



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

**IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS REGULADORAS
EN LA REGIÓN 5' DEL GEN AAEL006536 DE *Aedes aegypti*
QUE INCREMENTA SU TRANSCRIPCIÓN
DURANTE LA INFECCION POR VIRUS DENGUE
TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**Maestro en Ciencias de la Salud con área de Concentración
en Enfermedades Infecciosas**

PRESENTA:

Graciela Herlinda Gleason Rodríguez

DIRECTORA DE TESIS:

**Dra. Verónica Valverde Garduño D.Phil: (oxon.)
CISEI, INSP**

ASESORES:

**Dr. José Ramos Castañeda CISEI, INSP
Dra. Sandra Rosas Madrigal CINVESTAV, IPN**

Cuernavaca, Mor. México

2014

*“Él da la sabiduría a los sabios,
y la ciencia a los entendidos.
Él revela lo profundo y lo escondido;
conoce lo que está en tinieblas,
y con Él mora la luz.
A ti, oh Dios de mis padres,
te doy gracias y te alabo,
porque me has dado sabiduría y fuerza”*
Daniel capítulo 2

Gracias de manera especial
A mi familia, a mi iglesia y a mis compañeros y profesores de la maestría

Gracias de manera muy especial
A George, a Krys y a Many

Índice

Resumen	4
I. Marco Teórico	5
1. Las secuencias reguladoras	5
2. Relación entre las secuencias reguladoras activas y la cromatina abierta	6
3. Remodelación de la cromatina durante la transcripción de genes inducibles	7
4. Identificación de secuencias reguladoras	10
5. Importancia de la identificación de secuencias reguladoras en genes de <i>Aedes aegypti</i> que incrementan su transcripción durante la infección por virus Dengue	12
II. Antecedentes	13
III. Justificación	16
IV. Hipótesis	16
V. Objetivos	16
1. Objetivo general	16
2. Objetivos específicos	16
VI. Metodología	17
1. Sistema de detección para el análisis de la estructura de la cromatina	17
2. Obtención de regiones libres de nucleosomas del DNA de <i>Aedes aegypti</i>	18
3. Análisis de cromatina abierta de la región 5´proximal del gen AAEL006536 de <i>Aedes aegypti</i>	21
VII. Resultados	22
1. Diseño de oligonucleótidos	22
2. Validación de oligonucleótidos	23
3. Alimentación de <i>Aedes aegypti</i>	27
4. Disección y fijación de intestinos de <i>Aedes aegypti</i>	27
5. Detección de virus Dengue en mosquitos alimentados con sangre infectada	28

6.	Aislamiento de regiones libres de nucleosomas mediante la técnica FAIRE	29
7.	Análisis de presencia de cromatina abierta en la región 5´proximal del gen AAEL006536 en el DNA del intestino medio de <i>Aedes aegypti</i>	30
VIII.	Discusión	36
1.	Sistema de detección para el análisis de la estructura de la cromatina	36
2.	Obtención de regiones libres de nucleosomas a partir del DNA de <i>Aedes aegypti</i>	36
3.	Análisis de la estructura de la cromatina de la región 5´proximal del gen AAEL006536 en el DNA del intestino medio de moscos <i>Aedes aegypti</i>	37
IX.	Conclusiones	39
X.	Perspectivas	40
XI.	Bibliografía	41
XII.	Anexos	44
1.	Anexo 1	44
2.	Anexo 2	45

RESUMEN

Las secuencias reguladoras son regiones de DNA que modulan la transcripción de los genes. A ellas se unen factores de transcripción con el fin de desempeñar funciones diversas relacionadas con la expresión genética. Las secuencias pueden ser de varios tipos dependiendo de su localización y función: promotores basales, promotores proximales, amplificadores, silenciadores y aislantes de efecto de cromatina.

Las regiones reguladoras activas se caracterizan por tener una estructura abierta. Muchos trabajos de investigación han permitido establecer una relación consistente entre la estructura de la cromatina abierta y la activación de los genes.

El presente trabajo tuvo como objetivo la identificación de secuencias reguladoras en la región 5' del gen AAEL006536 de *Aedes aegypti*, el cual incrementa su transcripción durante la infección por virus Dengue.

La identificación se realizó en DNA de tres grupos de mosquitos: alimentados con sacarosa, alimentados con sangre no infectada y alimentados con sangre infectada. Se utilizó la técnica FAIRE para aislar DNA libre de nucleosomas y se diseñaron y validaron oligonucleótidos para realizar el análisis de la presencia de cromatina abierta en la región de estudio.

Se identificaron dos regiones de cromatina abierta en el DNA de mosquitos *Aedes aegypti* infectados por virus Dengue (DENV). La primera región se localiza entre las posiciones -53 y +26 y sobrelapa con el sitio de inicio de la transcripción, la segunda se localiza entre las posiciones -617 y -169 y es consistente con una función potencial de promotor. La presencia de estas regiones es congruente con el aumento en la actividad transcripcional que tiene el gen AAEL006536 en presencia de virus Dengue.

Las secuencias correspondientes a esta región en los mosquitos no infectados tienen una estructura de cromatina cerrada lo cual es congruente ya que el gen AAEL006536 no tiene una alta transcripción en la condición de no infección..

Al comparar las dos condiciones se observó una dinámica de la cromatina; cuando hay infección por virus Dengue y el gen aumenta su nivel transcripcional la cromatina está abierta. Cuando no hay infección y el gen no tiene una alta transcripción la cromatina está cerrada. El contraste entre la estructura de la cromatina en estas regiones, entre células del intestino estimuladas o no por la presencia del virus, permite inferir que la condición de infección induce el cambio de conformación cerrada a conformación abierta de la cromatina la cual a su vez contribuye al control positivo de la transcripción del gen.

Se sugiere que el gen AAEL006536 es un gen inducible; es decir, que su transcrito se incrementa ante el estímulo de la infección por virus Dengue, que presenta diferente estructura de cromatina de acuerdo a la ausencia o presencia de infección en las células.

I. Marco Teórico

1. Las Secuencias Reguladoras

Ahora que es posible tener las secuencias completas de los genomas de los seres vivos, hoy en día la comunidad científica se dedica a su interpretación, teniendo como primer objetivo identificar y caracterizar cada uno de los elementos funcionales que lo integran. En el caso del genoma humano, se estima que solamente el dos o tres por ciento del éste pertenece a genes codificantes, mientras que el treinta por ciento está constituido por regiones reguladoras. En contraste con los veinte o venticinco mil genes codificadores, existen millones de regiones reguladoras. Tal complejidad ha dado lugar a la implementación del término “reguloma” para identificar al conjunto de regiones reguladoras que integran el genoma. Tanto investigadores particulares como grupos que forman parte del proyecto ENCODE (Encyclopedia of DNA elements) han identificado millones de elementos reguladores. Catalogar estos elementos reguladores es importante para alcanzar una comprensión completa de la biología de los seres vivos. (Sheffield, 2012).

Las secuencias reguladoras, también llamadas elementos reguladores en *cis*, son regiones de DNA que modulan la transcripción de los genes. A estas secuencias se unen factores de transcripción (elementos reguladores en *trans*), con el fin de desempeñar funciones diversas en relación a la expresión genética. Aunque los términos regiones reguladoras y secuencias reguladoras se mencionan indistintamente en la mayoría de los textos de genética, es importante aclarar que el término “región” se utiliza con respecto a coordenadas del DNA y el término “secuencia” se utiliza con respecto al orden de nucleótidos en el DNA. Las regiones reguladoras pueden ser de varios tipos dependiendo de su función y localización: promotores basales, promotores proximales, amplificadores (enhancers), silenciadores y aislantes de efecto de cromatina. (Ladunga, 2010).

Los promotores basales son regiones que se sitúan alrededor del sitio de inicio de la transcripción, en su mayoría comprenden regiones que van de las posiciones -35 a +35. Contienen varios elementos de respuesta o regiones más pequeñas que facilitan la unión de factores de transcripción específicos para esa región, que se requieren para la formación del complejo de preinicio de la transcripción.

Los principales elementos de respuesta de los promotores basales son la caja TATA que se localiza entre las posiciones -35 y -25, el sitio Inr que es una secuencia pequeña que se localiza a ambos lados del sitio de inicio de la transcripción (SIT) entre las posiciones -2 y +5, y el sitio DPE (downstream promoter element) que actúa en cooperación con Inr y se localiza en las posiciones +28, +33 (Ladunga, 2010).

Los promotores proximales se localizan a unas 100-200 pb del SIT, tienen una longitud de 15-30pb, y facilitan la interacción entre amplificadores y promotores basales.

Los amplificadores son regiones alejadas del sitio de inicio de la transcripción, tienen una longitud de 100 a 200 pb y se pueden encontrar río arriba o río abajo del SIT, en exones o intrones, y a distancias tan lejanas como 10,000 pb (en *Drosophila*), o 100,000 pb (humanos) del SIT. Las regiones amplificadoras reclutan factores de transcripción para facilitar la unión del complejo de inicio de la transcripción al promotor incrementando la velocidad de la transcripción (Lewin, 2008).

Los silenciadores producen el efecto contrario al de los amplificadores. Cuando reclutan factores de transcripción que interfieren con el ensamblado del complejo de inicio se localizan río arriba, cuando previenen la unión de los factores de transcripción a sus motivos de regulación en *cis* se localizan tanto río arriba como río abajo del SIT (Ladunga, 2010).

Los aislantes de efecto de cromatina bloquean la interacción entre amplificadores y silenciadores con el promotor. Los aislantes que interfieren con los activadores, bloquean la interacción amplificador-promotor colocándose entre ellos y de esta manera inhiben el inicio de la transcripción. Los aislantes de barrera se localizan en el límite de dominios de eucromatina y heterocromatina y mantienen al gen en un estado transcripcionalmente activo ya que interfieren con la acción de los silenciadores (Lewin, 2008).

El reguloma es muy dinámico y su actividad varía de acuerdo a la edad, ambiente, estadio de desarrollo, tipo de tejido y tipo celular. A diferencia de los genes codificadores que tienen un código genético rígido, los elementos reguladores no lo tienen y presentan mayor variabilidad en su secuencia (Sheffield, 2012).

El cinco por ciento de los elementos reguladores se han identificado como partes de promotores y el resto se localiza en las regiones intergénicas o en los intrones (Sheffield, 2012).

2. Relación entre Secuencias Reguladoras Activas y la Cromatina Abierta

La primera evidencia que sustentó una relación entre la estructura de la cromatina y la activación génica fueron los estudios de hipersensibilidad a nucleasas en genes activos, realizados hace unos veinte años. La bioquímica de la transcripción y la genética de levaduras permitieron reconocer a los nucleosomas como barrera para el inicio de la transcripción, y a las histonas como participantes activos en el proceso de transcripción in vivo (Ladunga, 2010).

Muchos trabajos realizados en levaduras han permitido establecer la relación entre la estructura de la cromatina y la activación de los genes. Entre ellos están los estudios con PHO 5, los estudios de comparación entre activación de genes constitutivos y genes inducibles y los estudios de genes de histonas mutados.

PHO 5 es un gen que se activa a bajas concentraciones de fosfato gracias a los activadores Pho2 y Pho4. Almer y Horz demostraron la presencia de nucleosomas en el promotor de PHO 5 en los sitios de unión de Pho 4 y de factores de transcripción basales de los genes inactivos. Cuando PHO 5 se expresa, la zona de unión a Pho4 esta libre de nucleosomas, por lo que los autores concluyeron que los nucleosomas se encuentran en los promotores bloqueando el acceso de los factores de transcripción a sus sitios de unión cuando los genes no están activados y que los nucleosomas son alterados o removidos durante la transcripción (Almer, 1986).

A partir de 2004 se iniciaron los estudios de posicionamiento de nucleosomas en las regiones reguladoras y codificantes para el análisis de la estructura de la cromatina. Algunos de estos estudios han comparado la estructura de la cromatina en genes constitutivos y genes inducibles.

Los genes constitutivos se diferencian de los genes inducibles por tener una región libre de nucleosomas localizada rio arriba del sitio de inicio de la transcripción flanqueada por dos nucleosomas posicionados. Esta región se denomina “región NFR” (nucleosome free región) y es un sitio de unión para muchos factores de transcripción (TFs). Los genes inducibles, que se expresan solo bajo condiciones específicas, están regulados por una gran variedad de factores remodeladores de la cromatina y los sitios de unión en los promotores se caracterizan por la presencia de nucleosomas. Un intercambio en los nucleosomas permite que los sitios de unión sean accesibles a los factores de transcripción. Los cambios en la transcripción de los genes se correlacionan con estos cambios en la estructura de la cromatina (Rando, 2012).

Los estudios de genes de histonas mutados para determinar la función de estas proteínas, también han contribuido a la mejor comprensión de la relación entre transcripción y estructura de la cromatina. Se han podido aislar muchos genes de histonas mutados a partir de los cuales se han podido identificar factores que controlan la estructura de la cromatina mediante la estabilidad y dinámica del nucleosoma y la modificación de histonas. En muchos casos, se ha podido constatar una doble función en moléculas que intervienen en la regulación del inicio de la transcripción, por ejemplo enzimas acetilasas de histonas que son factores de transcripción o subunidades de complejos de remodelación de la cromatina (Rando, 2012).

3. Remodelación de la Cromatina durante la Transcripción de Genes Inducibles

La activación de los genes de *Aedes aegypti*, al igual que la de todos los eucariontes, está controlada por mecanismos de regulación que garantizan la activación en el momento y la célula precisos. Estos mecanismos se realizan a nivel transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional (Cruz-Bustillo, 2013).

A través de muchas investigaciones se ha podido demostrar que la estructura de la cromatina desempeña un papel fundamental en la regulación del inicio de la transcripción y que es a partir de dicha estructura que se decide si un gen se transcribe o no (Luo, 1999).

El DNA de los genes inactivos se encuentra en un estado compactado, esta estructura representa un problema para el inicio de la transcripción por la inaccesibilidad que tienen los factores de transcripción a los elementos de respuesta de acción *cis*. Para que un gen pueda iniciar su transcripción es necesaria la remodelación de la cromatina en las regiones reguladoras, de tal forma que se generen regiones libres de nucleosomas que permitan el reclutamiento de los factores de transcripción y la DNA polimerasa (Lewin, 2008).

En la actualidad se han identificado dos mecanismos esenciales, mediante los que se realiza la remodelación de la cromatina que propicia la activación génica: el remodelado de cromatina dependiente de ATP y la modificación post-traduccional de las histonas (Robin, 1999).

El complejo de remodelado dependiente de ATP es un conjunto de proteínas y realiza cambios en la estructura de la cromatina originando secuencias libres de nucleosomas, estos cambios originan la modificación de la posición de una secuencia sobre la superficie del nucleosoma por deslizamiento del DNA sobre el nucleosoma, ó el espaciamiento entre nucleosomas ó el desplazamiento completo del nucleosoma (Lewin, 2008)

Estos complejos proteicos utilizan energía de la hidrólisis del ATP (trifosfato de adenosina) por lo que tienen una subunidad fosfatasa. Algunos de los complejos aislados a partir de varios organismos son SWI/SNF (switch sucrose non fermentable) en levaduras y su homólogo mSWI/SNF en mamíferos, ISWI (imitation SWI), NURF (nucleosome remodeling factor), CHRAC (chromatin accessibility complex), ACF (ATP-dependent chromatin assembly and remodeling factor), estos tres últimos identificados en *Drosophila*. En todos los casos se ha demostrado que los complejos alteran la estructura de la cromatina y que facilitan la unión de factores de transcripción (Edmondson, 1996).

Los complejos de remodelado no tienen subunidades con secuencias de unión a DNA, por lo que tienen que ser reclutados por diversos factores, como el factor de transcripción Swi5 que se une al promotor HO y recluta SWI/SNF en levaduras o el factor de transcripción GAGA que se une al promotor HSP70 y recluta a NURF. Los complejos de remodelación pueden unirse al complejo basal, por ejemplo la holoenzima RNAPol II está compuesta por la polimerasa, factores de transcripción (excepto TBP y TFA) y SWI/SNF (Lewin, 2008). También se ha observado la unión entre complejos con actividad desacetilasa y complejos de remodelación de cromatina (Luo, 1999)

El complejo de acetilación de histonas, como su nombre lo indica, acetila las proteínas histonas H3 y H4 de los nucleosomas, esta acetilación se da

mayormente en el amino ξ de las lisinas de los extremos N terminales. Las histonas así acetiladas están asociadas con sitios activos de la transcripción (Allis, 2007).

Los complejos se caracterizan por tener una subunidad de unión a DNA, una subunidad coactivadora y una subunidad histona acetilasa (HAT). Muchos coactivadores de transcripción han sido identificados con función acetilasa como por ejemplo p/CAF (P300/CBP associated factor) homólogos de GCN5 (general control of amino acid synthesis protein 5) en levaduras, el coactivador del factor de transcripción CREB (cyclic adenosine monophosphate response element binding protein) y los coactivadores que se activan por medio de receptores nucleares de hormonas ACTR (activator of the thyroid and retinoica acid receptor) y SRC-1 (steroid receptor coactivator).

Aún no se conoce el mecanismo de acción de los complejos de acetilación en la activación génica; aunque se ha propuesto que la acetilación propicia la unión de algunos factores de transcripción y que además puede facilitar la desorganización de las estructuras de orden superior de organización de la cromatina (Luo 1999).

El mecanismo conjunto de remodelación de la cromatina involucra además de la acción de los complejos mencionados, otros mecanismos y factores que en conjunto generan el inicio de la transcripción. La secuencia en el DNA, no solo funciona como identificación para la unión de factores de transcripción, se ha observado que las regiones poly dA-dT (desoxiadencilato desoxitimidilato) están asociadas a una baja presencia de nucleosomas en las regiones promotoras (en levaduras), y que regiones con islas CpG se caracterizan por no formar estructuras de mayor nivel en la estructura de la cromatina (en mamíferos), permitiendo en ambos casos mayor accesibilidad a los factores de transcripción. La presencia de histonas con metilación en aminoácidos específicos, como H3K4 (histona 3 en lisina 4) y la desmetilación del DNA también están asociados a genes transcripcionalmente activos o próximos a ser transcritos (Guertin, 2013).

Desde la década de los noventas se han propuesto modelos generales de la regulación de la transcripción, como el citado por Lou (1999) en el que se propone la unión de ciertos factores de transcripción primarios a pequeños sitios de unión en el DNA libre de nucleosomas, estos factores primarios reclutan los complejos de acetilación de histonas y de remodelación dependiente de ATP los cuales, a su vez, generan otros sitios de unión, accesibles a los factores del complejo basal y otros factores de transcripción.

Más recientemente Guertin (2013) ha propuesto en su modelo (ver figura 1), la unión de un factor de transcripción a su elemento de respuesta en una isla CpG en el DNA de unión entre nucleosomas. Esta unión permite el reclutamiento de los complejos de acetilación de histonas y de remodelación de la cromatina dependiente de ATP los cuales generan otras regiones de cromatina abierta para el reclutamiento de diversos factores como los que forman el complejo basal para la transcripción.

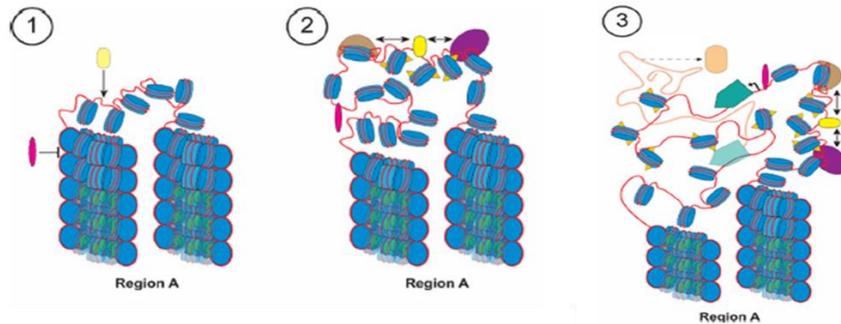


Figura 1. Modelo de remodelado de la cromatina para la unión de factores de transcripción. **1.** Reclutamiento de un primer factor (rectángulo amarillo) a una isla CpG en el DNA de unión entre nucleosomas (línea rosa fuerte), otros factores de transcripción (elipse rosa) no tienen acceso a sus sitios de unión. **2.** Reclutamiento de los complejos de remodelación de la cromatina (elipse café) y acetilación de histonas (elipse morado) formación de cromatina abierta (línea rosa fuerte) y reclutamiento de otros factores de transcripción (elipse rosa). **3.** Reclutamiento de RNA pol II (pentágono verde), formación de RNA mensajero (línea rosa claro) para la posterior traducción de una proteína (elipse naranja). Modificado, (Guerltin, 2013).

4. Identificación de Secuencias Regulatoras

A partir de la década de los ochentas y hasta la actualidad se han utilizado diversos métodos para estudiar las secuencias regulatoras en el genoma, entre los más empujados están el ensayo de hipersensibilidad a DNasa I (DHS), la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y más recientemente el asilamiento de elementos reguladores asistido por formaldehído (FAIRE) (Nagy,2009).

El mapeo de regiones sensibles a la DNasa se inició a partir de la décadas de los ochentas y es uno de los métodos más antiguos para identificar secuencias regulatoras por su sensibilidad a la digestión de nucleasas.

Las desoxiribonucleasas son enzimas que cortan los enlaces fosfodiéster en el DNA de manera inespecífica. Debido a su gran tamaño, su acción se restringe a sitios de fácil acceso caracterizados por ser regiones libres de nucleosomas. Después de tratar DNA con una pequeña concentración de enzima los cortes pueden ser localizados en el genoma. El ensayo puede hacerse tanto en loci individuales mapeando los cortes mediante la separación de los fragmentos por electroforesis en gel de poliacrilamida, o bien utilizando la secuenciación de alto rendimiento para todo el genoma. Después de secuenciar los fragmentos de DNA y alinearlos con una secuencia de referencia se obtiene el perfil de las regiones abiertas en el genoma (Sheffield, 2012)

Keene (1981) identificó sitios hipersensibles a DNasa I en los genes activos de las proteínas de choque térmico hsp 22, 23 26 y 28 en DNA de embriones de *Drosophila*, y observó que los sitios hipersensibles a la enzima siempre se localizaban en los extremos 5' de los genes, nunca en las regiones codificadoras ni en los extremos 3'.

La inmunoprecipitación de cromatina ha sido utilizada durante varias décadas y consiste en la generación de enlaces cruzados entre el DNA y las proteínas cercanas, seguido de inmunoprecipitación de la proteína de interés mediante anticuerpos específicos. Una vez identificada la proteína, las uniones cruzadas se revierten y se obtiene la secuencia del DNA unido previamente a ellas. Este ensayo permite identificar secuencias reguladoras para factores específicos, y modificaciones postraduccionales en las colas de las histonas (Sheffield, 2012). Esta técnica requiere un anticuerpo específico, y por lo tanto requiere de la previa identificación del factor, además, algunos factores no forman uniones cruzadas con el DNA (Nagy, 2009).

El aislamiento de elementos reguladores asistida con formaldehído es una técnica más reciente que detecta regiones de cromatina abierta. Se basa en el hecho de que no todas las regiones de DNA forman uniones cruzadas con las proteínas de la misma manera (Nagy, 2009). Estas uniones cruzadas se generan utilizando formaldehído, que une el DNA con proteínas en contacto directo, para que se realice esta unión se requiere un amino ξ el cual es característico de las lisinas que componen el veinte por ciento de las histonas. Por ello, las proteínas de los nucleosomas dominan el perfil de los enlaces cruzados. Posteriormente se realiza lisis y sonicación para fragmentar el genoma y finalmente una extracción fenol-cloroformo y precipitación. Las secuencias de DNA que sí se unen a proteínas mediante formaldehído permanecen en la interfase durante la extracción fenol-cloroformo mientras que aquellas que no se asocian a proteínas se acumulan en la fase acuosa permitiendo así, el aislamiento de regiones libres de nucleosomas (ver figura 2). Se trata de una técnica sencilla y rápida que hasta la fecha ha funcionado en los eucariontes en que se ha probado (Giresi, 2009).

La investigación de Hogan (2006) para comprobar que los promotores de los genes regulados por el ciclo celular en levaduras, se caracterizan por un empobrecimiento de nucleosomas durante su transcripción, reveló la coincidencia entre las regiones de enriquecimiento de DNA libre de nucleosomas obtenidas mediante FAIRE con los sitios hipersensibles a DNAsa I.

Existen otras técnicas como el mapeo de regiones sensibles a nucleasa micrococcal (MNAsa), y el mapeo utilizando sonicación o enzimas metiltransferasas. En todos los casos se identifican regiones potencialmente funcionales que requieren de ensayos reporteros para la validación funcional.

En la presente investigación se decidió utilizar la técnica FAIRE para la identificación de secuencias reguladoras debido a que es una técnica altamente reproducible, sencilla y rápida que ha funcionado en todos los eucariontes en los que se ha utilizado y que además las muestras de estudio requieren una preparación mínima.

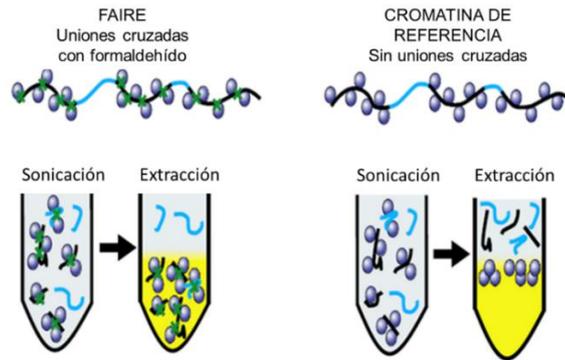


Figura 2. Diferencias entre la extracción de DNA con y sin FAIRE. En la extracción con FAIRE la fase acuosa contiene solo el DNA que en un inicio estaba libre de nucleosomas, en la extracción sin FAIRE la fase acuosa contiene todo el DNA de la muestra. Modificado, (Giresi, 2009).

5. Importancia de la Identificación de Secuencias Regulatoras en Genes de *Aedes aegypti* que Incrementan su Transcripción durante la Infección por virus Dengue

El dengue es un síndrome febril agudo con riesgo de complicaciones letales (Secretaría de Salud, 2013), que se transmite cuando mosquitos del género *Aedes* infectados inoculan el virus Dengue a hospederos sanos durante la alimentación sanguínea (Ramos-Castañeda, 2008).

Actualmente es considerada la enfermedad viral transmitida por vector más importante en el mundo (World Health Organization, 2012a), con un incremento de treinta veces en su incidencia durante los últimos cincuenta años. Sin embargo; a la fecha no existe una vacuna disponible ni antivirales específicos para su prevención y tratamiento (Colpits, 2011). Por lo que, toda investigación que aporte conocimiento en torno a la transmisión de esta enfermedad resulta relevante.

El virus Dengue (DENV) incluye cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) y el mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector de todos. Los mosquitos se infectan al alimentarse de una persona virémica y después de siete a catorce días, pueden transmitir el virus a un nuevo hospedero (Salazar, 2007).

La identificación de secuencias reguladoras de genes del vector que incrementan su transcripción en la condición de infección, establecerá las primeras bases para la comprensión de las interacciones moleculares entre virus Dengue y *Aedes aegypti*. Identificar secuencias reguladoras es solo el primer paso, pero representa la base para la posterior identificación de motivos de factores de transcripción y de los factores mismos, así como de las posibles vías de señalización involucradas en el control de la expresión del gen y los mecanismos mediante los cuales virus Dengue altera el programa transcripcional de las células que infecta.

Entender los efectos de la infección viral en la expresión genética resulta crucial para el conocimiento de la biología de *Aedes aegypti* en condición de infección y

proporcionará a los investigadores una de las herramientas para lograr interrumpir el ciclo de infección humano-insecto (Colpits, 2011)

En el caso particular de este trabajo, se pretende conocer cuáles son las secuencias reguladoras en la región 5' del gen AAEL006536 de *Aedes aegypti*, cuyo transcrito se incrementa durante la infección por virus Dengue, y proveer así los primeros conocimientos fundamentales sobre los cuales se irán construyendo otros hasta alcanzar la posibilidad de una aplicación concreta en el área de control de la transmisión y la enfermedad de dengue.

II. Antecedentes

Para que haya transmisión del virus Dengue, éste debe infectar las células epiteliales del intestino medio del mosquito, diseminarse hacia el hemocele y de allí al resto de los órganos, incluyendo las glándulas salivales, desde donde transmitirá el virus al picar al hospedero durante la alimentación sanguínea. Después de la alimentación de sangre infectada, virus Dengue pasa a través de la hipofaringe y el esófago al intestino medio e infecta las células epiteliales del mismo. En estas células se inicia la replicación viral y posteriormente la diseminación. Actualmente se ha detectado infección en las células epiteliales del intestino a partir del día dos después de la infección (ver figura 3) y hasta la muerte del mosquito (Salazar, 2009). Los autores reportan una tasa de infección entre 76-95% durante los días siete y diez después de la infección, utilizando ensayo de inmunofluorescencia para la detección del antígeno DENV-2.

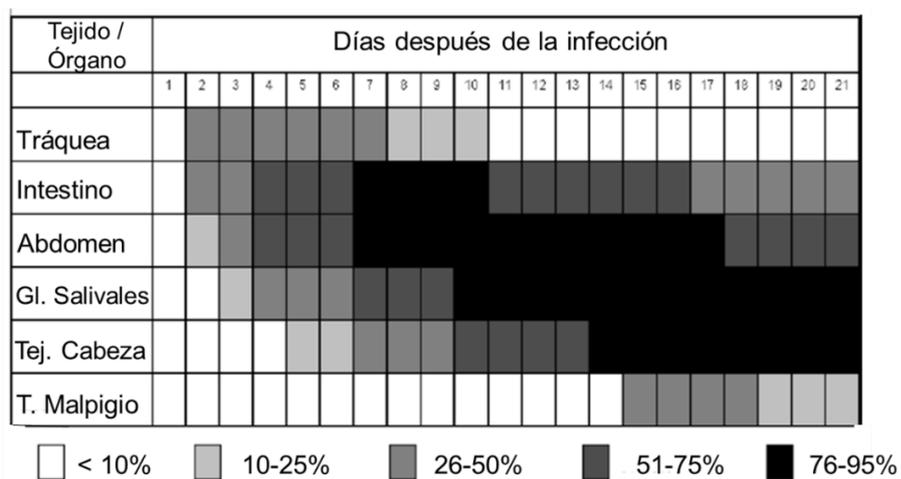


Figura 3. Tropismos temporales de DENV-2 en diferentes tejidos y órganos de *Ae. aegypti*. Las tasas de infección se muestran mediante una escala de grises. Los porcentajes se obtuvieron después de disectar, teñir y analizar los mosquitos individualmente. La tasa de infección se determinó como el número de intestinos con antígeno DENV-2 entre el número total de intestinos examinados, n=20-30. Modificado, (Salazar, 2007).

A medida que el virus se disemina a los diferentes órganos, algunos genes de las células infectadas presentan alteraciones en su expresión aumentando o disminuyendo su actividad transcripcional (ver figura 4). Entre los genes de *Aedes aegypti* que aumentan su transcripción en presencia de virus Dengue se encuentra el gen de interés del presente estudio; el gen AAEL006536, que presenta un incremento de más de 14 veces durante el primer día después de la infección y más de 4 y 5 veces el segundo y séptimo día respectivamente (Colpits, 2014).

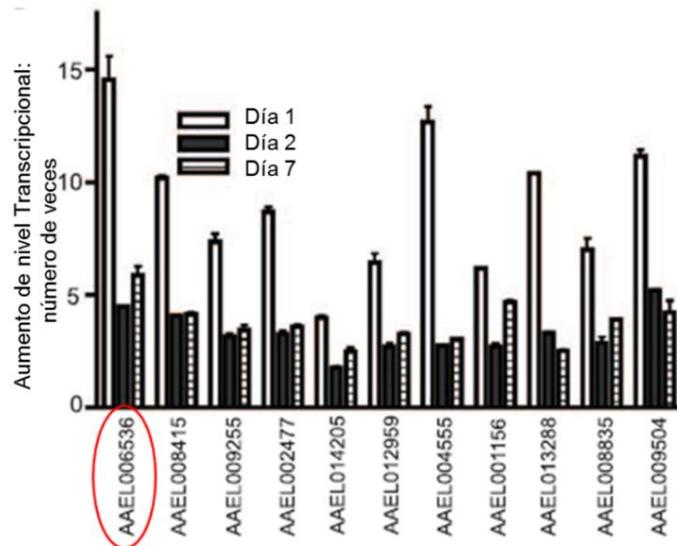


Figura 4. Expresión de genes individuales de *Aedes aegypti* en tres días diferentes después de la infección con virus Dengue. La infección se hizo mediante alimentación con sangre infectada y el RNA se aisló los días 1, 2 y 7 después de la infección. Se realizó qRT-PCR para medir la expresión de los genes. En rojo se circula el gen de interés de este trabajo AAEL006536 el cual aumenta su nivel transcripcional mas de cinco veces el día siete después de la infección. Modificado, (Colpitts, 2011).

Es el notable aumento en su transcripción en la condición de infección por virus Dengue, lo que hace del gen AAEL006536 un excelente candidato para el estudio de secuencias reguladoras en la región 5'.

El genoma de *Aedes aegypti* se encuentra organizado en tres cromosomas. El gen AAEL006536 se localiza en el brazo corto del segundo cromosoma en el supercontig 1.210: 1,025,197 – 1,034,969 como se observa en la figura 5 (Timoshevskiy, 2013).

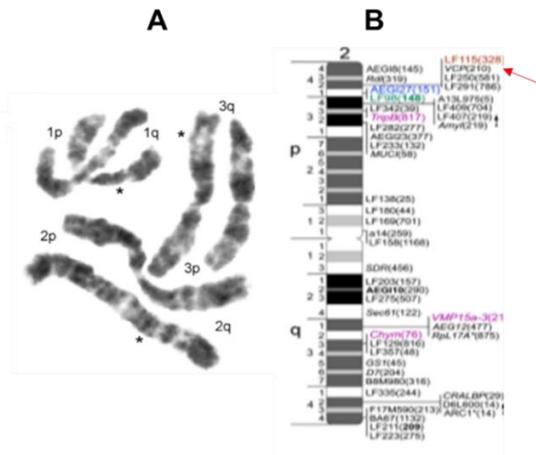


Figura 5. A. Cromosomas de *Aedes aegypti* en metafase temprana, teñidos con YOYO-1. B. Integración del mapa genómico del cromosoma 2 de *Aedes aegypti*. Se señalan los brazos p y q del cromosoma en el lado izquierdo y la localización de supercontigs en el lado derecho. La flecha roja indica la localización del supercontig 1.210 en el que se localiza el gen de estudio AAEL006536. Modificado, (Timoshevskiy, 2013).

El gen AAEL006536 tiene una longitud de 9.77 kilobases, contiene 3 exones (ver figura 6) y genera un transcrito de 954 nucleótidos que codifica para una proteína hipotética de 214 aminoácidos (Vector Base, 2014).

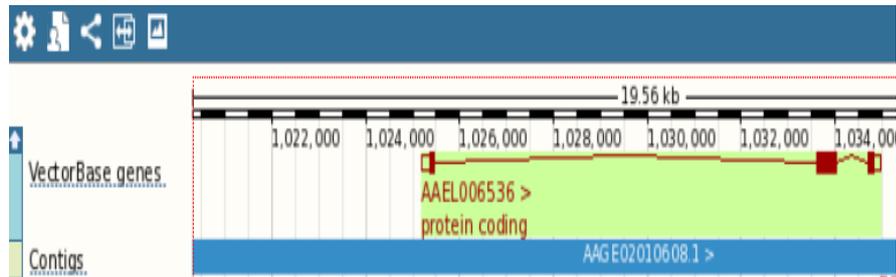


Figura 6. Representación del Gen AAEL006536 de *Aedes aegypti*. se señalan los 3 exones en rojo (Vector Base, 2014).

Aunque no se conoce la función del gen AAEL006536, ni la proteína que codifica, se escogió para realizar este trabajo debido a la alta posibilidad de encontrar cromatina abierta en la región 5' por el incremento en su transcripción durante la infección por virus Dengue.

III. Justificación

El dengue es una enfermedad infecciosa de alto impacto en Salud Pública cuyo vector principal es el mosquito *Aedes aegypti*.

El conocimiento del mecanismo de regulación de aquellos genes del vector que cambian su transcripción en presencia de virus Dengue, requiere la previa identificación de las secuencias reguladoras y sus elementos de respuesta.

El presente trabajo servirá para identificar regiones reguladoras y elementos de respuesta potencialmente responsables del incremento en la transcripción del gen AAEL006536 de *Aedes aegypti* durante la infección por virus Dengue.

La identificación de las regiones reguladoras y elementos de respuesta constituyen una base fundamental para conocer las vías de señalización que se modifican durante la infección y los mecanismos mediante los cuales el virus Dengue altera el programa transcripcional de las células que infecta.

Estas secuencias tienen el potencial para ser utilizadas en la expresión de moléculas exógenas inhibitoras de la replicación de virus Dengue en el intestino medio de *Aedes aegypti* solo en presencia de este virus.

IV. Hipótesis

Durante la infección por virus Dengue se activa el promotor del gen AAEL006536 de *Aedes aegypti* y se forma una región libre de nucleosomas en la secuencia correspondiente a dicho promotor.

V. Objetivos

1. Objetivo General

Identificar regiones reguladoras del gen AAEL006536 de *Aedes aegypti* que incrementa su transcripción durante la infección por virus Dengue.

2. Objetivos Específicos

- 2.1 Establecer un sistema de detección para el análisis de la estructura de la cromatina.
- 2.2 Analizar la presencia de cromatina abierta de la región 5'proximal del gen AAEL006536 de *Aedes aegypti* que incrementa su transcripción durante la infección por virus Dengue.

VI. Metodología

1. Sistema de Detección para el Análisis de la Estructura de la Cromatina

1.1 Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se diseñaron con el programa CLC Main Work Bench importando la secuencia del gen AAEL006536 de *Ae. aegypti* desde la base de datos Vector Base. Se incluyeron 2Kb de la región 5' río arriba y 200 pb de la región río abajo del sitio de inicio de la transcripción para la identificación de regiones reguladoras basales y proximales. Los parámetros considerados inicialmente fueron los siguientes: tamaño de oligonucleótido de 17 a 25 nucleótidos, tamaño de amplicón de 80 a 160 pb, T_m 55-60°C, no ricos en AT o GC o TC o AG, ni G o C en el extremo 3'. Estos parámetros de referencia se fueron ajustando en el programa de acuerdo a las posibilidades del diseño para quedar de la siguiente manera: tamaño de oligonucleótido de 19 y 25 nucleótidos, tamaño de amplicón de 79 a 225 nucleótidos, T_m 55.3-59.5°C, porcentaje citosina-guanina 40-57.9%, región cubierta por los oligonucleótidos -709 a +183. Se diseñaron dos series de pares de oligonucleótidos para la misma región, (serie "C" o básicos que cubren la región -702 a +183 y serie "D" o alternativos que cubren la región -709 a +173) con el fin de tener una reserva opcional en caso de que los pares básicos no fueran funcionales. Cada serie incluyó siete pares de oligonucleótidos que cubrieron las regiones mencionadas sin dejar regiones descubiertas ya que cada uno sobrelapó con el siguiente. Una vez diseñados los oligonucleótidos, éstos fueron fabricados por la compañía Integrated DNA Technologies.

1.2 Validación de amplicones

Validación de tamaño de amplicones. Se obtuvieron los diferentes amplicones a partir de PCR punto final con los pares de oligonucleótidos previamente diseñados y DNA extraído del mosquito *Ae. aegypti* mediante la técnica descrita en el Anexo 1. (*Mezcla de reacción para PCR:* 1µl DNA *Aedes aegypti*, 1µl oligo R, 1µl oligo F, 10µl buffer Sx, 2µl MgCl₂, 1µ dNTPs, 33.75µl H₂O BM, 0.25µl Taq Pol. Las especificaciones para PCR punto final fueron para la etapa de Inicio 95°C durante 2min, 35 ciclos para desnaturalización a 95°C durante 30seg, alineación a 50°C durante 30seg, elongación a 72°C durante 30seg y fase Final a 72°C durante 5min) Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con un marcador de peso molecular para corroborar el tamaño esperado de los amplicones. Como control positivo se generó el amplicón de los oligonucleótidos AaeH3_1F y AaeH3_1R previamente probado en el laboratorio.

Validación de amplificación de un solo producto. Mediante PCR en tiempo real se generaron las curvas de fusión para verificar que cada par de oligonucleótidos diseñados genera un amplicón único. (*Mezcla de reacción para qPCR:* 5µl SYBR, 0.2µl ROX, 0.15µl Oligo F, 0.15µl Oligo R, 2µl Agua BM, 0.25µl DNA. Las especificaciones para qPCR fueron para la etapa de Inicio 95°C durante 20seg, 40 ciclos para desnaturalización a 95°C durante 30seg, alineación de acuerdo a lo

especificado para cada par de oligonucleótidos (55°C-56°C) durante 30seg, elongación a 72°C durante 30seg y fase final a 72°C durante 5 min).

Validación de rango dinámico. La validación de rango dinámico se realizó mediante PCR tiempo real para cada par de oligonucleótidos a diferentes concentraciones de DNA: 100ng/μl, 10ng/μl y 1ng/μl (La mezcla de reacción y especificaciones para qPCR fueron las mismas utilizadas para la validación de amplificación de un solo producto). Esta validación se realizó para verificar una relación inversamente proporcional entre el ciclo umbral y el logaritmo de la concentración inicial de DNA.

2. Obtención de regiones libres de nucleosomas del DNA de *Aedes aegypti*

2.1 Alimentación de *Aedes aegypti*

Con el fin de comparar la presencia de regiones libres de nucleosomas en el DNA de mosquitos bajo diferentes condiciones se trabajó con tres grupos de mosquitos: alimentados con sacarosa, alimentados con sangre no infectada y alimentados con sangre infectada. Las pupas se solicitaron al insectario del INSP y una vez recibidas se mantuvieron a 27°C en diferentes contenedores con mosquitero para la eclosión pupal. Cuando los adultos de los tres grupos emergieron, todos fueron alimentados con sacarosa al 3% en agua cinco veces destilada, durante cuatro días. Los mosquitos que solo se alimentaron con sacarosa fueron alimentados hasta el día doce de haber emergido, y se procedió a la disección ese mismo día. Los mosquitos alimentados con sangre no infectada (suspensión de eritrocitos) o con sangre infectada (suspensión de eritrocitos conteniendo 8×10^6 pfu DENV) fueron privados de azúcar 24 horas antes de la alimentación con sangre la cual se realizó una sola vez durante dos horas a los cuatro-cinco días de emerger a través de un alimentador de membrana.

Los mosquitos hembra fueron separados unas horas después de la alimentación sanguínea y colocadas en un contenedor especial en el insectario a 27°C, se les alimentó con sacarosa los siguientes siete días y al séptimo día se realizó la disección.

Se utilizó sangre de conejo, proporcionada por el bioterio del INSP la cual se preparó centrifugando a 2,500rpm /10min/4°C, agregando 1ml de PBS al sobrenadante, repitiendo dos veces más este paso y agregando 2ml de SFB. La sangre infectada se preparó de la misma manera que la sangre no infectada y al final se le adicionó 8×10^6 DENV-2 Unidades Formadoras de Placa (pfu) aproximadamente en un volumen de 1 ml de PBS para tener un volumen final de 1ml de PBS con stock viral, 2ml de SFB y 1ml suspensión de eritrocitos y una concentración final de 1.6×10^6 pfu/ml aproximadamente. El stock viral y la técnica para la preparación de sangre infectada fueron proporcionados por el Dr. José Ramos Castañeda del CISEI del INSP (Ramos-Castañeda, 2008).

2.2 Disección de *Aedes aegypti*

Durante la disección, primero se separó el exoesqueleto del abdomen y posteriormente el intestino medio, para lo cual se utilizaron agujas para inyección de insulina. Los intestinos se guardaron en tubos eppendorf en grupos de diez. Las carcasas de los mosquitos disectados se guardaron para realizar la detección de virus Dengue y otros estudios posteriores.

2.3 Detección de virus Dengue mediante RT-PCR Anidada

Extracción de RNA con TRIzol. Los mosquitos (12) previamente disectados y congelados a -70°C fueron descongelados, macerados vigorosamente con pistilo y resuspendidos mediante una pipeta, se agregó 1ml de TRIzol (1mg/ml) incubando durante 5min, se realizó una centrifugación a 1400rpm/ 5min/ 4°C y fue separada la fase acuosa a la que se le agregó 1ml de Isopropanol frío mezclando, centrifugando a 14000rpm/ 30min/ 4°C, después de decantar fueron agregados 500µl de etanol 70% y se realizó una última centrifugación a 14000rpm/ 10min/ 4°C, después de decantar y secar al aire la pastilla fue resuspendida en 20µl de agua biología molecular.

Obtención de cDNA. Se realizó mediante PCR punto final. Mezcla de reacción1(1X): 2ng de RNA, 2µl de hexámeros aleatorios, y agua biología molecular hasta alcanzar un volumen de 13µl. incubando durante 5 min y pasando inmediatamente a hielo 5 min mas. Mix2(1X): 5µl de buffer, 5µl dNTP´s, 1µl RNA sin riboblock (inhibidor de RNAsas), 1µlM-MLURT (reversotranscriptasa). Fueron agregados 12µl de la mezcla 2 a los 13µl de la 1 incubando a 37°C durante 90 min.

Obtención de segmentos de aproximadamente 1385 pb . La primera PCR punto final para la PCR anidada se realizó con el siguiente Mezcla de reacción (1X): 5µl de Buffer, 2µl Mg⁺⁺, 1µl dNTP´s, 1µl oligonucleótido Flavi-1, 1µl oligonucleótido Flavi+1, 2µl cDNA, 12.75µl de agua biología molecular y 0.25µl de Taq Polimerasa. Las especificaciones para PCR , para la etapa de Inicio 94°C durante 5 min, 40 ciclos para desnaturalización a 94° durante 1 min, alineación 40°C durante 1.30 min, elongación a 72°C durante 10 min, y fase final a 72°C durante 10 min.

Obtención de segmentos de aproximadamente 143pb. La segunda PCR punto final para la PCR anidada se realizó con el siguiente mezcla de reacción (1X):): 5µl de Buffer, 2µl Mg⁺⁺, 1µl dNTP´s, 1µl oligonucleótido Flavi-2, 1µl oligonucleótido Flavi+2, 11.75µl de agua biología molecular, 0.25µl de Taq Polimerasa y 3µl de producto de PCR 1. Las especificaciones para PCR , para la etapa de Inicio 94°C durante 5 min, 40 ciclos para desnaturalización a 94° durante 1 min, alineación 47°C durante 1 min, elongación a 72°C durante 1 min, y fase final a 72°C durante 5 min.

Observación de bandas en gel de agarosa. El gel se preparó al 3%, teñido con 1.5µl de bromuro de etidio y se corrió a 70volts durante 30 min.

2.4 Técnica FAIRE

Fijación y formación de enlaces cruzados. Los intestinos recién disectados fueron colocados de 10 en 10 en tubos eppendorf con 500 μ l de medio Schneider, a los que se agregó 27.4 μ l de formaldehído y 472.6 μ l más de medio Schneider para tener un volumen final de 1ml y fueron incubados en agitador orbital a 80rpm/10min/temp.ambiente. A cada tubo fueron agregados 50 μ l de glicina (2.5M a una concentración final de 125mM) para incubar en agitador orbital 80rpm/5min/temp. ambiente. El sobrenadante fue retirado y se realizó lavado con 200 μ l de PBS 1x y MPSF (10 μ l / ml) e inhibidor de proteasa (10 μ l /ml) se incubaron en agitador orbital a 80 rpm/5min/temp. ambiente, se realizó centrifugación a 10 000 rpm/1 min/ temp. ambiente, el sobrenadante fue retirado y el material fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

Lisis Celular. Fue elaborado el Buffer de Lisis (50 ml, Tritón x-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100mM Tris-Cl pH 8 10mM y EDTA 1mM) y fueron colocadas las perlas para lisis (0.5mm diámetro) en el buffer un día antes de utilizarlas (500 μ l de perlas de vidrio en 1ml de buffer). Los intestinos de cada grupo fueron resuspendidos en 1ml de buffer de lisis y posteriormente se agregaron a un tubo de rosca de 2ml que contenía las perlas decantadas. La lisis fue realizada en un mezclador de perlas mediante 5 sesiones de 1 min. con incubaciones de 2 min. en hielo entre cada sesión. El lisado fue recolectado haciendo una punción en el fondo del tubo con una aguja de drenando en un tubo de 15ml en hielo.

Sonicación. El lisado obtenido fue transferido a tubos de 1.5 ml en alícuotas de 300 μ l para sonicar durante 15 min, con pulso alto por 30 seg. seguido de 30 seg. de descanso manteniendo el baño de agua a 4°C.

Extracción Fenol-Cloroformo. A un volumen de lisado fue adicionado un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 y después de mezclar con un vórtex se centrifugó a 14,000 rpm/5 min/ temp. ambiente. La fracción acuosa fue transferida a un tubo limpio de 1.5 ml, este procedimiento se realizó 2 veces para terminar agregando un volumen de cloroformo/alcohol insoamílico 24:1 a la fracción acuosa y centrifugar a 14,000 rpm/5 min/temp. ambiente y transferir la la fase acuosa a un tubo nuevo

Precipitación de DNA. A la fase acuosa obtenida mediante la extracción se le agregó acetato de sodio, (1/10 de alícuota 3M pH5.2 a una concentración final de 0.3M), 1 μ l de 20mg/ml de glicógeno y 2 volúmenes de alícuota, de etanol al 95% y se incubó a -20°C toda la noche. El precipitado fue centrifugado al día siguiente a 15 000g/30 min/ 4°C y lavado con 500 μ l de etanol frío al 70%, nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm/10 min/4°C. Después de retirar el sobrenadante y secar la pastilla a temperatura ambiente fue resuspendido en 50 μ l de 10mM Tris-HCL pH7.5. F. Se agregó 1 μ l de RNAsa (10mg/ml), e incubó durante 1 h a 37°C para finalizar con una última extracción.

3 Análisis de Cromatina Abierta de la Región 5´Proximal del Gen AAEL006536 de *Aedes aegypti*

3.1 PCR en tiempo real

Una vez obtenido el DNA libre de nucleosomas mediante la Técnica FAIRE y habiendo validado los oligonucleótidos diseñados, se procedió al análisis de cromatina abierta de la región 5´proximal del gen AAEL006536.

Se realizó el ensayo de PCR en tiempo real para cada par de oligonucleótidos, con el DNA obtenido de los mosquitos de cada una de las tres condiciones: alimentados con sacarosa, con sangre no infectada y con sangre infectada. En todos los casos se realizó réplica técnica y se obtuvieron los valores de ciclo umbral con una desviación estándar igual o menor a 0.3. Se utilizó DNA total de mosquito *Aedes aegypti* sin FAIRE como control para cuantificación relativa, el cual se extrajo mediante el procedimiento descrito en el Anexo 1. (*Mezcla de reacción para qPCR*: 5µl SYBR, 2.08µl agua biología molecular, 0.02µl ROX, 0.2µl Oligo F, 0.2µl Oligo R, 2.5µl DNA específico de cada grupo de estudio. Las especificaciones para qPCR fueron, para la etapa de Inicio 95°C durante 20 seg, 40 ciclos para desnaturalización a 95° durante 3 seg, alineación según lo especificado para cada par de oligonucleótidos (55°C-56°C) durante 30seg, elongación a 72°C durante 30 seg y fase final a 72°C durante 5 min).

3.2 Cuantificación relativa

El enriquecimiento relativo se estimó a partir de los ciclos umbrales (Cts) del DNA de la muestra FAIRE y del DNA control para cuantificación relativa sin FAIRE, ya que el ciclo umbral es inversamente proporcional al logaritmo de la cantidad inicial del DNA a amplificar. La concentración inicial relativa del DNA FAIRE con respecto al DNA control sin FAIRE, se refleja en la diferencia del número de ciclos necesarios para alcanzar el mismo nivel de fluorescencia:

$$\Delta Ct = Ct \text{ DNA control} - Ct \text{ DNA FAIRE}$$

El incremento de DNA FAIRE con respecto al DNA control sin FAIRE al inicio de la qPCR se obtiene elevando la base 2 a la diferencia de ciclos umbrales:

$$2^{\Delta Ct}$$

Una vez realizadas las cuantificaciones, se graficaron los resultados para su análisis posterior.

VII. Resultados

1. Diseño de Oligonucleótidos

Se diseñaron siete pares de oligonucleótidos básicos (serie C) y siete alternativos (serie D) para el análisis de la presencia de cromatina abierta en la región 5'proximal del gen AAEL006536 de acuerdo a lo descrito en la metodología.

Los oligonucleótidos básicos diseñados tienen un tamaño entre 21 y 25 nucleótidos, un porcentaje citosina-guanina que oscila entre 40% y 57.1%, una temperatura de fusión en el rango de 55.3°C a 59.1°C y están diseñados para generar amplicones con una longitud de 79 a 225 oligonucleótidos (ver tabla 1).

Abarcan una región de 885 nucleótidos, entre las posiciones -702 y +183 . La región se consideró suficiente para analizar presencia de cromatina abierta debido a que todos los promotores de RNAPol II tienen elementos de secuencia cerca del sitio de inicio de la transcripción. En la figura 7 se observa la localización de cada par de oligonucleótidos básicos. Las características y localización de los siete pares de oligonucleótidos alternativos se pueden observar en el *anexo 2*.

Tabla 1.

Oligonucleótidos diseñados (básicos) para el análisis de la presencia de cromatina abierta en la región 5' del gen AAEL006536 de *Aedes aegypti* (resultados de este trabajo).

OLIGONUCLEOTIDOS SERIE C PARA GEN AAEL006536 DE <i>Aedes aegypti</i>									
No.	Clave	Oligonucleótido	Tamaño	CG	Tm	Localización		Amplicón PB	
1	Aae6536_7cF	CGA TTC CAG GTC TGA GGA AGC	21	57.1	57.5	-702	-682	109	
2	Aae6536_7cR	CAT GAA ACG TAT TTT GAC GCC TTT C	25	40	55.3	-593	-617		
3	Aae6536_6cF	GAA AGG CGT CAA AAT ACG TTT CAT G	25	40	55.3	-617	-593	225	
4	Aae6536_6cR	GTC TCC AAG ACG CAG TTT TTG TTG C	25	48	59.1	-392	-416		
5	Aae6536_5cF	GCA ACA AAA ACT GCG TCT TGG AGA C	25	48	59.1	-416	-392	141	
6	Aae6536_5cR	CTA ACA ATG ACG GGC AAA TTC CGG	24	50	58.6	-275	-298		
7	Aae6536_4cF	CCG GAA TTT GCC CGT CAT TGT TAG	24	50	58.6	-298	-275	129	
8	Aae6536_4cR	GGT CCT CGT TCT GTA TTG TTT TAG G	25	44	55.4	-169	-193		
9	Aae6536_3cF	CCT AAA ACA ATA CAG AAC GAG GAC C	25	44	55.4	-193	-169	164	
10	Aae6536_3cR	CAA TAA TTA GAT CCG CTG GGA ATG C	25	44	56.1	-29	-53		
11	Aae6536_2cF	GCA TTC CCA GCG GAT CTA ATT ATT G	25	44	56.1	-53	-29	79	
12	Aae6536_2cR	CTC TCG AAT GGT GGG TGA CGA TG	23	56.5	59.5	26	4		
13	Aae6536_1cF	CAT CGT CAC CCA CCA TTC GAG AG	23	56.5	59.5	4	26	179	
14	Aae6536_1cR	CAT CTT CCT GTC CGT TGG CAT G	22	54.5	58.4	183	162		

Localización oligonucleótidos Serie C

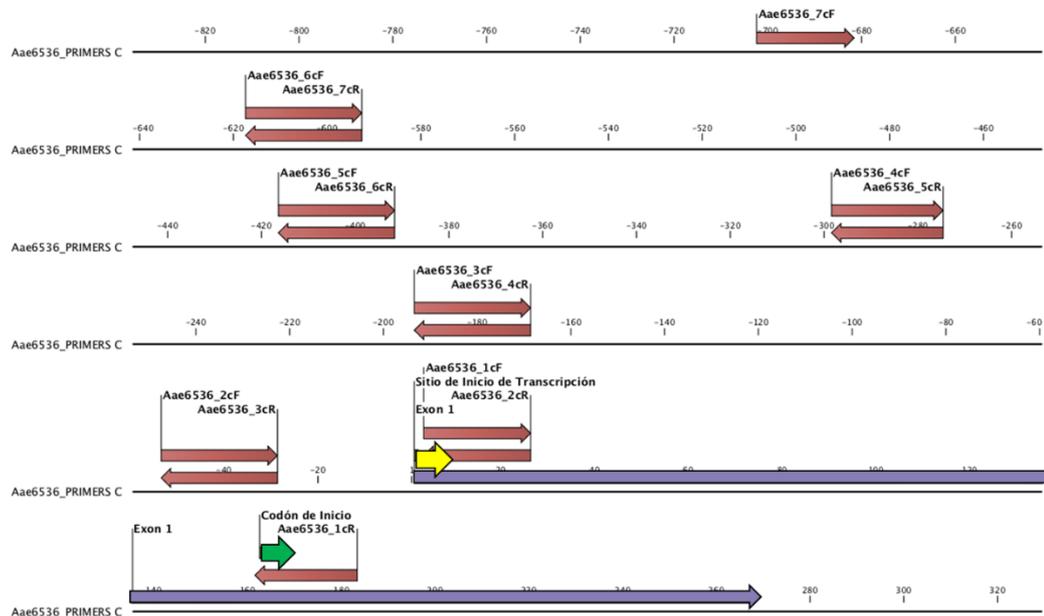


Figura 7. Localización de los oligonucleótidos Serie C (rojo) en el genoma de *Aedes aegypti*. Se observa el primer exón (azul), el sitio de inicio de la transcripción (flecha amarilla) y el codón de inicio (flecha verde) (resultados de este trabajo).

2. Validación de Oligonucleótidos

Con la finalidad de decidir la concentración mínima suficiente de DNA para realizar la validación de oligonucleótidos, primeramente se amplificó DNA de *Aedes aegypti* utilizando el par de oligonucleótidos previamente validados: AaeH3:1F y AaeH3:1R y DNA a las concentraciones de 100ng, 50ng y 10ng. El producto obtenido se corrió en gel de agarosa al 1.5% en el que se observaron bandas muy claras para las 3 concentraciones (ver figura 22).

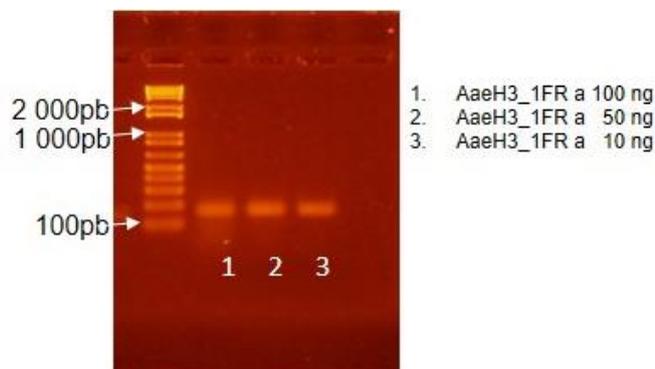


Figura 7. Detección de DNA de mosquito *Aedes aegypti* en gel de agarosa para valorar la concentración mínima suficiente a utilizar en la validación de oligonucleótidos. En las tres concentraciones se obtiene amplificación.

Este procedimiento permitió constatar que la concentración de DNA de 10 ng era la mínima suficiente y por lo tanto es la que se utilizó en todas las reacciones de validación.

2.1 Validación de tamaño de amplicones

Los productos obtenidos mediante PCR punto final para cada uno de los 7 pares básicos de oligonucleótidos se corrieron en gel de agarosa. Se observaron claramente 6 bandas con un tamaño cercano a 100 pb (ver figura 8). El producto del par Aae6536_7C FR (en el carril 1) no generó banda por lo que se realizó una nueva amplificación con el par alternativo Aae6536_7D FR (ver figura 9); sin embargo, tampoco se observó banda con el par alternativo.

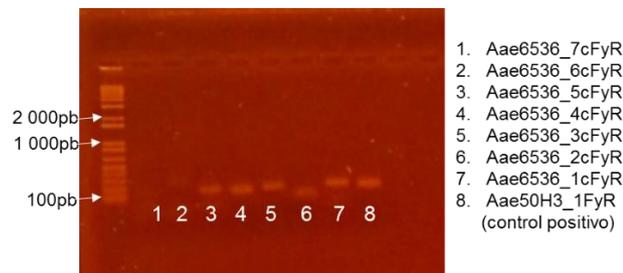


Figura 8. Detección de los productos amplificados por los 7 pares de oligonucleótidos. En el carril 1 correspondiente a los oligonucleótidos 7cFR no se generó producto. En los carriles 2 al 7 correspondientes al resto de los oligonucleótidos si se generaron fragmentos. En el carril 8 se observa el fragmento del control positivo.

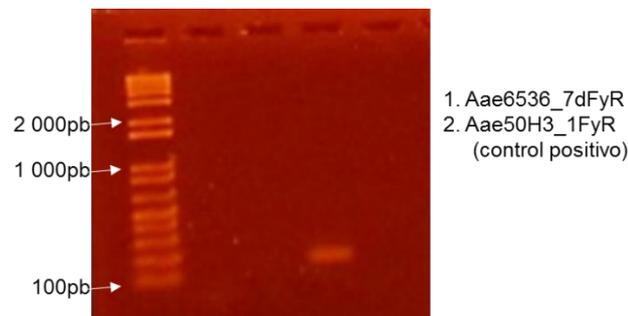


Figura 9. Detección de producto del par alternativo 7dFyR. En el carril 1 correspondiente a los oligonucleótidos 7FyR alternativo no se observó producto amplificado, en el carril 2 se observa el producto del control positivo.

Esta primera validación permitió comprobar la factibilidad de amplificación en seis de los siete pares de oligonucleótidos básicos diseñados, mismos que cubren la región comprendida entre las posiciones -617 y +183. No se observó producto amplificado a partir del par siete de oligonucleótidos básico y alternativo. Por lo tanto los amplicones generados a partir de los oligonucleótidos Aae6536_FyR, Aae6536_5FyR, Aae6536_4FyR, Aae6536_3FyR, Aae6536_2FyR y Aae6536_1F y R se utilizaron en los siguientes pasos de validación.

2.2 Validación de amplificación de un solo producto

Las curvas de disociación se obtuvieron mediante PCR tiempo real. En los casos en que la curva mostró la amplificación de un segundo producto, se realizó una nueva amplificación elevando la temperatura para evitar la formación de dímeros de oligonucleótidos. A continuación se muestran las curvas de disociación del producto de cada par de oligonucleótidos (ver figura 10) así como las temperaturas óptimas para amplificación (ver tabla 2).

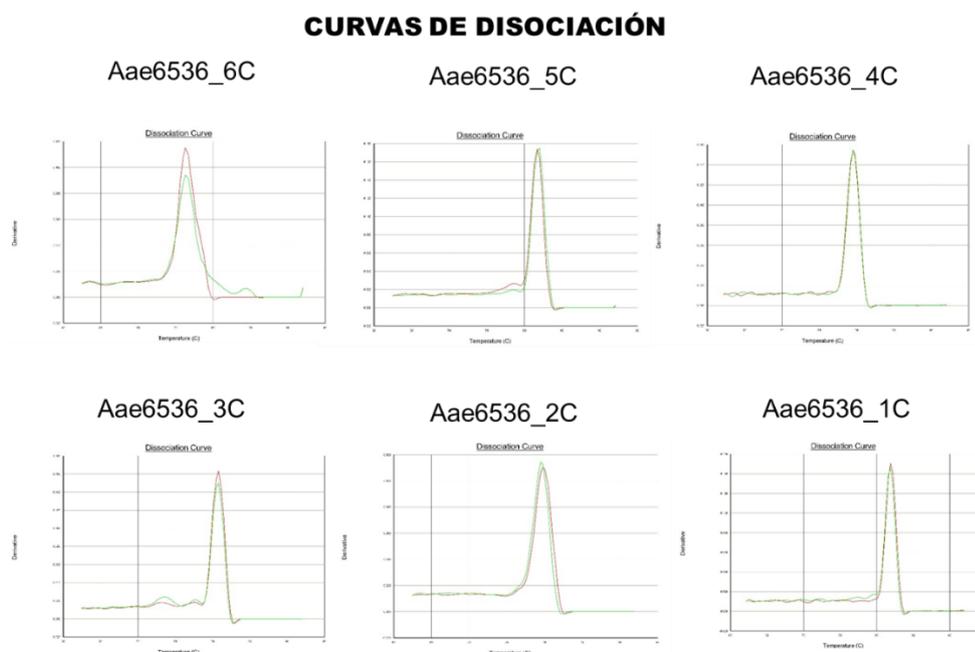


Figura 10. Curvas de disociación para la validación de amplificación de un solo producto. Se muestran 6 gráficas, cada una corresponde a un par de oligonucleótidos específico, en todos los casos se observa la amplificación de un solo producto (resultados de este trabajo).

En el eje de las ordenadas se grafica la derivada negativa de la fluorescencia y en el de las abcisas la temperatura. Las seis curvas muestran claramente un solo pico en la zona correspondiente a su temperatura de alineación. Los Amplicones generados por los oligonucleótidos Aae6536_FyR, Aae6536_5FyR, Aae6536_4FyR, Aae6536_3FyR, Aae6536_2FyR y Aae6536_1F y R generaron un solo producto de amplificación por lo que se continuó con la validación de rango dinámico.

Tabla 2.

Temperaturas óptimas para amplificación a partir de los oligonucleótidos diseñados (resultados de este trabajo).

OLIGONUCLEÓTIDOS	TEMPERATURA DE ALINEACIÓN
Aae6536_1 FR	55° C
Aae6536_2 FR	56° C
Aae6536_3 FR	56° C
Aae6536_4 FR	55° C
Aae6536_5 FR	56° C
Aae6536_6 FR	56° C

La temperatura de alineación para los pares uno y cuatro fue de 55°C, y para el resto de los oligonucleótidos fue de 56°C.

2.3 Validación de rango dinámico

La validación de rango dinámico se realizó con las temperaturas de alineación obtenidas a partir de la validación de un solo producto amplificado. Las concentraciones de DNA utilizadas en un principio fueron: 10ng/μl, 1ng/μl, 0.1ng/μl y 0.01ng/μl ; sin embargo, al observar un producto indeterminado para las dos concentraciones menores se procedió a utilizar concentraciones de 100ng/μl, 10ng/μl y 1ng/μl de DNA para cada par de oligonucleótidos. Las gráficas obtenidas se muestran en la figura 11.

GRÁFICAS DE RANGO DINÁMICO

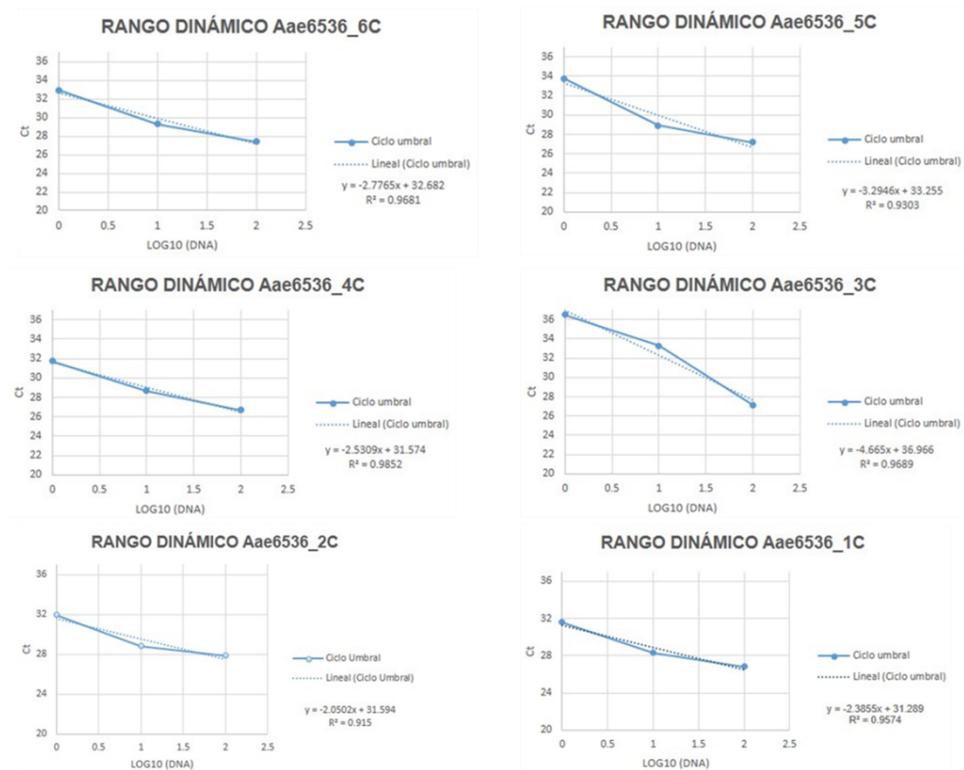


Figura 11. Curvas de Rango Dinámico para los 6 amplicones a concentraciones de 100ng/μl, 10ng/μl y 1ng/μl de DNA. Se muestran 6 gráficas, cada una corresponde a un par de oligonucleótidos específico. En todos los casos se observa una relación inversamente proporcional entre ciclo umbral y logaritmo de la concentración de DNA (resultados de este trabajo).

En el eje de las ordenadas se grafica el ciclo umbral y en el de las abcisas el logaritmo de la concentración inicial de DNA. Todas las gráficas reflejan la correlación inversamente proporcional esperada entre ambas características por lo que los amplicones pueden ser utilizados para la cuantificación relativa.

3. Alimentación de *Aedes aegypti*

La alimentación de los 3 grupos de mosquitos *Aedes aegypti* se llevó a cabo de acuerdo a los tiempos y condiciones descritas en la metodología. El primer grupo de mosquitos fue alimentado con sacarosa desde el primer día de eclosión pupal hasta el día doce, en que se realizó la disección. El segundo grupo fue alimentado con sacarosa a partir de la eclosión pupal y hasta el día tres, el día cuatro fue de ayuno y el día cinco se alimentaron con sangre no infectada (suspensión de eritrocitos) durante dos horas, los siete días siguientes se alimentaron nuevamente con sacarosa y la disección se realizó el día siete después de la alimentación sanguínea (en la figura 12 se observan 2 fotografías tomadas durante la alimentación de mosquitos con sangre no infectada). El tercer grupo también fue alimentado a partir del día de la eclosión pupal hasta el día tres con sacarosa, el día cuatro fue de ayuno y el día cinco de alimentación con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV) durante dos horas. Los siete días siguientes se alimentaron nuevamente con sacarosa. Los mosquitos fueron disectados al séptimo día después de la infección. Los mosquitos que no se utilizaron para disectar se desecharon colocándolos previamente en alcohol 96° durante cinco minutos.



Figura 12. Alimentación de mosquitos *Aedes aegypti* con sangre no infectada (suspensión de eritrocitos). En la fotografía de la izquierda se observan tres contenedores con los mosquitos y el generador de agua caliente circulante para el alimentador, en la fotografía de la derecha se observa el alimentador de vidrio.

Se obtuvo un número suficiente de mosquitos de cada una de las tres condiciones establecidas, por lo que se pudo continuar con la disección para la obtención de intestinos de *Aedes aegypti*.

4. Disección y Fijación de Intestinos de *Aedes aegypti*

Se disectaron 286 mosquitos *Aedes aegypti* hembra y los intestinos obtenidos se fijaron con formaldehído en grupos de diez, de acuerdo al primer paso de la Técnica FAIRE (ver figura 13):

- 100 intestinos de hembras *Aedes aegypti* alimentadas únicamente con sacarosa
- 100 intestinos de hembras *Aedes aegypti* alimentadas con sangre no infectada (suspensión de eritrocitos)

- 86 intestinos de hembras *Aedes aegypti* alimentadas con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV)

Las 86 carcazas de los mosquitos disectados, previamente alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV) se guardaron para la prueba de detección de virus Dengue y para realizar otros estudios posteriores.



Figura 13. Intestinos fijados con formaldehído. La fotografía muestra un tubo eppendorf que contiene diez intestinos de mosquitos *Aedes aegypti* alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV) a los que se agregó formaldehído de acuerdo al primer paso de la técnica FAIRE.

5. Detección de virus Dengue en Mosquitos Alimentados con Sangre Infectada

Con el fin de corroborar la infección viral en los mosquitos alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV), se realizó una prueba de detección de virus Dengue mediante la técnica molecular que identifica la presencia del gen NS5 viral mediante RT-PCR anidada descrita en la metodología.

La prueba se realizó en nueve de las ochenta y seis carcazas obtenidas durante la disección de mosquitos alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV), las cuales constituyen una muestra representativa del 10.5 % del total (Daniel, 2006). Las carcazas se tomaron al azar de la gradilla en donde estaban guardadas. Como control se utilizó DENV-2.

Siete de los nueve productos amplificados (77.7%) generaron fragmentos con una longitud entre cien y doscientas pares de bases (ver figura 14) , este tamaño concuerda con el tamaño de 143 pb de los fragmentos obtenidos por Sánchez-Seco y colaboradores (2005), autores de la técnica. Al corroborarse infección en el setenta y siete por ciento de la muestra representativa, se continuó con los siguientes pasos de la Técnica FAIRE para la identificación y aislamiento de las regiones libres de nucleosomas.

Los materiales, el virus utilizado como control y la metodología específica fueron proporcionados por el Dr. José Ramos Castañeda del CISEI, INSP (Ramos-Castañeda, 2008).



Figura 14. Detección de virus Dengue en mosquitos *Aedes aegypti* alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV). En el carril 1 se observa el fragmento del control DENV-2. En los carriles 2,3,4,5,6,8 y 9 se observan fragmentos de una longitud entre 100 y 200 pares de bases que corroboran la infección por virus Dengue. En los carriles 7 y 10 no se generaron fragmentos. Las bandas inferiores a 100 pares de bases de longitud muestran la presencia de oligonucleótidos (Datos recabados en colaboración con el Dr. Manuel Castillo).

6. Aislamiento de Regiones Libres de Nucleosomas mediante la Técnica FAIRE

Después de realizar todos los pasos de la técnica FAIRE de acuerdo a lo descrito en la metodología, se obtuvo el DNA libre de nucleosomas a partir de los intestinos de mosquitos de cada uno de los tres grupos de estudio. La cuantificación de DNA para cada caso se muestra en la tabla 3.

Tabla 3.

Cuantificación de DNA de *Aedes aegypti* libre de nucleosomas de cada uno de los grupos de estudio (resultados de este trabajo).

GRUPO DE ESTUDIO	CUANTIFICACIÓN DNA	CANTIDAD TOTAL DNA
Mosquitos alimentados con sacarosa	119.7 ng/μl	2.75 μg
Mosquitos alimentados con sangre no infectada (susp. eritrocitos)	210.4 ng/μl	4.83 μg
Mosquitos alimentados con sangre infectada (susp. eritrocitos con DENV)	45.8 ng/μl	1.05μg

Se obtuvo mayor cantidad de DNA a partir del grupo de mosquitos alimentados con sangre no infectada (suspensión de eritrocitos) seguido por el grupo de

mosquitos alimentados con sacarosa. Se obtuvo menor cantidad de DNA a partir de los mosquitos alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV). En los tres casos la cantidad de DNA fue suficiente para continuar con el análisis de presencia de cromatina abierta.

7. Análisis de Presencia de Cromatina Abierta en la Región 5´Proximal del Gen AAEL006536 en el DNA del Intestino Medio de *Aedes aegypti*

La cuantificación relativa de cromatina abierta se realizó con la información de los valores de los ciclos umbrales del DNA sin FAIRE (control para la cuantificación relativa) y del DNA FAIRE de los mosquitos de cada una de las tres condiciones de estudio. (El DNA control, como se mencionó en la metodología, es DNA total de mosquitos *Aedes aegypti*). Los ciclos umbrales se obtuvieron mediante PCR en tiempo real. En todos los casos se trabajó con réplica técnica y con desviaciones estándar menores o iguales a 0.3.

Los resultados numéricos se muestran en tablas para cada una de las tres condiciones de alimentación. El enriquecimiento se graficó mediante barras que representan el número de veces el DNA control para cuantificación relativa. El empobrecimiento se indica mediante flechas descendentes. El valor del control para cuantificación relativa se indica mediante una línea horizontal color azul y representa la unidad de cuantificación relativa. Las gráficas se estructuraron con las líneas de error de acuerdo a la desviación estándar, sin embargo, por el tamaño tan pequeño de enriquecimiento no es posible observarlas para las condiciones de alimentación con sacarosa y con sangre no infectada (suspensión de eritrocitos).

7.1 Grupo de mosquitos *Aedes aegypti* alimentados con sacarosa

Después de realizar qPCR, el DNA de los mosquitos alimentados con sacarosa tuvo valores de ciclos umbrales mayores a los obtenidos con el DNA sin FAIRE (control para cuantificación relativa). Al obtener la cuantificación relativa todos los resultados fueron menores a la unidad lo cual es indicio de un empobrecimiento (ver tabla 4).

Tabla 4.

Ciclos umbrales de los 6 amplicones obtenidos mediante qPCR y cálculo de enriquecimiento/empobrecimiento relativo en DNA de mosquitos alimentados con sacarosa (resultados de este trabajo).

Amplicón	Ct DNA Sin FAIRE (control para C.R.)	Ct DNA Con FAIRE condición Sacarosa	Δ Ct	$2^{\Delta Ct}$
6	29.9799	33.6378	-3.5579	0.0849
5	27.9720	32.5382	-4.5661	0.0422
4	29.8276	32.7493	-2.9216	0.1319
3	27.9835	33.4534	-5.4699	0.0225
2	29.4654	33.7361	-4.2707	0.0518
1	28.1715	34.8938	-6.7223	0.0094

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 15 mediante una gráfica de barras en la que cada barra representa el amplicón analizado, la altura de las barras muestran los valores detectados con respecto al control para cuantificación, que está representado por la línea azul, las flechas descendentes muestran el empobrecimiento con respecto al control.

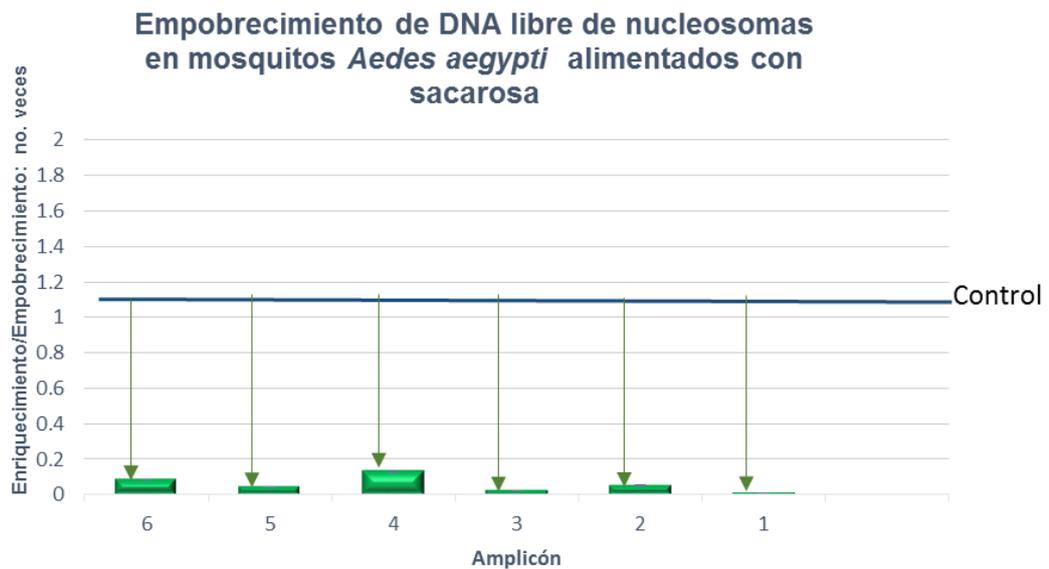


Figura 15. Empobrecimiento de DNA libre de nucleosomas en mosquitos *Aedes aegypti* alimentados con sacarosa. Las barras verdes indican los valores obtenidos y las flechas descendentes indican el empobrecimiento, ambos con respecto al control para cuantificación relativa (DNA sin FAIRE). En todos los casos los valores son menores a la unidad lo cual es indicio de empobrecimiento (resultados de este trabajo).

El análisis de la presencia de cromatina abierta en la región 5'proximal del gen AAEL006536 en el DNA del intestino medio de mosquitos *Aedes aegypti* alimentados exclusivamente con sacarosa muestra un empobrecimiento general para todos los amplicones analizados.

7.2 Grupo de mosquitos *Aedes aegypti* alimentados con sangre no infectada (suspensión de eritrocitos)

Después de realizar qPCR, el DNA de los mosquitos alimentados con sangre no infectada (suspensión de eritrocitos), tuvo valores de ciclos umbrales mayores a los obtenidos con el DNA sin FAIRE (control para cuantificación relativa). Al obtener la cuantificación relativa todos los resultados fueron menores a la unidad lo cual es indicio de un empobrecimiento (ver tabla 5).

Tabla 5.

Ciclos umbrales de los 6 amplicones obtenidos mediante qPCR y cálculo de enriquecimiento/empobrecimiento relativo en DNA de mosquitos alimentados con sangre no infectada (suspensión de eritrocitos) (resultados de este trabajo).

Amplicón	Ct DNA SIN FAIRE (control para C.R.)	Ct DNA CON FAIRE (condición sangre no infectada)*	Δ Ct	$2^{\Delta Ct}$
6	29.9799	35.6413	-5.6614	0.0197
5	27.9720	33.3572	-5.3851	0.0239
4	29.8276	35.1687	-5.3410	0.0246
3	27.9835	32.3279	-4.3444	0.0492
2	29.4654	34.0882	-4.6228	0.0405
1	28.1715	33.1596	-4.9880	0.0315

*Se utilizó un solo valor de Ct debido a que la réplica siempre reportó un valor indeterminado

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 16 mediante una gráfica de barras en la que cada barra representa el amplicón analizado, la altura de las barras muestran los valores detectados con respecto al control para cuantificación relativa, que está representado por la línea azul, las flechas descendentes muestran el empobrecimiento con respecto al control.

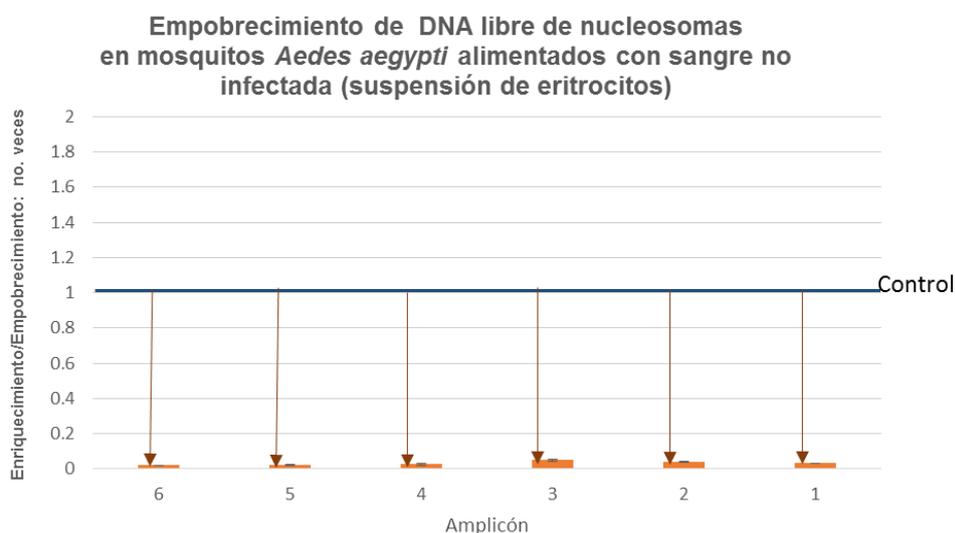


Figura 16. Empobrecimiento de DNA libre de nucleosomas en mosquitos *Aedes aegypti* alimentados con sangre no infectada (suspensión de eritrocitos). Las barras anaranjadas indican los valores obtenidos con respecto al control para cuantificación relativa (DNA sin FAIRE), las flechas descendentes indican el empobrecimiento con respecto al control (resultados de este trabajo).

El análisis de la presencia de cromatina abierta en la región 5'proximal del gen AAEL006536 en el DNA del intestino medio de mosquitos *Aedes aegypti* alimentados con sangre no infectada (suspensión de eritrocitos) muestra un empobrecimiento general para todos los amplicones analizados.

7.3 Grupo de mosquitos *Aedes aegypti* alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV)

Después de realizar qPCR, el DNA de los mosquitos alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV), tuvo valores de ciclos umbrales tanto mayores como menores a los obtenidos con el DNA sin FAIRE (control para cuantificación relativa). Al obtener la cuantificación relativa, los resultados correspondientes a los amplicones seis, cinco, cuatro y dos fueron mayores a la unidad lo cual es indicio de un enriquecimiento con respecto al DNA control, mientras que los resultados de los amplicones tres y uno fueron menores, lo cual es indicio de un empobrecimiento (ver tabla 6).

Tabla 6..

Ciclos umbrales de los 6 amplicones obtenidos mediante qPCR y cálculo de enriquecimiento/empobrecimiento relativo en DNA de mosquitos alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV) (resultados de este trabajo).

Amplicón	Ct DNA SIN FAIRE (control para C.R.)	Ct DNA CON FAIRE (condición sangre infectada)	Δ Ct	$2^{\Delta Ct}$
6	29.9799	29.0176	0.9623	1.9484
5	27.9720	27.4098	0.5622	1.4765
4	29.8276	28.8257	1.0019	2.0027
3	27.9835	29.0945	-1.111	0.4629
2	29.4654	28.6051	0.8602	1.8153
1	28.1715	29.7435	-1.5719	0.3363

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 17 mediante una gráfica de barras en la que cada barra representa el amplicón analizado, la altura de las barras muestran los valores detectados con respecto al control que está representado por la línea azul, las flechas descendentes muestran el empobrecimiento de los amplicones tres y uno, las flechas ascendentes muestran el enriquecimiento de los amplicones seis, cinco, cuatro y dos. En ambos casos con respecto al contros para cuantificación relativa.

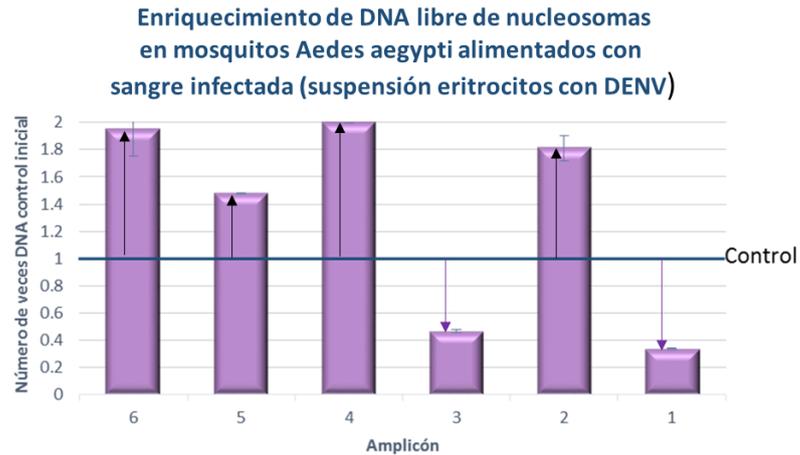


Figura17. Enriquecimiento-empobrecimiento de DNA libre de nucleosomas en mosquitos *Aedes aegypti* alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV). Las barras moradas indican los valores obtenidos con respecto al control para cuantificación relativa (DNA sin FAIRE), las flechas descendentes indican el empobrecimiento mientras que las ascendentes indican el enriquecimiento. Los amplicones seis, cinco, cuatro y dos tienen valores mayores a la unidad lo cual es indicio de enriquecimiento. Los amplicones tres y uno tienen valores menores a la unidad lo cual es indicio de empobrecimiento (resultados de este trabajo).

El análisis de la presencia de cromatina abierta en la región 5'proximal del gen AAEL006536 en el DNA del intestino medio de mosquitos *Aedes aegypti* alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV) muestra un enriquecimiento en los amplicones seis, cinco, cuatro y dos y un empobrecimiento en los amplicones tres y uno.

La figura 18 muestra una gráfica de barras en tres dimensiones con el resumen de enriquecimiento-empobrecimiento de cromatina abierta en cada uno de los amplicones analizados (señalados por números del seis al uno) para cada uno de los grupos estudiados (señalados por colores). Como en las gráficas anteriores, la altura de las barras señala el número de veces de DNA sin FAIRE (control para cuantificación relativa) que hay en la muestra analizada al inicio de la PCR. Los valores mayores a uno indican enriquecimiento de cromatina abierta, mientras que los menores a uno indican empobrecimiento.

Se observa una gran diferencia entre los resultados obtenidos a partir del DNA del grupo de mosquitos alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV) con respecto a los resultados obtenidos a partir de DNA del grupo de mosquitos alimentados con sacarosa y con sangre no infectada (suspensión de eritrocitos). En el primer caso se observa un enriquecimiento en cuatro de los seis amplicones mientras que en los otros dos grupos hay un notorio empobrecimiento en todos los amplicones.

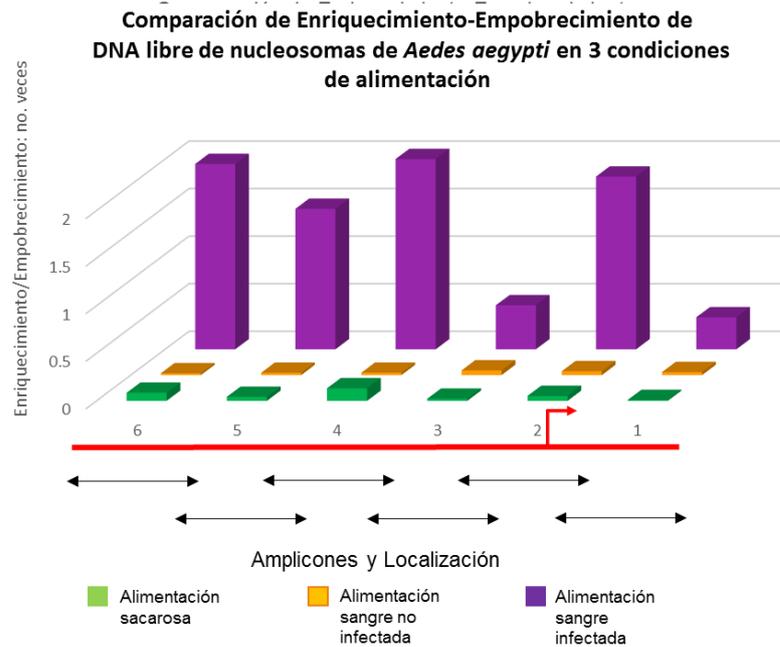


Figura 18. Comparación del enriquecimiento-empobrecimiento de DNA libre de nucleosomas de *Aedes aegypti* en las tres condiciones de estudio. Las barras moradas indican los valores obtenidos a partir de DNA de mosquitos alimentados con sangre infectada con respecto al control para cuantificación relativa (DNA sin FAIRE). Las barras anaranjadas indican los valores obtenidos a partir de DNA de mosquitos alimentados con sangre no infectada con respecto al control para cuantificación relativa (DNA sin FAIRE). Las barras verdes indican los valores obtenidos a partir de DNA de mosquitos alimentados con sacarosa con respecto al control para cuantificación relativa (DNA sin FAIRE). La flecha roja indica el sitio de inicio de la transcripción. Las flechas negras representan cada uno de los amplicones. El DNA de los amplicones seis, cinco, cuatro y dos muestran un enriquecimiento notorio en la condición de infección (resultados de este trabajo).

Los amplicones tres y uno del DNA de mosquitos alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV) también muestran empobrecimiento; el cual es menor al observado en el DNA de los mosquitos de las otras dos condiciones.

Los resultados del análisis de presencia de cromatina abierta en la región comprendida entre las posiciones -617 y +183 revelan la existencia de dos regiones libres de nucleosomas en la región 5' del gen AAEL006536 de *Aedes aegypti* en la condición de infección por virus Dengue. La primera región tiene una longitud de 448 pares de bases y se localiza entre las posiciones -617 y -169, la segunda tiene una longitud de 79 pares de bases y se localiza entre las posiciones -53 y +26 con respecto al sitio de inicio de la transcripción.

VIII. Discusión

1. Sistema de Detección para el Análisis de la Estructura de la Cromatina

En la estrategia experimental se planteó el diseño de oligonucleótidos para una región de 2 kilobases río arriba y 200 pb río abajo del sitio de inicio de la transcripción del gen de estudio; sin embargo la región cubierta finalmente fue de 799 bases de longitud, localizada entre las posiciones -617 y +183, debido a que la zona río arriba de la posición -617 es una región rica en adeninas y timinas que impiden el diseño de oligonucleótidos funcionales. Al considerar que todos los promotores de la RNA pol II tienen elementos de secuencia reconocidos por factores de transcripción, cerca del sitio de inicio de la transcripción, como el sitio Inr contenido entre -3 y +5, Caja TATA entre los sitios -35 y -25 y el DPE entre los sitios +28 y +32 (Lewin, 2008) se continuó con la investigación considerando que la región cubierta por los oligonucleótidos sería adecuada para realizar el análisis de presencia de cromatina abierta.

La prueba de amplificación utilizando diferentes concentraciones de DNA permitió constatar que la concentración de DNA de 10 ng era la mínima suficiente para lograr un producto amplificado por lo que fue la que se utilizó en el procedimiento de validación. Se comprobó la amplificación de producto en seis de los siete pares de oligonucleótidos básicos diseñados. Sin embargo, no hubo productos amplificados al utilizar el par número siete básico y alternativo, esto puede deberse a que el par siete se localiza en la región 5' más alejada del sitio de inicio de la transcripción caracterizado por ser una región abundante en repeticiones continuas de adenina y timina. Las seis curvas de fusión muestran claramente la amplificación de un solo producto a partir de cada uno de los seis pares de oligonucleótidos básicos con los que se realizó la validación. Todas las gráficas de rango dinámico reflejan una correlación inversamente proporcional entre el ciclo umbral y el logaritmo de la cantidad inicial de DNA, la verificación de esta correlación es fundamental para el cálculo del enriquecimiento relativo ya que establece el fundamento para realizar la comparación entre DNA FAIRE y DNA sin FAIRE (control para cuantificación relativa) iniciales.

2. Obtención de regiones libres de nucleosomas a partir del DNA de *Aedes aegypti*

La alimentación y las disecciones de los mosquitos se realizaron de acuerdo a los tiempos y condiciones establecidos en la metodología. El día de disección (día siete después de la alimentación sanguínea) se estableció tomando en cuenta algunos datos importantes encontrados en la bibliografía. En particular, el reporte del incremento en la tasa de infección viral (76-95%) en el intestino medio de *Aedes aegypti* entre los días siete y diez después de la infección, descrito por Salazar (2007). Dicha tasa de infección fue definida por los autores como el número de intestinos con presencia de antígeno DENV-2, entre el número total

de intestinos examinados. El otro dato bibliográfico tiene que ver con el aumento de más de cinco veces en la actividad transcripcional del gen AAEL006536 de *Aedes aegypti* el día siete después de la infección, reportado por Colpits (2011). Gracias a la información de estas dos investigaciones se asumió que sería más factible identificar presencia de cromatina abierta cuando la tasa de infección viral es mayor y el gen tiene una mayor actividad transcripcional.

Para verificar la tasa de infección por virus Dengue en el experimento de mosquitos alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV), se hizo la detección del virus en las carcazas obtenidas a partir de las disecciones. El análisis se realizó en nueve de las ochenta y seis carcazas obtenidas durante la disección de mosquitos alimentados con sangre infectada, las cuales constituyen una muestra representativa del 10.5% del total. Siete de ellas dieron resultados positivos; es decir, se detectó infección en el 77.7% de la muestra representativa. Este porcentaje obtenido mediante RT-PCR anidada en el presente trabajo, es similar al obtenido por Salazar (2007) de 76-95% mediante ensayo de inmunofluorescencia (IFA).

La técnica FAIRE se realizó exitosamente y se obtuvo suficiente cantidad de DNA para realizar el análisis de cromatina abierta por lo tanto se continuó con el experimento.

3. Análisis de la estructura de la cromatina de la región 5' proximal del gen AEL006536 en el DNA del intestino medio de mosquitos *Aedes aegypti*

Mediante el análisis de la estructura de la cromatina realizado en el DNA de mosquitos alimentados con sangre infectada (suspensión de eritrocitos con DENV) se identificaron dos secuencias de cromatina abierta. La primera de ellas se localiza entre las posiciones -53 y +26 y sobrelapa con el sitio de inicio de la transcripción. La segunda se localiza entre las posiciones -617 y -169 y podría tratarse de un promotor (Lewin, 2008).

El enriquecimiento observado en la condición de infección es consistente con la activación de la transcripción reportada por Colpits (2011), con lo reportado en diversas investigaciones que comprueban la presencia de cromatina abierta en los genes activos (Rando, 2012), y con lo reportado por Giresi (2009) con respecto a la factibilidad de la técnica FAIRE para identificar sitios de cromatina abierta.

En el análisis realizado en el DNA de mosquitos no infectados, (alimentados con sacarosa o con sangre no infectada) la presencia de secuencias correspondiente a esta región en la fase acuosa es mínima. La cromatina en esta condición tiene una estructura cerrada. Este hecho también es consistente con lo reportado ya

que cuando el mosquito no está infectado por virus Dengue, el gen AAEL006536 tiene una actividad transcripcional cinco veces menor (en el día siete después de la infección) que la reportada en la condición de infección (Colpits, 2011). Así, en los mosquitos donde no hay expresión del gen, hay un empobrecimiento consistente con la estructura de cromatina propuesta con respecto a esta expresión.

Al comparar las dos condiciones anteriores, se observa la siguiente dinámica de la cromatina; cuando hay presencia de virus Dengue y el gen aumenta su nivel de transcripción la cromatina está abierta, mientras que cuando hay ausencia de virus Dengue y el gen no tiene una alta transcripción la cromatina está cerrada.

Las dos secuencias identificadas como cromatina abierta (-53,+26 y -617,-169) corresponden a secuencias reguladoras que cuando no está el virus permanecen cerradas pero que en presencia de virus Dengue se encuentran abiertas. La infección es una condición que parece marcar la diferencia entre estas dos estructuras de la cromatina. Se sugiere que el gen AAEL06536 es un gen inducible que presenta diferente estructura de cromatina de acuerdo a su condición de actividad transcripcional.

En la figura 19 se muestra el modelo que se propone, de la estructura de la cromatina en la región comprendida entre las posiciones -617 y +183 del gen AAEL006536 de *Aedes aegypti* durante a infección por virus Dengue. Se infiere que la estructura de la cromatina en esta zona es dinámica y que en la condición de infección presenta dos regiones de cromatina abierta para la unión de factores reguladores positivos de la transcripción. La primera región se localiza entre las posiciones -53,+26, tiene un tamaño de 79 pb y sobrelapa con el sitio de inicio de la transcripción. La segunda región se localiza entre los sitios -617 y -169, tiene un tamaño de 448 pb, que al ser distinta al sitio de inicio de transcripción es consistente con una función potencial del promotor.

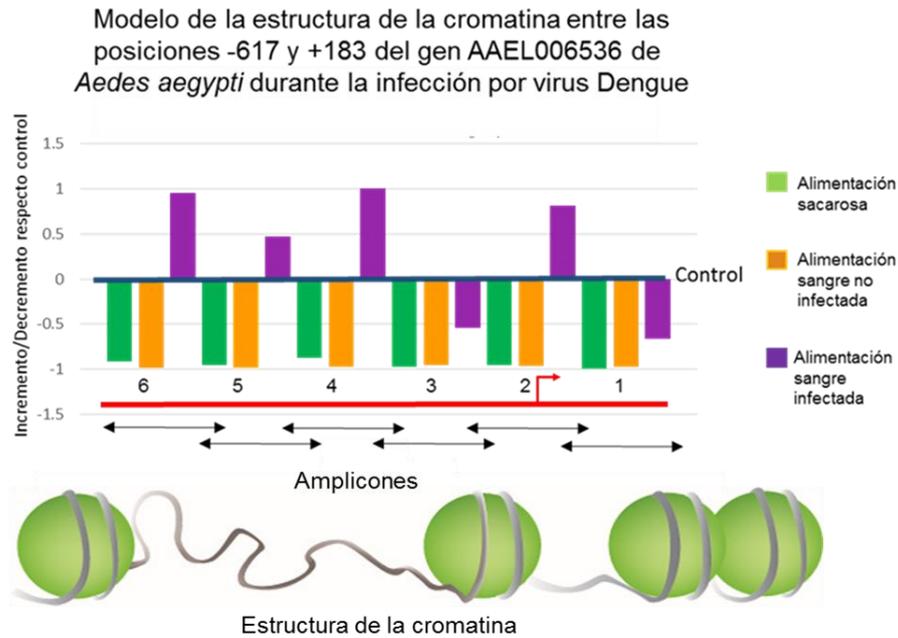


Figura 19. Modelo de la estructura de la cromatina en la región comprendida entre los sitios -617 al +183 del gen AAEL006536 de *Aedes aegypti* durante la infección por virus Dengue. Las barras por arriba de la línea azul muestran un enriquecimiento con respecto al control para cuantificación relativa, el DNA inicial libre de nucleosomas se localizó en la fase acuosa. Las barras debajo de la línea azul muestran un empobrecimiento con respecto al control de cuantificación relativa, el DNA inicial unido a los nucleosomas se localizó en la interfase de proteínas. Se propone una estructura dinámica de la cromatina la cual presenta dos regiones de cromatina abierta, y en medio de ellas una región de cromatina cerrada. La región comprendida entre los sitios -53 y +26 es consistente con el sitio de inicio de la transcripción y la región comprendida entre los sitios -617 y -169 es consistente con una función potencial de promotor (Dibujo realizado en colaboración con la Lic. Ana Gabriela Osorio).

IX. Conclusiones

En la presente investigación se identificaron dos regiones de cromatina abierta en el DNA de mosquitos infectados por virus Dengue.

La primera región se localiza entre las posiciones -53 y +26 y tiene un tamaño de 79 pb. Esta región sobrelapa con el sitio de inicio de transcripción para este gen y es consistente con el hallazgo de la función de la cromatina de esa región.

La segunda región se localiza entre las posiciones -617 y -169 y tiene un tamaño de 448pb. Esta región no sobrelapa con el sitio de inicio de la transcripción y es consistente con una función potencial del promotor.

Entre estas dos regiones de cromatina abierta se localiza una región intermedia de conformación cerrada entre las posiciones -193 y -29 en la que no hay regiones libres de nucleosomas.

Las secuencias de la región de estudio en los mosquitos no infectados por virus Dengue, tienen una estructura de cromatina cerrada lo cual también es consistente con lo reportado ya que el gen AAEL006536 no tiene una alta transcripción en la condición de no infección.

Al comparar las dos condiciones se observó una dinámica de la cromatina; cuando hay infección por virus Dengue y el gen aumenta su actividad transcripcional la cromatina está abierta. Cuando no hay infección y el gen no tiene una alta transcripción la cromatina está cerrada. El contraste entre la estructura de la cromatina en estas regiones, entre células del intestino estimuladas o no por la presencia del virus, permite inferir que la condición de infección induce el cambio de conformación cerrada a conformación abierta de la cromatina la cual a su vez contribuye al control positivo de la transcripción del gen.

Se sugiere que el gen AAEL006536 es un gen inducible que presenta diferente estructura de cromatina de acuerdo a la ausencia o presencia de infección en las células. Las dos secuencias identificadas como cromatina abierta corresponden a secuencias reguladoras que en ausencia del virus permanecen cerradas y en presencia del virus se encuentran abiertas.

X. Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos se abren las siguientes posibilidades para continuar la presente investigación; identificación de motivos de unión y sus respectivos factores de transcripción. Identificación de posibles vías involucradas en el control de este gen. Ensayos de gen reportero para agregar información sobre la activación de estas secuencias reguladoras en presencia del virus dengue. Y construcción de un promotor quimérico para la expresión de moléculas exógenas.

XI. Bibliografía

1. Allis, D. et al. (editores). (2007). *Epigenetics*. ed. Cold Spring Harbor Press. Estados Unidos.
2. Almer, A. et al. (1986) "Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional upstream activating DNA elements" en *EMBO Journal*. Vol. 5, número 10, 2681-2687.
3. Colpitts, T. et al. (2011). "Alterations in the *Aedes aegypti* transcriptome during infection with West Nile, Dengue and Yellow Fever Viruses". en *Plos Pathog*. Vol. 7, número 9.
4. Cruz-Bustillo, D. (2013). "Regulación de la Expresión Génica en Eucariontes". Conferencia inédita
Disponible en:
http://fbio.uh.cu/sites/genmol/confs/conf7/p04_euc.htm
(Accesado el día 6 de octubre de 2013)
5. Daniel, W. (2006) *Bioestadística, Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud*. 4a. edición. Limusa Wiley. México.
6. Edmondson, D.; S. Roth. (1996). "Chromatin and transcription" en *The FASEB Journal*. Vol. 10, 1173-1182pp.
7. Giresi, P.; J. Lieb. (2009). " Isolation of active regulatory elements from eukaryotic chromatin using FAIRE (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements)" en *Methods*. Vol. 48, 233-239 pp.
8. Guertin, M.; J. Lis. (2013). "Mechanisms by which transcription factors gain Access to target sequence element in chromatin". En *Curr Opin Gent Dev*. Vol 23, número 2, 116-123 pp.
9. Hogan, G.; Cheol-Koo, L. J. Lieb. (2006). "Cell Cycle-Specified Fluctuation of Nucleosome Occupancy at gene Promoters" en *Plos Genet*. Vol. 2, número 9, 1433-1450 pp.
10. Keene, M. et al. (1981). "DNase I hypersensitive sites in *Drosophila* chromatin occur at the 5' ends of regions of transcription" en *Proc. Natl. Acad. Sci*. Vol. 78, número 1, 143-146 pp.
11. Ladunga, I. (editor). (2010), *Computational Biology of Transcription Factor Binding*, Methods in Molecular Biology. ed. Humana Press.

12. Lewin, B. (editor). (2008). *Genes IX*. Traducido de 9ª ed. Mc Graw-Hill Interamericana editores. México.
13. Lou, R.; D. Dean. (1999). "Chromatin Remodeling and Transcriptional Regulation" en *Journal of the National Cancer Institute*. Vol.91, número 15, 1288-1294pp.
14. Nagy, P., D. Price (2009). "Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements". en *Wiley Interdiscip Rev. Syst Biol Med*. Vol. 1, número 3, 400-406pp.
15. Ramos-Castañeda, J. et al. (2008). "Effect of nitric oxide on Dengue virus replication in *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus*" en *Intervirology*. Vol. 51, número 5, 335-341pp.
16. Rando, O., F. Winston. (2012). "Chromatin and transcription in yeast" en *Genetics*. Vol 190, número 2, 317-349pp.
17. Robin, X. C. Douglas. (1999) "Chromatin Remodeling and Transcriptional Regulation" en *Journal of the National Cancer Institute*. Vol. 91, número 15.
18. Salazar, M. et al. (2007). "Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes" en *BMC Microbiology*. Vol.7, número 9.
19. Sánchez-Seco, M. et al. (2005). "Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification" en *Journal of virological methods*. Vol. 126, 105-109pp.
20. Secretaría de Salud. (2013). "Panorama Epidemiológico de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue". *Secretaría de Salud*. México.
Disponible en:
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2013/Pano_dengue_sem47_sem2013.pdf
(Accesado el día 11 de mayo de 2014)
21. Sheffield, N.; T. Furey. (2012). "Identifying and Characterizing Regulatory Sequences in Human Genome with Chromatin Accessibility Assays" en *Genes*. Vol.12, número 2 651-670pp.
22. Timoshevskiy V.A. et al. (2013). "An Integrated Linkage, Chromosome, and Genome Map for the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti*" en *PLoS Negl Trop Dis*. Vol.7, número 2.

23. Vector Base (2014). "Aedes aegypti annotation". (Nene et al. 2012)

Disponible en:

<http://vectorbase.org>.

(Accesado el día 24 de enero de 2014)

24. World Health Organization. (2012a). "Global Strategy for dengue prevention and control". *World Health Organization*. (En línea). Estados Unidos.

Disponible en:

<http://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/>

(Accesado el día 4 de junio de 2013).

XII. Anexos

Anexo 1

Extracción de DNA total de mosquito Aedes aegypti

Lisis. A los mosquitos previamente disectados y colocados en PBS en tubo eppendorf de 1.5ml se les retiró el PBS.y se les agregó solución de lisis(NaCl 150mM, Tris HCl 50mM, EDTA 50mM, NP40 0.5%, Tritón x100 1%), fueron sometidos a agitación durante 15 min y a centrifugación 1400rpm/ 5min/ temperatura ambiente y fue separado el sobrenadante en 2 tubos.

Sonicación. El lisado fue sonicado durante 15 min a pulsos 30 seg descanso/ 30 seg sonicación y reunido nuevamente en un solo tubo.

Extracción Fenol-cloroformo. Fue agregado un volumen igual a alícuota de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1, se agitó con vortex 30 seg y se centrifugó a 14000/ 5min/ temp ambiente, colocando sobrenadante en tubo limpio. Se hizo otra extracción exactamente igual y una mas con cloroformo-a. isoamílico 24:1 colocando el sobrenadante en tubo limpio.

Precipitación. Fue agregado acetato de sodio (3MpH5.2 a 0.3M concentración final 1/10 de volumen de alícuota), 1µl de glicógeno y etanol 95% frío (2 vol de alícuota) para incubar toda la noche para terminar centrifugando a 1500rpm/ 30min/ 4°C, resuspendiendo la pastilla con 500µl de etanol frío 70%, nuevamente se centrifugó y se resuspendió en 50µl de Tris-HCl pH 7.5.

Adición de RNAsa. Fue agregado 1µl de RNAsa (10mg/ml) y puesto en incubación 1 hora a 37°C.

Finalmente se realizó una nueva extracción y precipitación exactamente iguales a las descritas anteriormente.

Anexo 2

Características y Localización de Oligonucleótidos Serie D

1. Características.

Tabla 7.

Oligonucleótidos alternativos diseñados (Serie D) para el análisis de la presencia de cromatina abierta en la región 5' del gen AAEL006536 de *Aedes aegypti* (resultados de este trabajo).

OLIGONUCLEOTIDOS PARA GEN AAEL006536 DE <i>Aedes aegypti</i>							
No.	Clave	Oligonucleó-tido	Tamaño	CG	Tm	Localización	Ampli-ción PB
Oligonucleótidos Serie D							
15	Aae6536_7dF	GAA CAG CCG ATT CCA GGT C	19	57.9	55.8	-709 -691	116
16	Aae6536_7dR	CAT GAA ACG TAT TTT GAC GCC TTT C	25	40	55.3	-593 -617	
17	Aae6536_6dF	GAA AGG CGT CAA AAT ACG TTT CAT G	25	40	55.3	-617 -593	217
18	Aae6536_6dR	GAC GCA GTT TTT GTT GCG TTG	21	47.6	56	-400 -420	
19	Aae6536_5dF	CAA CGC AAC AAA AAC TGC GTC	21	47.6	56	-420 -400	80
20	Aae6536_5dR	GAA ATG TTA TTG ATC GAC CCG TGT G	25	44	56.6	-340 -364	
21	Aae6536_4dF	CAC ACG GCT GGA TCA ATA ACA TTT C	25	44	56.6	-364 -340	172
22	Aae6536_4dR	GGA TCA ACG GGT GCA ATA AAC TG	23	47.8	56.5	-192 -214	
23	Aae6536_3dF	CAG TTT ATT GCA CCC GTT GAT CC	23	47.8	56.5	-214 -192	137
24	Aae6536_3dR	CAA ACA GCC AAC CTA CCT TGT TC	23	47.8	56.5	-77 -99	
25	Aae6536_2dF	GAA CAA GGT AGG TTG GCT GTT TG	23	47.8	56.5	-99 -77	99
26	Aae6536_2dR	GAC GAC GCC GAA GAC AAT GAT AC	23	52.2	57.8	0 22	
27	Aae6536_1dF	GTA TCA TTG TCT TCG GCG TCG TC	23	52.2	57.8	22 0	151
28	Aae6536_1dR	GTC CGT TGG CAT GTT GCT TCT G	22	54.5	59.2	173 152	

2. Localización Oligonucleótidos Serie D

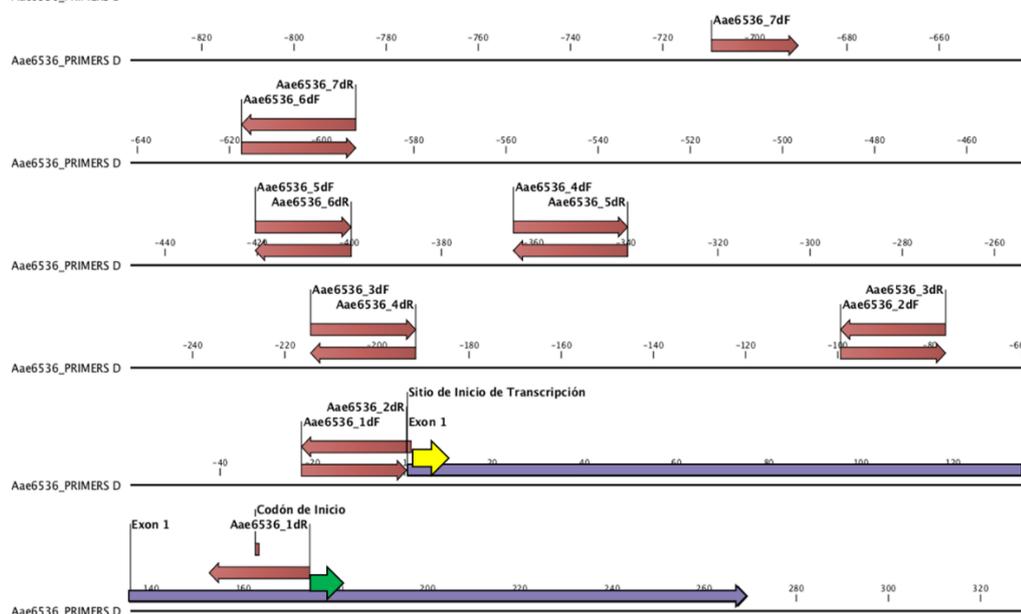


Figura 20. Localización de los oligonucleótidos Serie D (rojo) en el genoma de *Aedes aegypti*. Se observa el primer exón (azul), el sitio de inicio de la transcripción (flecha amarilla) y el codón de inicio (flecha verde) (resultados de este trabajo).

