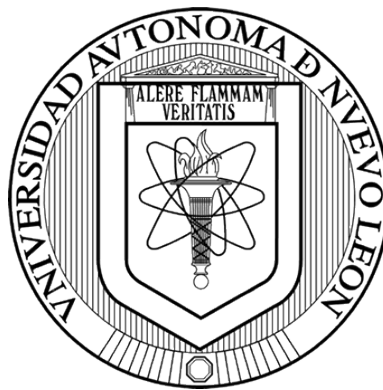


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



SILENCIAMIENTO DE GENES RELACIONADOS CON EL DIMORFISMO SEXUAL
DE *Aedes Aegypti* (L) UTILIZANDO iRNA's

Por

M.C. GERARDO DE JESÚS TRUJILLO RODRÍGUEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTORADO EN
CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA

2022

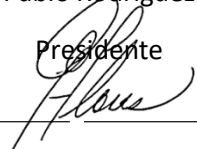
SILENCIAMIENTO DE GENES RELACIONADOS CON EL DIMORFISMO SEXUAL
DE *Aedes Aegypti* (L) UTILIZANDO iRNA's

Comité de Tesis



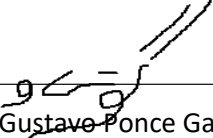
Dr. Iram Pablo Rodríguez Sánchez

Presidente




Dra. Adriana E. Flores Suárez

Secretario



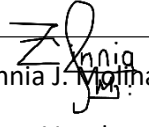
Dr. Gustavo Ponce García

Vocal



Dra. Susana Favela Lara

Vocal



Dra. Zinnia J. Molina Garza

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño

DIRECCIÓN
DE POSGRADO

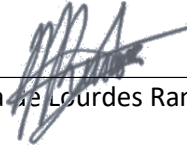
Subdirector de Posgrado

Dirección de tesis



Dr. Iram Pablo Rodríguez Sánchez

Director



Dra. María de Lourdes Ramírez Ahuja

Asesor externo



Dra. Mayra A. Gómez Govea

Asesor externo

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Molecular y Estructural en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, contando con el apoyo de la beca del CONACYT durante los 3 años del doctorado, agradezco por todo el apoyo brindado durante el tiempo correspondiente.

Quiero agradecer a mis Padres por darme la oportunidad de llegar hasta aquí.

RETRIBUCIONES

Quiero agradecer principalmente al **Doctor Iram Pablo Rodríguez Sánchez** por todo el conocimiento compartido, por todas sus enseñanzas y por todo el apoyo que me brindo.

Al **M.C. Alfonso Flores** por todo el apoyo brindado durante el largo recorrido de mis posgrados.

Al señor **Grifith Lizárraga** por ser un gran mentor y un gran amigo, por el apoyo incondicional y sus grandes consejos, ¡que Arceus siempre nos cubra con sus plates!

A todos mis compañeros del laboratorio, **Lulú Ahuja, Martha López, Daniel Saldaña, Diego Carrillo, Mariana (la Mabis) Jiménez**, muchas gracias por su apoyo y su amistad durante este periodo.

DEDICATORIAS

Este trabajo y cada uno de mis esfuerzos se los dedico a mis padres **Olga** y **Fernando** que desde el comienzo me han dado todo, no cabe duda que sin ellos no hubiese llegado hasta aquí.

Que este trabajo sea el primero de muchos de los éxitos que cosechemos juntos, te amo **Lizbeth**.

“Una estrella brilla en la hora de nuestro encuentro”

J.R.R. TOLKIEN

INDICE

1. INTRODUCCION	...	1
2. ANTECEDENTES	...	4
2.1. <i>Ae. aegypti</i> como vector	...	4
2.2. Métodos clásicos de control y resistencia a insecticidas	...	5
2.2.1. Control químico	...	5
2.3. Nuevos métodos de control o alternativos	...	9
2.3.1 Técnica del insecto estéril	...	9
2.3.2. Organismos genéticamente modificados	...	9
2.3.3 Control de mosquitos con <i>Wolbachia</i>	...	11
2.4. El gen DSX	...	12
2.5. RNA de interferencia	...	17
3. JUSTIFICACIÓN	...	20
4. HIPÓTESIS	...	21
5. OBJETIVO GENERAL	...	22
5.1. Objetivos específicos	...	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS	...	23
6.1. Establecimiento de la colonia <i>Ae. aegypti</i>	...	23
6.2. Diseño de RNA de interferencia	...	23
6.3. Exposición de moléculas	...	25
6.4. Evaluación de mosquitos expuestos	...	26
7. RESULTADOS	...	28
8. DISCUSIONES	...	40
9. CONCLUSIONES	...	43
10. PERSPECTIVAS	...	44
11. BIBLIOGRAFIA	...	45
12. ANEXOS	...	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Hembra de <i>Ae. aegypti</i> posterior a la alimentación sanguínea.	4
Figura 2	Zonas tropicales y sub tropicales donde se encuentran registros de <i>Ae. aegypti</i> .	5
Figura 3	Diagrama de las diferentes proteínas que se encuentran en la membrana celular de una neurona.	7
Figura 4	Funciones autónomas y no autónomas de células de genes <i>Dmrt</i> en ratón y <i>Drosophila</i> .	14
Figura 5	Jerarquía de determinación del sexo de <i>Drosophila</i> .	16
Figura 6	Estructura del gen <i>DSX</i> .	24
Figura 7	Diagrama, ala de mosquito.	26
Figura 8	Diagrama, abdomen de mosquito.	27
Figura 9	Bioensayos con DsiRNA.	29
Figura 10	Bioensayos con RNAi.	30
Figura 11	Gráfico de barras de error, longitudes de abdomen en machos tratados (DsiRNA).	36
Figura 12	Gráfico de barras de error, longitudes de abdomen en hembras tratadas (DsiRNA).	36
Figura 13	Gráfico de barras de error, longitudes de alas en machos tratados (DsiRNA).	37
Figura 14	Gráfico de barras de error, longitudes de alas en hembras tratadas (DsiRNA).	37
Figura 15	Gráfico de barras de error, longitudes de abdomen en machos tratados (SiRNA).	38
Figura 16	Gráfico de barras de error, longitudes de abdomen en hembras tratadas (SiRNA).	38
Figura 17	Gráfico de barras de error, longitudes de alas en machos tratados (SiRNA).	39
Figura 18	Gráfico de barras de error, longitudes de alas en hembras tratadas (SiRNA).	39

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Longitud de alas en machos y hembras con la molécula DsiRNA.	32
Tabla 2	Longitud de los abdómenes en machos y hembras tratados con la molécula DsiRNA.	33
Tabla 3	Longitud de alas en machos y hembras con la molécula SiRNA.	34
Tabla 4	Longitud de abdomen en machos y hembras tratados con la molécula SiRNA.	35

RESUMEN

El mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) es el vector transmisor del virus del dengue y otros patógenos importantes en América Latina. Existen varios programas de control, muchos de los cuales son ineficaces y, por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas alternativas de control. Se ha demostrado que los RNA de interferencia (dsRNAi) son mediadores de la expresión génica. El RNA silenciador es un mecanismo de naturaleza altamente conservado en el que RNA bicatenario pequeño (dsRNA) regula la traducción de genes. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la inhibición de la traducción del exón 5 del gen DSX utilizando RNA anti sentido (dsRNAi y sRNAi) por administración oral en larvas en estadio I. Este exón se elimina específicamente en los machos (el empalme alternativo en el exón 5 codifica una versión proteica de las hembras en las especies de dípteros). Nuestros resultados mostraron que la molécula de dsRNAi tuvo un mayor impacto en los individuos tratados, obteniendo un 25.45% de hembras emergidas, en contraste con la molécula de sRNAi que tuvo un 35.80%, en comparación con el control en el que hubo una relación de emergencia de 1: 1. Esto puede deberse a la naturaleza de la estructura química de las moléculas, ya que el dsRNAi se pliega sobre sí mismo, lo que proporciona una mayor estabilidad, en comparación con el sRNAi monocatenario. Los resultados de nuestro estudio nos permitieron concluir que el silenciamiento con RNAi del exón 5 en el gen DSX produce cambios en *Ae. aegypti* de diferenciación sexual, lo que podría conducir a una nueva estrategia de control de mosquitos.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) mosquito is the most important vector transmitting dengue virus and other pathogens in Latin America. There are several control programs, many of which are ineffective, and therefore, new control alternatives need to be developed. Small interference RNAs (dsRNAi) have been shown to be mediators of the interference of gene expression. Silencing RNA is a highly conserved mechanism in nature in which small double-stranded sRNAi (dsRNAi) regulate gene translation. The aim of this study was to evaluate the effect of the inhibition of the translation of exon 5 of the gene *DSX* using antisense RNA (dsRNAi and sRNAi) by oral administration in I stage larvae. This exon is removed specifically in males (the alternative splicing in exon 5 encodes a protein version of females in dipteran species). Our results showed that the dsRNAi molecule had a greater impact on the individuals treated, obtaining 25.45% of emerged females, in contrast to the sRNAi molecule which had 35.80%, compared with the control in which there was an emergence ratio of 1:1. This may have been due to the nature of the molecules' chemical structure, since dsRNAi is folded on itself, providing greater stability, compared to single-chain sRNAi. The results of our study allowed us to conclude that silencing with RNAi of exon 5 in the *DSX* gene produces changes in *Ae. aegypti* sexual differentiation, which could lead to a new mosquito control strategy.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas en humanos y causan más de 700.000 muertes al año (OMS 2018). El mosquito *Aedes aegypti* (L.) es el principal vector de virus como el dengue, Zika, fiebre Chik y la fiebre amarilla (DENV, YFV ZIK Y Chik) (OMS 2019). En México, el costo de la prevención de estas enfermedades cada año es de 10 millones de dólares y el impacto clínico es de alrededor de 20 millones más (OMS 2019). Este vector habita en zonas urbanas y utiliza contenedores artificiales para la reproducción, y a diferencia de otras especies, este insecto tiene una dieta diurna (mañana y tarde), pudiendo alimentarse de más de una persona creando un mayor riesgo de contagio (OMS 2019).

Existe una serie de herramientas para el control de *Ae. aegypti* propuesto por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), que corresponden a formulaciones combinadas (larvicidas y adulticidas), mosquitos modificados genéticamente, búsqueda de atrayentes y repelentes, vigilancia mediante la detección de serotipos virales y monitoreo de resistencia a insecticidas en uso (OPS 2019). El uso de piretroides ha sido la opción principal para la supresión de *Ae. aegypti* adultos (Ponce *et al.* 2009); sin embargo, la resistencia al derribo se confiere principalmente por mutaciones no sinónimas que reducen la unión del piretroide a los canales de sodio dependientes de voltaje (Maestre-Serrano 2019). Además, existen mecanismos enzimáticos que metabolizan los insecticidas. Las actividades de enzimas alfa y beta esterases, oxidasas de función mixta y glutatión-S-transferasas se han reportado en *Ae. aegypti* como causas de resistencia (Alvarez-González *et al.* 2017).

Tomando en cuenta los actuales problemas con la resistencia a los insecticidas es imperativo la búsqueda de nuevas opciones para el control de vectores, apoyándonos en los estudios

citológicos y genéticos en insectos llevados a cabo en las primeras décadas del siglo XX que contribuyeron a establecer la noción de que los factores genotípicos determinan el destino sexual y, desde entonces, los estudios en *Drosophila* han proporcionado pistas para responder a las preguntas de cómo se determina el sexo. En *Drosophila melanogaster*, la diferenciación sexual somática está regulada por una escalera genética bien caracterizada compuesta por una señal genética primaria, un regulador maestro (letal sexual), un regulador subordinado (transformador / transformador-2) y el gen doublesex (*DSX*) (Suzuki 2018), que es el último gen en la cascada de determinación del sexo. El pre-RNA_m de *DSX* se empalma para producir transcripciones masculinas y femeninas específicas que codifican proteínas específicas (Shukla y Nagaraju 2010). Los homólogos de *DSX* se han caracterizado en algunos órdenes de insectos (Diptera, Hymenoptera y Lepidoptera). Las formas de empalme específicas del sexo del pre-RNA_m de *DSX* en todos estos órdenes codifican una proteína *DSX* específica para machos y para hembras, que regulan los genes diana subsiguientes responsables de los rasgos específicos del sexo (Shukla y Nagaraju 2010).

La tecnología de los RNA de interferencia (RNAi) involucra diferentes tipos de moléculas [RNAi de doble (dsRNA) y monocatenario (siRNA)] y hoy en día se explota como una nueva herramienta para la evaluación de las funciones de los genes en una amplia gama de organismos (Singh *et al.* 2013).

La microinyección de RNAi sintético en insectos en diferentes etapas de desarrollo da como resultado cepas con pérdida de funciones específicas (Tomoyasu y Denell 2004). Este sigue siendo el método más común de exposición al RNAi; sin embargo, es una técnica compleja que requiere muchos insectos, además de causar un alto porcentaje de mortalidad por lesiones mecánicas. Por tanto, un método más sencillo sería a través de la dieta (Singh *et al.* 2013).

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de dos moléculas antisentido (dsRNAi y sRNAi) dirigidas a la transcripción del gen *DSX*, concretamente a la isoforma que guarda el exón 5. Los resultados demostraron cambios en la tasa de emergencia de machos y hembras. Esta tecnología podría ser usada como una herramienta para modificar la proporción de emergencia natural 1: 1 de machos y hembras de *Ae. aegypti* (Tomoyasu y Denell 2004). Esta tecnología puede incluirse como una herramienta robusta que apoyaría a los laboratorios interesados en la cría masiva de machos.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Ae. aegypti* como vector

Ae. aegypti es originario de África (región de Etiopía) rápidamente fue desplazado al continente americano; probablemente fueron transportados al nuevo mundo en barriles de agua en los barcos durante las primeras exploraciones y colonizaciones europeas. En el nuevo mundo *Ae. aegypti* tiene una conducta doméstica y se desarrolla en recipientes naturales o artificiales de las viviendas y alrededores (Barretto *et al.* 2017). La hembra se alimenta de sangre humana generalmente (Fig. 1). No es común encontrar al mosquito a más de 100 metros de las viviendas. En consecuencia, a la estrecha relación con el hombre se le denomina un mosquito urbano. La capacidad de soportar la desecación (huevos) es uno de los principales obstáculos para su control, esta condición permite que los huevos puedan transportarse en recipientes secos. Por lo tanto, el control de los mosquitos adultos y larvas en una localidad no descarta la reaparición a través de huevos (Barretto *et al.* 2017).



Figura 1.- Hembra de *Ae. aegypti* posterior a la alimentación sanguínea.

<https://www.cdc.gov/dengue/es/transmission/index.html>

El mosquito *Ae. aegypti* es considerado el vector biológico culícido transmisor de flavivirus más importante en todo el mundo, es una especie termófila, endémica y ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del planeta (Fig. 2); está adaptado al entorno urbano y se encuentra a menudo cerca de las viviendas (Carvalho *et al.* 2016). Es el principal vector de los virus del dengue y puede desempeñar un papel como vector del virus de la fiebre amarilla, las cuales se consideran dos de las enfermedades virales más importantes transmitidas por los artrópodos. Además, este insecto es un vector potencial de los virus Chikungunya, Zika y Nilo occidental (Carvalho *et al.* 2016).

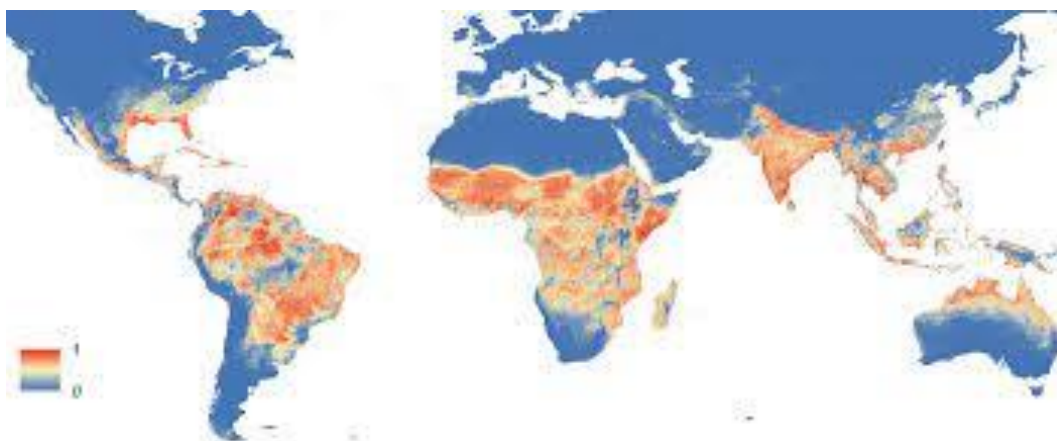


Figura 2.- Zonas tropicales y sub tropicales donde se encuentran registros de *Ae. aegypti*

<https://blog.sedici.unlp.edu.ar/2016/02/15/que-sabemos-del-aedes-aegypti/>.

2.2. Métodos clásicos de control y resistencia a insecticidas

2.2.1. Control químico

El control más practicado para *Ae. aegypti*, debido a su alta eficacia en la regulación de las poblaciones con acción relativamente rápida, es la aplicación de insecticidas químicos (Bisset *et al.* 2009). Los insecticidas piretroides se utilizan actualmente ampliamente para controlar

Ae. aegypti en todo el mundo y constituyen aproximadamente el 17% de la cuota de mercado mundial de insecticidas y 1,400 millones de dólares del comercio mundial (Housset y Dickmann 2009). En general, los piretroides son neurotoxinas que modifican la función normal de los nervios de los insectos y causan alteraciones en la bomba sodio-potasio despolarizando las neuronas (Fig. 3) (Scott 1988 y Narahashi 2002), paralizando y finalmente derribando al insecto. La deltametrina, cipermetrina, ciflutrina, lambda-cihalotrina, permetrina, alfa-cipermetrina, piretro, bifentrina, d-fenotrina, z-cipermetrina y etofenprox son los principales tipos de piretroides utilizados, y sus tratamientos suelen implicar una aplicación residual o espacial (Smith *et al.* 2016). Todos los insecticidas disponibles en el mercado para el control de vectores están obligados a aplicarse con precaución para retrasar la evolución mundial de la resistencia de los mosquitos.

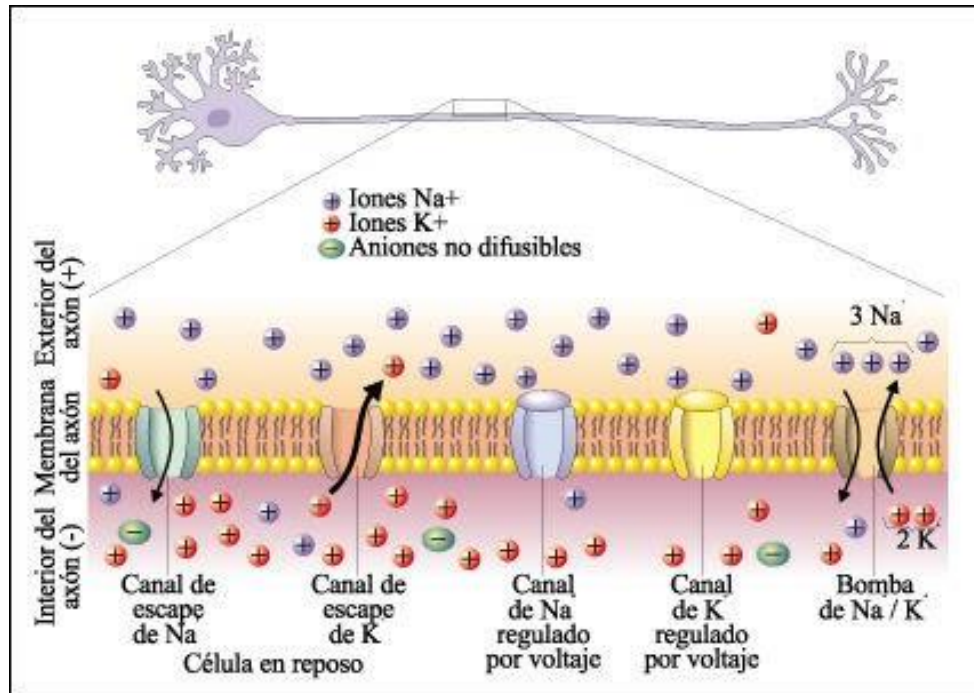


Figura 3.- Diagrama de las diferentes proteínas que se encuentran en la membrana celular de una neurona, las proteínas son el sitio blanco de los insecticidas piretroides, al presentar un cambio en su estructura estas no controlan el intercambio iónico de manera normal causando despolarización/hiperpolarización derribando al insecto. (<https://mejorconsalud.as.com/equilibrio-sodio-potasio/>)

Actualmente, la resistencia ante los insecticidas es uno de los problemas más graves que enfrentan los organismos de control de mosquitos. La pérdida de eficacia de los piretroides puede traer una gran falla operativa en el control de las poblaciones de *Ae. aegypti* y, posteriormente, conduce a un aumento en la transmisión de enfermedades (Smith *et al.* 2016).

Resistencia por mutaciones en sitio blanco (kdr) por sus siglas en inglés knockdown resistance, metabolismo elevado y cambios de conducta en *Ae. aegypti* son respuestas atribuidas a la implementación intensificada de programas de control basados en productos químicos. La resistencia por mutaciones en sitio blanco (kdr) implica la supervivencia del mosquito bajo la exposición a insecticidas químicos que normalmente conducirían a la

muerte completa, y comprende los mecanismos mejor documentados que confieren la resistencia a los insecticidas piretroides en *Ae. aegypti* (Brito *et al.* 2013); y la desintoxicación metabólica a través de oxidasas de función mixta (mono oxigenasas mediadas por P450), esterasas y glutatión S-transferasas (GST) (Chareonviriyaphap *et al.* 2013). El cambio de conducta es el desarrollo de cualquier cambio en el comportamiento de un mosquito para disminuir la exposición a sustancias tóxicas o para escapar del efecto letal del insecticida, pero este mecanismo se pasa por alto fácilmente (Chareonviriyaphap *et al.* 2013). Además de los mecanismos de resistencia previos mencionados, la resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti* también está mediado por la resistencia en la cutícula.

El engrosamiento de la cutícula está implicado en la resistencia a los insecticidas al reducir la absorción del insecticida que llega al sitio blanco. En los mosquitos, a menudo se hace mención a la resistencia cuticular, sin embargo, los estudios relacionados no son suficientes para comprender este fenómeno. Un reciente estudio reveló que este mecanismo puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de resistencia cuando normalmente ocurre simultáneamente con otros mecanismos (Kasai *et al.* 2014), causando resistencia a insecticidas (Nkya *et al.* 2013). En *Anopheles funestus* se ha analizado que el engrosamiento de la cutícula se asocia con la desintoxicación metabólica, por lo que una cutícula más gruesa provoca una tasa de absorción gradual del insecticida que aumentará la eficacia de la desintoxicación metabólica (Wood *et al.* 2010). Además, es fundamental tener en cuenta que los insectos con resistencia cuticular mostrarán un nivel de resistencia de no más de 3 veces en comparación con los insectos susceptibles, pero la combinación de otros mecanismos de resistencia conducirá a un aumento notable en el nivel de resistencia a los insecticidas (Lee *et al.* 2003). Esto se demuestra por *Anopheles gambiae* en Benin África (Djouaka *et al.* 2008)

a través del cual la sobreexpresión de genes cuticulares y genes P450 dio lugar a un nivel de resistencia relativamente alto. La resistencia cuticular a los piretroides también se caracteriza en *Ae. aegypti* (David *et al.* 2010), El hecho de que este mecanismo menos entendido pueda desempeñar un papel sustancial en la resistencia exige una atención inmediata en la investigación, particularmente en *Ae. aegypti*.

2.3. Nuevos métodos de control o alternativos

2.3.1 Técnica del insecto estéril

La técnica del insecto estéril es un método de control de plagas de insectos sin daños colaterales en el medio ambiente, este implica la cría en masa y la esterilización, por medio de la radiación de los insectos causantes de una plaga concreta. Una vez esterilizados, se procede a la liberación de los machos irradiados por zonas sistemáticamente, esperando que se apareen con hembras silvestres sin que haya descendencia, con lo que se reduce la población causante de la plaga (IAEA 2019).

La técnica del insecto estéril, o TIE, es uno de los métodos de control de plagas de insectos más respetuosos con el medio ambiente ideados hasta la fecha (IAEA 2019). La irradiación, por ejemplo, con rayos gamma y rayos X, se utiliza para esterilizar insectos criados en masa, de modo que, aunque siguen siendo sexualmente competitivos, no pueden reproducirse. La TIE no conlleva procesos transgénicos (ingeniería genética) (IAEA 2019).

2.3.2. Organismos genéticamente modificados

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado nuevas orientaciones que establecen normas esenciales para guiar la investigación y la obtención en el futuro de

mosquitos genéticamente modificados, sobre todo en lo que respecta a cuestiones relacionadas con la ética, la seguridad, la asequibilidad y la eficacia.

Las estrategias que se utilizan actualmente para limitar que los mosquitos transmitan enfermedades no son totalmente eficaces, por lo que es preciso adoptar nuevos enfoques que complementen a los actuales para solventar las lagunas existentes en las intervenciones de lucha anti vectorial (como la prevención eficaz de las picaduras en los espacios exteriores) y para ofrecer otras soluciones que permiten hacer frente a la amenaza creciente de la resistencia a los insecticidas (OMS 2021).

La OMS planteó nuevas normativas que tratan cuestiones y temas específicos relacionados con la investigación y la obtención de mosquitos genéticamente modificados y se incluyen, por ejemplo, normas que ayuden a tomar decisiones sobre cómo y cuándo evaluar su uso. Estas normativas, descritas en el 2014 por el Programa Especial y la Fundación para los Institutos Nacionales de Salud (FNIH), incorporan avances científicos recientes en materia de modificación genética de los mosquitos, así como otras informaciones y enseñanzas aprendidas recientemente en materia de seguridad y ética, como:

- Métodos para conocer los efectos de los mosquitos genómicamente manipulados para la salud humana, la sanidad animal y el medio ambiente.
- Explicaciones más avanzadas acerca de las estrategias más eficaces para evaluar los riesgos y para la participación de partes interesadas.
- Criterios más claros para pasar de una etapa a otra en las evaluaciones, en los que se explican los pasos necesarios para aplicar en la práctica las técnicas de modificación

genética de mosquitos de forma segura y responsable, incluidas las que emplean la genética dirigida.

- Un conjunto limitado de cuestiones relativas a la seguridad y la eficacia de cuestiones que se deben evaluar en cada etapa para fundamentar las decisiones relativas a la continuación de las pruebas y a la aplicación.

2.3.3 Control de mosquitos con *Wolbachia*

Otro método propuesto es el uso de relaciones simbióticas naturales entre organismos (mosquitos y bacterias del género *Wolbachia*), como método para frenar la transmisión del virus (Lambrechts 2015). Hallazgos a cargo de Hoffman y colaboradores demostraron que estrategias con bacterias del género *Wolbachia* pueden emplearse como un acercamiento práctico para la supresión del dengue, con potencial para ser usado en amplias áreas (Hoffmann *et al.* 2011).

Wolbachia es un género de bacterias endosimbiontes, gram negativas, pertenecientes al orden *Rickettsiales*, que participan en diversas relaciones simbióticas con varios organismos, principalmente artrópodos y nemátodos. Este género de bacterias fue identificado por primera vez en el ovario del mosquito *Culex pipiens*, en 1920 (Lambrechts *et al.* 2015). *Wolbachia* presenta un gran potencial como agente controlador de enfermedades vectoriales, debido a varias características que la hacen única. Primeramente, es quizá una de las bacterias endosimbiontes más comunes en el mundo. Se estima que está presente en el 60% de las especies de insectos descritas, lo que la hace muy fácil de obtener (Turley *et al.* 2009). Asimismo, esta bacteria tiene la capacidad para inducir diversos fenotipos reproductivos en sus hospederos, como feminización, muerte de machos, partenogénesis, e incompatibilidad

citoplasmática (Van *et al.* .2001; Ye *et al.* 2013). Este último fenotipo de incompatibilidad citoplasmática es la clave que utiliza la bacteria para aumentar su proporción en las poblaciones de mosquitos y asegurar su propagación.

De igual forma, *Wolbachia* puede inhibir la replicación viral, lo cual ocasiona la reducción de la transmisión del virus del dengue a través del mosquito. Esto lo realiza compitiendo por espacio y nutrientes que podría ocupar el virus, o estimulando el sistema inmune del mosquito, de manera que produzca ciertos péptidos antimicrobianos que inhiben la replicación viral (Meksianis *et al.* 2015). En *Ae. aegypti* no se encuentra *Wolbachia* de manera natural, (Segoli *et al.* 2014; Rancès *et al.* 2013), sin embargo, los embriones de sus huevos pueden ser infectados mediante microinyecciones. Existen 2 cepas de *Wolbachia* que han sido introducidas a los mosquitos *Ae. aegypti*, *WMel* y *WMelPop*, cada una con diferentes mecanismos en la reducción de la transmisión viral, pero con la capacidad de conferir protección ante la infección del virus del dengue (Segoli *et al.* 2014).

2.4. El gen *DSX*

El dimorfismo sexual (diferencias fenotípicas entre machos y hembras de la misma especie) es una de las características más generalizadas y diversas de la morfología, fisiología y comportamiento de los animales. Los mecanismos moleculares responsables del dimorfismo sexual son diversos, van desde la determinación del sexo basada en el empalme y la autonomía celular en insectos hasta el control endocrino dependiente de las gónadas de los rasgos sexuales en mamíferos y otros vertebrados (Wilhelm *et al.* 2007). Durante mucho tiempo, estas disparidades alentaron un enfoque limitado, taxón por taxón, para el estudio del desarrollo específico del sexo. Si bien la biología evolutiva ha proporcionado un marco

universal para comprender la evolución del sexo en todos los organismos, un amplio enfoque ha tardado en afianzarse en la biología del desarrollo. En los últimos años, sin embargo, han comenzado a surgir algunos temas comunes en el desarrollo de rasgos específicos del sexo en diferentes linajes de animales. En el centro de esta tendencia ha sido el descubrimiento de la familia de factores de transcripción relacionados con doublesex / mab-3 (Dmrt) (Zarkower 2001). Los genes dmrt comparten un dominio de unión al ADN (dominio DM) común, pero por lo demás muestran poca conservación de la secuencia, lo que hace que sus relaciones filogenéticas sean desconocidas. Los miembros de esta antigua familia de genes dan forma al dimorfismo sexual en organismos tan diversos como mamíferos, insectos y nematodos. Inicialmente, sus roles parecían muy diferentes en diferentes taxones: actuando en una cascada de empalme alternativo global en *Drosophila*, haciendo la elección entre el desarrollo de testículos y ovario en la gónada de vertebrados, o controlando de forma autónoma la diferenciación de órganos sensoriales en *Caenorhabditis elegans* (Raymond *et al.* 2000; Burtis *et al.* 1989). Pero posterior un detenido examen, estas diferencias pueden ocultar similitudes más profundas. Ahora, en los animales, los genes Dmrt funcionan como reguladores del desarrollo específicos de tejido que integran información sobre el sexo, la posición y el tiempo para dirigir poblaciones reducidas de células hacia el destino masculino o femenino. Las funciones específicas de taxón más llamativas de los genes Dmrt, como el empalme alternativo en insectos o la determinación primaria del sexo en algunos vertebrados, se derivan de esta función ancestral común (Herpin *et al.* 2011). Las funciones moleculares de los genes Dmrt se conocen bien (figura 4), y sus funciones en grupos de animales específicos o procesos de desarrollo han sido objeto de varias revisiones recientes (Verhulst *et al.* 2010) y (Gempe *et al.* 2011). Sin embargo, la acumulación de evidencia de una variedad de modelos abre el camino para una perspectiva comparativa más amplia.

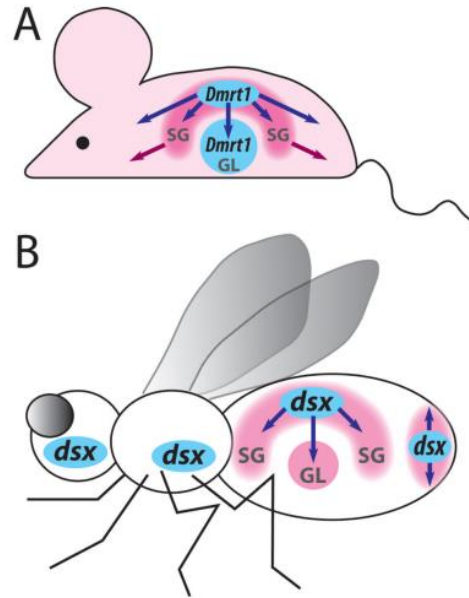


Figura 4.- Imagen basada en la publicación de (Artyom 2012) Funciones autónomas y no autónomas de células de genes Dmrt en ratón y *Drosophila*. Los tejidos donde los genes Dmrt se expresan y actúan de forma autónoma se muestran en azul; los tejidos que no expresan genes Dmrt pero que experimentan una diferenciación específica de sexo bajo la influencia no autónoma de los genes Dmrt están en rosa; las células sexualmente monomórficas están en blanco; las flechas indican funciones no autónomas de los genes Dmrt. GL, línea germinal; SG, gónada somática. A. En el ratón, Dmrt1 se expresa y actúa de forma autónoma en las células de la línea germinal y en las células de Sertoli de la gónada somática. Además, la expresión de Dmrt1 en las células de Sertoli controla el desarrollo de la línea germinal y otras células de las gónadas somáticas de forma no autónoma. Las hormonas secretadas por las células de Sertoli (flechas azules) y otras células de las gónadas somáticas (flechas violetas) regulan el desarrollo específico del sexo en muchos tejidos no gonadales. No se sabe que Dmrt1 desempeñe ningún papel autónomo de células en la diferenciación sexual fuera de la gónada. B. En *Drosophila*, DSX se expresa en células progenitoras de gónadas somáticas, que reclutan células adicionales en la gónada a través de la señalización célula-célula. DSX no se expresa en las células de la línea germinal, pero su función en la gónada somática es necesaria para el desarrollo de la línea germinal específica del sexo. DSX se expresa en un subconjunto de células no gonadales, donde actúa de forma autónoma para controlar la diferenciación sexual somática. Algunas de estas células también inducen el desarrollo específico del sexo en los tejidos adyacentes mediante un mecanismo de señalización.

La expresión localizada del gen DSX en el desarrollo específico del sexo se puede apreciar en órganos sexualmente dimórficos como los genitales y el sistema nervioso central (SNC). Las moscas mutantes DSX desarrollan genitales masculinos y femeninos, lo que indica que DSX actúa como un interruptor entre dos vías de diferenciación alternativas, pero no es necesario que las especifique (Hildreth 1965; Christiansen *et al.* 2002). En el SNC, DSX se expresa y requiere en grupos neuronales discretos que dirigen el canto de cortejo, la eyaculación y otros comportamientos específicos del sexo (Kimura *et al.* 2000; Rideout *et al.* 2007).

A diferencia del mecanismo de los insectos en el que DSX desempeña un papel activo tanto en machos como en hembras, en *Daphnia* el gen DSX es esencial para el desarrollo de los machos, pero es prescindible en las hembras (Artyom 2012). Los machos de *Daphnia magna* se diferencian de las hembras por tener ojos más grandes, ganchos torácicos y antenas más largas. Todas estas estructuras expresan DSX en machos, pero no en las hembras y son feminizadas por el silenciamiento del gen DSX inducida por RNAi. Por el contrario, la expresión DSX ectópica en embriones femeninos puede masculinizar estas estructuras (Kato *et al.* 2011).

En *Drosophila*, las diferencias sexuales en la expresión génica se han estudiado ampliamente en diferentes tejidos y en diferentes momentos de desarrollo (Samson y Rabinow 2014). La jerarquía de determinación del sexo especifica las diferencias de sexo en los tejidos somáticos. La jerarquía consiste en una cascada de empalme de pre-RNA alternativa, que responde al número de cromosomas X, que dirige la producción de factores de transcripción específicos del sexo codificados por doublesex (DSX) e infructuosos (fru) (Fig. 5) (Salz 2011). DSX establece casi todas las diferencias morfológicas de sexo conocidas y también

tiene un papel en el sistema nervioso, mientras que la fruta tiene un papel principal en la dirección del potencial reproductivo en el sistema nervioso (Manoli *et al.* 2006; Yamamoto y Koganezawa 2013).

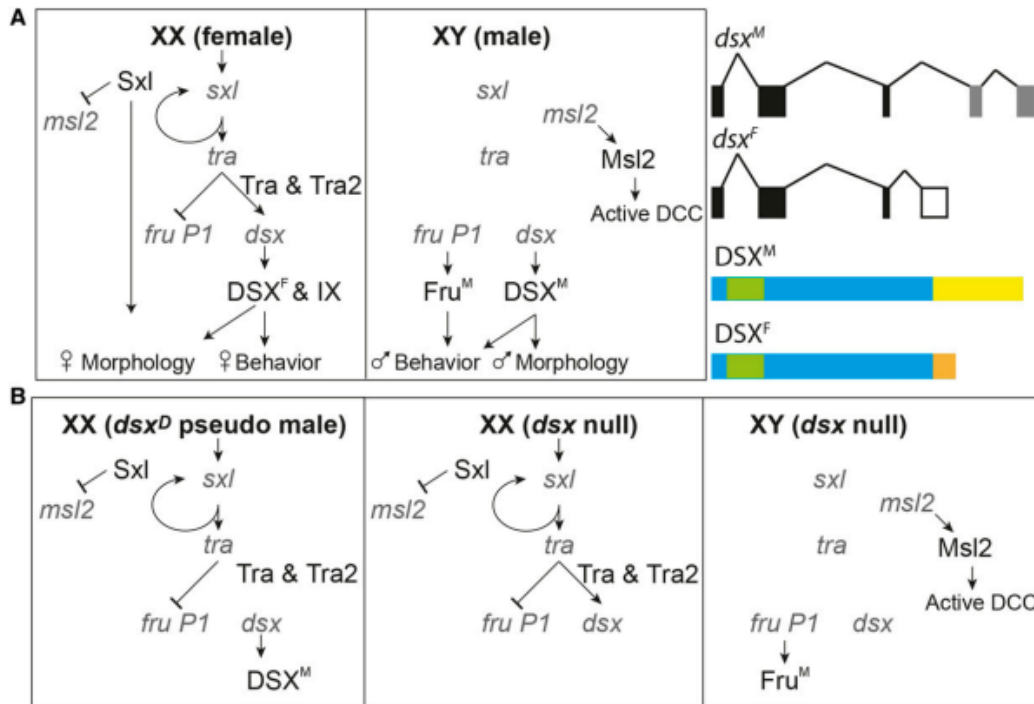


Figura 5.- Jerarquía de determinación del sexo de *Drosophila*, efectos de los alelos mutantes y diferencias sexuales en la expresión en animales de tipo salvaje. (A) La jerarquía de determinación del sexo somático de *Drosophila*. El principal determinante del sexo es el número de cromosomas X. La jerarquía de sexos incluye factores de empalme producidos diferencialmente por sexo codificados por sex-lethal (*sxl*), transformer (*tra*) y factor de empalme transformer-2 (*tra-2*). El corte y empalme alternativo del pre RNAm de DSX y fru P1 conduce a la producción específica del sexo de factores de transcripción DSX y Fru. En las hembras la compensación de dosis (DCC) no está activa debido a la producción de *Sxl*, que inhibe la traducción de *msl2*. En las hembras, DSXF junto con IX regulan la expresión génica para dirigir el comportamiento, la morfología y la fisiología específicos de la hembra. En los machos, DSXM y FruM regulan la expresión génica para dirigir el comportamiento, la morfología y la fisiología específicos del macho. Se muestran las diferencias de empalme de los pre-RNAm de DSX y los esquemas de las isoformas de la proteína DSX. El dominio de unión

al ADN común se indica con un recuadro verde. Las diferencias de sexo en los extremos carboxilo terminales se muestran en amarillo y naranja. (B) Los pseudo machos DSXD son cromosómicamente XX, pero producen solo la isoforma DSX específica del macho. Por encima de DSX, la jerarquía de sexos es genéticamente la misma que en las hembras de tipo salvaje. Los animales nulos DSX no tienen DSX producido, pero por encima de DSX, la jerarquía es genéticamente la misma que la de los animales de tipo salvaje hembra y macho (figura basada en el trabajo de Arbeitman 2016).

2.5. RNA de interferencia

La interferencia de RNA (RNAi) es un mecanismo mediado por RNA bicatenario (RNAdc) para silenciar la expresión génica en eucariotas. Después de la administración en una célula, Dicer escinde el dsRNA en RNA de interferencia cortos (~ 21 nucleótidos). Los RNA de interferencia cortos se incorporan luego en un complejo de silenciamiento inducido por RNA, que facilita la unión y la escisión de secuencias de RNAm complementarias, evitando así la traducción del gen (Hannon 2002; Kim y Rossi 2008). Los componentes básicos de la maquinaria del RNAi se encuentran esencialmente en todos los eucariotas y, por lo tanto, el RNAi ahora se explota ampliamente como una herramienta de genética inversa para evaluar las funciones de los genes en una amplia gama de especies. La aplicación de RNAi en la mayoría de las especies en estudio solo está limitada por la facilidad con la que el dsRNA puede entregarse a las células diana.

Se pueden definir tres tipos de respuesta de RNAi de acuerdo con Whangbo y Hunter (2008): autónoma celular, ambiental y sistémica, y los dos últimos también se denominan juntos RNAi autónomo no celular. En el RNAi autónomo celular, el efecto de silenciamiento se engloba dentro de las células donde el RNAdc se expresa constitutivamente o se introduce

exógenamente, mientras que en el RNAi ambiental la señal de silenciamiento es captada directamente por las células del entorno inmediato, como el intestino o el hemocele. Si la señal de silenciamiento se propaga a las células vecinas desde un epicentro de células, se activa el RNAi sistémico. En particular, la señal de silenciamiento puede captarse y transmitirse incluso entre células donde los genes diana están ausentes (Winston *et al.* 2007). Con respecto al esfuerzo por aplicar RNAi al manejo de plagas, la atención se ha centrado en RNAi autónomo no celular. Se han identificado dos tipos de mecanismos de captación de dsRNA. En *Caenorhabditis elegans* Maupas, el animal mejor caracterizado para RNAi, se identificaron dos proteínas transmembrana implicadas en la captación de dsRNA en RNAi autónomo no celular. SID-1 (Systemic RNAi Defective) es esencial y suficiente para mediar la propagación sistémica de la señal de RNAi, mientras que SID-2 es específico del intestino y facilita principalmente el RNAi ambiental en cooperación con SID-1 (Feinberg y Hunter, 2003; McEwan *et al.* 2012). El segundo mecanismo de captación de dsRNA implica una vía de endocitosis mediada por receptor específica para el RNAi ambiental. Se descubrió por primera vez en células de *Drosophila* S2 y luego se demostró que también desempeña un papel en los gusanos, lo que indica su conservación evolutiva (Jose y Hunter, 2007; Saleh *et al.* 2006; Ulvila *et al.* 2006).

En otros estudios se han explorado nuevas direcciones en el uso de los RNAi, como en el trabajo realizado por Singh *et al.* 2013, donde decidieron silenciar el gen que codifica para la β -tubulina por medio de administración oral, el autor menciona que mantener bajo exposición por 2 horas a las larvas de primer estadio fue suficiente para obtener mortalidad dependiente de la dosis. La β -tubulina es un componente esencial del citoesqueleto de una célula, y las mutaciones de pérdida de función del gen β -tub son letales en varios organismos

(Buszczak *et al.* 2007). Reducción de la expresión de la tina β por RNAi en los mosquitos presumiblemente afectó negativamente las funciones normales de las células intestinales, lo que resultó en una falla en la adquisición de suficientes nutrientes y la muerte.

3. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a insecticidas del vector *Ae. aegypti* es un problema global el cual afecta directamente en la salud debido a la transmisión de virus (dengue, zika, chikunguña y fiebre amarilla), generando alto impacto económico, por lo tanto, se requiere implementar nuevas estrategias para el manejo del mosquito, involucrar el uso de RNA's de interferencia sería un método innovador, específico y no dañino al medio ambiente el cual nos permitiría mejorar las cifras en el control del vector, generando nuevos protocolos que a la par de los métodos de control clásicos generen un nuevo control integrado para el manejo óptimo del vector.

4. HIPÓTESIS

Interferir la transcripción de la isoforma que retiene el exón 5 del gen DSX en *Ae. aegypti* utilizando RNA sintético suministrado vía oral se verá reflejado en el fenotipo sexual, generando mayor número de machos emergidos

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los RNA de interferencia dirigidos a una secuencia específica del exón 5 en el gen DSX en *Ae. aegypti*.

5.1. Objetivos específicos

- Cambiar la proporción entre machos y hembras, mediante el uso de moléculas sintéticas de RNA.
- Determinar los cambios morfológicos en los mosquitos sometidos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Establecimiento de la colonia *Ae. aegypti*

Los mosquitos *Ae. aegypti* utilizados fueron de la cepa New Orleans (NO) de referencia susceptible a insecticidas. Los mosquitos fueron criados en condiciones controladas en insectarios, con una temperatura de 28 ± 2 ° C, humedad relativa del 90% y fotoperiodo luz / oscuridad de 12/12 h, con una proteína liofilizada dieta, sacarosa al 10% y sangre bovina heparinizada utilizando un alimentador artificial.

6.2. Diseño de RNA de interferencia

Los RNAi (dsRNAi y sRNAi) se diseñaron sobre la base del exón 5 del gen DSX (Fig. 6). El diseño se realizó utilizando el sitio web de RNAstructure (<https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructure.html>), y luego las secuencias se enviaron a Integrated DNA Technologies (IDT; Coralville, IA, EE. UU.) Para confirmar la estructura correcta y sintetizar las dos moléculas. La doble hebra (dsRNAi-Exon5A de la posición de 83 a 108 nucleótidos) compuesta por dos moléculas antisentido: sentido positivo (GUCCGGAUGAUAGACUUUUUACACG) y sentido negativo (CGUGUAAAAAGUCUAUCAUCCGGACUG) en el caso de las moléculas monocatenarias (sRNAi), diseñamos contra dos dianas, a saber exón 5A de 150 a 173 (C * T * G * ATCTTCGTGGTTTATTC * T * T * G) y exón 5B de 140 a 163 (G * T * T * TTGCATTTTTTAAATTT * T * C * C).

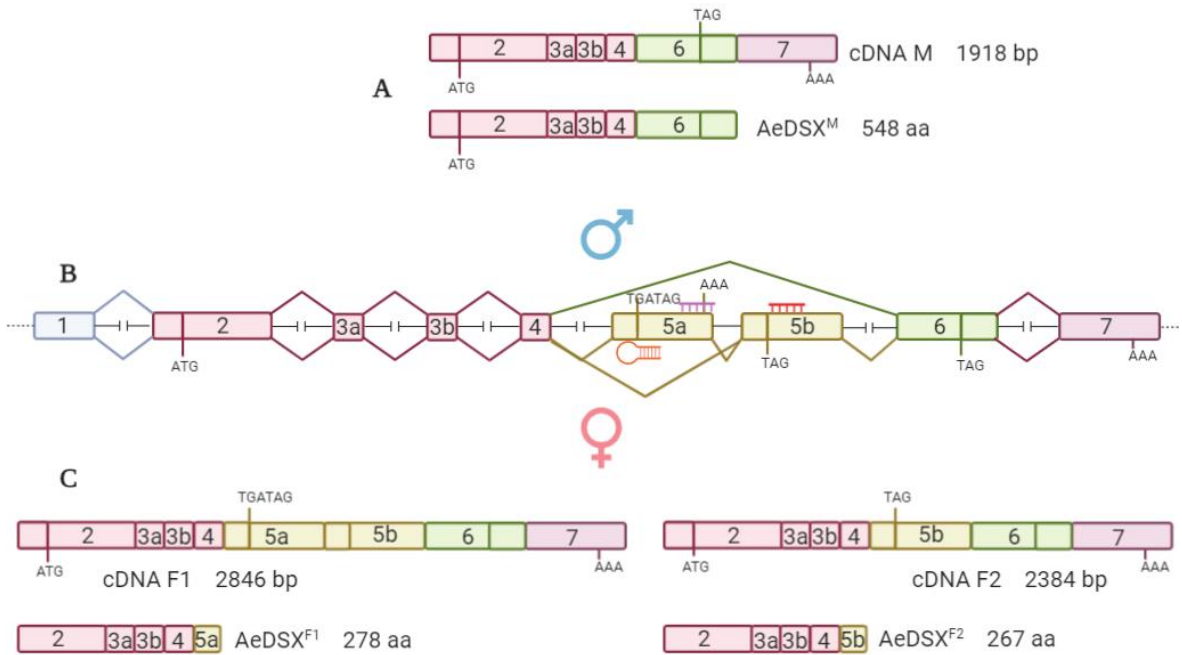


Figura 6. Estructura del gen DSX. Modificado de (Salvemini *et al.* 2011), la anatomía del gen DSX se muestra en la parte central (B), y las isoformas de las hembras se pueden ver en la parte inferior (C), mientras que la parte superior (A) muestra el único para el macho. Después del empalme, las hembras conservan el exón 5, mientras que los machos lo descartan. Las áreas de hibridación son evidentes en el exón 5.

6.3. Exposición de moléculas

Las larvas de primer estadio (L1) de la cepa NO de *Ae. aegypti* se expusieron tres veces al dsRNA (n = 30) y al siRNA (n = 50) diez veces, el número de repeticiones estuvo sujeto a la abundancia de la molécula proporcionada por la compañía. Este protocolo de exposición antisentido se basó en la metodología publicada por Singh *et al.* (2013). La exposición se realizó en tubos de 1.5 ml que contenían un volumen final de 1 ml de agua, donde se depositaron las larvas y se recuperaron con una micropipeta. Para ambas pruebas las larvas fueron expuestas por un período de 48 h a 0.05 μ M a dsRNAi y 5 μ M a siRNA, y luego de la exposición, las larvas fueron transferidas por decantación a una cámara de emergencia con 500 ml de agua hasta que alcanzaron la etapa adulta y los grupos de control se realizaron simultáneamente, donde los parámetros fueron los mismos, siendo la única diferencia la ausencia de las moléculas de prueba en el agua.

6.4. Evaluación de mosquitos expuestos

Después de que emergieron los mosquitos, se colocaron en diferentes jaulas entomológicas, una jaula para cada molécula de prueba y una jaula para cada grupo de control, y se les alimentó con una solución de sacarosa para el mantenimiento de la colonia. La colonia se observó cada 24 h, y se determinó el surgimiento de cambios en la relación de machos y hembras. Las mediciones se realizaron utilizando el estereoscopio, con ayuda del micrómetro se midieron las alas y los abdómenes de los mosquitos sometidos al tratamiento contra el grupo control (ver figura 7 y 8). Los datos se analizaron con la prueba de chi-cuadrada con 0.05 sig. utilizando el software SPSS Statistics 22, y las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante tabulación cruzada entre los grupos de control y los expuestos a los RNAi.

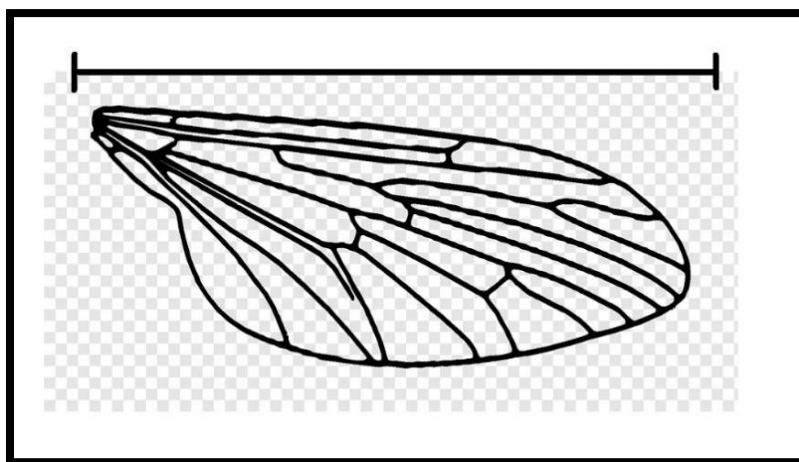


Figura 7.- Diagrama, ala de mosquito. La figura muestra la manera en que se midieron las alas de los mosquitos, (longitudinalmente).

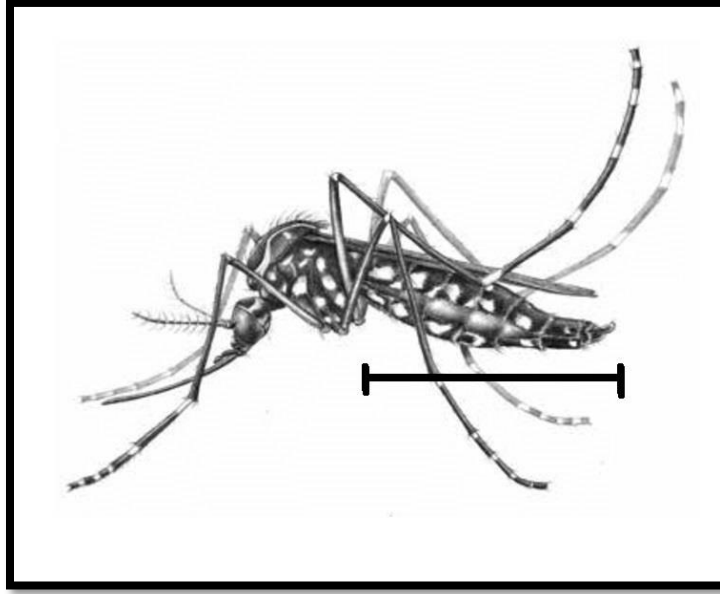


Figura 8.- Diagrama, abdomen de mosquito. La figura muestra la manera en que se midieron los abdómenes de los mosquitos, (longitudinalmente).

7. RESULTADOS

Los resultados mostraron que el efecto de nuestras moléculas (dsiRNA y siRNA) en *Ae. aegypti* en primer estadio de las larvas fue la modificación de la proporción de sexos de 1: 1 (hembras: machos) previamente informada (Quispe-Pretel *et al.* 2014). La proporción de sexos con exposición a dsiRNA en larvas en primer estadio fue de 73.33% para machos y 26.67% para hembras (figuras 7 y 8), por otro lado, se encontró diferencia significativa en la proporción de sexos al tratar las larvas con siRNA ($p \leq 0.05$). (Figura 8) obteniéndose 64.20% de machos con respecto a 35.80% hembras, con una proporción de 0.716: 1.284 (hembras: machos).

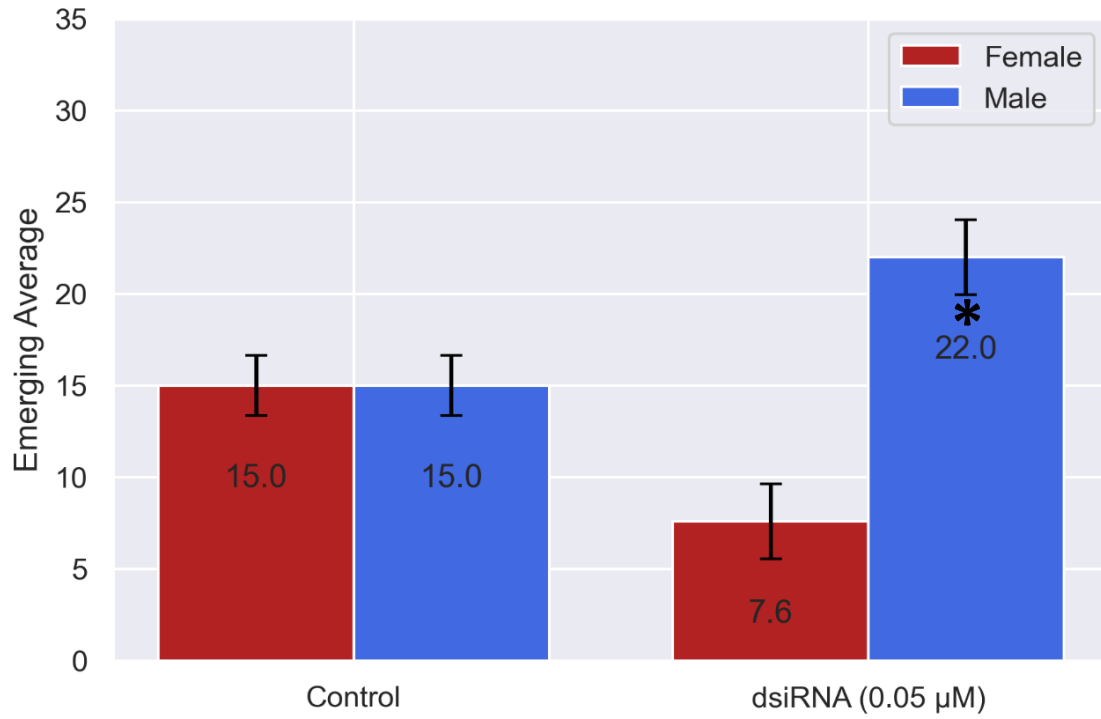


Figura 9. Bioensayos con DsiRNA. En la imagen se pueden apreciar el efecto del DsiRNA en la emergencia de los adultos en *Ae. aegypti*. ($\sigma < 0.5$ para los tratados y $\sigma < 1$ para los controles).

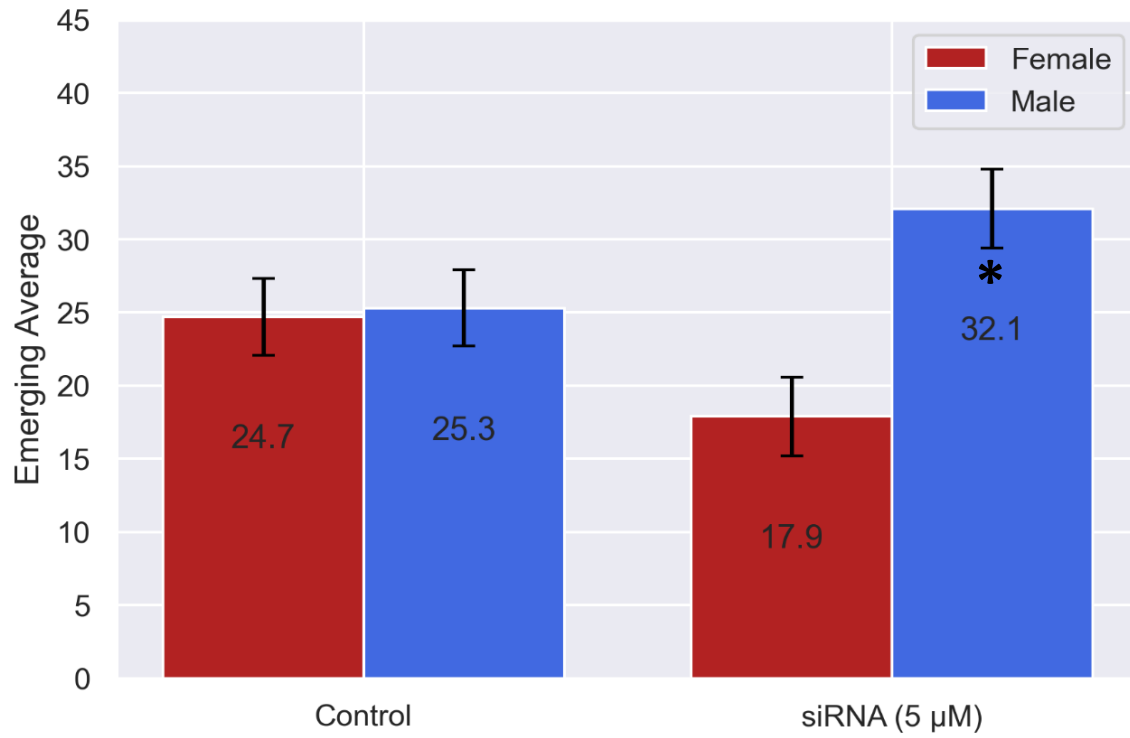


Figura 10. Bioensayos con RNAi. En la imagen se pueden apreciar el efecto del siRNA en la emergencia de los adultos en *Ae. aegypti*. ($p < 0.05$). ($\sigma < 0.5$ para los tratados y $\sigma < 1$ para los controles).

Los mosquitos sometidos al tratamiento fueron observados bajo el estereoscopio y con ayuda del micrómetro se midieron dos partes de su anatomía, (longitud de alas y longitud de abdomen) posteriormente se realizó una prueba de T de Student (n=23) para determinar la diferencia de estos parámetros (tablas 1 a 4). En ambas longitudes y en ambas moléculas no se observaron diferencias significativas (Figuras 11 a 18).

Tabla 1.- Longitud de alas en machos y hembras con la molécula DsiRNA

Longitud de alas machos tratados (milímetros)	Longitud de alas machos control (milímetros)	Longitud de alas hembras tratadas (milímetros)	Longitud de alas hembras control (milímetros)
3.21	3.22	3.27	3.26
3.22	3.22	3.28	3.29
3.22	3.22	3.28	3.27
3.21	3.22	3.28	3.27
3.22	3.22	3.27	3.28
3.22	3.22	3.28	3.28
3.22	3.21	3.28	3.29
3.21	3.22	3.26	3.29
3.22	3.22	3.28	3.29
3.22	3.22	3.27	3.28
3.22	3.22	3.28	3.28
3.21	3.22	3.28	3.29
3.22	3.22	3.28	3.29
3.22	3.22	3.29	3.28
3.22	3.21	3.28	3.27
3.22	3.22	3.29	3.26
3.22	3.22	3.28	3.28
3.21	3.22	3.28	3.28
3.22	3.22	3.28	3.28
3.22	3.23	3.28	3.28
3.22	3.22	3.27	3.28
3.22	3.22	3.28	3.28
3.22	3.22	3.26	3.28

Tabla 2.- Longitud de los abdómenes en machos y hembras tratados con la molécula DsiRNA.

Longitud abdomen de machos tratados (milímetros)	Longitud abdomen machos control (milímetros)	Longitud abdomen hembras tratadas (milímetros)	Longitud abdomen hembras control (milímetros)
3.1	3.1	3.32	3.32
3.1	3.1	3.32	3.32
3.1	3.1	3.33	3.32
3.12	3.12	3.32	3.33
3.1	3.1	3.32	3.32
3.11	3.12	3.32	3.32
3.1	3.1	3.34	3.32
3.1	3.1	3.32	3.32
3.1	3.1	3.32	3.34
3.13	3.1	3.33	3.32
3.1	3.12	3.31	3.32
3.1	3.1	3.32	3.32
3.1	3.1	3.32	3.22
3.1	3.1	3.22	3.31
3.1	3.1	3.33	3.32
3.11	3.12	3.32	3.32
3.1	3.1	3.32	3.33
3.1	3.1	3.32	3.32
3.1	3.1	3.32	3.32
3.1	3.1	3.33	3.32
3.11	3.12	3.32	3.32
3.1	3.1	3.32	3.32
3.1	3.1	3.32	3.32

Tabla 3.- Longitud de alas en machos y hembras con la molécula SiRNA.

Longitud de alas machos tratados (milímetros)	Longitud de alas machos control (milímetros)	Longitud de alas hembras tratadas (milímetros)	Longitud de alas hembras control (milímetros)
3.25	3.12	3.27	3.26
3.22	3.22	3.28	3.28
3.22	3.22	3.28	3.27
3.21	3.22	3.28	3.27
3.22	3.12	3.27	3.28
3.24	3.22	3.1	3.28
3.32	3.21	3.28	3.29
3.21	3.22	3.26	3.2
3.2	3.22	3.28	3.29
3.22	3.32	3.27	3.28
3.2	3.22	3.3	3.28
3.21	3.22	3.28	3.29
3.12	3.22	3.28	3.29
3.22	3.2	3.3	3.28
3.12	3.21	3.28	3.27
3.22	3.22	3.29	3.26
3.2	3.24	3.26	3.28
3.21	3.22	3.28	3.3
3.22	3.12	3.28	3.28
3.22	3.25	3.3	3.3
3.12	3.2	3.27	3.28
3.22	3.22	3.28	3.3
3.22	3.22	3.26	3.28

Tabla 4.- Longitud de abdomen en machos y hembras tratados con la molécula SiRNA

Longitud abdomen de machos tratados (milímetros)	Longitud abdomen machos control (milímetros)	Longitud abdomen hembras tratadas (milímetros)	Longitud abdomen hembras control (milímetros)
3.1	3.1	3.32	3.32
3	3.1	3.32	3.32
3.1	3.1	3.33	3.36
3.12	3.12	3.32	3.33
3.1	3.1	3.32	3.32
3.11	3.12	3.32	3.2
3.2	3.1	3.34	3.32
3.1	3.1	3.22	3.32
3.1	3.1	3.32	3.34
3.13	3.1	3.32	3.4
3.1	3.2	3.31	3.32
3.15	3.1	3.32	3.32
3.1	3.1	3.32	3.32
3.1	3.14	3.32	3.31
3.15	3.1	3.23	3.32
3.11	3.12	3.32	3.32
3.1	3.1	3.32	3.33
3.1	3.1	3.32	3.32
3.1	3	3.32	3.22
3.1	3.1	3.43	3.32
3.11	3.12	3.32	3.13
3.1	3.1	3.12	3.32
3.1	3.1	3.32	3.33

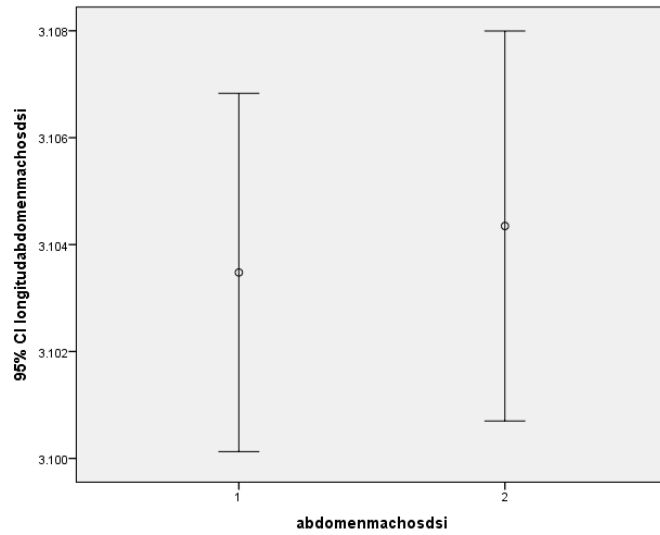


Figura 11.- Gráfico de barras de error donde se puede apreciar que no existen diferencias significativas entre las medias de las longitudes de abdomen en machos tratados (DsiRNA) versus machos control, con un 95% CI.

CI.

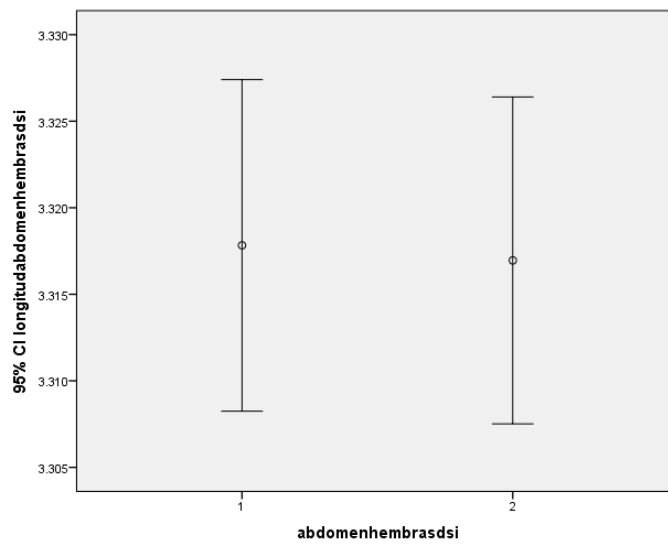


Figura 12.- Gráfico de barras de error donde se puede apreciar que no existen diferencia significativa entre las medias de las longitudes de abdomen en hembras tratadas (DsiRNA) versus hembras control, con un 95% CI.

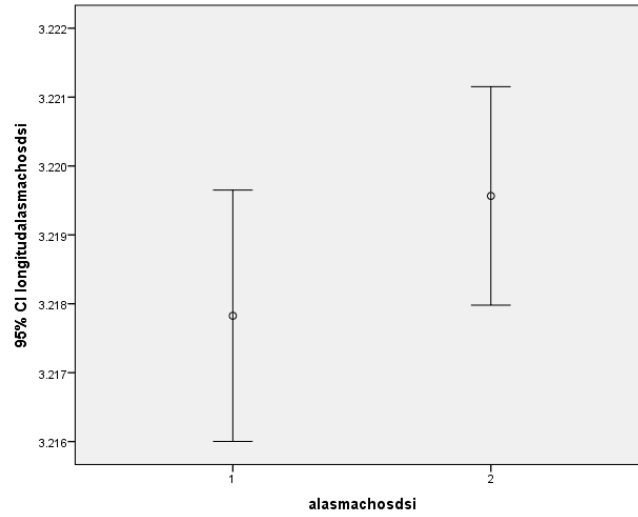


Figura 13.- Gráfico de barras de error donde se puede apreciar que no existen diferencia significativa entre las medias de las longitudes de alas en machos tratados (DsiRNA) versus machos control, con un 95% CI.

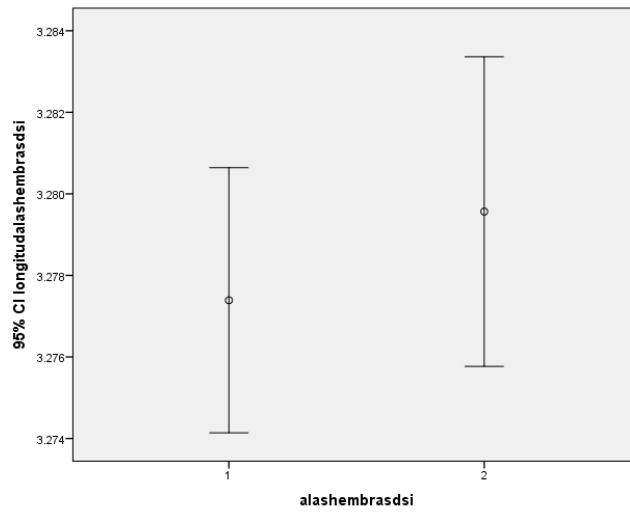


Figura 14.- Gráfico de barras de error donde se puede apreciar que no existen diferencia significativa entre las medias de las longitudes de alas en hembras tratadas (DsiRNA) versus hembras control, con un 95% CI.

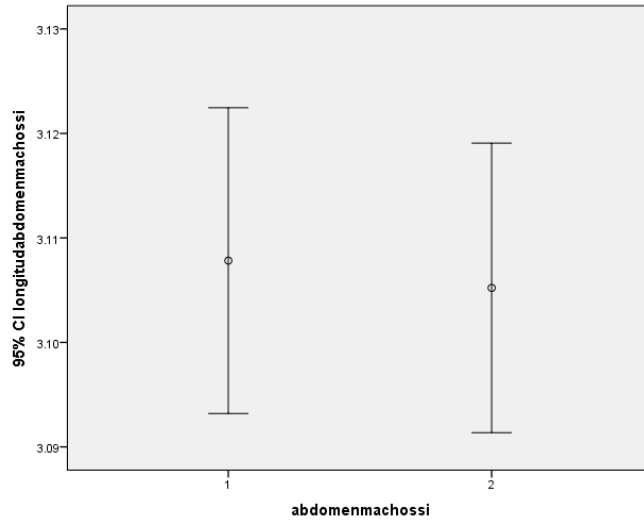


Figura 15.- Gráfico de barras de error donde se puede apreciar que no existen diferencia significativa entre las medias de las longitudes de abdomen en machos tratados (SiRNA) versus machos control, con un 95% CI.

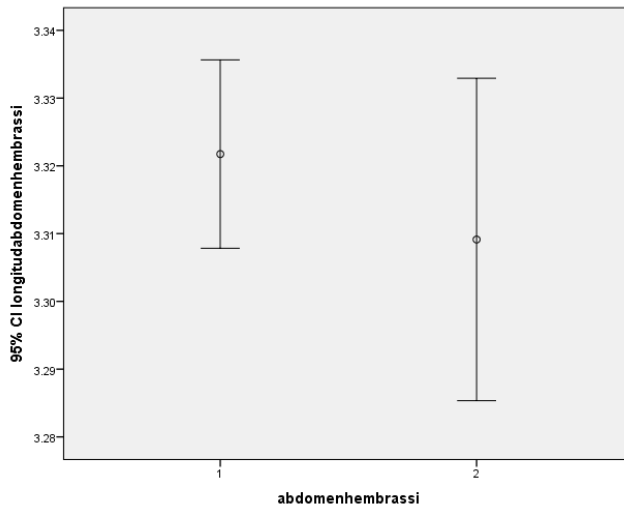


Figura 16.- Gráfico de barras de error donde se puede apreciar que no existen diferencia significativa entre las medias de las longitudes de abdomen en hembras tratadas (SiRNA) versus hembras control, con un 95% CI.

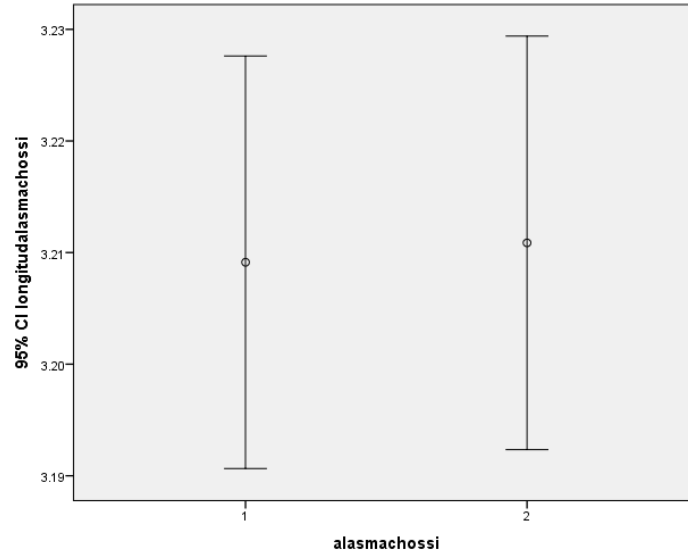


Figura 17.- Gráfico de barras de error donde se puede apreciar que no existen diferencia significativa entre las medias de las longitudes de alas en machos tratados (SiRNA) versus machos control, con un 95% CI.

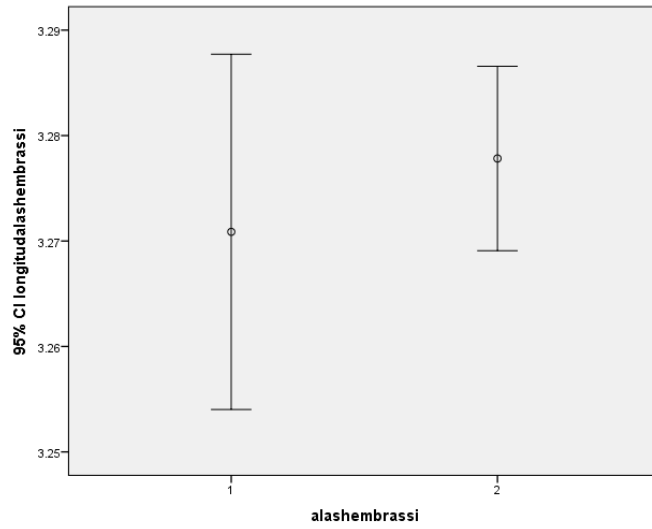


Figura 18.- Gráfico de barras de error donde se puede apreciar que no existen diferencia significativa entre las medias de las longitudes de alas en hembras tratadas (SiRNA) versus hembras control, con un 95% CI.

8. DISCUSIONES

La tasa de emergencia de *Ae. aegypti* son aproximadamente 1: 1 hembra: machos (Quispe-Pretel *et al.* 2014). Después de nuestros experimentos con las moléculas de RNAi diseñadas, pudimos observar que la proporción de sexos fue de 0.716: 1.284 (Hembras: machos)

Pudimos observar cambios en la proporción de machos y hembras emergidos, pero no cambios morfológicos macroscópicos, en contraste con los resultados del estudio de Mysore *et al.* (2015), donde obtuvieron cambios al silenciar el gen DSX durante el desarrollo de *Ae. aegypti* (pupas), lo que resulta en hembras con menor tamaño de ala y longitud de la probóscide. En el estudio realizado por Mysore *et al.* (2015), el proceso de alimentación de sangre o el comportamiento de apareamiento no se vio afectado en condiciones de laboratorio, en nuestro estudio faltaron pruebas contundentes para poder afirmar que nuestras moléculas no afectan el comportamiento del mosquito. Aunque existen resultados similares entre los dos estudios, cabe destacar las diferentes técnicas empleadas con las que se entregó dsRNAi; proporcionamos dsRNAi por vía oral con exposición en el medio junto con alimentos comenzando en la primera etapa larval, mientras que (Mysore *et al.* 2015) usó microinyección en la etapa de pupa. Si bien los resultados de la microinyección indicaron cambios en la morfología de las hembras adultas, esta técnica requiere lesionar los ejemplares, provocando una alta mortalidad en los insectos; por otro lado, por vía oral, se eliminó la mortalidad por exposición a la molécula, lo que nos permite en el futuro seguir manipulando los especímenes de esta manera.

Existen estudios donde silenciaron el gen que codifica la β -tubulina, lo que resultó en cambios morfológicos y fisiológicos registrados visualmente (principalmente estructura anatómica) (Singh *et al.* 2013). En nuestro caso, no se determinaron visualmente cambios morfológicos o fisiológicos, lo que puede deberse a la abundancia de β -tubulina en contraste con la proteína codificada por DSX.

En 2014 se reportó que la proporción hembra-macho de *Ae. aegypti* en condiciones de laboratorio fue 1:1.2, posteriormente los resultados de F1 fueron 47.5% machos y 52.5% hembras (Quispe-Pretel *et al.* 2014). Estos resultados contrastaron con nuestra evaluación de dsRNAi y sRNAi, en la que obtuvimos 74 y 65% de machos, respectivamente, generando un mayor número de machos. Tras analizar nuestros resultados y compararlos con los resultados de otros autores, podemos concluir que la proporción de machos y hembras puede modificarse mediante la exposición temporal a dsRNAi, este trabajo abre nuevas líneas de investigación sobre aplicaciones potenciales.

En una investigación en 2016 se mostró evidencia preliminar de exposición a RNAi que causa una disminución en la expresión de *Ae. aegypti* tra-2, que conduce a una distorsión de la segregación que actúa a nivel de la función de los gametos, que se ve reforzada por la letalidad cigótica específica del sexo (Kim *et al.* 2016). Aunque nuestro trabajo se centró en el gen DSX, ambos genes están involucrados en la cascada de determinación del sexo y la exposición a los RNAi produce cambios significativos; si se interrumpen ambos genes se podrían generar nuevas líneas de mosquitos con modificaciones en el sexo que nos permitan desarrollar nuevas estrategias de control.

En *Ae. aegypti* silenciaron el gen que codifica la hormona juvenil metil transferasa ácida (AeaJHAMT) mediante microinyección, y concluyeron que el desarrollo de huevos en las

hembras tratadas se redujo en un 50%. Sin embargo, los adultos tardaron tres (3) semanas más en emerger (Van Ekert *et al.* 2014). El uso de microinyección puede mejorar los resultados, y dicho esto, se requiere una gran cantidad de material biológico para realizar esta técnica, sin mencionar que los sitios objetivo deben estar bien planificados para obtener mejores resultados.

Por otro lado, existen registros de dónde el uso de RNAi en conjunto con otras moléculas produce resultados alentadores para el control de plagas. En 2016 se demostró que el quitosano más dsRNAi contra el gen VG causaba una mortalidad significativa, con retraso en el desarrollo del crecimiento y malformaciones en las alas de los adultos (Ramesh *et al.* 2016). Nuestros hallazgos, junto con los del autor antes mencionado, sugieren que las estrategias de intervención para genes de interés utilizando RNAi pueden surgir como una opción viable para el control de plagas.

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se reporta uno de los primeros abordajes para el cambio de sexo en *Ae. aegypti* para su control. Lo anterior atendiendo a los objetivos, con lo que nos permitió concluir que la hipótesis planteada [Interferir la transcripción de la isoforma que retiene el exón 5 del gen DSX en *Ae. aegypti* utilizando RNA sintético suministrado vía oral se verá reflejado en el fenotipo sexual, generando mayor número de machos emergidos que hembras] se aceptó. Con lo anterior se abren nuevas líneas de investigación para posibles apoyos potenciales en el control del mosquito.

10. PERSPECTIVAS

Esta tecnología puede incluirse como una herramienta robusta que apoyará a los laboratorios interesados en la cría masiva de machos para apoyar las técnicas actuales como en los mosquitos infectados con *Wolbachia* y la técnica del mosquito estéril.

11. BIBLIOGRAFIA

Alvarez-Gonzalez, L.C., A. Briceño, G. Ponce-Garcia, O.K. Villanueva-Segura, J.A. Davila-Barboza, B. Lopez-Monroy, S.M. Gutierrez-Rodriguez, Y. Contreras-Perera, I.P Rodriguez-Sanchez, and A.E. Flores. 2017. Assessing the effect of selection with deltamethrin on biological parameters and detoxifying enzymes in *Aedes aegypti* (L.). *Pest Manag Sci.* 73:2287-2293.

Arbeitman, M. N., New, F. N., Fear, J. M., Howard, T. S., Dalton, J. E., & Graze, R. M. (2016). Sex Differences in *Drosophila* Somatic Gene Expression: Variation and Regulation by doublesex. *G3* (Bethesda, Md.), 6(7), 1799–1808. <https://doi.org/10.1534/g3.116.027961>

Barretto André, Bruno Wilke Antônio, Ralph Medeiros-Sousa, Walter Ceretti-Junior Mauro, Toledo Marrelli, Mosquito populations dynamics associated with climate variations Volume 166, February 2017, Pages 343-350.

Bisset JA, Rodríguez MM, San Martín JL, Romero JE, Montoya R. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Pan Am J Public Health.* 2009; 26:229–234.

Brito LP, Linss JG, Lima-Camara TN, Belinato TA, Peixoto AA, Lima JBP, et al. Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PLoS One.* 2013;8: e60878. doi: 10.1371/journal.pone.0060878.

Burtis KC, Baker BS. *Drosophila* doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell.* 1989; 56:997–1010.

Buszczak M, Paterno S, Lighthouse D, Bachman J, Planck J, Owen S, Skora AD, Nystul TG, Ohlstein B, Allen A, Wilhelm JE, Murphy TD, Levis RW, Matunis E, Srivali N, Hoskins RA, Spradling AC. The CRNAegie protein trap library: A versatile tool for *Drosophila* developmental studies. *Genetics*. 2007; 175:1505–1531.

Carvalho BM, Rangel EF, Vale MM, La evaluación de los impactos del cambio climático en los vectores de enfermedades a través de modelos de nicho ecológico. -Boletín de investigación de Entomología. 2016; 1-12.

Chareonviriyaphap T, Bangs MJ, Suwonkerd W, Kongmee M, Corbel V, Ngoen-Klan R. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. *Parasit Vectors*. 2013; 6:280. doi: 10.1186/1756-3305-6-280.

Christiansen AE, Keisman EL, Ahmad SM, Baker BS. Sex comes in from the cold: the integration of sex and pattern. *Trends Genet*. 2002; 18:510–516.

Christiansen AE, Keisman EL, Ahmad SM, Baker BS. Sex comes in from the cold: the integration of sex and pattern. *Trends Genet*. 2002; 18:510–516.

David JP, Coissac E, Melodelima C, Poupardin R, Riaz MA, Chandor-Proust A, et al. Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics*. 2010; 11:216. doi: 10.1186/1471-2164-11-216.

Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbeto MC, Ranson H, Hemingway J, et al. Expression of the cytochrome P450, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae*s. from southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics*. 2008; 9:538.

Feinberg, E.H., Hunter, C.P., 2003. Transport of dsRNA into cells by the trans membrane protein SID-1. *Science* 301, 1545e1547.

Gempe T, Beye M. Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. *Bioessays*. 2011; 33:52–60.

Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002; 418:244–251.

Herpin A, Scharl M. Dmrt1 genes at the crossroads: a widespread and central class of sexual development factors in fish. *FEBS J*. 2011; 278:1010–1019.

Hildreth PE. Doublesex, Recessive Gene That Transforms Both Males and Females of *Drosophila* into Intersexes. *Genetics*. 1965; 51:659–678.

Hoang, K.P., T.M. Teo, T.X. Ho, and V.S. Le. 2016. Mechanisms of sex determination and transmission ratio distortion in *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors*. 9: 1-13

Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe I, Johnson PH, Muzzi F, et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*. 2011; 476:454-7.

Housset P, Dickmann R. A promise fulfilled-pyrethroid development and the benefits for agriculture and human health. *Bayer CropScience*. 2009; 62:135–144.

Jose, A.M., Hunter, C.P., 2007. Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Annu. Rev. Genet.* 41, 305e330.

Kasai S, Komagata O, Itokawa K, Shono T, Ng LC, Kobayashi M, et al. Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity,

penetration, and metabolism. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8: e2948. doi: 10.1371/journal.pntd.0002948.

Kato M, Takehana Y, Fukuda Y, Naruse K, Sakaizumi M, et al. An autosomal locus controls sex reversal in interspecific XY hybrids of the medaka fishes. *Heredity.* 2011

Kim D, Rossi J. RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques.* 2008; 44:613–616.

Kimura K, Hachiya T, Koganezawa M, Tazawa T, Yamamoto D. Fruitless and doublesex coordinate to generate male-specific neurons that can initiate courtship. *Neuron.* 2008; 59:759–769.

Kopp A. Dmrt genes in the development and evolution of sexual dimorphism. *Trends Genet.* 2012;28(4):175-184. doi: 10.1016/j.tig.2012.02.002.

Lambrechts L, Ferguson NM, Harris E, Holmes EC, McGraw EA, O’Neill SL. Assessing the epidemiological impact of Wolbachia deployment for dengue control. *Lancet Infect Dis.* 2015; 15: 862-866.

Lambrechts L. Predicting Wolbachia potential to knock down dengue virus transmission. *Ann Transl Med* 2015; 3:288.

Lee CY, Yap HH. Overview on urban pests: a Malaysian perspective. In: Chong NL, Lee CY, Jaal Z, Yap HH, editors. *Urban Pest Control - A Malaysian Perspective.* 2nd ed. Penang, Malaysia: Vector Control Research Unit, Universiti Sains Malaysia; 2003.

Maestre-Serrano, R., P. Pareja-Loaiza, D. Gomez Camargo, G. Ponce-García, A.E. Flores.2019. Co-occurrence of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium

channel and resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (L.) from the Colombian Caribbean region. *Pest Manag Sci.* 75: 1681-1688.

Manoli D. S., Meissner G. W., Baker B. S., 2006. Blueprints for behavior: genetic specification of neural circuitry for innate behaviors. *Trends Neurosci.* 29: 444–451

McEwan, D.L., Weisman, A.S., Hunter, C.P., 2012. Uptake of extracellular double stranded RNA by SID-2. *Mol. Cell.* 47, 746e754.

Meksianis ZN, Hickson RI, Allingham D, Mercer GN. Modelling the transmission dynamics of dengue in the presence of Wolbachia. *Math Biosci.* 2015; 157-166.

Mysore, K., L. Sun, M. Tomchaney, G. Sullivan, H. Adams, A.S. Piscocoya, D.W. Severson, Z. Syed, and M. Duman-Scheel. 2015. siR-NA-Mediated Silencing of doublesex during Female Development of the Dengue Vector Mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 9: e0004213.

Narahashi T. Nerve membrane ion channels as the target site of insecticides. *Mini Rev Med Chem.* 2002; 2:419–432. doi: 10.2174/1389557023405927.

Nkya TE, Akhouayri I, Kisinza W, David JP. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect Biochem Mol Biol.* 2013; 43:407–416. doi: 10.1016/j.ibmb.2012.10.006.

Pan American Health Organization. 2019. Dengue. Available online: <https://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-nacional/9-dengue-pais-ano.html> (accessed on 7 September 2019).

Quispe-Pretel, E., A. Carbajal-Villaverde, J. Gozzer-Fernández, and B. Moreno-Rodríguez. 2015. Biological cycle and Life Table of *Aedes aegypti*, under laboratory conditions: Trujillo (Peru), *Rebiolest.* 3: 91-101.

Ramesh Kumar D., P. Saravana Kumar, M.R. Gandhi, N.A. Al-Dhabi, M.G. Paulraj. 2016: Ignacimuthu S. Delivery of chi-tosan/dsRNA nanoparticles for silencing of wing development vestigial (vg) gene in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Int J Biol Macromol.* 86: 89-95.

Rancès E, Johnson TK, Popovici J, Iturbe I, Zakir T, Warr CG, et al. The Toll and Imd Pathways Are Not Required for Wolbachia- Mediated Dengue Virus Interference. *J Virol.* 2013; 87:11945-11949.

Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* 2000; 14:2587–2595.

Rideout EJ, Billeter JC, Goodwin SF. The sex-determination genes fruitless and doublesex specify a neural substrate required for courtship song. *Curr Biol.* 2007; 17:1473–1478.

Samson M. L., Rabinow L., 2014. Transcriptomic analysis of sexual differentiation in somatic tissues of *Drosophila melanogaster*: successes and caveats. *Sex Dev.* 8: 113–126.

Saleh, M.C., van Rij, R.P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P.H., Andino, R., 2006. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nat. Cell. Biol.* 8, 793e802.

Salvemini, M., U. Mauro, F. Lombardo, A. Milano, V. Zazzaro, B. Arcà, L.C. Polito, and G. Saccone. 2011. Genomic organization and splicing evolution of the doublesex gene, a *Drosophila* regulator of sexual differentiation, in the dengue and yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Evol Biol.* 11: 1-19.

Salz H. K., 2011. Sex determination in insects: a binary decision based on alternative splicing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21: 395–400.

Scott JG. Pyrethroid insecticides. *ISI Atlas Sci Pharmacol.* 1988; 2:125–128.

Segoli M, Hoffmann AA, Lloyd J, Omodei GJ, Ritchie SA. The Effect of Virus- Blocking Wolbachia on Male Competitiveness of the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8: e3294.

Shukla, J.N., and J. Nagaraju. 2010. Two female-specific DSX proteins are encoded by the sex-specific transcripts of DSX, and are re-quired for female sexual differentiation in two wild silkmoth species, *Antheraea assama* and *Antheraea mylitta* (Lepidoptera, Saturniidae), *Insect Biochem Mol Biol.* 40: 672-682.

Singh, A. D., Wong, S., Ryan, C. P., & Whyard, S. (2013). Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: implications for pest mosquito control. *Journal of insect science (Online)*, 13, 69. <https://doi.org/10.1673/031.013.6901>.

Smith LB, Kasai S, Scott JG. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pestic Biochem Phys.* 2016; 133:1–12. doi: 10.1016/j.pestbp.2016.03.005.

Suzuki, M.G. 2018. Sex Determination Cascade in Insects: A Great Treasure House of Alternative Splicing, pp. 267-288. In *Reproductive and Developmental Strategies*, Springer, Tokio.

Técnica del insecto estéril, control de plagas mediante insectos esterilizados | OIEA (iaea.org).

Tomoyasu, Y., and R.E. Denell. 2004. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Dev Genes Evol.* 214: 575-578.

Turley A.P., Moreira L.A., O'Neill S.L., McGraw E.A. *Wolbachia* Infection Reduces Blood-Feeding Success in the Dengue Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3: e516.

Ulvila, J., Parikka, M., Kleino, A., Sormunen, R., Ezekowitz, R.A., Kocks, C., Ramet, M., 2006. Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. *J. Biol. Chem.* 281, 14370e14375.

Van Borm S, Wenseleers T, Billen J, Boomsma JJ. *Wolbachia* in leafcutter ants: a widespread symbiont that may induce male killing or incompatible matings. *J Evol Biol.* 2001; 14:805-14.

Van Ekert, E., C.A. Powella, Jr. R.G. Shatters, and D. Borovsky. 2014. Control of larval and egg development in *Aedes aegypti* with RNA interference against juvenile hormone acid methyl transferase, *J. Insect Physiol.* 70: 143-150.

Verhulst EC, van de Zande L, Beukeboom LW. Insect sex determination: it all evolves around transformer. *Curr Opin Genet Dev.* 2010; 20:376–383.

Whangbo, J.S., Hunter, C.P., 2008. Environmental RNA interference. *Trends Genet.* 24, 297e305

Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev.* 2007; 87:1–28.

Winston, W.M., Sutherlin, M., Wright, A.J., Feinberg, E.H., Hunter, C.P., 2007. *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10565e10570.

Wood OR, Hanrahan S, Coetzee M, Koekemoer LL, Brooke BD. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasit Vectors.* 2010; 3:67. doi: 10.1186/1756-3305-3-67

World Health Organization. 2019. Dengue. Available online: <https://www.who.int/topics/dengue/es/> (accessed on 7 September 2019).

Wu, W., W. Xiong, C. Li, M. Zhai, Y. Li, F. Ma, and B. Li. 2017. MicroRNA-dependent regulation of metamorphosis and identification of microRNAs in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Genomics.* 109: 362-373.

Yamamoto D., Koganezawa M., 2013. Genes and circuits of courtship behaviour in *Drosophila* males. *Nat. Rev. Neurosci.* 14: 681–692.

Ye YH, Woolfit M, Rance's E, O'Neill SL, McGraw E.A. Wolbachia-Associated Bacterial Protection in the Mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7: e2362.

Zarkower D. Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat Rev Genet.* 2001; 2:175–185.

12. ANEXOS

Anexo 1. Pruebas T de STUDENT para la molécula de doble cadena (DsiRNA).

Prueba T

[Conjunto_de_datos0]

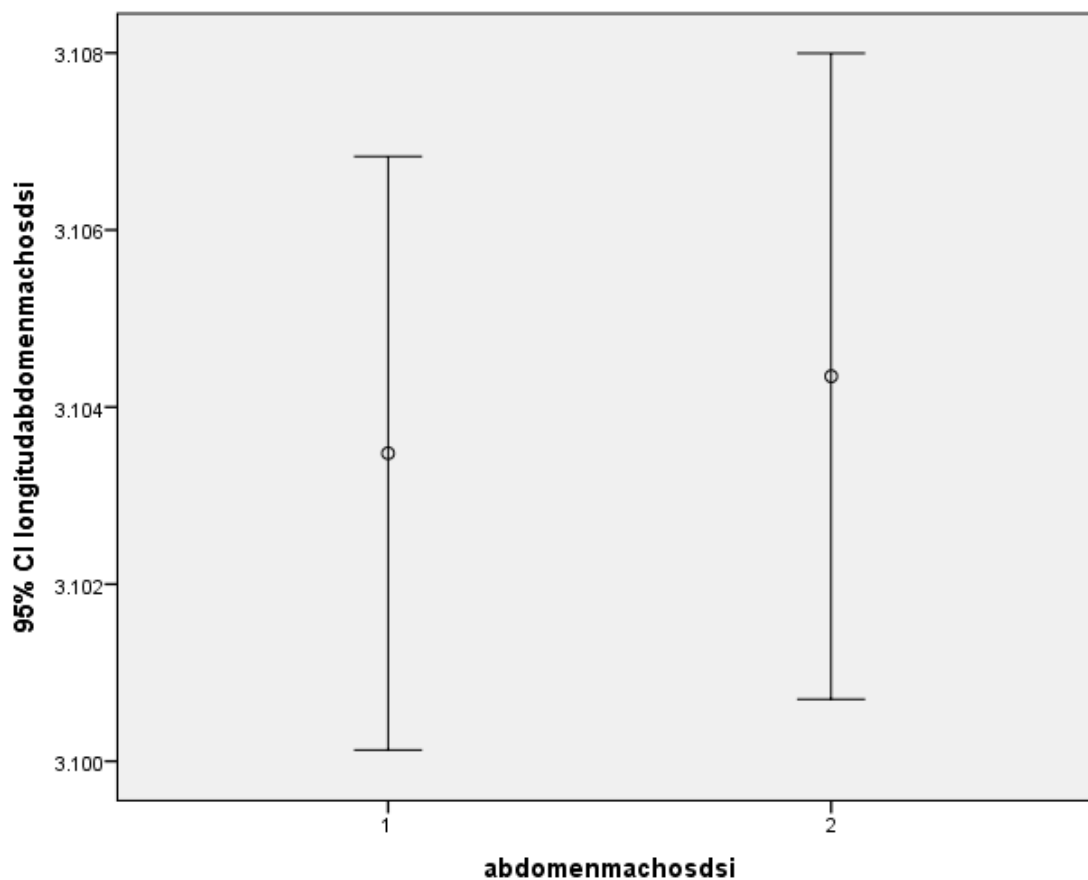
Estadísticas de grupo

abdomenmachosdsi		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
longitudabdomenmacho	1	23	3.1035	.00775	.00162
sdsi	2	23	3.1043	.00843	.00176

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior	
longitudabdomenmacho	Se asumen varianzas iguales	.822	.369	-.364	44	.718	-.00087	.00239	-.00568	.00394
sdsi	No se asumen varianzas iguales			-.364	43.689	.718	-.00087	.00239	-.00568	.00395

Gráfico



Prueba T

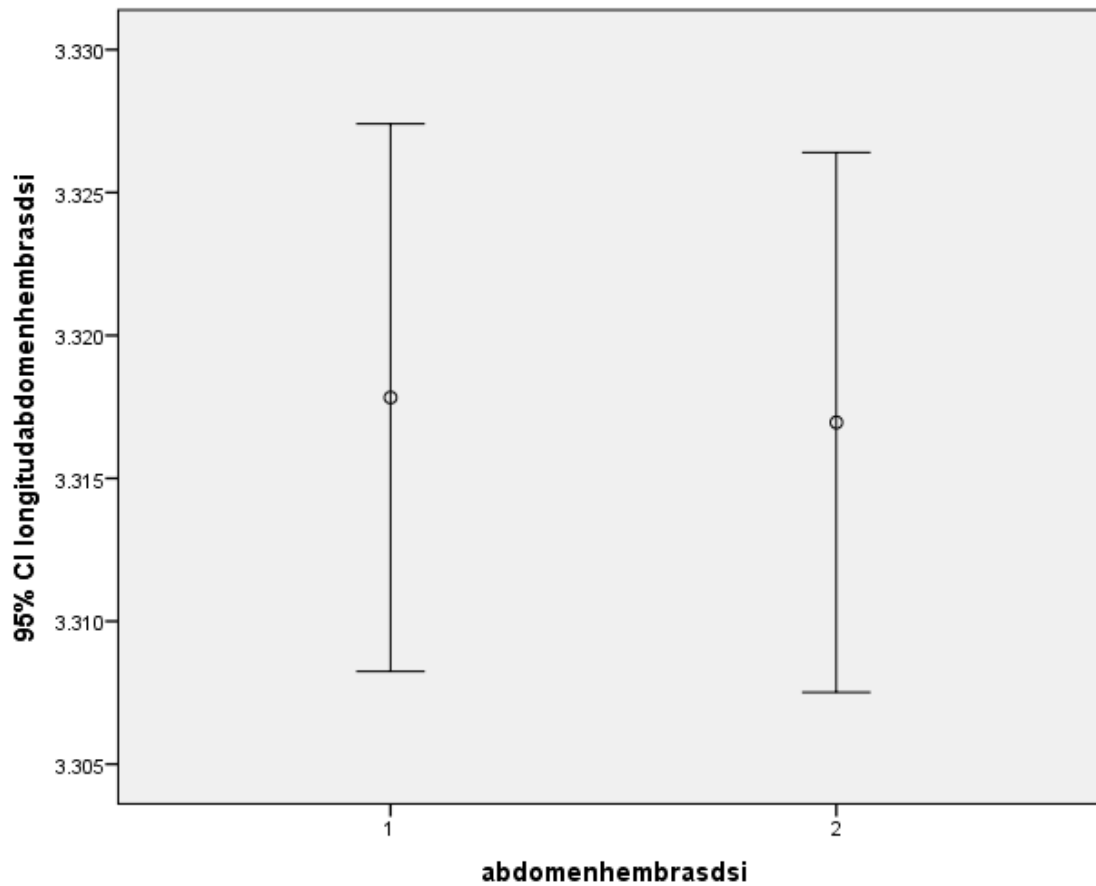
Estadísticas de grupo

abdomenhembrasdsi		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
longitudabdomenhembra	1	23	3.3178	.02215	.00462
sdsi	2	23	3.3170	.02183	.00455

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
longitudabdomenhembra	Se asumen varianzas iguales	.001	.980	.134	44	.894	.00087	.00648	-.01220	.01394
sdsi	No se asumen varianzas iguales			.134	43.991	.894	.00087	.00648	-.01220	.01394

Gráfico



Prueba T

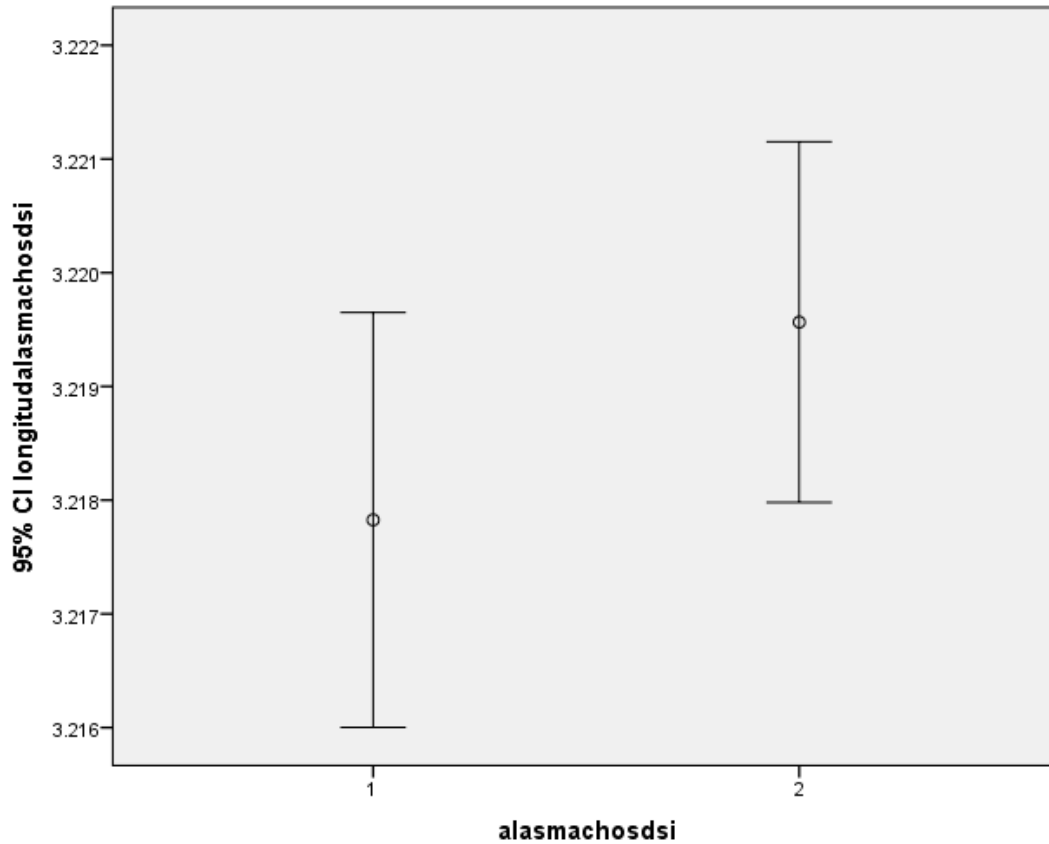
Estadísticas de grupo

	alasmachosdsi	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
longitudalasmachosdsi	1	23	3.2178	.00422	.00098
	2	23	3.2196	.00367	.00076

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior		Superior
longitudalasmachosdsi	Se asumen varianzas iguales	4.287	.044	-1.493	44	.143	-.00174	.00117	-.00409	.00061
	No se asumen varianzas iguales			-1.493	43.163	.143	-.00174	.00117	-.00409	.00061

Gráfico



Prueba T

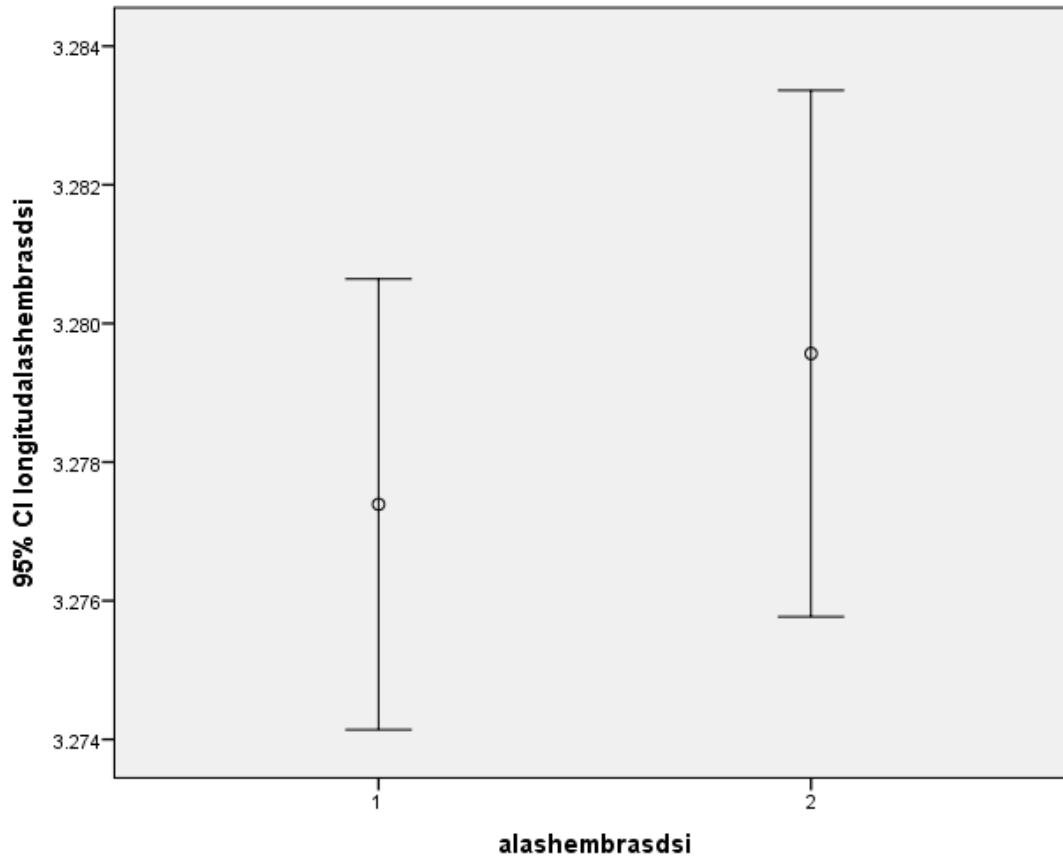
Estadísticas de grupo

alashembrasdsi		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
longitudalashembrasdsi	1	23	3.2774	.00752	.00157
	2	23	3.2796	.00878	.00183

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias							
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
										Inferior	Superior
longitudalashembrasdsi	Se asumen varianzas iguales	.033	.857	-.902	44	.372	-.00217	.00241	-.00703	.00268	
	No se asumen varianzas iguales			-.902	42.983	.372	-.00217	.00241	-.00703	.00269	

Gráfico



Anexo 2, Pruebas T de STUDENT para la molécula de cadena simple (SiRNA).

Prueba T

[Conjunto_de_datos0]

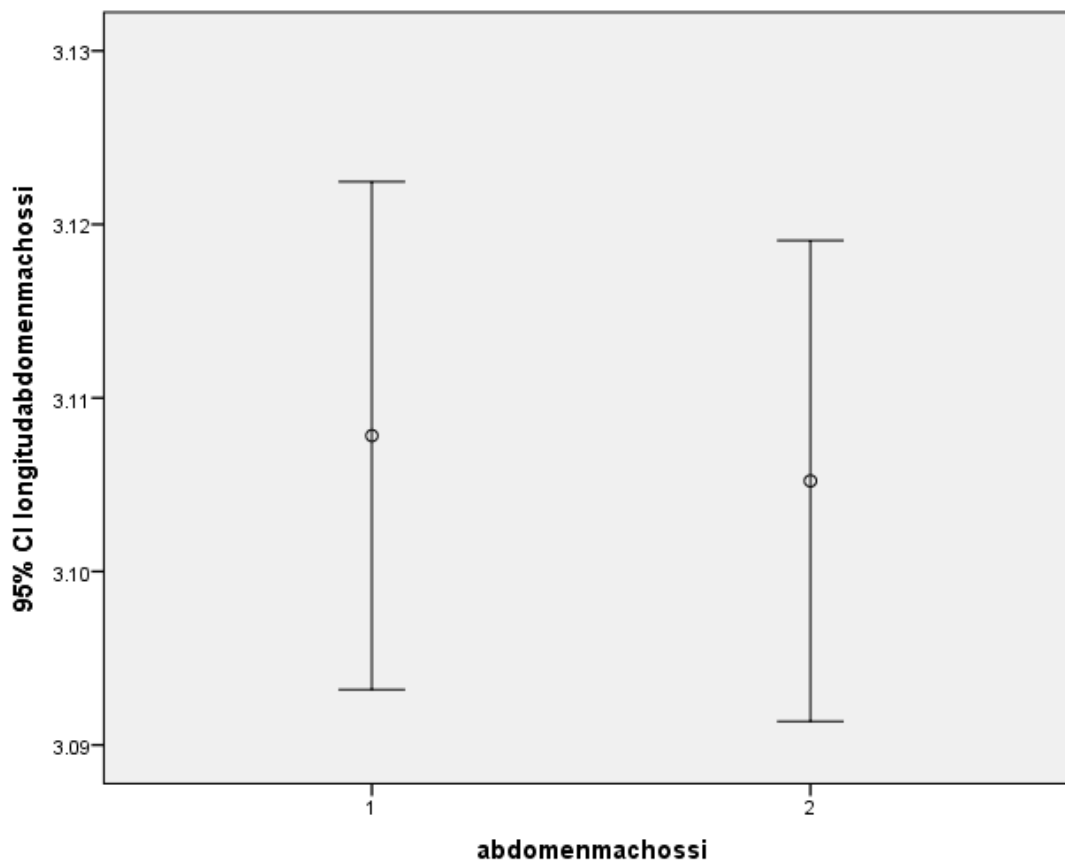
Estadísticas de grupo

abdomenmachossi		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
longitudabdomenmachossi	1	23	3.1078	.03384	.00706
	2	23	3.1052	.03203	.00668

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
longitudabdomenmachossi	Se asumen varianzas iguales	.094	.760	.268	44	.790	.00261	.00972	-.01697	.02219
	No se asumen varianzas iguales			.268	43.868	.790	.00261	.00972	-.01697	.02219

Gráfico



Prueba T

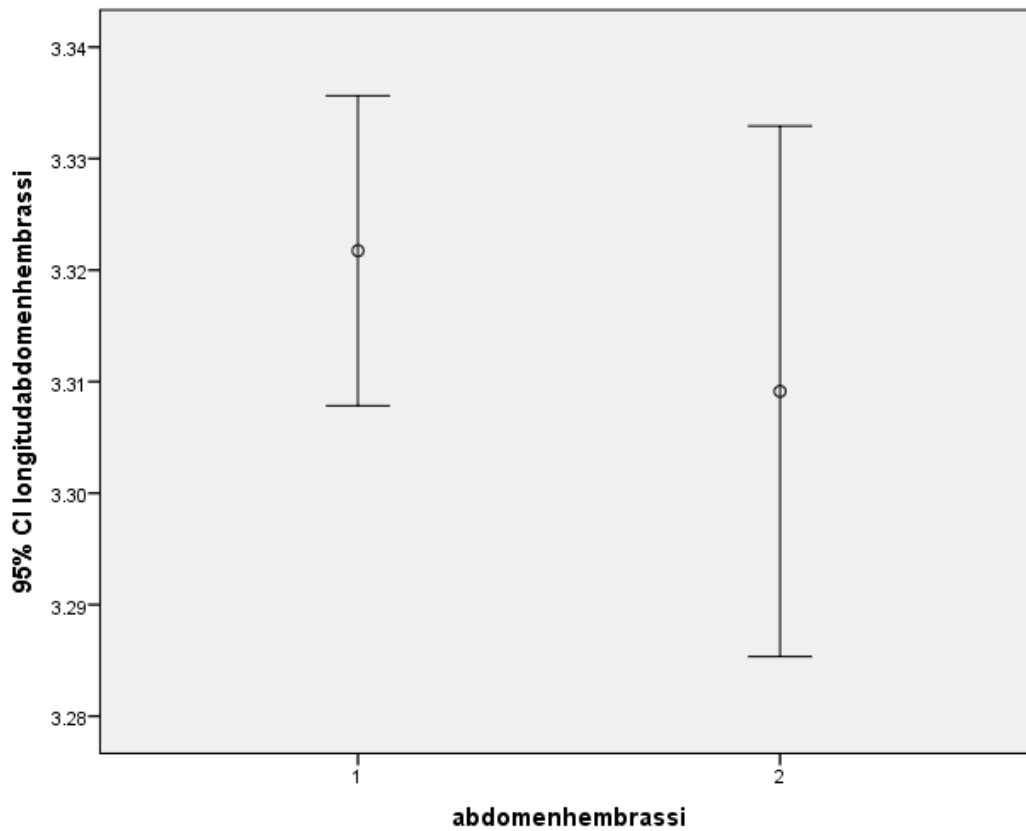
Estadísticas de grupo

abdomenhembrassi		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
longitudabdomenhembra	1	23	3.3217	.03214	.00670
ssi	2	23	3.3091	.05501	.01147

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
longitudabdomenhembra	Se asumen varianzas iguales	3.446	.070	.949	44	.348	.01261	.01329	-.01417	.03938
ssi	No se asumen varianzas iguales			.949	35.453	.349	.01261	.01329	-.01435	.03957

Gráfico



Prueba T

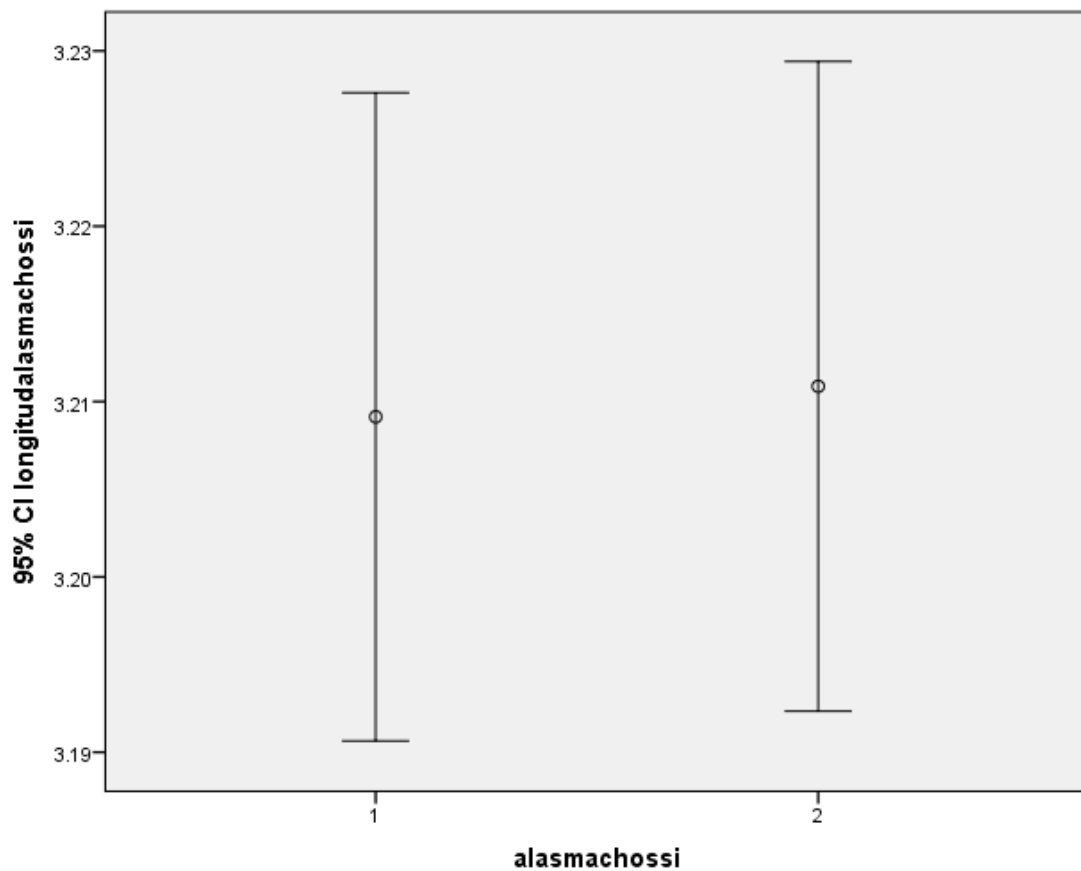
Estadísticas de grupo

	alasmachossi	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
longitudalasmachossi	1	23	3.2091	.04274	.00891
	2	23	3.2109	.04284	.00893

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
longitudalasmachossi	Se asumen varianzas iguales	.000	.991	-.138	44	.891	-.00174	.01262	-.02717	.02369
	No se asumen varianzas iguales			-.138	44.000	.891	-.00174	.01262	-.02717	.02369

Gráfico



Prueba T

Estadísticas de grupo

alashembrassi		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
longitudalashembrassi	1	23	3.2709	.03895	.00812
	2	23	3.2778	.02022	.00422

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
longitudalashembrassi	Se asumen varianzas iguales	.592	.446	-.760	44	.451	-.00696	.00915	-.02540	.01149
	No se asumen varianzas iguales			-.760	33.049	.453	-.00696	.00915	-.02557	.01166

Gráfico

