopheles gambiae es el vector principal en África subsahariana (Harris *et. al.*, 2009, Osta *et. al.*, 2004, Waterhouse *et. al.*, 2007). Un importante tema de estudio en la malaria es la defensa del sistema inmune del mosquito, la cual está implicada en respuesta a la invasión por el parásito *Plasmodium* y por lo tanto en el éxito o fracaso de la transmisión de la malaria (Dimopoulos *et. al.*, 2002). La resistencia de los mosquitos a la infección por la malaria es altamente variable en las poblaciones, y se sabe que está estrictamente regulada genéticamente (Harris *et. al.*, 2010).

1.2.2 Sistema inmune del mosquito durante infección por patógenos.

Durante la evolución, los mosquitos y otros insectos han adoptado la hematofagia para sostener una producción abundante de su progenie. Sin embargo al alimentarse de sangre, pueden adquirir agentes patógenos. Estos patógenos se enfrentan en el hospedero a las reacciones de la inmunidad innata, la cual reconoce y responde a numerosos agentes invasores (Waterhouse *et. al.*, 2007).

Los mosquitos, utilizan la inmunidad innata para su defensa, la cual puede variar entre las especies/cepas de insecto, lo que determina que las especies/cepas de *Plasmodium*, que también presentan diferencias entre sí, sean específicas de especies y cepas de mosquitos. Las reacciones del sistema inmune innato, inician cuando las moléculas de algún agente patógeno son detectadas por el sistema del insecto y son reconocidas como no propias por moléculas que median la interacción con los diferentes estadios del parásito (Gonzales-Cerón *et. al.*, 2010). Este proceso implica a los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs), que reconocen y se unen a los llamados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) (Osta *et. al.*, 2004 y Harris *et. al.*, 2010), los cuales se encuentran presentes en varios microorganismos, pero se encuentran ausentes en células eucarióticas (Osta *et. al.*, 2004). Varios PRRs han sido identificados, entre ellos se encuentran las Proteínas de Reconocimiento de Peptidoglicano (PGRPs) y las Proteínas de Unión a Gram-negativos (GNBPs), los cuales son una familia de receptores de reconocimiento que activan las vías de señalización de Toll e inmunodeficiencia (IMD), generando la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs) (Osta *et. al.*, 2004 y Waterhouse *et. al.*, 2007). Se han identificado siete PGRPs en *Anopheles*, donde PGRPLB es regulada transcripcionalmente durante la infección por *Plasmodium* en mosquitos adultos, y esta expresión se mantiene elevada durante todo el ciclo de vida del parásito (Waterhouse *et. al.*, 2007 y Dimopoulos *et. al.*, 2002).

El reconocimiento de moléculas no propias usualmente activa la cascada proteolítica de las serina proteasas, la cual amplifica la señal y desencadena respuestas río abajo generando la muerte del agente patógeno. Un componente clave de esta cascada son los dominios clip de las serina proteasas (CLIPs) los cuales están implicados en diversos mecanismos de defensa como la activación de vías de señalización (Toll e IMD) para la producción de AMPs, aglutinación y melanización (Osta *et. al.*, 2004). Se han encontrado dos CLIPs en *A. gambiae*, CLIPB14 y CLIPB15, los cuales son sensibles a infecciones bacterianas y de *Plasmodium*. En los mosquitos se muestra una persistente aumento en la expresión de CLIPB14 en infecciones por *Plasmodium*, al igual que CLIPB15 durante la invasión al intestino medio (Osta *et. al.*, 2004). La vía de señalización de las serina proteasas se encuentra regulada por inhibidores de las serina proteasas,

llamadas serpinas (SNRPs). Estos inhibidores se unen covalentemente al centro activo de la enzima y actúan como sustratos suicidas (Silverman *et. al.*, 2001). En *Anopheles* se han identificado 18 genes que codifican para serpinas, donde tres de éstas son isoformas de SRPN4 (Suwanchaichinda y Kanost 2009). La serpina SRPN10 codifica cuatro isoformas, de las cuales sólo dos de éstas aumenta su producción específicamente por hembras de mosquitos en respuesta a la invasión del intestino medio por los oocinetos de *P. berghei* (Osta *et. al.*, 2004, Waterhouse *et. al.*, 2007 y Suwanchaichinda y Kanost 2009). El gen de SNRP6, es expresado por las células del epitelio del intestino medio y al igual que SNRP10, aumenta su expresión en respuesta a una infección por malaria (Shiao *et. al.*, 2006). SRPN2 es expresada a lo largo del ciclo de vida y en el cuerpo graso y ovarios de las mosquito hembras (Michel *et. al.*, 2006).

Otro componente importante en el sistema inmune son los hemocitos, las células de la hemolinfa, los cuales juegan un papel central en este sistema y son un arma esencial requerida para la fagocitosis y encapsulación de microorganismos patógenos, éstos están presentes tanto en las hembras adultas así como en los machos adultos, pupas y larvas de mosquitos (Castillo *et. al.*, 2006). También son una fuente importante de las moléculas de señalización y efectoras presentes en la hemolinfa (Castillo *et. al.*, 2006 y Dimopoulos *et. al.*, 2002) como son los péptidos antimicrobianos, proteínas tipo complemento y componentes de la cascada proteolítica que regula la melanización (Baton *et. al.*, 2009). Por medio de microarreglos se han identificado 4047 genes de hemocitos que se expresan en hembras adultas de *A. gambiae*, incluyendo 959 genes que se expresan diferencialmente ante un reto bacteriano y/o una infección por parásitos de la malaria. Ciento cinco de estos genes se encuentran relacionados con la inmunidad, de los cuales se sabe o supone que tienen roles en la defensa contra *P. berghei* y otras especies de *Plasmodium* (Baton *et. al.*, 2009). Los granulocitos son, con mucho, el tipo de célula más abundante, mientras que los oenocitoides y los prohemocitoides, juntos representan, por lo general, menos del 10% de la población total de hemocitos (Castillo *et. al.*, 2006). Los perfiles de muchos hemocitos se han asociado con dos diferentes estadios del parásito de la malaria durante la infección, lo que probablemente refleja los diferentes lugares en los que los parásitos se encuentran dentro de los mosquitos, las diferencias antigénicas

entre oocinetos y esporozoitos, y/o diferencias temporales asociadas con la ingesta de sangre y la edad de los mosquitos (Baton *et. al.*, 2009).

La síntesis de péptidos antimicrobianos es el paso final de la respuesta del sistema inmune humoral. Los AMPs son producidos rápidamente por el cuerpo graso, posterior al reconocimiento de patógenos, y son secretados a la hemolinfa, donde son acumulados en grandes concentraciones. Se han encontrado varios genes que codifican para AMPs en el genoma de *Anopheles*, entre los cuales se encuentran cuatro genes que codifican para defensinas (DEFs), cuatro para cecropinas (CECs) uno para atacina y uno para gambicina (GAM1). Las defensinas y cecropinas son expresadas en el intestino medio, tórax, tejidos abdominales y preferencialmente en la parte anterior del intestino medio del mosquito (Vizioli *et. al.*, 2001).

La fagocitosis es una de las respuestas clásicas del sistema inmune celular de los insectos, donde los hemocitos se encargan de engullir a los patógenos. Se identificó una proteína tioéster soluble (TEP1) en *An. gambiae*, la cual actúa como una opsonina complementando y promocionando la fagocitosis de las bacterias Gram-negativas en la línea celular tipo hemocito “sua 5.1” (Levashina *et. al.*, 2001, Osta *et. al.*, 2004 y Waterhouse *et. al.*, 2007). TEP1 es activada por un corte proteolítico inducido por la infección, esto provoca la exposición del enlace tioéster altamente reactivo involucrado en un ataque nucleofílico, lo que conduce a la unión covalente de TEP1 a la superficie de los microorganismos (Osta *et. al.*, 2004).

Otro mecanismo del sistema inmune del mosquito contra las infecciones por patógenos es la encapsulación, en la cual los hemocitos forman una cápsula con múltiples capas alrededor de los patógenos de gran tamaño, lo que resulta en su aislamiento, inmovilización y posteriormente su muerte por asfixia, oxidación o melanización (Osta *et. al.*, 2004)

Los protozoarios patógenos han generado varios mecanismos para evadir el sistema inmune del mosquito, estos mecanismos incluyen variación antigénica, secreción de proteínas de superficie, mimetismo antigénico, ocultarse dentro de las células y la modulación de las respuestas inmunes del mosquito (Osta *et. al.*, 2004). Recientemente se han identificado genes en el mosquito que actúan como antagonistas del desarrollo del parásito dentro del mosquito, así como genes que actúan como agonistas protegiendo al parásito de sus antagonistas. Las proteínas

que se han identificado como antagonistas son TEP1 y una proteína rica en leucina (LRIM1), ésta última se encarga de la eliminación parcial del parásito y su actividad es necesaria para la melanización del parásito. Adicionalmente se han reportado dos lectinas tipo C (CTL4) y una lectina tipo C con unión a manosa (CTLMA2) que actúan como agonistas protegiendo al parásito de la respuesta inmune (melanización) del mosquito (Osta *et. al.*, 2004 y Waterhouse *et. al.*, 2007).

1.2.3 Melanización por profenoloxidasas y su participación en el sistema inmune del mosquito.

La melanización es la primera reacción de la respuesta inmune humoral del mosquito, está involucrada en la cicatrización de heridas y el secuestro de los invasores patógenos en una capa densa de melanina (Shiao *et. al.*, 2006). La melanización requiere de un corte proteolítico que activa las profenoloxidasas (PPOs) a fenoloxidasas (POs), paso que se encuentra regulado tanto positiva como negativamente por la acción de las serina proteasas con dominios CLIPs y sus inhibidores las serpinas como SRPN2, la cual limita la activación de las PPOs evitando con esto la activación accidental de la respuesta de melanización (Michel *et. al.*, 2006).

La melanización es un proceso altamente regulado, ya que su producción genera subproductos tóxicos incluyendo las especies reactivas de oxígeno así como el incremento de niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la melanización de *Plasmodium* (Waterhouse *et. al.*, 2007). La actividad de las fenoloxidasas se da en los granulocitos, donde su mayor actividad es posterior a desafíos inmunes generados por algún patógeno. Mientras que los oenocitoides muestran una actividad fenoloxidasa constitutiva. Esto sugiere que la regulación de la cascada de las fenoloxidasas diferencia potencialmente entre estos tipos de hemocitos (Fig. 2) (Castillo *et. al.*, 2006).

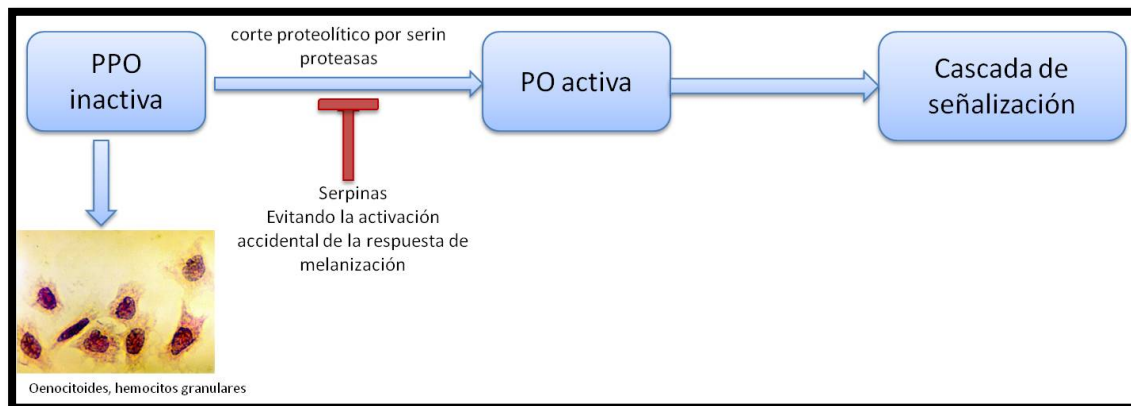


Figura 2. Cascada de las fenoloxidasas y su activación.

Las PPOs son enzimas bifuncionales que dos sitios de unión al cobre y poseen la actividad de oxidoreductasa y de monooxigenasa, además de presentar (García *et. al.* 2002). Estas enzimas hidroxilan sustancias fenólicas como tirosina, para formar L-hidroxifenilalanina (L-DOPA), la cual a su vez se oxida al igual que la dopamina para dar lugar a sus respectivas quinonas, generando diferentes compuestos llamados dopacromos, los que posteriormente se polimerizan y forman la melanina (García *et. al.* 2002) la cual sirve para varias tareas incluyendo la cicatrización de heridas, la pigmentación de la cutícula, la esclerotización y melanización de los patógenos invasores (Osta *et. al.*, 2004, Müller *et. al.*, 1999 y Waterhouse *et. al.*, 2007).

2. ANTECEDENTES

2.1 Perfil de expresión de las profenoloxidasas de *Anopheles gambiae*

Hasta ahora se han identificado nueve genes que codifican para las PPOs (PPO1-9) en el genoma de *An. gambiae* (Osta *et. al.* 2004). Los primeros seis fueron identificados mediante la clonación por PCR con oligonucleótidos degenerados (Müller *et. al.*, 1999) y los genes 7, 8 y 9 se identificaron por similitud en la secuencia del genoma de *An. gambiae* (Osta *et. al.* 2004). La tabla 1 muestra las etapas del desarrollo del mosquito en las cuales se expresan las PPOs 1 a 6, la localización anatómica de dicha expresión, así como a la respuesta a un estímulo fisiológico esencial en la vida del mosquito, que es la alimentación con sangre. Estos mismos genes se han estudiado en una línea celular modelo derivada de *An. gambiae* denominada “4a3B”, que presenta características fenotípicas parecidas a la de los hemocitos y expresa las PPOs de la 1 a la 6.

Tabla 1. Perfil de expresión de genes de las Profenoloxidasas en *An. gambiae*.

Gen	Perfil de expresión del gen		
	Etapas del mosquito	Alimentación con sangre	Partes del cuerpo
PPO1	Embrión, larva y pupas jóvenes.	Expresión después de alimentación	Cabeza, tórax y abdomen
PPO2	Embrión, larva y pupas jóvenes.	Expresión antes y después de alimentación	En todo el cuerpo excepto intestino medio y ovarios
PPO3	Embrión, larva y pupas jóvenes y viejas, adultos en bajas concentraciones.	Expresión después de alimentación	Cabeza, tórax y abdomen
PPO4	Estadios pre-adultos (larva tardía), pupa joven y adultos.	Expresión después de alimentación	Cabeza, tórax y abdomen
PPO5	Mosquitos adultos.	Expresión antes y después de alimentación	Cabeza, tórax y abdomen
PPO6	Mosquitos adultos.	Expresión antes y después de alimentación	En todo el cuerpo excepto intestino medio y ovarios

2.2 Regulación transcripcional de profenoloxidasas en *An. gambiae*

Aunque la expresión de algunos de estos genes es constitutiva y su actividad efectora depende de su activación por otras enzimas (serina proteasas), también presenta inducibilidad al estímulo por 20-HOE (Osta *et. al.*, 2004 y Müller *et. al.*, 1999), la cual tiene una función importante en la vitelogénesis, esclerotización, muda y metamorfosis de los mosquitos (Pondeville *et. al.*, 2008). La figura 3 muestra el efecto de la estimulación con la hormona (que se incrementa durante la alimentación con sangre) sobre la transcripción de los genes de las PPO4, PPO5 y PPO6. El efecto que tiene la hormona en la transcripción de los genes de las PPO1, PPO2 y PPO3 es similar a la de la PPO4 (Müller *et. al.*, 1999).

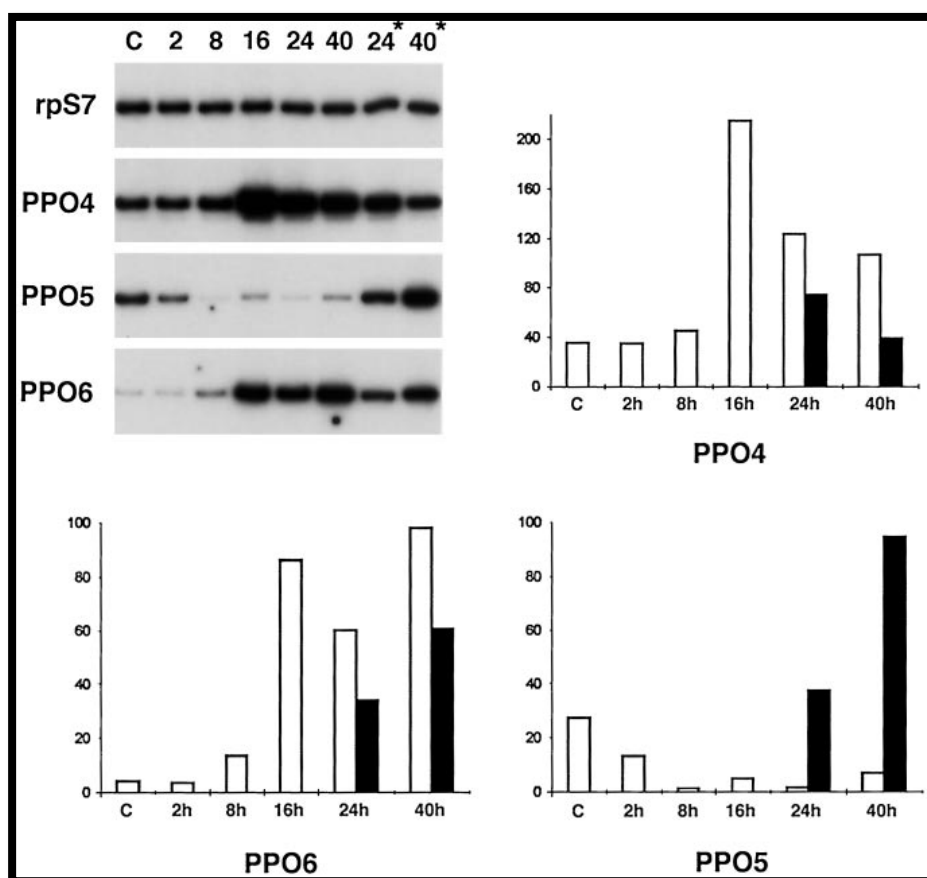


Figura 3. Efecto de 20-HOE en la transcripción del gen de la PPO6 en la línea celular 4a3B.

La expresión del transcrito en células no tratadas (C), y células expuestas a la hormona por 2, 8, 16, 24 y 40 horas fue analizada por RT-PCR (Barras blancas). La hormona fue removida a las 16 horas por lavados y medido el transcrito a las 24* y 48* horas (barras negras). Las bandas fueron cuantificadas por "phosphorimaging", y los datos obtenidos fueron normalizados contra las señales del gen rpS7. Los valores mostrados son en unidades arbitrarias de phosphoimager (Müller *et. al.*, 1999).

La regulación transcripcional solo se ha estudiado en uno de estos genes, el que corresponde a la PPO1 y cuya transcripción se estimula a concentraciones fisiológicas de la hormona 20-HOE en la línea celular 4a3B (Müller *et. al.*, 1999). En la región 5' proximal del gen de la PPO1 se identificaron dos elementos de respuesta a ecdisteroides (EcREs, similares a los descritos previamente en genes de *D. melanogaster* y *M. sexta*), así como un motivo GATA. Se demostró que la secuencia EcRE localizada en la posición -60 es capaz de unir el heterodímero formado por el receptor a ecdisteroides y el complejo ultraespiraculo (AaEcR/AaUSP) de *A. aegypti* traducido *in vitro*, así como un complejo de proteínas nucleares del mosquito adulto (Ahmed *et. al.*, 1999).

De manera similar a como ocurre con el gen de la PPO1, la transcripción del gen de la PPO6 se incrementa en presencia de la hormona 20-HOE en la línea celular 4a3B. Esto sugiere que alguna de las regiones que regulan la transcripción del gen de la PPO6 podría contener elementos de respuesta tipo EcRE. No obstante, la presencia de una secuencia similar o aún idéntica a un elemento de respuesta, no implica que es un sitio funcional, como lo muestra la presencia de un segundo sitio tipo EcRE en el gen de la PPO1 que no muestra funcionalidad mediante los análisis realizados (Ahmed *et. al.*, 1999). Por esta razón, como un primer paso en el esclarecimiento del complejo control transcripcional del gen de la PPO6, que tiene un componente de expresión constitutiva y es capaz de responder a estímulos hormonales y retos inmunológicos, en este trabajo se propone analizar la estructura de la cromatina de su región 5'proximal con el fin de identificar regiones reguladoras que potencialmente contribuyen al control de su transcripción.

2.3 Función de la profenoloxidasas 6 en hemolinfa

Aunque se conoce la función general de las fenoloxidasas y los procesos biológicos en los que participan en el mosquito, no se sabe en qué proceso específico participa cada una de ellas. Se ha reportado que la PPO6 está presente en la hemolinfa de pupas y hembras adultas, así como en el sobrenadante de cultivos de la línea celular 4a3B (Müller *et. al.*, 1999). También se sabe que la PPO6 se expresa específicamente en los hemocitos y se ha reportado que participa en la respuesta inmune humoral a la invasión por el hongo patógeno

Beauveria bassiana formando una capa densa de la melanina alrededor de los conidios, tubos germinativos e hifas (Yassine *et. al.*, 2012).

2.4 Estructura y organización del gen de la PPO6

Con el Proyecto Internacional del Genoma de *An. gambiae*, actualmente se conoce la secuencia completa del gen de la PPO6 y su ubicación (PPO6 AGAP004977-PA, *Anopheles gambiae* str. PEST. Gene ID: 1275799). Este gen se encuentra en el cromosoma 2L, en la cadena reversa, en un cluster compuesto por los genes que codifican para las proteínas PPO3, PPO8 y PPO9. Consta de 6 exones y 5 intrones, teniendo un total de 2.77 Kb de longitud (Fig. 4) (Holt *et. al.*, 2002 y VectorBase). Hasta ahora se desconocen que secuencias son responsables de la regulación transcripcional de este gen. La región 5' proximal del gen de la PPO6 consta de 800 pb, dentro de esta región se podría localizar una región reguladora que contribuya al control de la transcripción de este gen.

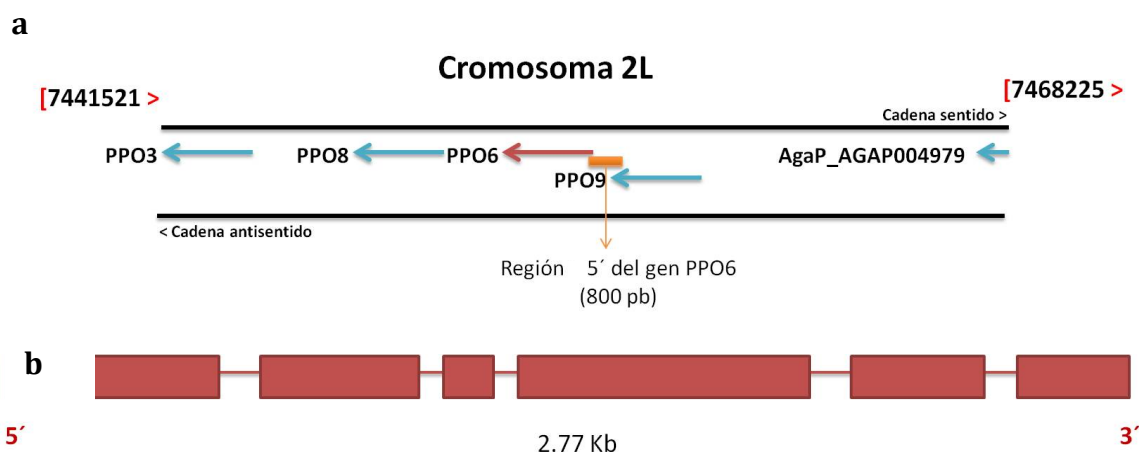


Figura 4. Gen de la profenoloxidasasa 6.

a) Cluster de 4 profenoloxidasas - en este cluster se localizan las profenoloxidasas 9, 6, 8 y 3, con una longitud total de 22.77 Kb y b) Gen de la profenoloxidasasa 6 – localizado en cadena antisentido con 6 exones y con una longitud de 2.77 Kb (Modificado de VectorBase).

3. JUSTIFICACIÓN

La malaria es la enfermedad parasitaria mas importante en el mundo, siendo responsable de 216 millones de casos y arriba de 566 000 muertes anualmente (OMS, 2010). Durante los años 50 la campaña de erradicación de la malaria de la OMS, logró eliminar esta enfermedad en Europa y redujo claramente su prevalencia en otras partes del mundo. Sin embargo actualmente existen parásitos resistentes a drogas y los mosquitos vectores han desarrollado resistencia a los insecticidas que se utilizan para el control de esta enfermedad (Holt et. al., 2002). Esta resistencia, así como la ausencia de una vacuna, han generado interés por conocer y entender las interacciones ecológicas y moleculares entre el vector, mosquitos del género *Anopheles* y el parásito, protozoarios del género *Plasmodium*, para generar nuevas estrategias para el control de la malaria en el mundo.

Dado que los hemocitos, y las profenoloxidasas que expresan, participan en la respuesta del mosquito ante microorganismos invasores, en este trabajo se propone identificar regiones reguladoras de la transcripción para el gen que codifica para la profenoloxidasa 6 en el genoma de *Anopheles gambiae*. Este estudio tiene el fin de generar información que permita eventualmente identificar elementos reguladores corriente arriba de este gen y que potencialmente pueden ser reconocidos por factores de transcripción, y así contribuir al conocimiento de los mecanismos de regulación de la PPO6 y de las redes genéticas involucradas en la respuesta inmune del vector.

4. HIPÓTESIS

Dentro de la región 5' proximal del gen de la Profenoloxidasa 6, constituida por 800 pb, entre la región codificante de este gen y la región 3' del gen de la Profenoloxidasa 9, se localizan regiones reguladoras importantes para el control de la transcripción del gen de la Profenoloxidasa 6.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar regiones reguladoras del gen de la PPO6 en células 4a3B derivadas de *Anopheles gambiae* estimuladas y no estimuladas con la hormona 20-HOE.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Establecer un sistema de detección para el análisis de la estructura de la cromatina.
- 2) Analizar la estructura de la cromatina de los 800 pb de la región 5' proximal.

7. METODOLOGÍA

7.1 Obtención de secuencias del genoma de *Anopheles gambiae*

La secuencia que se utilizó para diseñar los oligonucleótidos fue de *An. gambiae* (PPO6 AGAP004977-PA, *Anopheles gambiae* str. *PEST*. Gene ID: 1275799) la cual se obtuvo de la base de datos de VectorBase (www.vectorbase.com).

7.2 Diseño de oligonucleótidos por métodos bioinformáticos

El diseño de los oligos se utilizó el programa AmplifiX 1.5.4 (<http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX>), para amplificar la región 5' del gen de la PPO6 de *Anopheles gambiae* (800 pb río arriba), estos oligonucleótidos amplifican 7 amplicones de 120-200 pb de longitud. En la tabla 2 se muestran los criterios principales que se consideraron para la selección adecuada de los oligonucleótidos (Cortazar y Silva 2004).

Tabla 2. Criterios principales para el diseño de oligonucleótidos

Tamaño	18-25 nucleótidos de longitud
Base en el extremo 3'	G o C
Temperaturas de fusión (Tm)	50-65 °C (temperatura no mayor entre oligos de 5 °C)
Contenido de GC	40-60%
Autocomplementariedad	0% para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de oligos
Similaridad	100% de apareamiento con el molde de ADN
Translape entre oligos	Aproximadamente 10 pb entre oligo reverse de un amplicón y oligo forward del amplicón siguiente

Una vez teniendo los oligonucleótidos se utilizó el software CLC Sequence Viewer 6.5.2 (<http://www.clcbio.com/index.php?id=28>), para mapearlos. El análisis de BLAST se realizó en Vector Base, para verificar la especificidad de los oligonucleótidos.

7.2.1 Confirmación del tamaño, funcionalidad y especificidad de los oligonucleótidos

Para confirmar el tamaño, la funcionalidad y la especificidad de los oligonucleótidos se realiza un PCR de punto final, utilizando como molde ADN genómico obtenido de la línea celular 4a3B y una electroforesis en gel de agarosa.

PCR de punto final. Se utilizó el Kit para PCR (Fermentas), el cual contiene: amortiguador 5X GoTaqFlexi (10 µl/rxn), MgCl₂ (concentración final de 1 M), dNTPs (concentración final de 0.2 mM), polimerasa (concentración final de 0.025 U/µl), oligonucleótidos (0.4 pmol/µl) tanto para el forward como para el reverse y ADN (concentración final de 100 ng). Se aforó con agua grado biología molecular hasta obtener un volumen final de 50 µl. El termociclador (MultiGene OPTIMAX de Labnet) se programó como se muestra a continuación:

- Desnaturalización inicial (95°C-2min-1 ciclo)
- Desnaturalización (95°C-30seg-25 ciclos)
- Alineamiento (58°C-30seg-25 ciclos)
- Extensión (72°C-30seg-25 ciclos)
- Extensión final (72°C-5min-1 ciclo)

→ Enfriamiento (4°C-tiempo indefinido-1 ciclo)

Electroforesis en gel de agarosa. Las muestras mezcladas con xilencianol sin azul de bromofenol 6X como amortiguador de carga se colocan en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (10mg/ml). El marcador de peso molecular que se utilizó es de 1Kb (Invitrogen). La imagen de los amplicones fue captada por medio de un fotodocumentador (PhotoDoc-It™ Imaging Systems de UVP) (Cortazar y Silva 2004).

7.2.2 Especificidad de los oligonucleótidos por qPCR

Para determinar la especificidad de los oligonucleótidos se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y se realizaron rangos dinámicos (indican las concentraciones mayores y menores donde la PCR se comporta de forma cuantitativa y las muestras se pueden medir). Las concentraciones de ADN que se probaron para los rangos fueron 0.01, 0.1, 1 y 10 ng/μl. Para el análisis de los rangos dinámicos se realizó una recta de regresión lineal y se determinó el coeficiente de correlación (R^2) (el cual indica la fuerza y la dirección de una relación lineal y proporcionalidad entre dos variables estadísticas) no menor de 0.95. Se configuró el termociclador (ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System Applied biosystems) para obtener las curvas *melting* o de disociación (esto permite determinar posibles productos no específicos como dímeros de oligonucleótidos) de la siguiente manera:

- Desnaturalización inicial (95°C-30seg-1 ciclo)
- Amplificación (95°C-5seg-40 ciclos)
- Alineamiento (58°C-10seg-40 ciclos)
- Extensión (72°C-15seg-40 ciclos)
- Disociación (95-65-95°C-0-1-0min-1 ciclo)
- Enfriamiento (4°C-30seg-1 ciclo)

Se utilizó el kit "SYBR Advantage® qPCR Premix" de Clontech. La mezcla de la reacción contiene SYBR Green 2X (dilución final 0.5X), ROX 50X (dilución final de 0.5X), oligonucleótidos (concentración final de 0.3 pmol/μl) y ADN (concentración final de 0.01, 0.1, 1 y 10 ng/μl) se afora con agua grado biología

molecular para obtener un volumen final de 10 μ l.

En los ciclos iniciales de PCR, hay un pequeño cambio en la señal de fluorescencia. Esto define la línea de fondo para el diagrama de la amplificación. Un aumento en fluorescencia sobre la línea de fondo indica la detección del producto acumulado de PCR, en este caso se comparan los Ct's de las muestras (McArthur *et. al.*, 2001 y Applied Biosystems, 2001).

7.3 Cultivo celular

La línea celular 4a3B se cultivó en frascos de cultivo F-25, para mantener las células, y en frascos F-75 para los ensayos de FAIRE y DNasa I. El medio de cultivo que se utilizó es Medio Schneider suplementado con suero fetal bovino (SFB) descomplementado al 10%, se adicionaron posteriormente una mezcla 1:100 de penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 μ g/ml). Las células se incubaron a 37°C hasta obtener una confluencia del 80%.

7.4 Estimulación con 20 hidroxiecdisona

Las células 4a3B se siembran en cajas F-75 y se incuban hasta tener una confluencia del 80% en cada caja. Posteriormente se adiciona la hormona 20 hidroxiecdisona a cada caja F-75, la cual se diluye en etanol, para obtener una concentración final de 0.5 μ g/ml, con la concentración de etanol por debajo del 0.1%. Como control se incuban células únicamente con medio Schneider con SFB y células con etanol a una concentración por debajo del 0.1%. Las células estimuladas, las células control y las células tratadas con etanol se incuban por 16 horas. Se toma una pequeña muestra de células de cada una de las condiciones para extraer RNA y medir el nivel de transcripción, el resto de las células serán utilizadas para realizar ensayos de aislamiento de regiones reguladoras asistida por formaldehído (FAIRE) (Müller *et. al.*, 1999, Giresi *et. al.*, 2009 y Cabrera, 2012).

7.5 Extracción de RNA de células 4a3B estimuladas.

Posterior a la estimulación con la hormona 20 hidroxiecdisona, las cajas F-75 destinadas para RNA se lavan con PBS 1X y se extrae el RNA por medio del método de Trizol (TriPure Isolation Reagent de Roche). Posterior al lavado con

PBS 1X, se les agregaron 200 µl de TriPure (Roche), las células se rasparon y se pasan a tubos eppendorf (uno por cada tratamiento) y se incuban a temperatura ambiente por 5 min. Posterior a esto se les agregaron 40 µl de cloroformo a cada tubo y se incuban por 3 min a temperatura ambiente, pasado el tiempo de incubación las muestras se centrifugan a 12 000 x g por 10 min a temperatura ambiente. A partir del centrifugado se colectó la fase acuosa, la cual contiene el RNA total y se precipitó con 500 µl de isopropanol centrifugando las muestras a 12 000 x g por 10 min, posterior a esto la pastilla se lavó con etanol al 70% para posteriormente resuspender con agua libre de RNasas y DNasas. Se cuantificó el RNA total y se almacenó a -80°C hasta su uso en los ensayos de RT-PCR de tiempo real.

7.5.1 Síntesis del cDNA de células 4a3B estimuladas.

La síntesis del cDNA se realiza con el Kit “Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR” (Thermo Scientific). En un tubo estéril y libre de RNasa se agregan 4 µl de 5X Reaction Mix, 2 µl de Maxima Enzyme Mix, 1 µg de RNA estimulado con 20-HOE, no estimulado y tratado con etanol, cada condición en un tubo. Se programó el termociclador (MultiGene OPTIMAX de Labnet) con las siguientes condiciones: 10 min a 25°C, 30 min a 50°C, 5 min a 85°C y tiempo indefinido a 4°C. Posteriormente se realiza una Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) para determinar el nivel del mensajero utilizando oligonucleótidos diseñados para amplificar con cDNA.

7.5.2 Diseño de oligonucleótidos para cDNA de la profenoloxidasasa 6.

El diseño de los oligonucleótidos para cDNA se realiza con el programa AmplifiX 1.5.4 (<http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX>). Los criterios que se tomaron en cuenta para su diseño se muestran en la tabla 3. El análisis de BLAST se realizó en Vector Base, para verificar la especificidad de los oligonucleotidos.

Tabla 3. Criterios principales para el diseño de oligonucleótidos para cDNA

Tamaño	18-25 nucleótidos de longitud
Base en el extremo 3´	G o C
Temperaturas de fusión (Tm)	50-65 °C (temperatura no mayor entre oligos de 5 °C)
Contenido de GC	40-60%
Autocomplementariedad	0% para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de oligos
Similaridad	100% de apareamiento con el molde de ADN
Tamaño de amplicón:	
ADN genómico	150 a 200 pb
cDNA	100 a 150 pb

Para confirmar el tamaño, la funcionalidad y la especificidad de los oligonucleótidos se realizó una PCR de punto final, y para determinar su especificidad se llevó a cabo una qRT-PCR determinando las curvas *melting* o de disociación y su rango dinámico. Ambas PCR's se llevaron a cabo con cDNA.

El gen control que se utilizó para este experimento fue el s7, éste es un gen constitutivo y se localiza en el cromosoma 3L. Para este gen también se realizó qPCR para determinar las curvas melting y su rango dinámico.

7.6 Aislamiento de regiones reguladoras asistida por formaldehído "FAIRE"

Los controles se trataron como a las muestras FAIRE, y previo a la extracción fenólica, se incubaron a 65°C toda la noche para liberar el ADN de las proteínas previamente fijadas.

Formación de enlaces reversibles con formaldehído

Las células (confluencia 80%) se rasparon con un raspador celular y se les añadió formaldehído (concentración final 1%) al medio de cultivo Schneider con SBF (concentración final 10%) y antibiótico, 1:100 de penicilina (50 U/ml) y estreptomicina (50 µg/ml), se incubaron a temperatura ambiente en un agitador orbital GyroMini™ Nutating Mixer de Labnet durante 5 minutos. Para detener la

fijación, se añadió glicina (concentración final de 125 mM) y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente en un agitador orbital GyroMini™ Nutating Mixer de Labnet. Posteriormente se centrifugaron las células a 301.86 x g durante 5 min a 4°C. Se lavó la pastilla con PBS 1X con PMSF (concentración final de 2 mM) frío, para asegurar que todo el medio residual sea eliminado.

Se resuspende la pastilla con el mismo PBS 1X con PMSF, y se centrifuga a 20 000 x g durante 2 minutos para posteriormente congelar la pastilla en nitrógeno líquido y almacenar a -70°C.

Lisis celular

Se añaden 3 ml de amortiguador de lisis 1 (Tabla 4) en agitación orbital GyroMini™ Nutating Mixer de Labnet a 4°C durante 15 minutos. Centrifugar a 3 490 x g durante 5 min a 4°C y retirar el sobrenadante.

Posteriormente se añaden 3 ml de amortiguador de lisis 2 (Tabla 4) en agitación orbital GyroMini™ Nutating Mixer de Labnet a 4°C durante 15 minutos y centrifugar a 3 490 x g durante 5 minutos a 4°C y retirar el sobrenadante.

Posteriormente se añaden 300 µl de amortiguador de lisis 3 (Tabla 4) para realizar directamente la sonicación.

Sonicación (Biorruptor)

Se transfiere el lisado a tubos de 1.5 ml en alícuotas de 300 µl y se dejan en sonicación en el Biorruptor UCD-200 (Diagenode), durante 15 minutos ajustando a pulso alto durante 30 segundos seguido de 30 segundos de descanso. El baño de agua se mantiene a una temperatura constante de 4°C (Giresi y Lieb, 2010 y Cabrera, 2012).

Tabla 4. Buffers de lisis para FAIRE.

Buffer de lisis 1	HEPES-KOH 50 mM, pH7.5 NaCl 140 mM EDTA 1 mM glicerol 10% NP-400.5% TritonX-100 0.25%
Buffer de lisis 2	Tris-HCl 10 mM, pH8.0 NaCl 200 mM EDTA 1 mM EGTA 0.5 mM
Buffer de lisis 3	Tris-HCl 10 mM, pH8.0 NaCl 100 mM EDTA 1 mM EGTA 0.5 mM Na-Desoxicolato 0.1% N- lauroylsarcosina 0.5%

7.7 Ensayos de digestión limitada con DNasa I

Este ensayo se estandarizó para la línea celular 4a3B. Para su estandarización se utilizaron diferentes condiciones como tiempo de incubación y concentraciones de NP-40 y DNasa I. El protocolo final para éste ensayo es el siguiente:

Para este ensayo se utilizaron 2 cajas F-25 para este ensayo, con una confluencia celular del 80%. Para obtener los núcleos celulares, las células se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron a 135 x g por 5 min a 4 °C para obtener una pastilla de células. Este paso se repitió una vez más para después resuspender la pastilla en 0.5 ml de Buffer de lisis, con 0.01% de NP-40 concentración final y se incubaron por 3 min a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugar 135 x g por 1 min a 4 °C y lavar la pastilla de células con Buffer de digestión, se centrifugó 135 x g por 5 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Los núcleos obtenidos se resuspendieron en el Buffer de digestión, para poder realizar la digestión de la cromatina con las siguientes concentraciones de DNasa I (U/ml): 5, 10, 15, 20 y 30. Se incubaron por 5 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo se adicionó un volumen igual de Buffer de paro. Posteriormente las muestras fueron tratadas con RNasa A (10 µg/ml) (Sigma) por 30 minutos a 37 °C, después de este tiempo se adicionó proteinasa K (25 µg/ml concentración final) y las muestras se

incubaron toda la noche a 55 °C (McArthur *et. al.*, 2001 y Dorschner *et. al.*, 2004).

En la tabla 5 se muestran las condiciones estandarizadas para la línea celular 4a3B, al igual que en el Anexo 5 se muestran todas las condiciones que se utilizaron para esta estandarización.

Tabla 5. Condiciones y buffers estandarizados para ensayo de digestión limitada con DNasa I en células 4a3B.

Buffer	Reactivos	NP-40		DNasa I	
		Concentración final (%)	Incubación	Concentración final (U/ml)	Incubación
Buffer de lisis	NaCl 15mM Tris HCl 50mM EDTA 1mM NP40*	0.01	3 min-Temp. ambiente	0 5 10 15 20 30	5 min-37°C
Buffer de digestión	Tris HCl 10mM NaCl 10mM MgCl ₂ 3mM				
Buffer de Paro	NaCl 0.1 M SDS 0.1% Tris HCl 50mM EDTA 100mM				

* Se adiciona al momento del experimento

7.8 Extracción Fenol/Cloroformo del ADN.

Posterior al tratamiento con la DNasa I y FAIRE, el ADN se purifica por el método fenol/cloroformo.

A las muestras se agrega un volumen igual de fenol/cloroformo, se agita con vortex y se centrifuga (12 000 x g por 5 min), la fase acuosa se pasa a un tubo eppendorf (1.5 ml) nuevo y estéril para volver a tratarla con fenol/cloroformo. A la fase acuosa obtenida se le adiciona un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se centrifuga (12 000 x g por 5 min) para obtener la fase acuosa, la cual es transferida a otro tubo nuevo y estéril.

7.9 Precipitación de ADN.

A la fase acuosa obtenida de la extracción, se le adiciona 1/10 de acetato de sodio 3M (pH 5.2), 1µl de glicógeno (concentración final de 0.04 mg/ml), el glicógeno sólo se adiciona a las muestras tratadas con FAIRE) y 2X de volumen de etanol absoluto frío, incubar las muestras a -20 °C toda la noche. Pasado el tiempo

de incubación, el ADN se centrifuga a 12 000 x g por 30 min a 4 °C, se elimina el sobrenadante y se adicionan 500 µl de etanol al 70% para lavar las muestras. Posteriormente se centrifuga a 12 000 x g por 5 min a temperatura ambiente y elimina el sobrenadante, dejando secar las pastillas de ADN a temperatura ambiente. Cuando las pastillas estén totalmente libres de etanol, las muestras tratadas con DNasa I, se resuspenden en agua grado biología molecular. Para las muestras tratadas con FAIRE, se resuspenden las pastillas en 50 µl de Tris-HCl (10 mM), pH 7.5. Posteriormente a éstas muestras se les añade RNasa A (concentración final de 0.2 mg/ml) y se incuban durante una hora a 37°C. Se limpian utilizando una columna de ADN Clean & Concentrator -5 (ZYMO RESEARCH) capaz de recuperar fragmentos pequeños de ADN. Las muestras tratadas con DNasa I y con FAIRE se cuantifican para determinar la cantidad de ADN obtenida, y se mantienen a 4 °C hasta su uso.

7.10 PCR en tiempo real (qPCR) para detección enriquecimiento por FAIRE y de sitios hipersensibles por DNasa I.

Se realizó qPCR para determinar los sitios hipersensibles de las muestras tratadas con DNasa I y el enriquecimiento de las muestras tratadas con FAIRE en el termociclador ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System de Applied biosystems. Para el análisis de los resultados se realizó el método del Ct comparativo $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Giresi y Lieb, 2009, Livak y Schmittgen, 2001). Las condiciones en las que se realizó el qPCR son las siguientes:

- Desnaturalización inicial (95°C-30seg-1 ciclo)
- Amplificación (95°C-5seg-40 ciclos)
- Alineamiento (58°C-10seg-40 ciclos)
- Extensión (72°C-15seg-40 ciclos)
- Enfriamiento (4°C-30seg-1 ciclo)

Se utilizó el kit “SYBR Advantage® qPCR Premix” de Clontech. La mezcla de la reacción contiene SYBR Green 2X (dilución final 0.5X), ROX 50X (dilución final de 0.5X), oligonucleótidos (concentración final de 0.3 pmol/µl) y ADN (concentración final de 1 ng/µl) se afora con agua grado biología molecular para obtener un volumen final de 10 µl. (McArthur *et. al.*, 2001 y Applied Biosystems, 2001).

8. RESULTADOS

8.1 Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se diseñaron por medio del programa computacional AmpliX 1.5.4 para la región no codificante (800pb) y parte del exón 1 del gen de la profenoloxidasasa 6, ubicado en el cromosoma 2L. Los criterios que se utilizaron para el diseño se muestran en la metodología, apartado 7.2, tabla 2. Posterior al diseño se realizó un análisis de Blast (Blast-NCBI) a cada oligo para verificar la especificidad de éstos. Todos los oligonucleótidos diseñados cumplieron con los criterios necesarios. En la tabla 6 y 7 se muestran los oligonucleótidos seleccionados para el análisis de la estructura de la cromatina del gen de la profenoloxidasasa 6 (PPO6).

Tabla 6. Oligonucleótidos de la región 5' del gen PPO6.

Nombre	Oligos región 5' PPO6		TM	Longitud	Coordenadas	Tamaño Amplicón
PPO6 5'A6F	GGGCAGGTTCCCAATATGAG	Fwd	56.9	21	7455515	127
PPO6 5'A6R	GATCATACGGGTCAGCCACAA	Rev	56.6	21	7455605	
PPO6 5'A5F	GATCGATGAACGATACTTGTG	Fwd	51.3	21	7455404	132
PPO6 5'A5R	GAAATGCGGTATATATTTGCT	Rev	48.8	21	7455519	
PPO6 5'A4F	AGCAAATATATACCGCATTTT	Fwd	48.8	21	7455289	142
PPO6 5'A4R	CGATAACTGGGAATGTGTGTG	Rev	53.6	21	7455424	
PPO6 5'A3F	GCAATATGGATAAGGCACACA	Fwd	53	21	7455181	136
PPO6 5'A3R	ATTGTTGCACTACATGGGAAG	Rev	55.5	21	7455303	
PPO6 5'A2F	ATGTGCATACGCGTGGTTTAC	Fwd	56.2	21	7455109	95
PPO6 5'A2R	CCACTGCATCTGCGATAATGA	Rev	55.1	21	7455175	
PPO6 5'A1F	TATCATTATCGCAGATGCAGT	Fwd	51.5	21	7454930	150
PPO6 5'A1R	GTCACGTTTGTGATGCTACAG	Rev	54.2	21	7455127	

Tabla 7. Oligonucleótidos de exón 1 del gen PPO6.

Nombre	Oligos región exón 1 PPO6		TM	Longitud	Coordenadas	Tamaño Amplicón
PPO6 AE1F	TTCTCGCGCGTCTTTAAACAC	Fwd	56.5	21	7454836	135
PPO6 AE1R	CCGTCATCTTTGCGGTAGAAC	Rev	55.1	21	7455000	

En la figura 5 se muestra la secuencia completa de este gen (800pb río arriba hasta 600pb de la región 3'), así como la ubicación de todos los oligonucleótidos mostrados en las tablas anteriores.

8.1.1 Tamaño, funcionalidad y especificidad de los oligonucleótidos

Se hizo una PCR de punto final para determinar la funcionalidad y especificidad de los oligonucleótidos, y el tamaño del amplicón que éstos generan (Fig. 6).

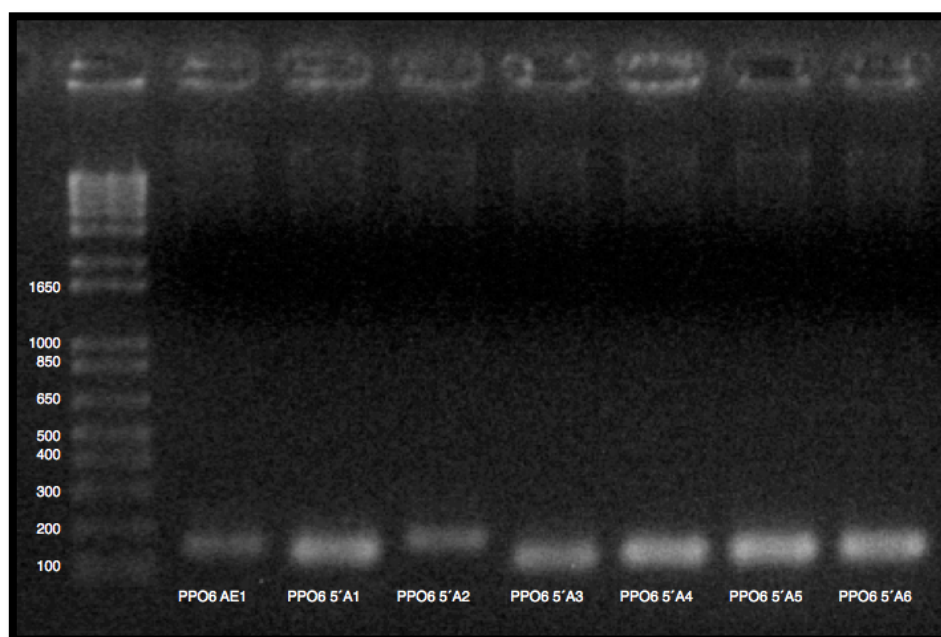


Figura 6. Amplicones del gen de la PPO6.

Los productos generados por PCR de punto final se corrieron en un gel de agarosa (1.5%). De izquierda a derecha: pozo 1- marcador molecular (1Kb), pozo 2- amplicón de exón 1 (135pb), pozo 3- amplicón 1 región no codificante (150pb), pozo 4- amplicón 2 región no codificante (95pb), pozo 5- amplicón 3 región no codificante (136pb), pozo 6- amplicón 4 región no codificante (142pb), pozo 7- amplicón 5 región no codificante (132pb), pozo 8- amplicón 6 región no codificante (127pb).

Para determinar la especificidad y eficiencia de los oligonucleótidos se determinó que las concentraciones probadas están dentro de sus rangos dinámicos por medio qPCR incluyendo las curvas *melting* o de disociación, las cuales permiten determinar posibles productos no específicos como dímeros de oligonucleótidos. Las concentraciones de ADN utilizadas fueron de 0.01, 0.1, 1 y 10 ng/μl. Con una desviación estándar entre cada réplica de <0.3 y una R^2 mayor a 0.95. En las figuras 7 y 8 se muestran los rangos dinámicos de dos amplicones con sus respectivas curvas de disociación. En el Anexo 1 se encuentran los rangos dinámicos y las curvas de disociación de los demás amplicones.

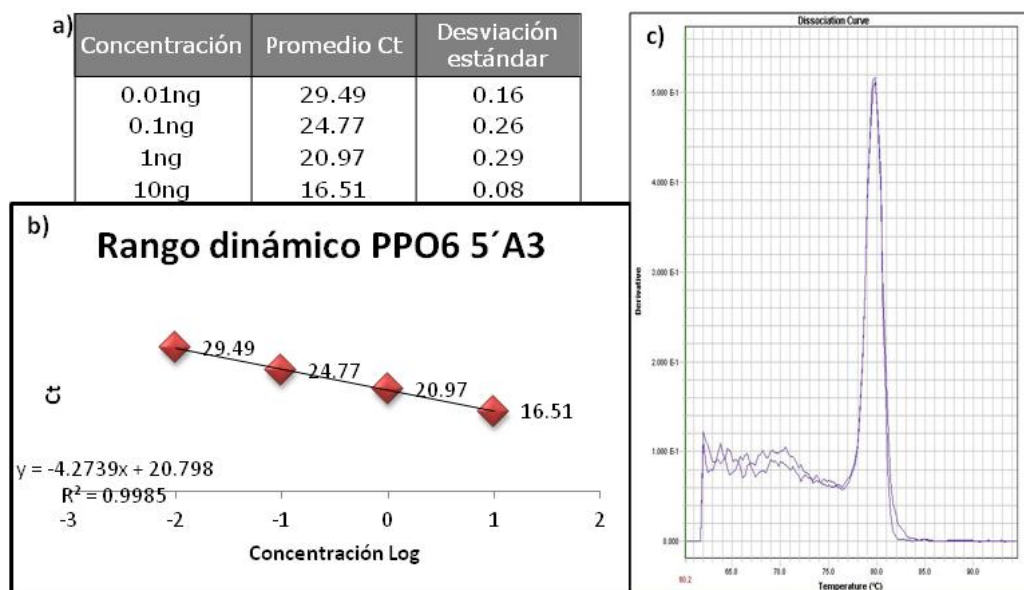


Figura 7. Rango dinámico del amplicón 3 región no codificante.

Se realizó una qPCR (SYBR Green) para obtener los rangos dinámicos y las curvas de disociación.

a) Tabla con las concentraciones de ADN utilizadas, el promedio de los Cts y su desviación estándar, b) Gráfica del rango dinámico a diferentes concentraciones y c) Curva de disociación.

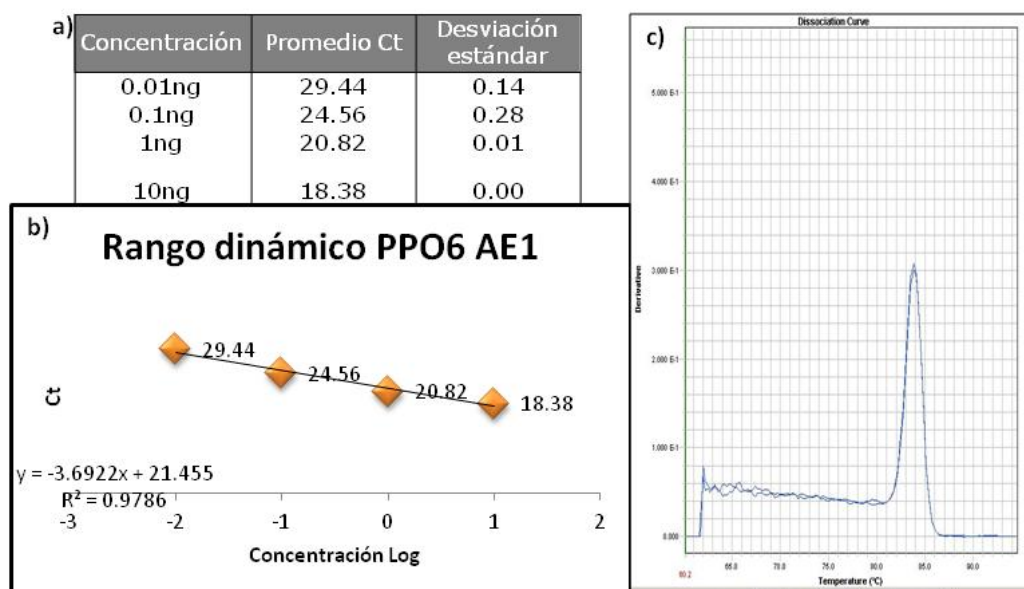


Figura 8. Rango dinámico del amplicón exón 1.

Se realizó una qPCR (SYBR Green) para obtener los rangos dinámicos y las curvas de disociación.

a) Tabla con las concentraciones de ADN utilizadas, el promedio de los Cts y su desviación estándar, b) Gráfica del rango dinámico a diferentes concentraciones y c) Curva de disociación.

8.2 FAIRE

En este ensayo se realizaron por medio de PCR en Tiempo Real tres muestras, las cuales se analizaron inicialmente con dos regiones, la región promotora y la región codificante del gen Def1, los cuales ya habían sido analizados por este método y se vio que el amplicón de la región promotora tiene enriquecimiento en comparación con el amplicón de la región codificante (Cabrera, 2012), por lo que, en este trabajo, estas regiones fueron utilizadas como control de enriquecimiento, donde la región del promotor se enriquece al contrario de la región codificante.

Una vez analizadas las muestras obtenidas en este trabajo con las regiones control, se analizó la región 5' y parte del exón 1 del gen de la PPO6 que consta de 800 pb y se encuentra abarcada por los 7 amplicones diseñados en este trabajo.

8.2.1 FAIRE de controles (región promotora y codificante del gen Def1)

Se analizaron las regiones control, el promotor del gen Def1 y parte de su región codificante, abarcadas por los amplicones R5'A2 y RCA4 respectivamente, por medio de PCR de Tiempo Real. En la figura 9 se muestra el enriquecimiento de la región del promotor abarcada por el amplicón R5' A2 (longitud 87pb, coordenadas 20627551-20627638) y el empobrecimiento de la región codificante abarcada por el amplicón RCA4 (longitud 126pb, coordenadas 20628050-20628176) del gen Def1 de la réplica biológica 1, utilizados como controles positivo y negativo respectivamente del enriquecimiento de amplicones.

En este trabajo el amplicón R5' A2 de la región promotora del gen Def1 enriquece 8.51 veces en comparación con el control, y el amplicón de la región codificante RCA4 de este mismo gen empobreció 1.58 veces en comparación con el control de la réplica biológica 1. El enriquecimiento se obtuvo por medio de la siguiente fórmula: $\text{FAIRE/Control} = 2^{(\text{Ct Control} - \text{Ct FAIRE})}$ y se sacó el inverso de esta fórmula para obtener el empobrecimiento. En el Anexo 2 (fig. A y B) se muestran los controles del enriquecimiento de las réplicas biológicas 2 y 3.

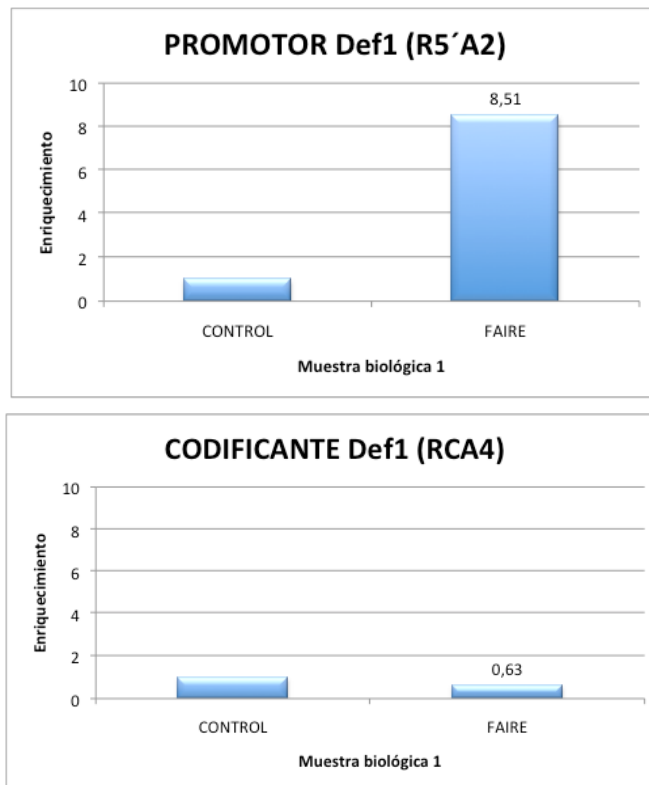


Figura 9. Enriquecimiento de los controles.

Réplica biológica 1. Se realizó una qPCR (SYBR Green). Gráfica de arriba amplicón de la región promotora del gen Def1- enriquecimiento de 8.51 veces (control positivo). Gráfica de abajo amplicón de la región codificante del gen Def1- empobrecimiento de 1.58 veces (control negativo, se saca el inverso de 0.63).

En todas las réplicas biológicas la región del promotor enriquece en comparación con la región codificante la cual muestra un empobrecimiento. Esto nos dice que las réplicas biológicas analizadas son confiables para poder analizar otros genes y poder identificar regiones libres de nucleosomas.

8.2.2 FAIRE de región 5' y parte del exón 1 del gen de la PPO6.

Posterior al análisis de las regiones control, se analizó la región ubicada en el cromosoma 2L, en el gen de la PPO6 abarcada por los 7 amplicones de la PPO6 diseñados en este trabajo. El enriquecimiento de los amplicones que abarcan el exón 1 y su región contigua (PPO6 AE1 y PPO6 5'A1) muestran un mayor enriquecimiento en comparación con los demás amplicones analizados, lo cual nos dice que en esta región se localiza una región libre de nucleosomas. El enriquecimiento de estos amplicones en la réplica biológica 1, se muestra en la tabla 8 y figura 10. En las 3 réplicas biológicas analizadas se muestra el mismo

patrón de enriquecimiento, lo que confirma que la región abarcada por el amplicón PPO6 AE1 y parte de la región abarcada por el amplicón PPO6 5'A1 es una región libre de nucleosomas. En el Anexo 2 (tablas A y B y fig. C y D) se muestra el enriquecimiento de las réplicas biológicas 2 y 3.

Tabla 8. Enriquecimiento de los 7 amplicones del gen de la PPO6 en la réplica biológica 1.

AMPLICÓN	ENRIQUECIMIENTO
PPO6 AE1	13.29
PPO6 5'A1	4.23
PPO6 5'A2	1.66
PPO6 5'A3	3.35
PPO6 5'A4	2.24
PPO6 5'A5	1.96
PPO6 5'A6	2.60

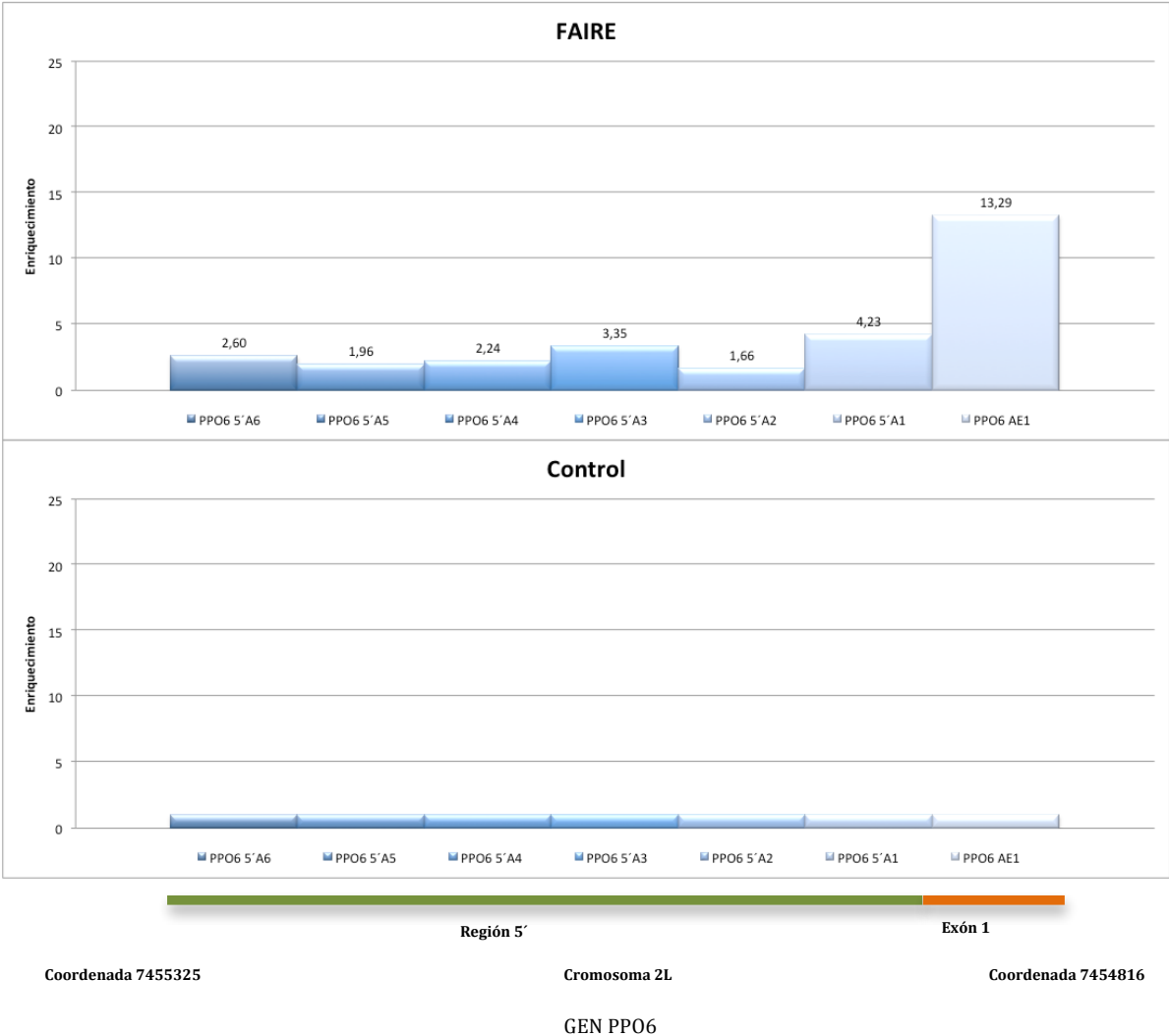


Figura 10. Enriquecimiento de los 7 amplicones del gen de la PPO6.
 Réplica biológica 1. Se realizó una qPCR (SYBR Green) para este análisis.

8.3 Cuantificación del mensajero de la PPO6 de células estimuladas con 20 hidroxiecdisona.

Posterior al análisis de la región abarcada por los 7 amplicones diseñados para el gen de la PPO6 por FAIRE, se realizó una RT-PCR para analizar la expresión de este gen cuando las células son estimuladas con la hormona 20 hidroxiecdisona (20-HOE). Se utilizaron como controles para este ensayo células sin estimular y células tratadas con etanol a una concentración final $\leq 0.01\%$. El control con etanol se utilizó para evaluar si había algún cambio en la cantidad del mensajero causado por el éste y no por la hormona, ya que la 20-HOE tiene que ser diluida en etanol. Como gen control se utilizó el gen constitutivo s7 de *An. gambiae*.

Las células estimuladas y los controles (sin estimular y con etanol) se incubaron por 16 horas. El tiempo de incubación (16 hrs) fue determinado basándose en un ensayo realizado por Müller y colaboradores en 1999 donde se observó una mayor expresión del gen de la PPO6 estimulado con 20-HOE en la misma línea celular 4a3B a las 16 horas (antecedentes, fig 3). Este ensayo sólo se realizó en una réplica biológica.

Como se muestra en la figura 11 el mensajero de la muestra con células estimuladas con 20-HOE aumenta su nivel 13.28 veces en comparación con la muestra de células no estimuladas y las células tratadas con etanol, las cuales no mostraron un cambio significativo en el nivel de transcripción. Para hacer la cuantificación relativa del mensajero, se utilizó el método de Ct comparativo ($\Delta\Delta CT$) el cual permite cuantificar las diferencias en la expresión relativa del gen blanco (PPO6) a la expresión del gen control (s7), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{“Gen PPO6/Gen s7} = 2^{\Delta\Delta C_T} = 2^{(Ct_{PPO6} - Ct_{s7})_{\text{control}} - (Ct_{PPO6} - Ct_{s7})_{\text{estimulado}}} \text{”}.$$

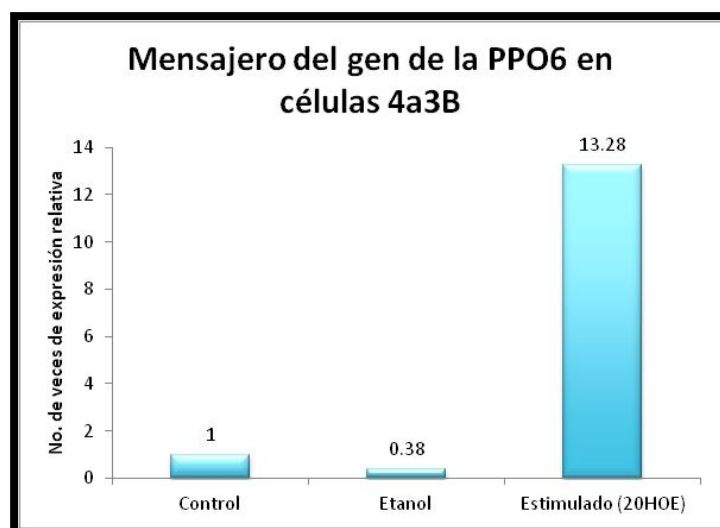


Figura 11. Nivel del mensajero del gen de la PPO6 en la línea celular 4a3B.

Se realizó una qPCR (SYBR Green) para el análisis de la cuantificación relativa del mensajero del gen de la PPO6.

Estos resultados nos dicen que al estimular las células con la hormona 20-HOE, el nivel del mensajero del gen de la PPO6 aumenta en comparación con el control (células no estimuladas).

En el Anexo 3, tabla A se muestran los oligonucleótidos seleccionados para el análisis de la expresión del gen de la PPO6, en la figura A se muestra el producto del amplicón, obtenido por PCR de punto final y en la figura B se muestran los rangos dinámicos y sus curvas de disociación de los amplicones de los mensajeros de los genes s7 y PPO6.

8.4 FAIRE de células estimuladas con 20 hidroxiecdisona.

Confirmando que la expresión del gen de la PPO6 se incrementa al estimular las células con la hormona 20-HOE (concentración final de 0.5 µg/ml), se realizó el ensayo de FAIRE con células estimuladas con esta hormona para la misma región analizada por FAIRE con células no estimuladas para determinar si había algún cambio en el enriquecimiento de los amplicones analizados. Para este ensayo las células 4a3B se incubaron 16 horas con la hormona y posteriormente se les realizó FAIRE. Las muestras, así como los controles, fueron analizadas con los

7 amplicones del gen de la PPO6 por PCR de tiempo real (SYBR Green). Este experimento se realizó únicamente en dos réplicas biológicas ya que se ha reportado que en estudios de cromatina realizar 3 réplicas biológicas no modifica los resultados ni agrega información. En todos los amplicones se observa un aumento en el enriquecimiento, siendo nuevamente los amplicones PPO6 AE1 y PPO6 5'A1 los que tuvieron un mayor enriquecimiento. El aumento en este enriquecimiento es debido al estímulo que se les dio a las células con la hormona 20-HOE, la cual genera que la expresión del gen de la PPO6 aumente. El enriquecimiento de los amplicones en la réplica biológica 1, se muestra en la tabla 9 y figura 12. En el Anexo 4 (tabla A y fig. A) se muestra el enriquecimiento de la réplica biológica 2.

Tabla 9. Enriquecimiento de los 7 amplicones del gen de la PPO6 en células estimuladas con 20-HOE en la réplica biológica 1.

AMPLICÓN	ENRIQUECIMIENTO
PPO6 AE1	20.31
PPO6 5'A1	8.96
PPO6 5'A2	2.87
PPO6 5'A3	5.61
PPO6 5'A4	3.71
PPO6 5'A5	4.86
PPO6 5'A6	4.47

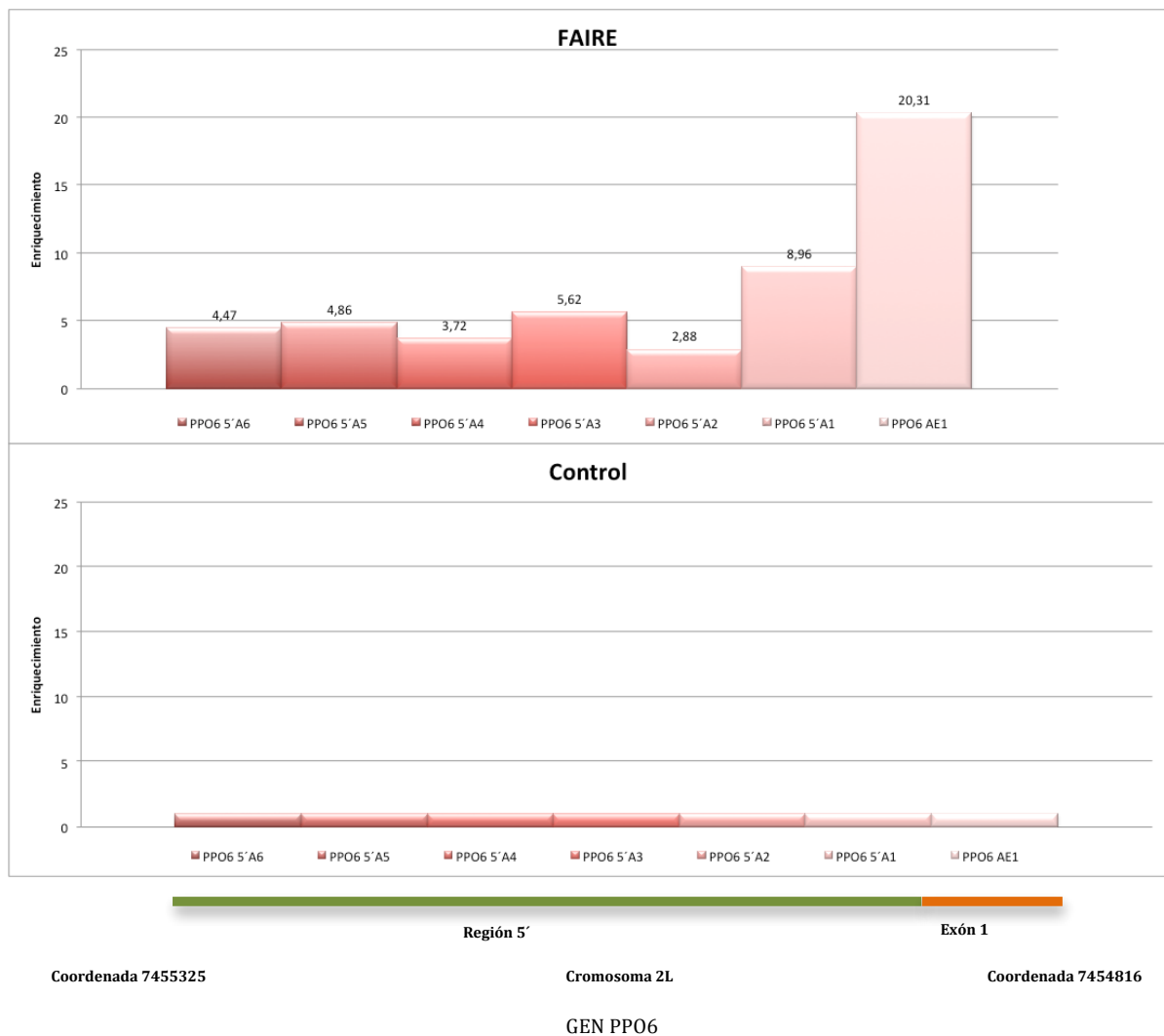


Figura 12. Enriquecimiento de los 7 amplicones del gen de la PPO6 en células estimuladas con 20-HOE.

Réplica biológica 1. Se realizó una qPCR (SYBR Green) para este análisis.

En la tabla 10 y la figura 13 se muestra la comparación del enriquecimiento de una muestra de FAIRE de células no estimuladas y una muestra de FAIRE de células estimuladas con la hormona 20-HOE, donde se puede observar que el enriquecimiento de las muestras de FAIRE con células estimuladas con 20-HOE aumenta casi el doble en comparación con las muestras con células no estimuladas. El aumento en la expresión del gen de la PPO6, genera un aumento en el enriquecimiento de los 7 amplicones analizados.

Tabla 10. Comparación del enriquecimiento de muestras FAIRE en células no estimuladas y estimuladas con la 20-HOE.

AMPLICÓN	ENRIQUECIMIENTO		DIFERENCIA ENTRE MUESTRAS
	Células no estimuladas	Células estimuladas	
PPO6 AE1	13.29	20.31	7.03
PPO6 5'A1	4.23	8.96	4.73
PPO6 5'A2	1.66	2.87	1.21
PPO6 5'A3	3.35	5.61	2.26
PPO6 5'A4	2.24	3.71	1.48
PPO6 5'A5	1.96	4.86	2.90
PPO6 5'A6	2.60	4.47	1.87

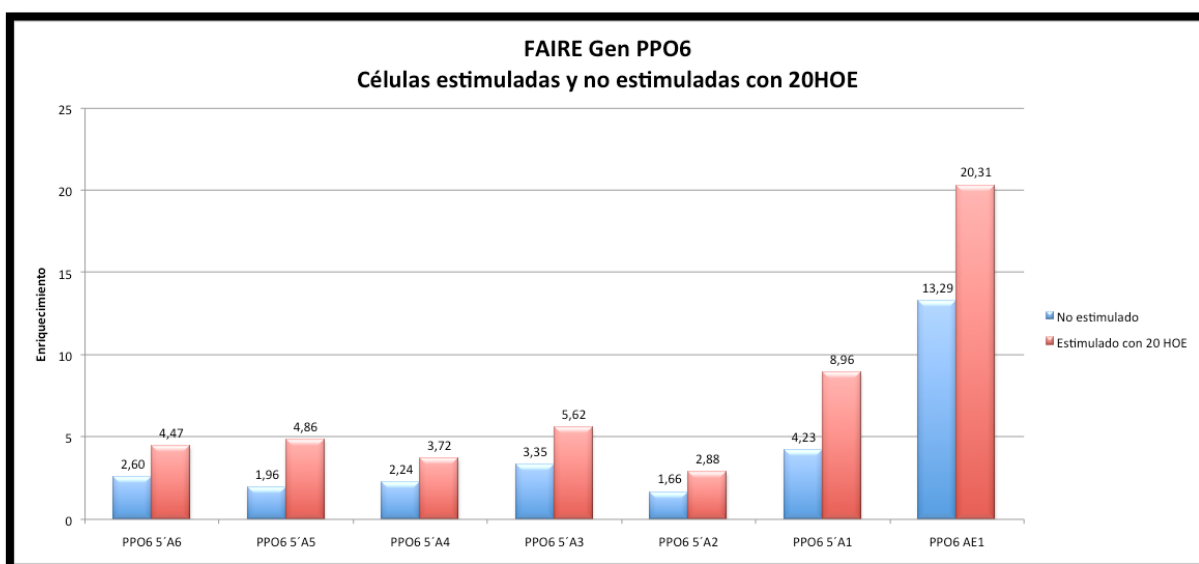


Figura 13. Gráfica de comparación de enriquecimiento de FAIRE de células estimuladas con 20-HOE de los 7 amplicones del gen de la PPO6.

8.5 Ensayos de digestión limitada con DNasa I en células 4a3B.

Los ensayos de digestión limitada con DNasa I se realizaron para comprobar los resultados obtenidos en los ensayos realizados por el método de FAIRE. Las regiones libres de nucleosomas son regiones sensibles a la digestión por la enzima DNasa I.

Para este ensayo se analizó únicamente la región que abarca el amplicón del exón 1 (PPO6 AE1) del gen de la PPO6, ya que éste fue el que tuvo el mayor

enriquecimiento en FAIRE. Como control se utilizó la región abarcada por el amplicón de la región codificante del gen de la defensina 1 (RCA4).

Para el análisis de los resultados se utilizó la fórmula “ $\text{DNasa I/Control} = (2^{(\text{Ct Control} - \text{Ct DNasa I})} \times 100)$ ”. El porcentaje de copias restantes en las muestras tratadas con diferentes concentraciones de DNasa I se obtuvo por qPCR, analizando los resultados con la fórmula. La región que abarca el amplicón PPO6 AE1 mostró sensibilidad a la digestión limitada por DNasa I, ya que el porcentaje de copias restantes de éste en la qPCR fue disminuyendo conforme aumentaba la concentración de esta enzima (Fig. 14), esto se debe a que en este amplicón se encuentra una región libre de nucleosomas, y por esto, es una región sensible a la enzima. La región control que abarca el amplicón RCA4, no mostró sensibilidad a esta enzima, ya que el porcentaje de copias restantes de éste no disminuyó al aumentar las concentraciones de la DNasa I (Fig. 13), esto es debido a que en este amplicón se encuentra una región con nucleosomas, a la cual no puede ingresar la DNasa I y degradar el DNA. En el anexo 5, figura A se muestran los resultados obtenidos en un segundo ensayo.

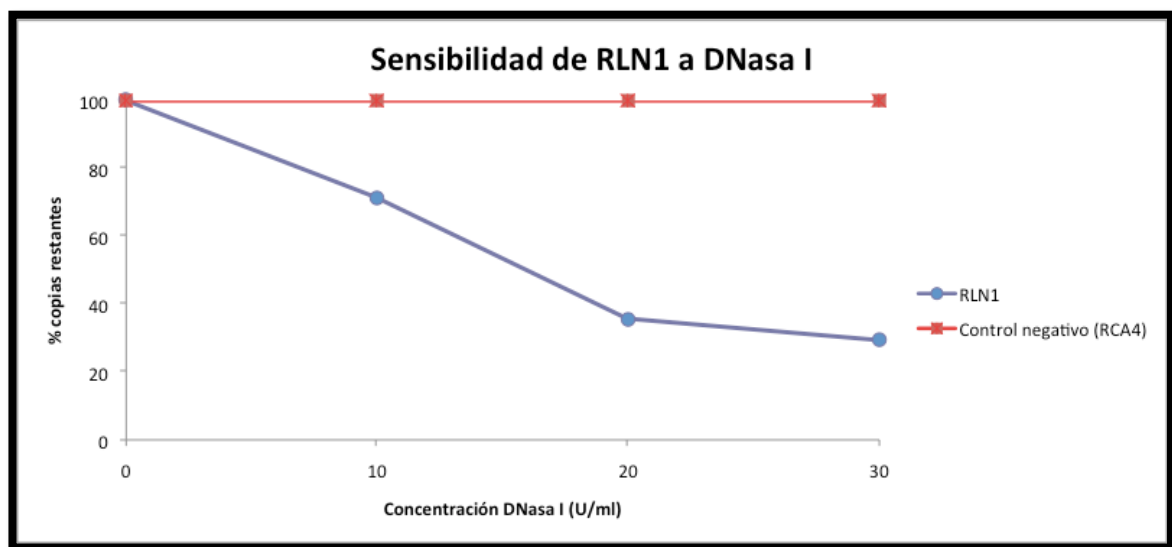


Figura 14. Digestión limitada con DNasa I de RLN1.

Ensayo 1. Para este ensayo se realizó una qPCR (SYBR Green). La muestra se incubó por 5 min con la enzima a 0, 5, 10, 15, 20 y 30 U/ml. La región del amplicón del exón 1 denominada RLN1 del gen de la PPO6 es degradada a diferentes concentraciones de la DNasa I en comparación con el gen control (RCA4) el cual no muestra degradación a ninguna concentración de la enzima.

8.6 Alineamiento de secuencias de elementos de respuesta tipo ISRE en el gen de la PPO1 y tipo EcRE en el gen Fbp1 de *Drosophila melanogaster* con la secuencia del gen de la PPO6.

Posterior al análisis de la cromatina por medio de FAIRE y digestión limitada con DNasa I, se realizó un alineamiento de la región libre de nucleosomas encontrada en este trabajo abarcada por los amplicones PPO6 5'A1 y PPO6 AE1 del gen de la PPO6, con diferentes secuencias de elementos de respuesta encontradas en *An. culicifacies*, *D. melanogaster* y *An. gambiae* (tabla 11). Este alineamiento se realizó debido a que en la región libre de nucleosomas se puede encontrar una región reguladora del gen de la PPO6, la cual contenga elementos de respuesta. Se eligieron los sitios de unión que presentaron mayor similitud con secuencias ubicadas en esta región. Las secuencias seleccionadas fueron el de un elemento de respuesta a ecdisteroides localizado en el gen de la PPO1 de *An. gambiae* y un elemento de respuesta tipo ISRE localizado en el gen Fbp1 de *D. melanogaster* (tabla 12). En la figura 15 se muestra la ubicación de estos elementos en el gen de la PPO6.

Tabla 11. Secuencias de elementos de respuesta de diferentes organismos.

Organismo	Elemento de respuesta tipo	Secuencia
<i>Anopheles gambiae</i>	ISRE	GGAAAAAGAAACG
	kB	GAGGATTTC GGGAGTATTT
	EcRE	GTACCATTGACCT CTAACCATGACCTATGCTTG
<i>Anopheles culicifacies</i>	EcRE	GGTTGAATGCGTTGGT AGTGGTCAGTACT
<i>D. melanogaster</i>	EcRE	AATTCATTCAAC

Tabla 12. Comparación de nucleótidos de elementos de respuesta tipo ISRE en el gen de la PPO1 de *An. gambiae* y tipo EcRE en el gen Fbp1 de *D melanogaster*.

Organismo	Gen	Elemento de respuesta tipo	Secuencia
<i>Anopheles gambiae</i>	PPO1 PPO6	ISRE	GGAAAAAGAAACG GGAAAAACTAACG *****
<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Anopheles gambiae</i>	Fbp1 PPO6	EcRE	AATT-CATTCAAC AATTGCATACAAC *****

* Nucleótidos conservados

— Nucleótidos deletados

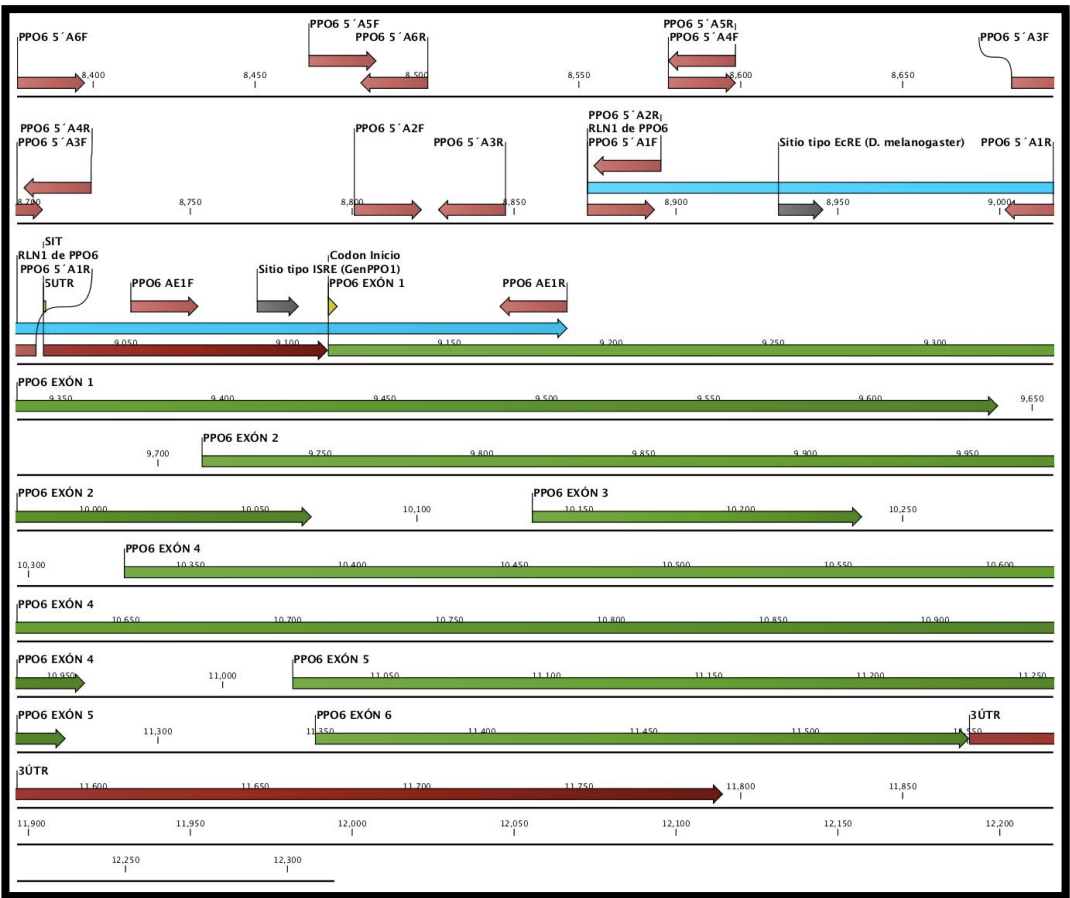


Figura 15. Mapeo de elementos de respuesta en gen de la PPO6.

Oligonucleótidos forwards (flechas rosas en dirección a la derecha), oligonucleótidos reverse (flechas rosas en dirección a la izquierda), exones (flechas verdes), Región libre de nucleosomas (RLN1) (flecha azul), elementos de respuesta tipo EcRE e ISRE (flechas grises). Codón de Inicio (flecha amarilla) 5' UTR y 3' UTR (flechas rojas).

9. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó la estructura de la cromatina de la región río arriba del gen de la PPO6. Los métodos utilizados fueron FAIRE y digestión limitada con DNasa I, los cuales brindan resultados *in vivo* de la estructura de la cromatina, específicamente regiones libres de nucleosomas.

El método de FAIRE para la identificación de regiones libres de nucleosomas es un procedimiento sencillo y fácil, ya que los enlaces que se forman entre el ADN y las proteínas histonas por el formaldehído, es muy fuerte, pudiéndose aislar en la fase acuosa de la extracción fenol/cloroformo regiones libres de nucleosomas como regiones reguladoras. Por esta técnica se han podido identificar regiones libres de nucleosomas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y del *Homo sapiens*, como sitios del inicio de la transcripción y elementos reguladores distales tales como promotores, enhancers y silenciadores (Giresi *et. al.* 2010), en este trabajo se identificó una región libre de nucleosomas ubicada en el cromosoma 2L, en el gen de la PPO6 cuyas coordenadas son 7454836-7455000 y se localiza en la posición -152 a 162 de dicho gen. Esta región se encuentra cubierta por el amplicón PPO6 AE1, donde su enriquecimiento en las 3 réplicas biológicas fue de 13.29, 12.03 y 10.54 respectivamente en comparación con el control por el método de FAIRE (Fig. 10). Por su ubicación, en esta región libre de nucleosomas se podría encontrar una región reguladora del gen tal como su promotor.

El amplicón PPO6 5'A1 con coordenadas 7454930-7455127, tuvo un enriquecimiento en las 3 réplicas biológicas de 4.23, 5.68 y 6.05 respectivamente en comparación con el control (Fig. 10), el cual fue menor comparado con el amplicón PPO6 AE1, pero mayor que los demás amplicones (PPO6 5'A2 al A6). Dado su enriquecimiento, esta región podría contener parte de la región libre de nucleosomas cubierta por el amplicón PPO6 AE1.

El amplicón PPO6 5'A2 con coordenadas 7455109-7455175, tuvo un enriquecimiento en las 3 réplicas biológicas de 1.66, 1.62 y 1.96 respectivamente comparado con el control (Fig. 10). El enriquecimiento de este amplicón no fue significativo en comparación con el amplicón PPO6 AE1 y podría suponerse que en

esa región la cromatina se encuentra relajada, pero no significa que exista una región libre de nucleosomas como tal aunque haya un mínimo enriquecimiento.

Los demás amplicones tuvieron un enriquecimiento en las 3 réplicas biológicas de 3.35, 2.83 y 4.12 para PPO6 5'A3 (coordenadas 7455181-7455303), 2.24, 2.41 y 3.8 para PPO6 5'A4 (coordenadas 7455298-7455424), 1.96, 3.15 y 3.77 para PPO6 5'A5 (coordenadas 7455404-7455519) y 2.60, 3.15 y 3.16 para PPO6 5'A6 (coordenadas 745515-7455605), en comparación con el control (Fig. 10), estos amplicones al igual que el amplicón PPO6 5'A2 se encuentran posiblemente en regiones donde la cromatina se encuentra relajada, más no precisamente en regiones libres de nucleosomas ya que su enriquecimiento en comparación con el amplicón PPO6 AE1 y con el amplicón del gen control (R5'A2) fue mucho menor.

Las regiones utilizadas como control para el experimento de FAIRE, se encuentran ubicadas en el cromosoma 3L, en el gen de la defensina 1, cubiertas por el amplicón 2 de la región 5' de éste (R5'A2) y el amplicón de la región codificante (RCA4) de este mismo gen, con coordenadas 20627551-20627638 y 20628050-20628176 respectivamente. Anteriormente los amplicones fueron analizados por este método, siendo R5'A2 el que obtuvo un mayor enriquecimiento, ya que en esa región se localiza parte de la región I y toda la región II del promotor del gen de la defensina 1, así como dos motivos (NF y C/EBP); por lo cual fue utilizado en este trabajo como control positivo y el RCA4 fue utilizado como control negativo, ya que, por el contrario a R5'A2 se empobreció en comparación con el control. En este amplicón se encuentra la región codificante del gen de la defensina 1 y por lo tanto es una región con nucleosomas (Cabrera, 2012).

Como bien se sabe la hormona 20-HOE regula procesos esenciales en el desarrollo del mosquito como muda, metamorfosis, reproducción y vitelogénesis. En 1999 Müller y colaboradores demostraron en *An. gambiae* que al estimular las células 4a3B con esta hormona los mensajeros de la PPO1, PPO2, PPO3, PPO4 y PPO6 se incrementaron en comparación con el gen de la PPO5 el cual disminuyó. Ese mismo año Ahmed y colaboradores observaron que el mensajero de la PPO1

se incrementó al estimular la misma línea celular con la misma hormona a concentraciones fisiológicas (200nM) y en 1993 se encontró que la transcripción del gen Fbp1 de *D. Melanogaster* es inducido por la 20-HOE (Laval *et. al.*, 1993).

En este trabajo se estimularon células inmunocompetentes (línea celular 4a3B) (Müller *et. al.*, 1999) con la hormona 20-HOE, para determinar la expresión del gen de la PPO6 y demostrar que su expresión aumenta cuando las células son estimuladas con esta hormona. Las células fueron tratadas con la 20-HOE por 16 horas y posterior a esto se determinó la cantidad del mensajero. En células estimuladas el nivel del mensajero aumentó 13.28 veces en comparación con el control (células no estimuladas) (Fig. 11). Se tomó en cuenta otra condición como control, células tratadas con etanol, ya que el etanol puede modificar la expresión de algunos genes como el que codifica para la proteína sinaptotagmina 1 (Syt1) en cultivos de neuronas corticales (Varodayan, *et. al.*, 2012) y en *Drosophila* se vio que la expresión de genes del sistema inmune son regulados por el etanol (Kong *et. al.*, 2010). En este trabajo la expresión del gen en presencia de etanol no fue significativa ya que se vio una disminución en la cantidad del mensajero de 0.38 veces en comparación con el control (Fig. 11). Con estos resultados se demostró que se estimula la transcripción de este gen y por lo tanto se analizó la estructura de la cromatina en células estimuladas.

Al asegurarnos que el nivel de transcripción se incrementaba con la exposición de las células a la 20-HOE, se realizó un FAIRE de células estimuladas. Los 7 amplicones analizados tuvieron un enriquecimiento mayor que en el FAIRE de células no estimuladas (Fig. 12), pero el mayor enriquecimiento se dio de nuevo en los amplicones PPO6 AE1 y PPO6 5'A1. El amplicón PPO6 AE1 tuvo un enriquecimiento en las 2 réplicas biológicas de 20.31 y 19.96 respectivamente en comparación con el control y aumentó en comparación con el enriquecimiento de FAIRE de las células no estimuladas 7.03 veces. El amplicón PPO6 5'A1 enriqueció 4.73 veces en comparación con el enriquecimiento de FAIRE de las células no estimuladas, su enriquecimiento en las 2 réplicas biológicas fue de 8.95 y 8.95 respectivamente en comparación con el control. Los demás amplicones PPO6 5'A3, PPO6 5'A4, PPO6 5'A5 y PPO6 5'A6 tuvieron un enriquecimiento de 1.21, 2.26, 1.48, 2.9 y 1.87 veces respectivamente en comparación con el FAIRE de células no estimuladas (Fig 12). Lo que sugiere que cuando hay un incremento

en la expresión del gen de la PPO6 en células 4a3B estimuladas con 20-HOE, el enriquecimiento en FAIRE aumenta en comparación con células que no son estimuladas, lo cual podría deberse a un cambio en la estructura de la cromatina, en el caso de las regiones abarcadas por los amplicones PPO6 AE1 y PPO6 5'A1; y una relajación adicional en la cromatina de la región 5' del gen abarcada en los amplicones PPO6 5'A2 al PPO6 5'A6. La figura 16 es una representación de lo que podría estar pasando con la estructura de la cromatina al estimular las células 4a3B con 20-HOE.

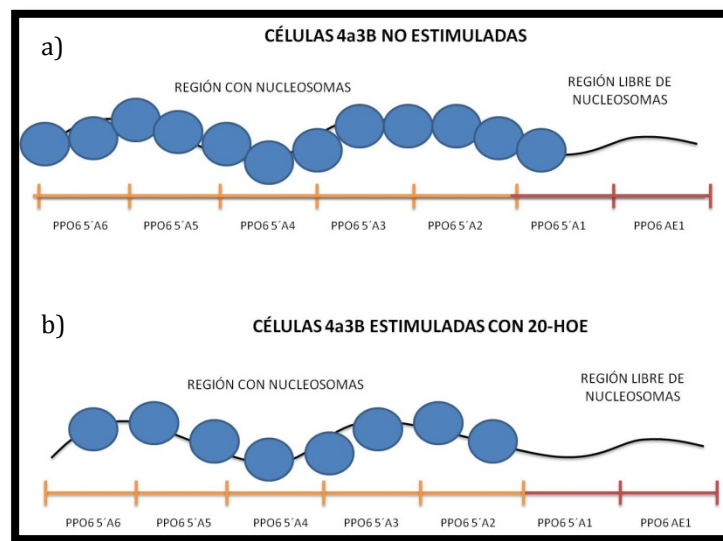


Figura 16. Representación de la estructura de la cromatina al estimular células 4a3B con la hormona 20-HOE.

a) Región de 800 pb analizadas donde se observa una región con nucleosomas (amplicones PPO6 5'A6 a A2) y una región libre de nucleosomas (parte del amplicón PPO6 5'A1 y amplicón PPO6 AE1) y b) Misma región donde la cromatina se encuentra relajada.

En *D. melanogaster* los promotores y enhancers de genes que codifican para péptidos antimicrobianos (AMPs) y otros genes, contienen sitios de unión tipo κ B para Dorsal, Dif y Relish; así como también el motivo R1. El elemento R1 y el sitio tipo κ B regulan independientemente la expresión de la CecropinaA a través de diferentes factores de transcripción al ser inducidos por un reto inmunológico. El gen *Fbp1* contiene en su enhancer sitios de unión a receptores de respuesta a ecdisona (Brodu *et. al.*, 1999; Ganesan *et. al.*, 2011). En 1999 Ahmed y colaboradores demostraron que la PPO1 de *An. gambiae* es regulada por estímulos hormonales (20-HOE) a través de elementos de respuesta a

ecdisteroides presentes en su región promotora. Por lo que el ensayo de FAIRE en células estimuladas con 20-HOE en este trabajo nos puede indicar que en la región cubierta por el amplicón PPO6 AE1 y parte del amplicón PPO6 5'A1, se puede localizar una región de ADN a la cual se unen receptores de la hormona 20-HOE, ya que en la región que abarca el amplicón del exón 1 (PPO6 AE1) se encuentran secuencias similares (tabla 12) a elementos de respuesta encontrados en el gen *Fbp1* de *D. melanogaster* y en el gen de la PPO1 de *An. gambiae*. Las secuencias encontradas en *D. melanogaster* corresponden a un elemento de respuesta a ecdisteroides y la que se localiza en el gen de la PPO1 a un sitio tipo ISRE. El elemento tipo EcRE se localiza en la posición 4 y el de tipo ISRE se localizan en la posición 66 del gen de la PPO6.

Los ensayos de digestión limitada por DNasa I son útiles para la identificación de regiones libres de nucleosomas, como regiones reguladoras. Por ejemplo, se han identificado enhancers y promotores en los genes *GATA1*, tanto en ratón como en humano, así como regiones reguladoras de locus (LCRs) de la β -globina y el promotor de la ϵ -globina por medio de esta técnica (McArthur *et. al.*, 2001 y Valverde-Garduño, *et. al.*, 2004).

Para corroborar lo encontrado por FAIRE se utilizó un método independiente, el ensayo de digestión limitada por DNasa I, el cual fue estandarizado en este trabajo para la línea celular tipo hemocito 4a3B. Esta estandarización consistió en la modificación de las condiciones y concentraciones de los buffers y reactivos utilizados (Tabla 5). Parte importante de esta estandarización fue determinar la concentración correcta del detergente NP-40 y el tiempo de incubación para la obtención de núcleos intactos, al igual que la concentración y tiempo de incubación de estos núcleos con la enzima DNasa I. Con este ensayo únicamente se analizó la región cubierta por el amplicón PPO6 AE1, región que fue determinada como libre de nucleosomas por el método de FAIRE. Las concentraciones de DNasa I utilizadas fueron 0, 10, 20, 30 y 40 U/ml. Los resultados obtenidos mostraron una degradación del amplicón. Conforme aumentaba la concentración de la DNasa I, el porcentaje de copias restantes en la muestra detectadas por qPCR iba disminuyendo (Fig. 14), por lo tanto esta región es un sitio denominado “sitio hipersensible a DNasa I”. Cuando la digestión es

limitada, se puede observar un patrón de degradación donde el porcentaje de las regiones libres de nucleosomas va disminuyendo en comparación con las regiones con nucleosomas (que no degrada la enzima). En el segundo ensayo se muestra un patrón diferente a 40 U/ml, este cambio podría deberse a que hay un exceso de la enzima en la muestra, por lo tanto, la digestión deja de ser limitada y la DNasa I empieza a digerir no solo ADN que se localiza en regiones libres de nucleosomas sino también regiones de ADN que se encuentran entre los nucleosomas, como resultado de esta digestión el porcentaje de regiones libres de nucleosomas es el mismo que el de las regiones donde se encuentran nucleosomas las cuales fueron degradadas por el exceso de enzima en la muestra (Sabo *et. al.*, 2006).

La región control que se utilizó para este ensayo se encuentra localizada en el cromosoma 3L, cubierta por el amplicón RCA4 del gen de la defensina 1. Este amplicón control mostró un patrón totalmente contrario al del amplicón PPO6 AE1 del gen de la PPO6, ya que éste no mostró degradación a ninguna concentración de la DNasa I mediante qPCR (Fig. 14 y Fig. A, antexo 5). Como se ha mencionado anteriormente la región de este amplicón es una región que contiene nucleosomas por lo que la enzima DNasa I no puede acceder al ADN y cortarlo.

Los resultados anteriores confirman que la región de ADN que abarca el amplicón PPO6 AE1, es una región libre de nucleosomas, por lo tanto una región reguladora del gen de la PPO6. En este ensayo, esta región fue denominada como RLN1 (Región Libre de Nucleosomas 1).

10. CONCLUSIONES

La identificación de sitios reguladores y sitios de unión a proteínas reguladoras en el genoma *in vivo*, es esencial para entender el funcionamiento del genoma en los organismos. En este trabajo se localizó una región libre de nucleosomas ubicada en la posición -152 a 162 del gen de la PPO6, por dos técnicas, FAIRE y digestión limitada con DNasa I, la cual podría ser una región reguladora de este gen. En dicha región se encontraron secuencias similares a un elemento de respuesta tipo ISRE y tipo EcRE, ubicados en la posición 4 y 66. El mapeo de regiones reguladoras activas en *An. gambiae* permitirá una mejor comprensión de cómo ocurre la interacción entre elementos y proteínas reguladoras; así como la función que tiene la estructura de la cromatina en la regulación de los genes en un determinado entorno celular.

11. PERSPECTIVAS

Para caracterizar con más detalle la región libre de nucleosomas (RNL 1) encontrada en el gen de la PPO6 se sugiere realizar los siguientes ensayos:

- Ensayos de retardamiento, los cuales sirven para estudiar las interacciones entre proteínas y regiones específicas de ADN. Por lo tanto, con este ensayo, se determinaría si los elementos de respuesta encontrados en esta región (tipo EcRE e ISRE) se unen proteínas tanto en células estimuladas con la hormona 20-HOE y en células no estimuladas.
- Ensayos de reportero. Estos ensayos identifican regiones reguladoras como promotores, al analizar la región RLN 1 encontrada en este trabajo, se podría determinar si se localiza el promotor del gen de la PPO6 así como determinar si el elemento de respuesta a EcRE es funcional.

12. ANEXOS

12.1 Anexo 1

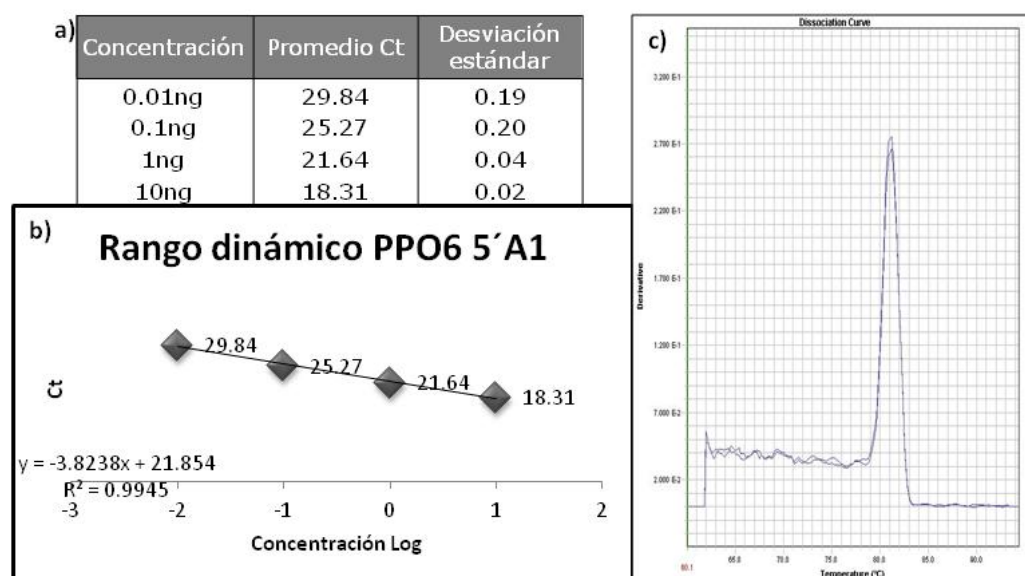


Figura A. Rango dinámico del amplicón 1 región no codificante.

Se realizó una qPCR (SYBR Green) para obtener los rangos dinámicos y las curvas de disociación.

a) Tabla con las concentraciones de ADN utilizadas, el promedio de los Cts y su desviación estándar, b) Gráfica del rango dinámico a diferentes concentraciones y c) Curva de disociación.

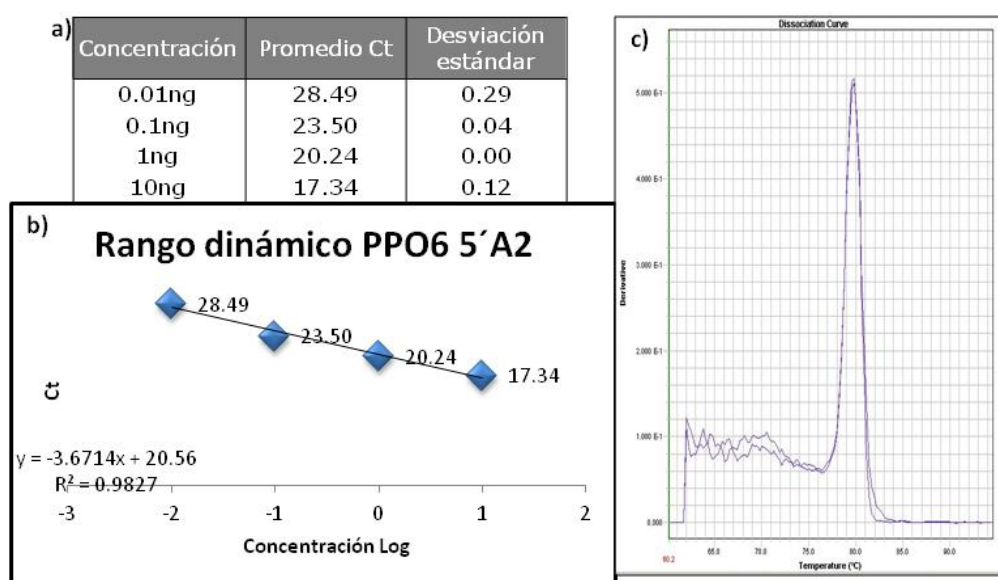


Figura B. Rango dinámico del amplicón 2 región no codificante.

Se realizó una qPCR (SYBR Green) para obtener los rangos dinámicos y las curvas de disociación.

a) Tabla con las concentraciones de ADN utilizadas, el promedio de los Cts y su desviación estándar, b) Gráfica del rango dinámico a diferentes concentraciones y c) Curva de disociación.

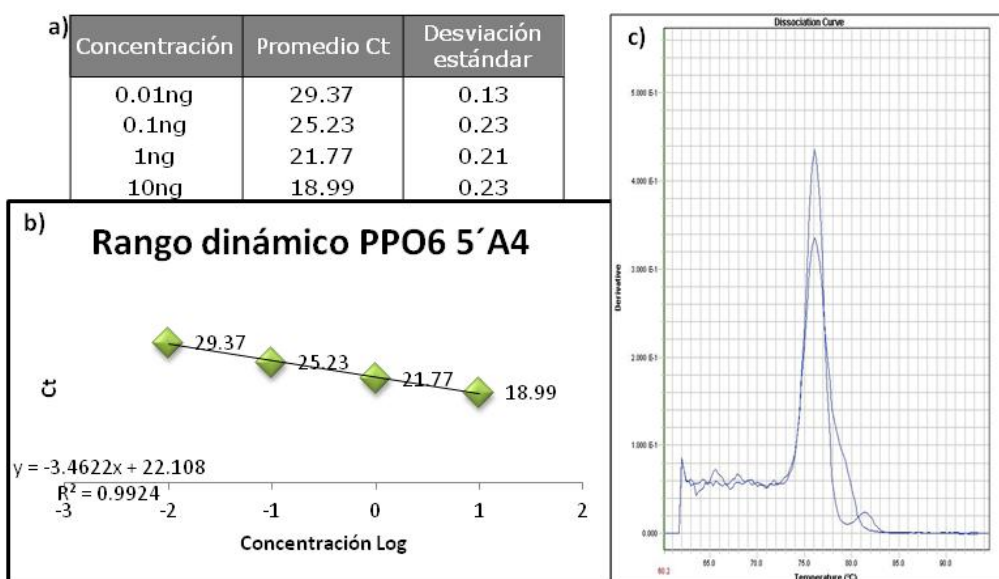


Figura C. Rango dinámico del amplicón 4 región no codificante.

Se realizó una qPCR (SYBR Green) para obtener los rangos dinámicos y las curvas de disociación.

a) Tabla con las concentraciones de ADN utilizadas, el promedio de los Cts y su desviación estándar, b) Gráfica del rango dinámico a diferentes concentraciones y c) Curva de disociación.

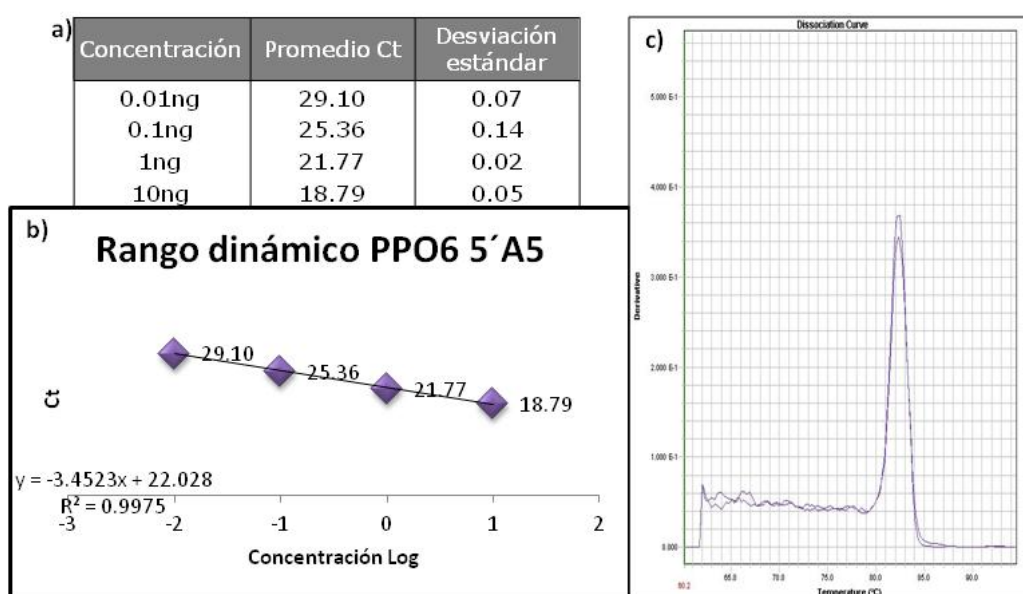


Figura D. Rango dinámico del amplicón 5 región no codificante.

Se realizó una qPCR (SYBR Green) para obtener los rangos dinámicos y las curvas de disociación.

a) Tabla con las concentraciones de ADN utilizadas, el promedio de los Cts y su desviación estándar, b) Gráfica del rango dinámico a diferentes concentraciones y c) Curva de disociación.

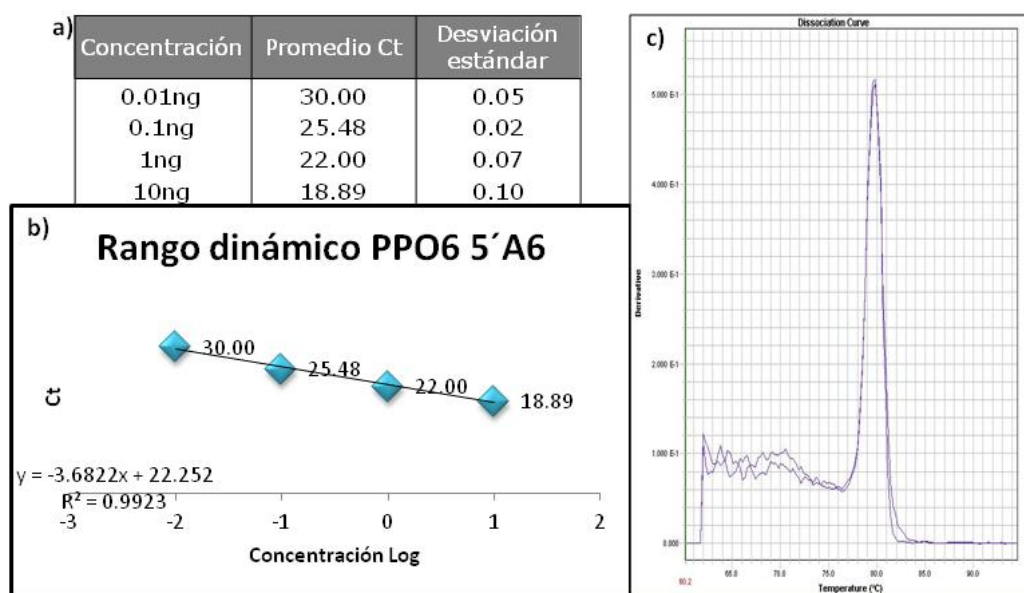


Figura E. Rango dinámico del amplicón 6 región no codificante.

Se realizó una qPCR (SYBR Green) para obtener los rangos dinámicos y las curvas de disociación.

a) Tabla con las concentraciones de ADN utilizadas, el promedio de los Cts y su desviación estándar, b) Gráfica del rango dinámico a diferentes concentraciones y c) Curva de disociación.

12.2 Anexo 2

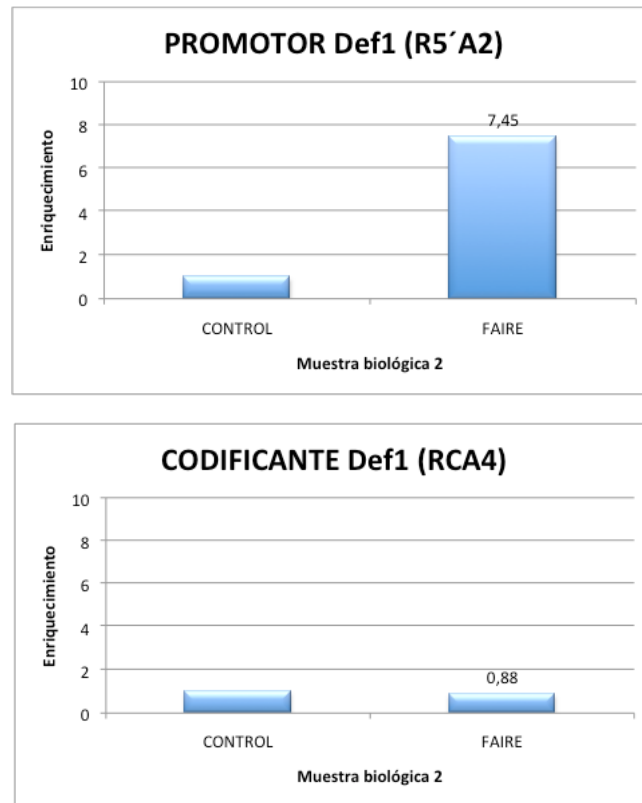


Figura A. Enriquecimiento de los controles.

Réplica biológica 2. Se realizó una qPCR (SYBR Green). Gráfica de arriba amplicón de la región promotora del gen Def1- enriquecimiento 7.45 veces. Gráfica de abajo amplicón de la región codificante del gen Def1- empobrecimiento 1.13 veces (se sacó el inverso de 0.88).

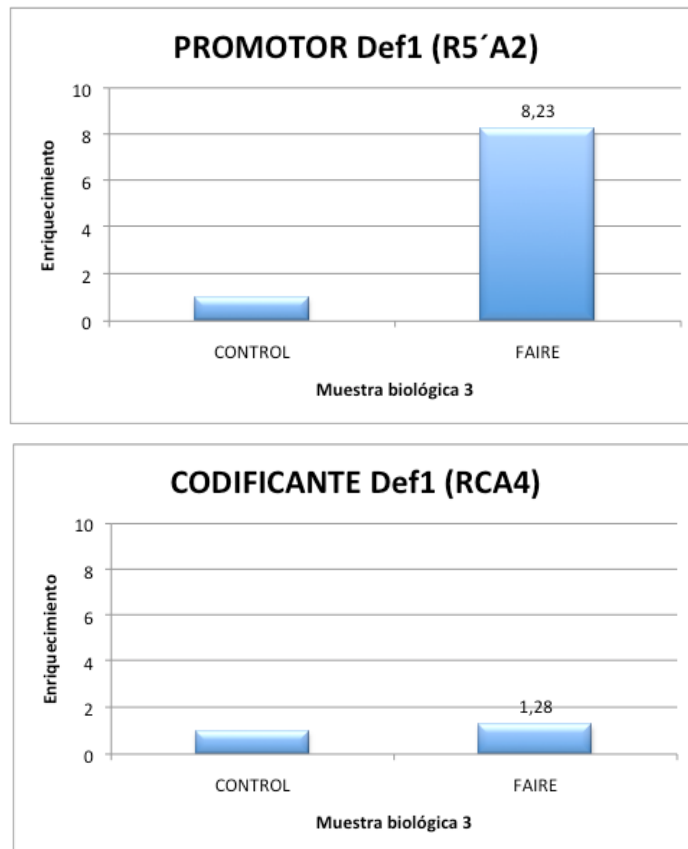


Figura B. Enriquecimiento de los controles.

Réplica biológica 3. Se realizó una qPCR (SYBR Green). Gráfica de arriba amplicón de la región promotora del gen Def1- enriquecimiento 8.23 veces. Gráfica de abajo amplicón de la región codificante del gen Def1- empobrecimiento 0.78 veces (se sacó el inverso de 1.28).

Tabla A. Enriquecimiento de los 7 amplicones del gen PPO6 en la réplica biológica 2.

AMPLICÓN	ENRIQUECIMIENTO
PPO6 AE1	12.03
PPO6 5'A1	5.68
PPO6 5'A2	1.62
PPO6 5'A3	2.83
PPO6 5'A4	3.41
PPO6 5'A5	3.15
PPO6 5'A6	3.15

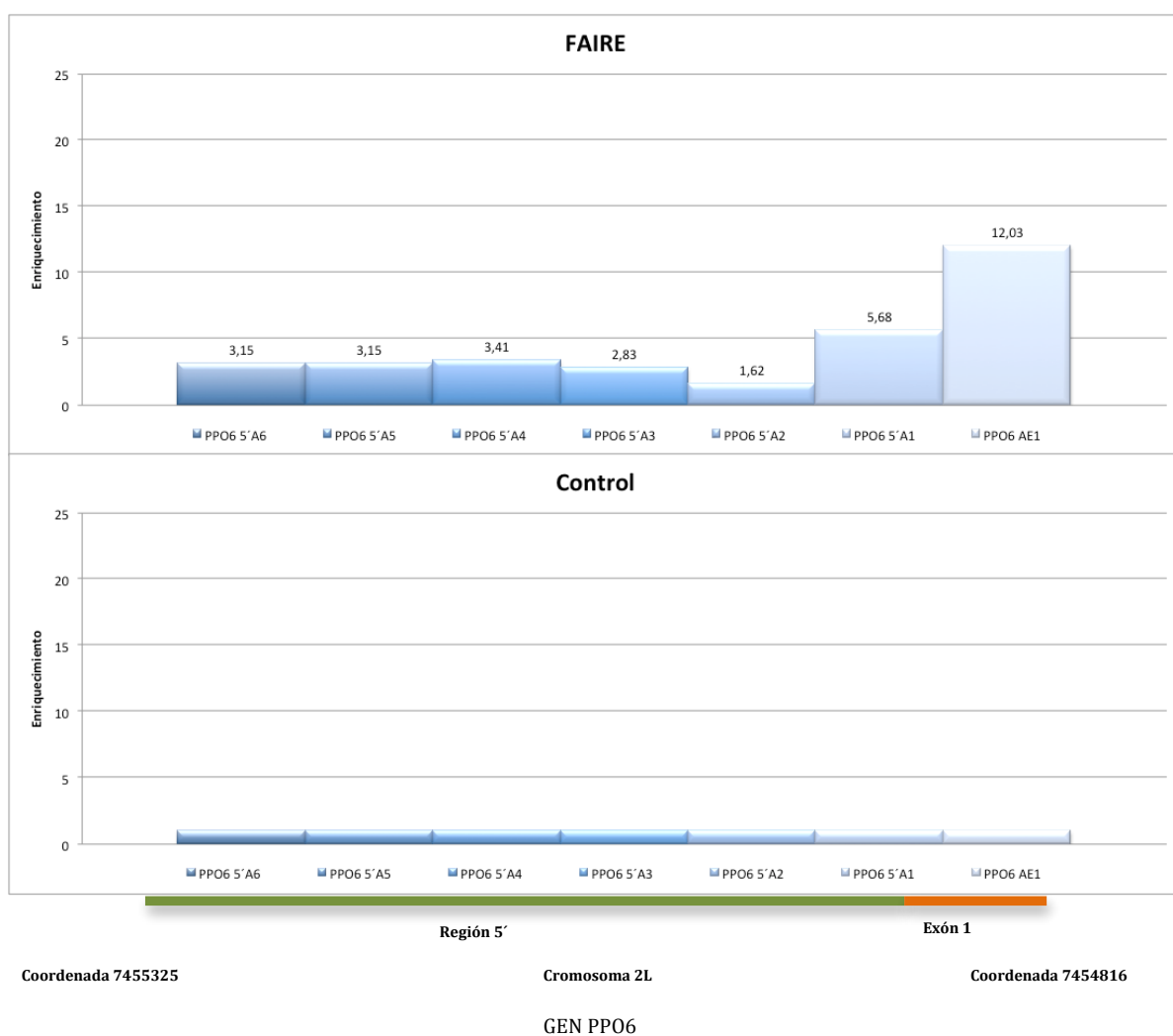


Figura C. Enriquecimiento de los 7 amplicones del gen de la PPO6.

Réplica biológica 2. Se realizó una qPCR (SYBR Green) para este análisis.

Tabla B. Enriquecimiento de los 7 amplicones del gen PPO6 en la réplica biológica 3.

AMPLICÓN	ENRIQUECIMIENTO
PPO6 AE1	10.54
PPO6 5'A1	6.05
PPO6 5'A2	1.96
PPO6 5'A3	4.12
PPO6 5'A4	3.80
PPO6 5'A5	3.77
PPO6 5'A6	3.16

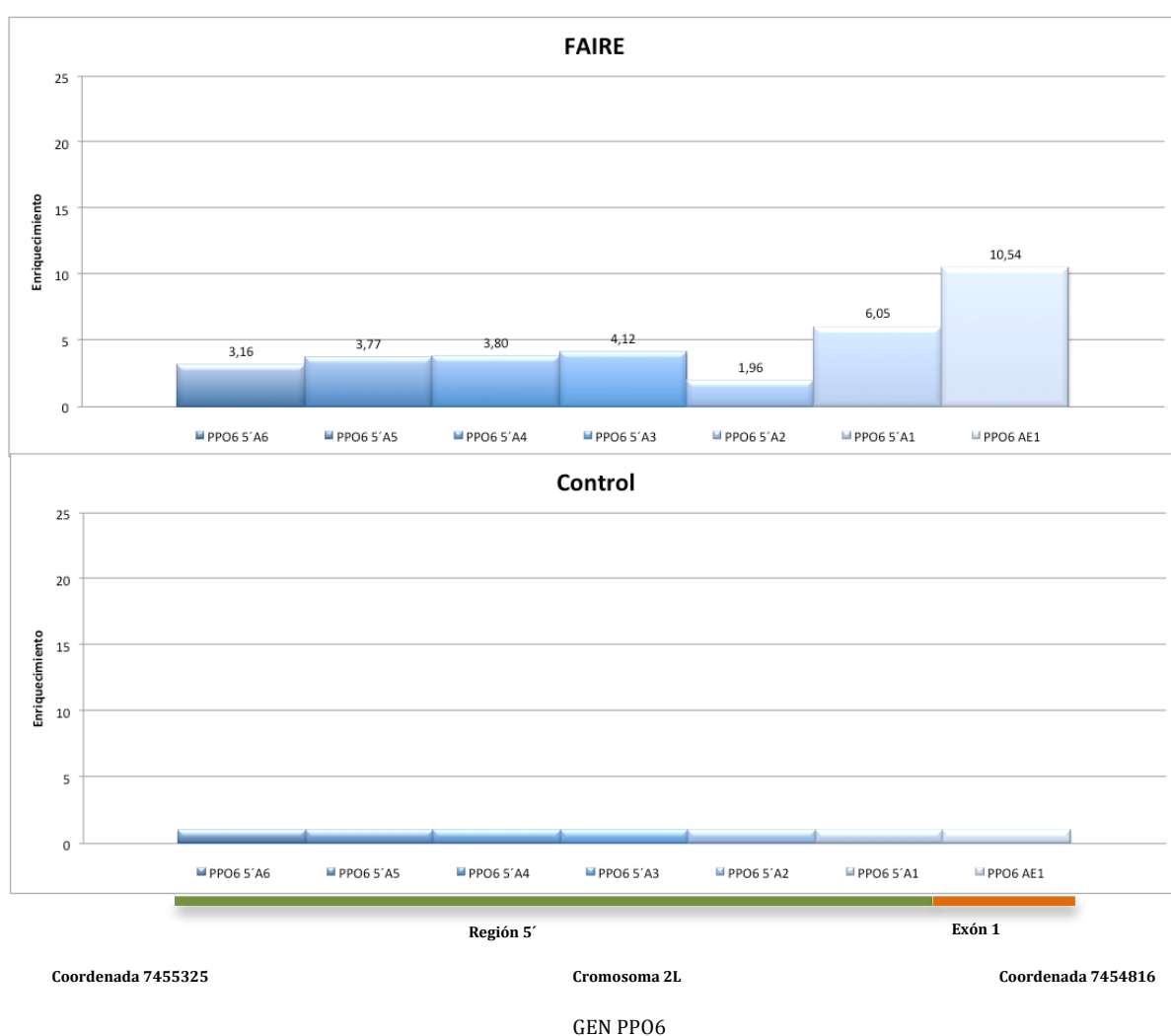


Figura D. Enriquecimiento de los 7 amplicones del gen de la PPO6.
 Réplica biológica 3. Se realizó una qPCR (SYBR Green) para este análisis.

12.3 Anexo 3

Tabla A. Oligonucleótidos diseñados para el mensajero del gen de la PPO6

Nombre	Oligos región codificante PPO6		TM	Longitud	Tamaño Amplicón
PPO6 mRNF	GACGGTCATTCCAAAGCTTCGAGA	Fwd	59.1	24	126
PPO6 mRNAR	AAGTAGGCCAACCGCTGTTCAT	Rev	59.1	24	



Figura A. Amplicón del mensajero del gen de la PPO6.

El producto generado por PCR punto final, se corrió en un gel de agarosa (1.5%). De izquierda a derecha: pozo 1- marcador molecular (1Kb), pozo 2- NTC, pozo 3- Control negativo y pozo 4- amplicón del mensajero del gen de la PPO6 (126pb).

a)

Diluciones cDNA	Gen s7		Gen PPO6	
	Promedio Ct	Desviación estándar	Promedio Ct	Desviación estándar
1:16	18.83	0.09	34.32	0.12
1:8	17.74	0.07	32.34	0.03
1:4	16.71	0.25	31.31	0.05
1:2	15.81	0.27	30.79	0.03

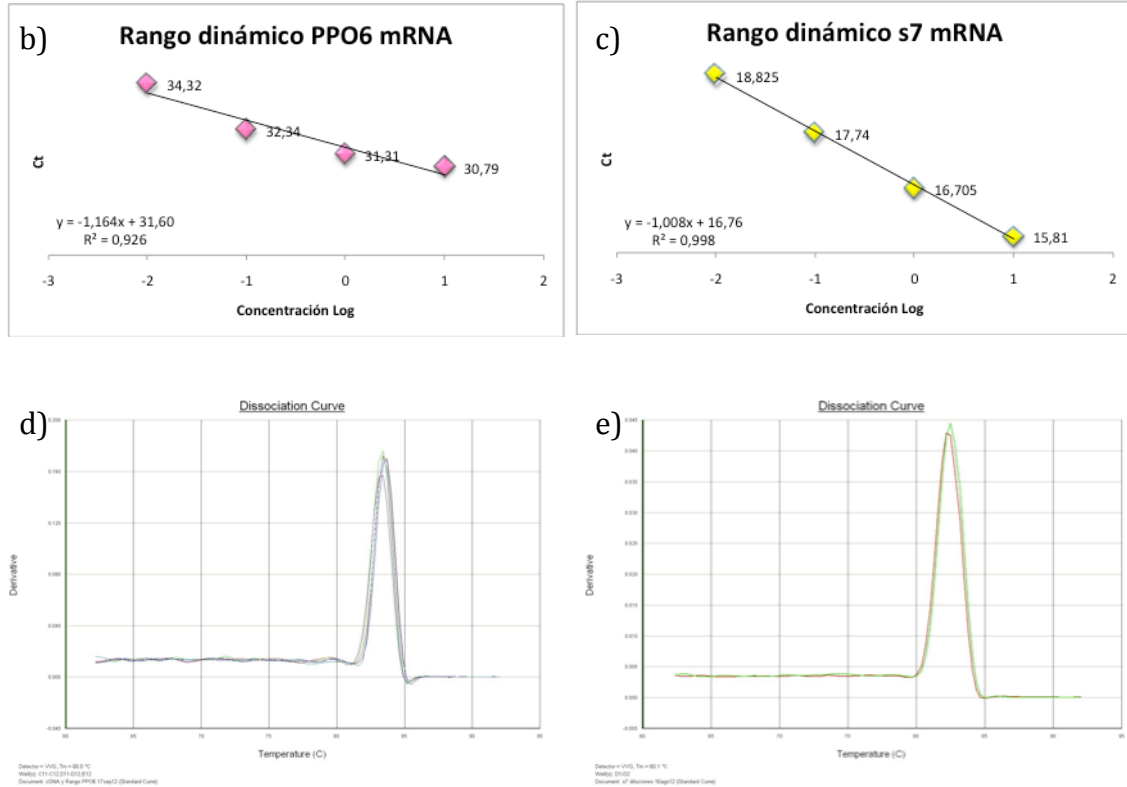


Figura B. Rangos dinámicos con cDNA de los genes s7 y PPO6.

Se realizó un RT-PCR para obtener el cDNA de ambos genes. Se realizó una qPCR (SYBR Green) para obtener los rangos dinámicos y las curvas de disociación. a) Tabla con diferentes diluciones de cDNA, el promedio de los Cts y su desviación estándar de cada gen, b) Gráfica del rango dinámico del gen de la PPO6, c) Gráfica del rango dinámico del gen s7, d) Curva de disociación del gen de la PPO6 y e) Curva de disociación del gen s7.

12.4 Anexo 4

Tabla A. Enriquecimiento de los 7 amplicones del gen de la PPO6 en células estimuladas con 20-HOE en la réplica biológica 2.

AMPLICÓN	ENRIQUECIMIENTO
PPO6 AE1	19.96
PPO6 5'A1	8.95
PPO6 5'A2	2.65
PPO6 5'A3	6.85
PPO6 5'A4	4.10
PPO6 5'A5	4.96
PPO6 5'A6	3.78

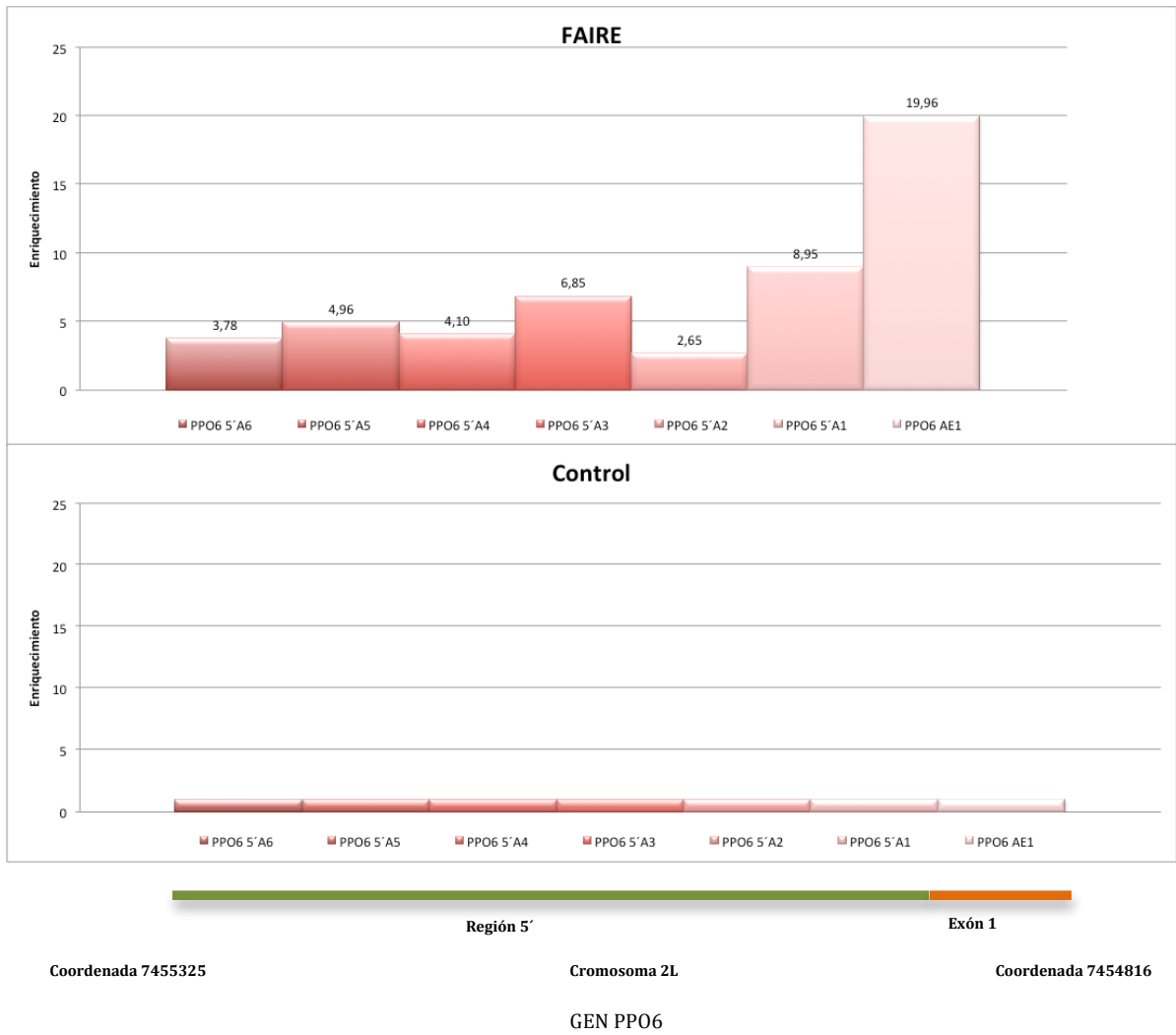


Figura A. Enriquecimiento de los 7 amplicones del gen de la PPO6 en células estimuladas con 20-HOE.

Réplica biológica 2. Se realizó una qPCR (SYBR Green) para este análisis.

12.5 Anexo 5

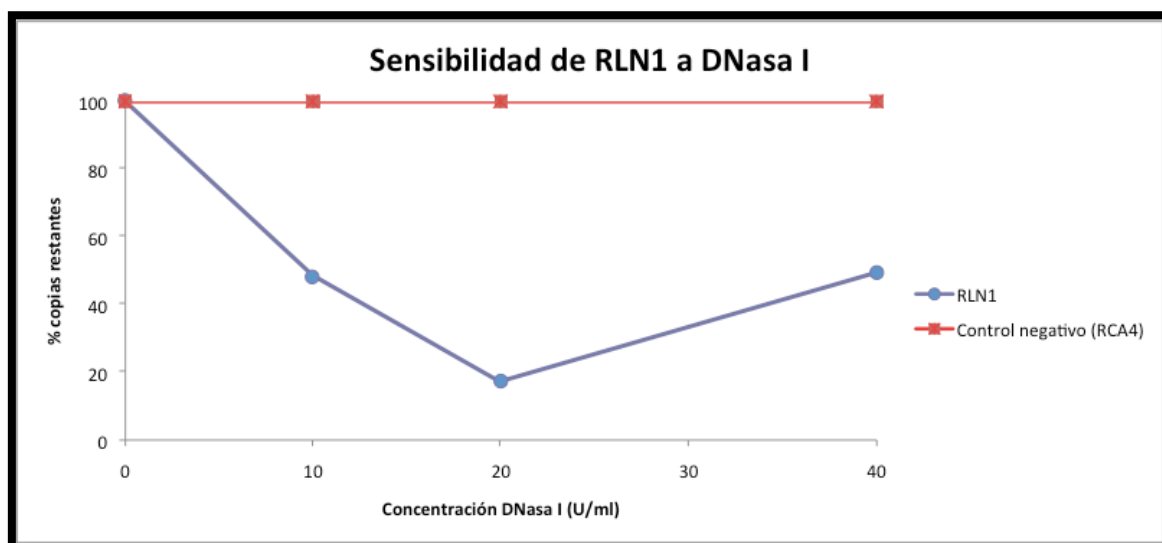


Figura A. Digestión limitada con DNasa I de RLN1.

Ensayo 2. Para este ensayo se realizó una qPCR (SYBR Green). La muestra se incubó por 5 min. con la enzima a 0, 5, 10, 15, 20 y 30 U/ml. La región del amplicón del exón 1 denominada RNL1 del gen de la PPO6 es degradada a diferentes concentraciones de la DNasa I en comparación con el gen control (RCA4) el cual no muestra degradación a ninguna concentración de la enzima. En la región analizada del gen de la PPO6 el patrón de sensibilidad para las concentraciones 0, 10 y 20 U/ml es similar al patrón observado en el primer ensayo, sin embargo, a 40 U/ml el patrón cambia, debido a que la digestión dejó de ser limitada por un exceso de enzima.

13. GLOSARIO

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
20-HOE	20 hidroxiecdisona
3C	Conformación del Cromosoma
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Péptido antimicrobiano
ATP	Adenosín trifosfato
CEC	Cecropina
ChIP	Inmunoprecipitación de Cromatina
CLIPs	Dominios Clips de las serina proteasas
Def1	Defensina 1
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
EcREs	Elementos de Respuesta a Ecdisteroides
AaEcRE/AaUSP	Heterodímero formado por el receptor a ecdisteroides y el complejo ultraespiráculo
FAIRE	Aislamiento de Regiones Reguladoras Asistida por Formaldehído
Fbp1	Gen de la proteína 1 del cuerpo graso de <i>D. melanogaster</i>
Fwd	Forward
GAM	Gambicina
GNBPs	Proteínas de unión a Gram negativos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
IMD	Vía de inmunodeficiencia
ISRE	Elementos putativos de respuesta estimulados por IFN
Kb	Kilobase
LCRs	Regiones Reguladoras de Locus
M	Molar
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PGRP	Proteínas de Reconocimiento de Péptidoglicano
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PO	Fenoloxidasa
PPO	Profenoloxidasa
PRRs	Receptores de Reconocimiento de Patrones
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
Rev	Reverse
RLN1	Región Libre de Nucleosomas 1
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa
Rxn	Reacción
SFB	Suero Fetal Bovino
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNRPs	Serpinas
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
U	Unidad
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
µl	Microlitros

14. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed A, Martín D, Manetti AG, Han SJ, Lee WJ, Mathiopoulos KD, Müller HM, Kafatos FC, Raikhel A, Brey PT. Genomic structure and ecdysone regulation of the prophenoloxidase 1 gene in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 21; 96:14795-800.
- Applied Biosystems. [sitio de Internet]. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System User Guide 2001 [consultado 2011 oct 22]. Disponible en: http://openwetware.org/images/9/93/ABI_Prism_7900HT_User_Guide.pdf
- Baton LA, Robertson A, Warr E, Strand MR y Dimopoulos G. Genome-wide transcriptomic profiling of *Anopheles gambiae* hemocytes reveals pathogen-specific signatures upon bacterial Challenger and *Plasmodium berhei* infection. *BMC Genomics* 2009; 10: 1-13.
- Beier JC. Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 1998; 43:519-543.
- Boyle AP, Davis S, Shulha HP, Meltzer P, Margulies EH, Weng Z, Furey TS, Crawford GE. High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. *Cell*. 2008; 132:311-22.
- Brodu V, Mugat B, Roignant JY, Lepesant JA, Antoniewski C. Dual requirement for the EcR/USP nuclear receptor and the dGATAb factor in an ecdysone response in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*. 1999; 19:5732-42
- Cabrera A. Estandarización de un método para el aislamiento de regiones reguladoras en *cis*, presentes en la cromatina de una línea celular tipo hemocito derivada de *Anopheles gambiae*. Cuernavaca, Morelos. Instituto Nacional de Salud Pública, 2012.
- Carlton JM, Sina BJ, Adams JH. Why is *Plasmodium vivax* a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5:e1160
- Castillo JC, Robertson AE y Strand MR. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insecto Biochem Mol Biol*. 2006; 36:891-903.
- CENAPRECE. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. [sitio de internet]. Programa de acción específico: Informe de Rendición de Cuentas 2006-2012 [consultado 2013 feb 19]. Disponible en: http://www.salud.gob.mx/cdi/pot/2012/fXV/Informes/IRC_CENAPRECE_3.pdf
- CENAVECE. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades [sitio de internet]. Programa de acción específico 2007-2012. Otras enfermedades transmitidas por vector [consultado 2013 feb 25]. Disponible en: <http://www.cenavece.salud.gob.mx/descargas/pdf/etv.pdf>
- Cortazar MA y Silva RE. Métodos físico-químicos en biotecnología [sitio de internet] "PCR" [consultado 2011 oct 19]. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
- Cox FEG. History of Human Parasitology. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 2002: 595–612.
- Dimopoulos G, Christophides GK, Meister S, Schultz J, White KP, Barillas-Mury C y Kafatos FC. Genome expresión análisis of *Anopheles gambiae*: Responses to injury, bacterial Challenger, and malaria infection. *PNAS* 2002; 99: 8814-8819.

- Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E, Dimopoulos G. Anopheles gambiae Immune Responses to Human and Rodent Plasmodium Parasite Species. PLoS Pathogens 2006; 2: 513-525.
- Dorschner MO, Hawrylycz M, Humbert R, Wallace JC, Shafer A, Kawamoto J, Mack J, Hall R, Goldy J, Sabo PJ, Kohli A, Li Q, McArthur M, Stamatoyannopoulos JA. High-throughput localization of functional elements by quantitative chromatin profiling. Nat Methods. 2004; 1:219-25
- Escalante AA., Freeland DE, Collins WE y Lal AA. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. PNAS 1998; 95: 8124-8129.
- Feachem GA, Phillips A, Hwang J, Cotter C, Wielgosz B, Greenwood BM, Sabot O, Rodriguez MH, Abeyasinghe RR, Adhanom GT, and Snow RW. Shrinking the malaria map: progress and prospects. Lancet. 2010; 376: 1566–1578.
- Fumadó V, Pou J y Jiménez R. Malaria importada en la infancia (1993-1998). An Esp Pediatr 2000; 52: 305-308.
- Ganesan S, Aggarwal K, Paquette N, Silverman N. NF- κ B/Rel proteins and the humoral immune responses of Drosophila melanogaster. Curr Top Microbiol Immunol. 2011; 349:25-60
- García F, Aguilar P, Celma AB, Lanz H, del Río I, Hernández F. Identificación y caracterización parcial del gen de la enzima profenoloxidasas en *Dactylopius coccus*. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*. 2002; 2: 12-17
- Garnham, PCC. Malaria parasites and other haemosporidia. Londres: Blackwell Scientific Publications 1966.
- Giresi PG, Lieb JD. Isolation of active regulatory elements from eukaryotic chromatin using FAIRE (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements). Methods. 2009; 3:233-9.
- González-Cerón L, Alvarado-Delgado A, Martínez J, Rodríguez MH, Ovilla-Muñoz, Pérez F, et. al. Sequence variation of ookinete surface proteins Pvs25 y Pvs28 of Plasmodium vivax isolates from Southern Mexico and their association to local anophelines infectivity. Infection, Genetics and Evolution 2010; 10: 645-654.
- Harris C, Lamberechts L, Rousset F, Abate L, Nsango SE, Fontenille D, Moralis I, Cohuet A. Polymorphisms in Anopheles gambiae Immune Genes Associated with Natural Resistance to Plasmodium falciparum. PLoS Pathog 2010; 6: 1-12.
- Hesselberth JR, Chen X, Zhang Z, Sabo PJ, Sandstrom R, Reynolds AP, Thurman RE, Neph S, Kuehn MS, Noble WS, Fields S, Stamatoyannopoulos JA. Global mapping of protein-ADN interactions in vivo by digital genomic footprinting. Nat Methods. 2009; 6:283.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JM, Wides R, Salzberg SL, Loftus B, Yandell M, Majoros WH, Rusch DB, Lai Z, Kraft CL, Abril JF, Anthouard V, Arensburger P, Atkinson PW, Baden H, de Berardinis V, Baldwin D, Benes V, Biedler J, Blass C, Bolanos R, Boscus D, Barnstead M, Cai S, Center A, Chaturverdi K, Christophides GK, Chrystal MA, Clamp M, Cravchik A, Curwen V, Dana A, Delcher A, Dew I, Evans CA, Flanagan M, Grundschober-Freimoser A, Friedli L, Gu Z, Guan P, Guigo R, Hillenmeyer ME, Hladun SL, Hogan JR, Hong YS, Hoover J, Jaillon O, Ke Z, Kodira C, Kokoza E, Koutsos A, Letunic I, Levitsky A, Liang Y, Lin JJ, Lobo NF, Lopez JR, Malek JA,

- McIntosh TC, Meister S, Miller J, Mobarry C, Mongin E, Murphy SD, O'Brochta DA, Pfannkoch C, Qi R, Regier MA, Remington K, Shao H, Sharakhova MV, Sitter CD, Shetty J, Smith TJ, Strong R, Sun J, Thomasova D, Ton LQ, Topalis P, Tu Z, Unger MF, Walenz B, Wang A, Wang J, Wang M, Wang X, Woodford KJ, Wortman JR, Wu M, Yao A, Zdobnov EM, Zhang H, Zhao Q, Zhao S, Zhu SC, Zhimulev I, Coluzzi M, della Torre A, Roth CW, Louis C, Kalush F, Mural RJ, Myers EW, Adams MD, Smith HO, Broder S, Gardner MJ, Fraser CM, Birney E, Bork P, Brey PT, Venter JC, Weissenbach J, Kafatos FC, Collins FH, Hoffman SL. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*. 2002; 298: 129-49.
- Keene MA, Corces V, Lowenhaupt K, Elgin SC. ADNse I hypersensitive sites in *Drosophila* chromatin occur at the 5' ends of regions of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78: 143-6.
- Kong EC, Allouche L, Chapot PA, Vranizan K, Moore MS, Heberlein U, Wolf FW. Ethanol-regulated genes that contribute to ethanol sensitivity and rapid tolerance in *Drosophila*. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010; 34:302-16.
- Laval M, Pourrain F, Deutsch J, Lepesant JA. In vivo functional characterization of an ecdysone response enhancer in the proximal upstream region of the *Fbp1* gene of *D. melanogaster*. *Mech Dev*. 1993;44:123-38.
- Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*. 2001; 104:709-18.
- Li G, Reinberg D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev*. 2011; 21:175-86.
- Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PC Rand the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *METHODS*, 2001; 25:402-408.
- Llop A, Valdés-Dapena M, Zuazo JL. Plasmodium. En: *Microbiología y Parasitología Médicas*. Cuba: Ciencias Médicas 2001; 3: 151- 167.
- Marangi M, Di R, Mens PF., Martinelli D, Fazio V, Angarano G, Schallig DFH, Giangaspero A y Scotto G. Prevalence of *Plasmodium* spp. in malaria asymptomatic African migrants assessed by nucleic acid sequence based amplification. *Malaria Journal*, 2009; 8:12.
- McArthur M, Gerum S, Stamatoyannopoulos G. Quantification of ADNsel-sensitivity by real-time PCR: quantitative analysis of ADNsel-hypersensitivity of the mouse beta-globin LCR. *J Mol Biol*. 2001; 313: 27-34.
- Michel K, Suwanchinda C, Morlais I, Lambrechts L, Cohuet A, Awono-Ambene PH, et. al. increased melanizing activity in *Anopheles gambiae* does not affect development of *Plasmodium falciparum*. *PNAS* 2006; 103; 16858-16863.
- Müller HM, Dimopoulos G, Blass C, y Kafatos FC. A Hemocyte-like Cell Line Established from the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Expresses Six Prophenoloxidase Genes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274: 11727-11735.

- Nagy PL, Cleary ML, Brown PO, Lieb JD. Genome wide demarcation of RNA polymerase II transcription units revealed by physical fractionation of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:6364-9.
- Nagy PL, Price DH. Formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009; 1:400-6
- OMS. World Health Organization [sitio de internet]. World Malaria Report 2012: OMS Global Malaria Programme [consultado 2013 feb 19]. Disponible en: http://www.OMS.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/
- Osta MA, Christophides GK, Valachou D y Kafatos FC. Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *The Journal of Experimental Biology*. 2004; 207: 2551-2563.
- Padrón A y Talledo L. Mortalidad por malaria cerebral en poblaciones civiles y militares de la república popular de angola. *Rev Cubana Med Milit* 2001; 30:13-19.
- Pondeville E, Maria A, Jacques JC, Bourgouin C, Dauphin-Villemant C. *Anopheles gambiae* males produce and transfer the vitellogenic steroid hormone 20-hydroxyecdysone to females during mating. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:19631-6.
- Robert V, Rocamora G, Julienne S, Goodman SM. Why are anopheline mosquitoes not present in the Seychelles?. *Malaria Journal* 2011; 10: 1-11.
- Rodríguez MH, Ulloa A y Ramsey J. Manual para la vigilancia y el control del paludismo en Mesoamérica. 2008. Instituto Nacional de Salud Pública. Primera Edición.
- Sabo PJ, Kuehn MS, Thurman R, Johnson BE, Johnson EM, Cao H, Yu M, Rosenzweig E, Goldy J, Haydock A, Weaver M, Shafer A, Lee K, Neri F, Humbert R, Singer MA, Richmond TA, Dorschner MO, McArthur M, Hawrylycz M, Green RD, Navas PA, Noble WS, Stamatoyannopoulos JA. Genome-scale mapping of ADNse I sensitivity in vivo using tiling ADN microarrays. *Nat Methods*. 2006; 3:511-8
- Secretaría de Salud [sitio de internet]. Programa de Acción: Enfermedades transmitidas por vector 2001-2006 [consultado 2011 may 18]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/vectores.pdf>
- Shiao SH, Whitten MMA, Zachary D, Hoffmann JA y Levashina EA. Fz2 and Cdc42 Mediate Melanization and Actin Polymerization but Are Dispensable for Plasmodium Killing in the Mosquito Midgut. *PLoS* 2006; 2: 1152-1164.
- Shimada O, Ishikawa H, Tosaka-Shimada H, Yasuda T, Kishi K, Suzuki S. Detection of deoxyribonuclease I along the secretory pathway in Paneth cells of human small intestine. *J Histochem Cytochem*. 1998; 46:833-40.
- Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PGW, et. al. the Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins. *JBC* 2001; 36: 33293-33296.
- Suwanchaichinda C y Kanost MR. The serpin gene family in *Anopheles gambiae*. *Gene* 2009; 442: 47-54.

- van Driel R, Fransz PF, Verschure PJ. The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci.* 2003; 116: 4067-75.
- Valverde-Garduño V, Guyot B, Anguita E, Hamlett Isla, Porcher C y Vyas P. Differences in the chromatin structure and cis-element organization of the human and mouse GATA1 loci: implications for cis-element identification . *Blood* 2004; 104: 3106- 3116
- Varodayan FP, Pignataro L, Harrison NL. Alcohol induces synaptotagmin 1 expression in neurons via activation of heat shock factor 1. *Neuroscience.* 2011; 193:63-71
- VectorBase. [sitio de internet]. Anopheles section of VectorBase [consultado 2011 nov 13]. Disponible en: <http://agambiae.vectorbase.org/>
- Vizioli J, Bulet P, Hoffmann JA, Kafatos FC, Müller HM y Dimopoulos G. Gambicin: A novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PNAS* 2001; 98: 12630-12635.
- Walter Reed Biosystematics Unit [sitio Internet]. Systematic Catalog of Culicidae 2001 [consultado 2011 jul 09]. Disponible en: <http://www.mosquitocatalog.org>.
- Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC, et. al. Evolutionary Dynamics of Immune-Related Genes and Pathways in Disease-Vector Mosquitoes. *Science* 2007; 316: 1738-1743.
- Wellems TE., Hayton K y Fairhurst RM.. The impact of malaria parasitism: from corpuscles to communities.*J. Clin. Invest* 2009; 119: 2496–2505.
- Yassine H, Kamareddine L, Osta MA. The Mosquito Melanization Response Is Implicated in Defense against the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *PLoS Pathog.* 2012; 8:e1003029