

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



**“CONSTRUCCIÓN DE VECTORES Y EXPRESIÓN DE dsRNA EN *Escherichia coli* HT115 (DE3) ESPECÍFICOS PARA LOS GENES *Cyp302a1*, *Cyp314a1* *AchE* Y *ChsA* DE *Aedes aegypti*”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**

**PRESENTA  
Q.F.B MELINA LÓPEZ PECINA**

REYNOSA, TAMPS

JULIO, 2017

**INSTITUTO POLITÉCNICO**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



**“CONSTRUCCIÓN DE VECTORES Y EXPRESIÓN DE dsRNA EN *Escherichia coli* HT115 (DE3) ESPECÍFICOS PARA LOS GENES *Cyp302a1*, *Cyp314a1* *AchE* Y *ChsA* DE *Aedes aegypti*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**

PRESENTA

**Q.F.B MELINA LÓPEZ PECINA**

REYNOSA, TAMPS

JULIO 2017



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. el día 28 del mes de Junio del año 2017, la que suscribe Melina López Pecina alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica, con número de registro B150667, adscrita al Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Dr. Erick de Jesús de Luna Santillana, Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez y cede los derechos del trabajo titulado "Construcción de Vectores y Expresión de RNAs en *Escherichia coli* HT115 (DE3) específicos para los genes *cyp302A1*, *cyp314A1*, *ChsA* y *AchE* de *Aedes aegypti*.", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones Bld. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Melina López Pecina



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. siendo las 12:00 horas del día 28 del mes de Junio del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada:  
Construcción de Vectores y Expresión de RNAs en Escherichia coli HT115 (DE3) específicos para los genes cyp302A1, cyp314A1, ChsA y AchE de Aedes aegypti.

Presentada por el alumno:

López	Pecina	Melina
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro:
		B 1 5 0 6 6 7

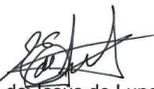
aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

  
Dr. Erick de Jesús de Luna Santillana

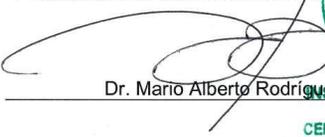
  
Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez

  
Dr. Carlos Armando García Pérez

  
Dr. Xianwu Guo

  
Dr. Víctor Ricardo Moreno Medina

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez



## ÍNDICE

Sección	Página
LISTA DE CUADROS .....	VIII
LISTA DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE SÍMBOLOS Y/O ABREVIATURAS.....	XII
AGRADECIMIENTOS.....	XV
DEDICATORIA.....	XVI
RESUMEN.....	XVII
ABSTRACT.....	XIX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Arbovirus.....	3
2.2 Dengue.....	3
2.3 <i>Aedes aegypti</i> .....	5
2.4 Control del vector.....	10
2.5 RNA de interferencia (RNAi).....	11
2.5.1 Mecanismo de RNAi en insectos.....	12
2.5.1.1 miRNA.....	12
2.5.1.2 siRNA.....	13
2.5.1.3 piRNA.....	13
2.6 Silenciamiento de genes RNAi.....	14
2.7 Producción de dsRNA.....	16
2.8 Entrega de dsRNA .....	17
2.9 Genes Halloween.....	18

2.10 Gen <i>ChsA</i> .....	19
2.11 Gen <i>Ache</i> .....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos particulares.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1 Material biológico.....	23
6.2 Metodología.....	23
6.2.1 Construcción de vectores de expresión de dsRNA.....	23
6.2.1.2 Obtención de fragmentos específicos para la producción de dsRNA.....	23
6.2.1.2.1 Síntesis de cDNA.....	24
6.2.1.2.2 Amplificación mediante PCR.....	25
6.2.1.3 Clonación de los fragmentos en el vector pGEM-T.....	27
6.2.1.3.1 Ligación.....	27
6.2.1.3.2 Transformación en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	27
6.2.1.3.3 Confirmación de colonias positivas mediante PCR de colonia y a partir de plásmido.....	28
6.2.1.3.4 Confirmación de colonias positivas mediante digestión enzimática y secuenciación plasmídica.....	28
6.2.1.4 Subclonación de los fragmentos en pL4440.....	29
6.2.1.4.1 Generación de extremos cohesivos en pL4440 y liberación de los insertos mediante las enzimas <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i> .....	29
6.2.1.4.2 Ligación.....	30
6.2.1.4.3 Transformación en <i>E. coli</i> HT115 (DE3).....	30

6.2.1.4.4 Confirmación de colonias positivas mediante PCR, digestión enzimática y secuenciación plasmídica.....	31
6.2.2 Expresión de los dsRNA.....	31
6.2.3 Extracción de dsRNA.....	32
6.2.4 Obtención de dsRNA de las construcciones mediante transcripción <i>in vitro</i> .....	32
7. RESULTADOS.....	35
7.1 Amplificación mediante PCR.....	35
7.2 Clonación de los fragmentos en el vector pGEM-T.....	36
7.2.1 Confirmación de colonias positivas mediante digestión y secuenciación plasmídica.....	37
7.3 Subclonación de los fragmentos en pL4440.....	41
7.3.1 Confirmación de colonias positivas mediante digestión y secuenciación.....	45
7.4 Inducción y extracción de dsRNA.....	48
7.5 Obtención de dsRNA de las construcciones mediante transcripción <i>in vitro</i> .....	50
8. DISCUSIÓN.....	52
9. CONCLUSIONES.....	57
10. PERSPECTIVAS.....	58
11. BIBLIOGRAFÍA.....	59

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Mezcla de reacción para la RT-PCR.....	25
2	Iniciadores empleados en la síntesis de los fragmentos para obtención de dsRNA.....	26
3	Mezcla de reacción para amplificación de los fragmentos específicos para los dsRNA.....	26
4	Condiciones en el termociclador para la amplificación de los fragmentos específicos para los dsRNA.....	26
5	Mezcla para ligación de los fragmentos amplificados en pGEM-T Easy.....	27
6	Mezcla para la digestión de pGEM-T + insertos.....	29
7	Mezcla de ligación de los insertos Cyp302a1, Ache y F2 en pL4440.....	30
8	Mezcla de reacción para amplificación con M13 fwd y T7 a partir de las construcciones.....	33
9	Condiciones en el termociclador para la amplificación con M13 fwd y T7 a partir de las construcciones.....	33
10	Mezcla de reacción para transcripción <i>in vitro</i> de dsRNA.....	34
11	Cuantificación de dsRNA obtenido mediante transcripción <i>in vivo</i> .....	50

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Distribución mundial del dengue a nivel mundial según el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC).....	4
2	Distribución de <i>Ae. aegypti</i> en América.....	6
3	Ciclo de vida de <i>Ae. aegypti</i> .....	7
4	Huevos de <i>Ae. aegypti</i> .....	8
5	Larvas de <i>Ae. aegypti</i> .....	8
6	Pupas de <i>Ae. aegypti</i> .....	9
7	<i>Ae. aegypti</i> adulto.....	10
8	Vías de RNAi en insectos.....	14
9	Esquema de biosíntesis con las funciones de las P450 codificadas por los genes Halloween.....	19
10	Amplificación del fragmento Cyp302a1.....	35
11	Amplificación del fragmento Ache.....	35
12	Amplificación del fragmento F2.....	36
13	PCR de colonia de DH5 $\alpha$ transformantes con plásmido pGEM-T_Ache y pGEM-T_Cyp302a1.....	37
14	PCR de colonia de DH5 $\alpha$ transformantes con plásmido pGEM-T_F2....	37
15	Digestión enzimática de ADN plasmídico pGEM-T_Cyp302a1 con <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i> .....	38

16	Digestión enzimática de ADN plasmídico pGEM-T_Ache con <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i> .....	39
17	Digestión enzimática de ADN plasmídico pGEM-T_F2 con <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i> .....	39
18	Alineamiento local de la secuencia de Cyp302a1 mediante BLAST.....	40
19	Alineamiento local de la secuencia de Ache mediante BLAST.....	40
20	Alineamiento local de la secuencia de F2 mediante BLAST.....	41
21	Digestión enzimática con <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i> de pGEM-T_Cyp302a1, pGEM-T_Ache y pL4440.....	42
22	Digestión enzimática con <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i> de pGEM-T_F2 y pL4440.....	43
23	Mapa de construcción de pL4440-Cyp302a1.....	44
24	Mapa de construcción de pL4440-Ache.....	44
25	Mapa de construcción de pL4440-F2.....	45
26	Digestión enzimática de ADN plasmídico L4440_Cyp302a1 y L4440_Ache con <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i> .....	46
27	Digestión enzimática de ADN plasmídico L4440-F2 con <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i> .....	46
28	Alineamiento local de la secuencia de Cyp302a1 mediante BLAST.....	47
29	Alineamiento local de la secuencia de Ache mediante BLAST.....	47

30	Alineamiento local de la secuencia de F2 mediante BLAST.....	48
31	Extracción ARNt sin DNAsa I.....	49
32	Extracción ARNt con DNAsa I.....	49
33	Transcripción <i>in vitro</i> a partir de los productos de PCR de M13 Fwd y T7.....	50
34	Parte de la secuencia del vector de expresión pL4440.....	55

## LISTA DE SÍMBOLOS Y/O NOMENCLATURA

°C	Grados centígrados
µg	microgramos
µL	Microlitros
20E	20-Hidroxiecdisona
L4440_ChxA	Nomenclatura para designar la construcción pL4440 con dsRNA específico para el gen <i>ChxA</i>
L4440_Cyp314a1	Nomenclatura para designar la construcción pL4440 con dsRNA específico para el gen <i>Cyp314a1</i>
<i>Ache</i>	Gen productor de acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGO	Proteína argonauta
ARN	Ácido ribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AUB	Aubergina
C	Cápside
CDC	Centro de Control de y Prevención de Enfermedades
cDNA	DNA complementario
CHS	Quitina sintasa
<i>ChxA</i>	Gen codificante de la enzima quitina sintasa A
<i>ChxB</i>	Gen codificante de la enzima quitina sintasa B
<i>Cyp302a1</i>	Gen <i>disembodied</i>
<i>Cyp314a1</i>	Gen Shadow

DENV	Virus dengue
dNTP	Desoxirribonucleótidos Trifosfato
dsRNA	RNA de doble cadena
dsRNA-F2	RNA de doble cadena dirigido al gen trombina humana
E	Envoltura
E	Ecdisona
E20MO	20-monooxigenasa
E-RNAi	Programa en línea para el diseño y evaluación de dsRNA
ETV	Enfermedades transmitidas por vectores
F2	Nomenclatura del gen trombina humana
HT115 (DE3)	Cepa de <i>E. coli</i> deficiente en RNAsa III
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
pL4440	Vector plasmídico que contiene dos promotores T7
LB	Luria Bertani
M	Membrana
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
miRNA	Micro RNA
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
OD	Densidad óptica

OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pGEM-T	Vector de clonación
piRNA	RNA de interferencia con Piwi
Pre-miRNA	miRNA precursor
Pri-miRNA	miRNA primario
PTTH	Hormona Prototorácica
RISC	Complejo proteico de silenciamiento inducido por RNA
RNAi	RNA de interferencia
Rpm	Revoluciones por minuto
Rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa- Retrotranscriptasa
shRNA	Pequeños RNA en horquilla
siRNA	Pequeños RNA de interferencia
ssRNA	RNA de hebra sencilla
TAE	Tampón (Tris-Borato-EDTA)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que mediante su programa Nacional de Posgrado de Calidad, me otorgo apoyo económico para la realización de este trabajo.

Al programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI-IPN) que por medio del programa de Becas de Estimulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI), me brindo apoyo económico para mi formación durante la maestría.

Al CBG-IPN por permitirme estudiar su postgrado y subir un escalón más en mi formación profesional.

A mi director de tesis, el Dr. Erick de Jesús de Luna Santillana por su todo su apoyo, ayuda y consejos durante la maestría.

Al Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

Al Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz por otorgarme su tiempo, conocimientos, material y su confianza al permitirme desarrollar una parte de mi trabajo en su laboratorio de Microorganismos Marinos en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste (CIBNOR) así como al centro por aceptar mi estancia.

A todos mis amigos y a mis compañeros del laboratorio de Biomedicina Molecular por demostrarme su preocupación y cariño así como la ayuda que me brindaron en cada una de mis dudas tanto teóricas como prácticas.

## **DEDICATORIA**

Para mi familia que simplemente son las personas que hacen que yo pueda estar aquí siguiendo las metas que me he propuesto, en todo lo que logre siempre estarán presentes sin importar donde me encuentre, siempre apoyándolos y queriéndolos como ustedes lo han hecho conmigo.

## RESUMEN

El virus dengue (DENV) es una de las arbovirosis más importantes a nivel mundial. *Aedes aegypti* es el principal vector y transmisor del dengue y otros arbovirus hacia humanos a través de la picadura del mosquito. No existe tratamiento contra el virus del dengue y el control de la enfermedad se basa principalmente en el saneamiento de lugares de cría de larvas y en el control químico del vector, sin embargo, debido al continuo uso y exceso de insecticidas los mosquitos han desarrollado resistencia. Por lo que es importante buscar nuevas alternativas para controlar la población del vector del dengue y otras arbovirosis. La técnica de ARN de interferencia (ARNi) es una aproximación molecular que tiene mucho potencial para control de plagas clave debido a que se pueden bloquear genes necesarios para el desarrollo o supervivencia de los organismos plaga, mediante la introducción de RNA de doble cadena (dsRNA) exógeno que provoca la degradación del mRNA. Existen actualmente estudios con RNAi para el control de *Ae. aegypti*, sin embargo, la producción de dsRNA ha sido mediante transcripción *in vitro*, un proceso costoso y con una producción limitada. Por ello el presente trabajo tuvo como objetivo la construcción de una plataforma para la producción de dsRNA que resulte menos costosa y que pueda ser llevado a una mayor escala.

Para lograr el objetivo se clonaron los fragmentos de los genes *Cyp302a1*, *Ache* y *F2* en los sitios de restricción *HindIII* y *XhoI* del vector de expresión pL4440. Células *E. coli* HT115 (DE3) fueron transformadas con las construcciones y posteriormente se llevó a cabo la inducción mediante la adición de IPTG de L4440\_Cyp302a1, L4440\_Ache, L4440\_F2 (realizadas en este trabajo) y de L4440\_Cyp314a1, L4440\_ChxA (realizadas en un trabajo previo). También se realizó una transcripción *in vitro* usando el estuche comercial AmpliScribe™ T7 High Yield. En todas las inducciones se obtuvo dsRNA excepto en L4440\_ChxA. Los tamaños de los dsRNA obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo* fueron 420, 445, 511 y 403 pb respectivamente. Se logró la construcción de los sistemas de producción *in vivo* así como la obtención de dsRNA mediante este sistema

con una producción en promedio de 1.8  $\mu\text{g}$  de dsRNA por 3 mL de cultivo celular con O.D<sub>600</sub> de 1 y, de manera *in vitro*, con un promedio de 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  a partir de 1  $\mu\text{g}$  de producto de PCR. El costo beneficio de producción de dsRNA mediante sistemas bacterianos es una alternativa económica y eficiente por lo que se debe buscar e implementar una estrategia para mejorar la producción.

## ABSTRACT

At worldwide, the dengue virus (DENV) is the most important arbovirosis. *Aedes aegypti* is the main vector and transmitter of the dengue and others arbovirus towards humans through the mosquito bite. There is not exist treatment against the dengue virus, and the disease control is mainly based in the sanitation of breeding sites of larvae and the chemical control of the vector, however, due to continuous and excessive use of insecticides the mosquitoes have developed resistance. So it is important to search new alternatives to control the population of the dengue vector and others arbovirus. The technique of interference RNA (RNAi) is a molecular approach that has much potential for control of key pests, because genes can be blocked genes required for the development or survival of the pests through exogenous double-stranded RNA (ds-RNA), which causes degradation of the mRNA. Currently exist studies whit RNAi for the control of *Ae. Aegypti* however the production of dsRNA has been by *in vitro* transcription, expensive process and with a limited production. For this reason, the present work was aimed at building a platform for the production of dsRNA that is less costly and that can be taken to a larger scale.

To achieve the goal, were cloned the fragments of the genes *Cyp302a1*, *Ache* and *F2* in the restriction sites *HindIII* and *XhoI* from the expression vector pL4440. *E. coli* HT115 cells (DE3) were transformed with the constructs and subsequently the induction was carried out by the addition of IPTG from L4440\_Cyp302a1, L4440\_Ache, L4440\_F2 (performed in this work) and L4440\_Cyp314a1, L4440\_ChxA (performed in a previous work). Also performed an *in vitro* transcription using the AmpliScribe™ T7 high yield transcription kit. In all inductions dsRNA was obtained except in L4440\_ChxA. The sizes of the dsRNAs obtained both *in vitro* and *in vivo* were 42, 420, 445, 511 and 403 pb respectively. The construction of the *in vivo* production systems was achieved as well as the obtaining of dsRNA by this system with an average production of 1.8 µg of dsRNA per 3 mL of cell culture with O.D.<sub>600</sub> 1 and *in vitro*, with an average of 20 µg/µL from 1 µg of PCR product. The cost benefit of producing dsRNA by bacterial systems is

an economical and efficient alternative and it is necessary to search and implement a strategy to improve production.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los arbovirus son virus transmitidos por artrópodos. La emergencia y remergencia de arbovirus tales como el virus Zika, virus Chikungunya y principalmente virus Dengue representan un gran problema de salud pública y carga económica para los países endémicos. El dengue es una de las arbovirosis más importantes a nivel mundial provocada por un *Flavivirus*, llamado virus Dengue (DENV). Esta enfermedad se presenta con manifestaciones clínicas que van desde una fiebre indiferenciada hasta un cuadro hemorrágico que puede comprometer la vida del paciente. El dengue es transmitido principalmente por mosquitos *Ae. aegypti*, presente en regiones tropicales y subtropicales, en estrecha convivencia con el ser humano por los hábitos hematófagos de las hembras. Diversos factores han provocado una constante dispersión del mosquito y, por ende, las infecciones por DENV. La principal estrategia para el control y prevención del DENV en México es mediante el control del vector transmisor, llevándose a cabo por medio de programas de educación para eliminar los sitios de cría o bien mediante la aplicación de insecticidas químicos, sin embargo, el uso inadecuado de éstos ha generado resistencia en *Ae. aegypti*.

El mecanismo de RNAi es un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional, ocasionado por la introducción al organismo de RNA de doble cadena (dsRNA), el cual es cortado por una enzima llamada Dicer generando pequeños RNAi (siRNA) que son, posteriormente colocados en el complejo proteico de silenciamiento inducido por RNAi (RISC), que mediante una hebra guía es llevado al mRNA diana complementario para ser degradado y, por lo tanto, no es traducido. El RNAi ofrece un potencial para el control de insectos plaga con eficiencia y, sin perjudicar al medio ambiente, mediante el silenciamiento de genes involucrados en su desarrollo, provocándoles su muerte.

Debido a lo anterior y, basado en el empleo del RNAi para inhibir el desarrollo de *Ae. aegypti*, el objetivo del presente trabajo es la obtención de dsRNAs a partir de un sistema de expresión bacteriano, específicos a los genes *Quitin sintasa (ChsA)*, *Disembodied*

(*Cyp302a1*), *Shade* (*Cyp314a1*) y *Acetilcolinesterasa* (*Ache*) los cuales participan en el desarrollo larval y en la sinapsis colinérgica de *Ae. aegypti*.

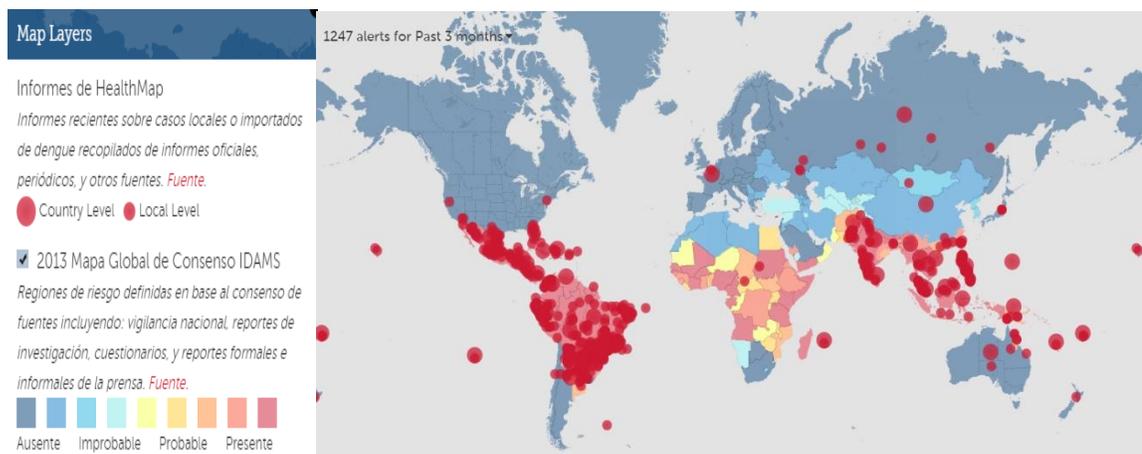
## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Arbovirus**

Los arbovirus (por su denominación en inglés: arthropod-borne viral) son virus que requieren para completar su ciclo biológico, tanto de un vector (invertebrado hematófago) como de un hospedero (vertebrado) (Dash *et al.*, 2013). Son transmitidos biológicamente por mosquitos, garrapatas, moscas y otros artrópodos vectores (Bolling *et al.*, 2015). Se han reportado más de 100 especies causantes de enfermedades en seres humanos y animales, los cuales pertenecen principalmente a las familias *Flaviviridae*, *Togaviridae*, y *Bunyaviridae* (Carvajal *et al.*, 2015; Franz *et al.*, 2015). Existen otros arbovirus aparentemente no patógenos para los humanos, sin embargo, siendo altamente adaptables pudieran ser un recurso para la conversión a patógenos en un futuro (Liang *et al.*, 2015). La emergencia y reemergencia de arbovirus tales como el virus Zika, virus Chikungunya y principalmente virus Dengue (DENV) representan un gran problema de salud pública y carga económica para los países afectados (Dash *et al.*, 2013).

### **2.2 Dengue**

El dengue es una enfermedad reemergente y una de las arbovirosis más importantes a nivel mundial. La infección por el virus del dengue se originó en el sudeste asiático extendiéndose a través de los años a África y América, encontrándose actualmente en casi la mitad del mundo. Estudios recientes indican que 3,900 millones de personas en 128 países están en riesgo de contraer la enfermedad y ocurren alrededor de 390 millones de infecciones cada año (Brady *et al.*, 2012; Bhatt *et al.*, 2013; Guzmán *et al.*, 2014). (Figura 1).



**Figura 1. Distribución mundial del dengue a nivel mundial según el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC).** <http://www.healthmap.org/dengue/es/>

El dengue es ocasionada por un virus icosaédrico de 50 nm de diámetro perteneciente a la familia *Flaviviridae* género *Flavivirus* llamado virus dengue (DENV). Su genoma se presenta como ARN de cadena sencilla de sentido positivo con aproximadamente 10.7 Kb de longitud. Contiene un marco de lectura abierto que codifica para tres proteínas estructurales: cápside (C), membrana (M) y envoltura (E) (glicoproteínas), y siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Guzmán *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2016).

Presenta 5 serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, DENV-5) (Mustafa *et al.*, 2015), genéticamente diversos compartiendo del 60 al 75% de identidad entre sus aminoácidos (Guzmán *et al.*, 2014).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2009 clasificó cuatro cuadros clínicos del dengue: 1. Dengue asintomático; 2. Fiebre indiferenciada, caracterizada por fiebre, rinorrea, odinofagia y cefalea; 3. Dengue no grave (antes llamado dengue clásico), se caracteriza por fiebre súbita y ataque al estado general; 4. Dengue grave, en el cual se presenta fiebre, fuga plasmática, hemorragia grave y afección crónica grave (Fajardo *et al.*, 2012).

La transmisión del dengue se lleva a cabo por mosquitos hembras del género *Aedes* quienes requieren de alimentación de sangre para obtener las proteínas necesarias para llevar a cabo la ovogénesis y la producción de huevos viables. Las subespecies implicadas en la transmisión son *Ae. albopictus* y principalmente *Ae. aegypti* de la familia *Culicidae* (Fajardo *et al.*, 2012). El vector adquiere el virus al alimentarse de sangre de humanos infectados con el DENV durante el periodo de viremia. El virus pasa del tracto gastrointestinal a las glándulas salivales del mosquito después de 10 días de incubación extrínseca. La picadura del mosquito después de la incubación extrínseca a otro humano susceptible genera la infección por DENV, completando así su ciclo vital (Guzmán *et al.*, 2010).

### **2.3 *Aedes aegypti***

*Ae. aegypti* es una especie de mosco perteneciente al Phylum *Artrópoda*, Orden *Díptera*, Suborden *Nematócera*, Familia *Culicidae*, Subfamilia *Culicinae*, Género *Aedes*, Subgénero *Stegomya* (Badii *et al.*, 2006).

*Ae. Aegypti* fue probablemente introducido a América desde África a través del transporte de sus huevos o larvas en depósitos de los barcos durante las primeras exploraciones y colonizaciones europeas (Nelson 1986; Fajardo *et al.*, 2012). A partir del siglo XV en adelante, se incrementó el número poblacional del vector en América y, por consiguiente, las infecciones por DENV, provocando que la Organización Panamericana de la Salud (OPS) estableciera un programa de erradicación del mosco en 1947. Entre 1948 y 1962, 21 países declararon la erradicación de *Ae. aegypti*, sin embargo, la falta de seguimiento del programa trajo como consecuencia la re-infestación del vector y, para el año 1995, su distribución era igual que la que presentaba en 1940 (Eisen *et al.*, 2013) (Figura 2).

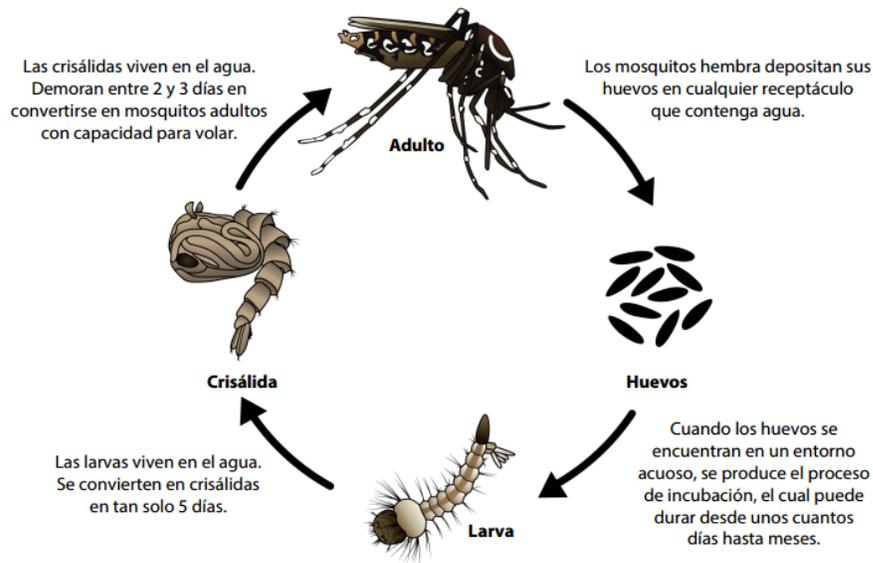


**Figura 2. Distribución de *Ae. aegypti* en América.** Imagen tomada de Badii *et al* 2006

*Ae. aegypti* se encuentra en regiones tropicales y subtropicales con temperaturas de 15 a 40 °C (Rodríguez *et al.*, 2014; Mora *et al.*, 2010). Esta especie se distribuye a 35° latitud norte y 35° sur, sin embargo, puede extenderse hasta los 45° norte y 40° sur, y en una altitud máxima generalmente de 1, 200 metros sobre el nivel del mar, pero existen reportes de su presencia en lugares a más de 2, 400 metros sobre el nivel del mar (Eiman *et al.*, 2012).

*Ae. aegypti* se asocia estrechamente al entorno del ser humano, encontrándose en áreas urbanas, suburbanas y poco menos en áreas rurales (Icaza, 2010). Los recipientes de retención de agua como floreros, tambos, pilas, cubetas, tanques, llantas y envases, así como también lugares baldíos y basureros son aprovechados por los moscos como sitios de depósito de huevos y cría de estados inmaduros. Las hembras son localizadas principalmente en interiores de las casas para descansar y alimentarse (WHO 2011).

Este vector cuenta con un ciclo de vida con metamorfosis completa (acuático y aéreo) en el cual pasa por cuatro fases para su desarrollo biológico (Eiman *et al.*, 2002) (Figura 3).



**Figura 3. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*.** Se presentan cuatro estados en el desarrollo de *Aedes aegypti*: 1) Huevos; 2) Larva; 3) Crisálida o pupa; 4) Adulto. Imagen tomada de CDC, División de Enfermedades Transmitidas por Vectores. 2016.

Las hembras hematófagas después de la alimentación pueden depositar entre 50 y 150 huevos de alrededor de 0,6 a 0,8 mm de longitud. Estos son colocados en las paredes internas de los contenedores sobre el nivel del agua. Los huevos son transparentes al momento de su depósito, pero cambian a color negro en el transcurso de unas horas. Una vez que el embrión se desarrolló, los huevos pueden resistir largos periodos de desecación desde meses hasta más de un año, los cuales al entrar en contacto con el agua se produce su eclosión (Figura 4).



**Figura 4. Huevos de *Aedes aegypti*.** Tomada de CDC, División de Enfermedades Transmitidas por Vectores. 2016.

Los huevos eclosionan para dar lugar a la segunda fase de larva, la cual es acuática con gran movilidad. Su cuerpo se divide en tres regiones principales: cabeza, tórax y abdomen con nueve segmentos. El segmento posterior del abdomen tiene 4 branquias lobuladas para la regulación osmótica y un sifón corto para la respiración en la superficie del agua. Las larvas se alimentan de materia orgánica en suspensión o acumulado en paredes y en el fondo de los recipientes y presentan la característica de ser fotosensibles. Durante su desarrollo mudan su exoesqueleto tres veces, por ello se divide en 4 estadios (del 1 al 4) que exteriorizan un tamaño inicial de 1 mm y finaliza en 7 mm, cuando la larva de cuarto estadio muda, pasa al estado de pupa. La duración en esta etapa depende de factores como temperatura, densidad larvaria, depredadores y disponibilidad de alimento, presentándose las condiciones adecuadas su periodo varía entre 5 y 10 días (Nelson, 1986; Icaza 2010; Eiman *et al.*, 2012; Rodríguez 2015) (Figura 5).



**Figura 5. Larvas de *Aedes aegypti*.** Tomada de CDC, División de Enfermedades Transmitidas por Vectores. 2016.

La siguiente fase de desarrollo es la de pupa, la cual no se alimenta y cuenta con poca movilidad. Se constituye de cabeza y el tórax en una estructura única, llamada cefalotórax, en la que se destacan las trompetas respiratorias que atraviesan la superficie del agua para poder respirar. Tiene la propiedad de ser flotable lo que favorece la emergencia del adulto. La pupa puede durar de 1 a 3 días bajo buenas condiciones, siendo este corto periodo esencial para que ocurran transformaciones que llevan a la formación del adulto y a cambiar el hábitat acuático por el terrestre (Icaza 2010; Eiman *et al.*, 2012) (Figura 6).



**Figura 6. Pupas de *Aedes aegypti*.** Tomada de CDC, División de Enfermedades Transmitidas por Vectores. 2016.

La última fase del ciclo biológico de *Ae. aegypti* es la emergencia del adulto, de vida terrestre, color oscuro con franjas blancas en los segmentos tarsales y presenta en la parte superior del cuerpo un diseño en forma de lira característico de *Ae. aegypti*. Su cuerpo se divide en cabeza, tórax y abdomen. Presentan dimorfismo sexual caracterizado por el tipo de antenas y forma de los palpos. Las antenas de las hembras son plumosas y palpos largos mientras en los machos son denso-plumosas y los palpos más cortos. Hembra y macho son fitófagos pero la hembra además es hematófaga ya que después de la ingesta sanguínea se incrementa la producción de hormonas esteroideas necesarias para la maduración de los huevos. Los machos pueden vivir una semana en promedio, mientras que las hembras viven un periodo más largo de hasta un mes (Icaza 2010; Eiman *et al.*, 2012; Rodríguez 2015) (Figura 7).



**Figura 7. *Aedes aegypti* adulto.** Tomada de CDC, División de Enfermedades Transmitidas por Vectores. 2016.

## 2.4 Control del vector

Diversos factores como el crecimiento poblacional, los viajes internacionales, el nivel socioeconómico bajo de las comunidades, que repercute en las condiciones de vivienda, educación, desabasto de agua y mala recolección de desechos sólidos, han permitido la dispersión del vector *Ae. aegypti* y por consiguiente el incremento de infecciones por virus dengue (Mora *et al.*, 2010).

La principal estrategia hasta el momento para controlar y prevenir el dengue en México es el control del vector. Esto se realiza ya sea con programas de saneamiento para eliminar los sitios de cría o bien mediante control químico. Para el control químico se aplican plaguicidas contra los vectores en sus estadios larvarios o inmaduros y adultos. Tres clases de plaguicidas son empleados principalmente: los organofosforados, los piretroides y los carbamatos. Sin embargo, el uso intensivo y extensivo ha generado el desarrollo de resistencia a estos compuestos, característica que es definida por la OMS como hereditaria, y que permite mayor tolerancia al insecticida (Paoletti and Pimentel 2000; Stahl, 2002; Hemingway *et al.*, 2002; Nicholson 2007).

Un método desarrollado recientemente para el control de insectos es el silenciamiento de genes involucrados en el desarrollo, conduciendo a la letalidad mediada por el mecanismo de ARN de interferencia (RNAi).

## **2.5 RNA de interferencia (RNAi)**

El ARN de interferencia (RNAi) es un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional ocasionado por moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA). Es un proceso regulatorio de la expresión génica y la defensa antiviral en eucariotas (Wynant *et al.*, 2014; Nandety *et al.*, 2015)

El primer indicio de este mecanismo fue visto en 1990 de manera accidental cuando científicos quería intensificar el color de rojo de las petunias para beneficio comercial. Rich Jorgensen introdujo el gen que expresaba la enzima *chalcona sintasa* para la formación de pigmento violeta en la flor de las violetas, esperando obtener un aumento en la pigmentación, sin embargo, obtuvieron flores con menor coloración incluso blancas. A este fenómeno lo denominaron co-supresión debido a que el gen introducido no se expresaba y, además, el gen nativo en la planta dejó de expresarse (Napoli *et al.*, 1990). Posteriormente también se observó este mismo fenómeno, pero en un hongo llamado *Neurospora crassa*, llamándolo *quelling* (Romano y Macino 1992).

En animales fue caracterizado por primera vez en 1998 por Fire y Mello. Ellos demostraron que la introducción de dsRNA en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* provocó la degradación del RNA mensajero (mRNA) complementario a una u otra cadena del dsRNA, resultando en un silenciamiento del gen (Fire *et al.*, 1998). Estudios posteriores demostraron que el RNAi se presentaba en todos los eucariontes de manera conservada en respuesta a dsRNA, determinándose como un mecanismo antiviral evolutivamente conservado (Ortíz, 2009).

### **2.5.1 Mecanismo de RNAi en insectos**

El primer paso consiste en la escisión de dsRNA por medio de una enzima tipo III llamada Dicer en pequeños RNA de doble hebra (siRNA) de 22-25 nucleótidos de longitud con 2-3 nucleótidos no apareados y un grupo hidroxilo en el extremo 3' mientras que en el extremo 5' se encuentra un grupo fosfato.

El segundo paso se da mediante la unión de estos siRNA en el complejo proteico de silenciamiento inducido por RNA (RISC). RISC separa las hebras de los siRNA y sólo utiliza la hebra anti-sentido como guía para dirigirse y unirse al mRNA que contiene la secuencia complementaria. Además, RISC contiene endonucleasas llamadas Argonautas (AGO) que escinden la cadena de mRNA, mientras que la hebra anti-sentido se degrada durante la activación de RISC. Para que ocurra este rompimiento es necesario que la hebra guía del siRNA y el mRNA diana presenten perfecta complementariedad de bases cerca del sitio de rompimiento (10-11 nucleótidos cerca del extremo 5' del siRNA) (Ortíz, 2009; Senapedis *et al.*, 2011).

La actividad de RNAi es determinada por los pequeños RNAs (sRNA) por medio del reconocimiento y preciso apareamiento de bases entre estos sRNA y su diana complementaria en el mRNA. Estos sRNA incluyen a tres clases distintas: pequeños RNAs de interferencia (siRNA), microRNAs (miRNA) e interacción con piwi (piRNAs) los cuales son generados a través de vías de biogénesis independientes (Nandety *et al.*, 2015).

#### **2.5.1.1 miRNA**

Los miRNA una vez maduros son hebras sencillas de ARN (ssARN) con una longitud de 19-24 nucleótidos, generados a partir de transcritos primarios endógenos por medio de la acción de 2 nucleasas (RNAasa tipo II).

El mecanismo inicia generándose los transcritos primarios a partir de genes endógenos por medio de la RNA polimerasa II, con la característica de formar una estructura tipo tallo-asa llamada miRNA primario (pri-miRNA). Un paso en la maduración de este pri-miRNA se logra a través de la escisión de esta estructura mediante la actividad de una enzima tipo RNasa III llamada Drosha y un cofactor llamado Pasha, en el núcleo, generando el precursor microRNA (pre-miRNA). Este pre-miRNA se transporta al citoplasma a través de una proteína de transporte, la exportina 5 con ayuda de su asociación al cofactor GTP-Ran. Por medio de la hidrólisis del GTP, este pre-miRNA es liberado en el citoplasma para, posteriormente ser cortado por la enzima Dicer 1 en dúplex de 19-24 nucleótidos con 2 nucleótidos sobresaliendo en el extremo 5', generando así los miRNA maduros y, colocándose posteriormente la hebra guía en la proteína AGO 1.

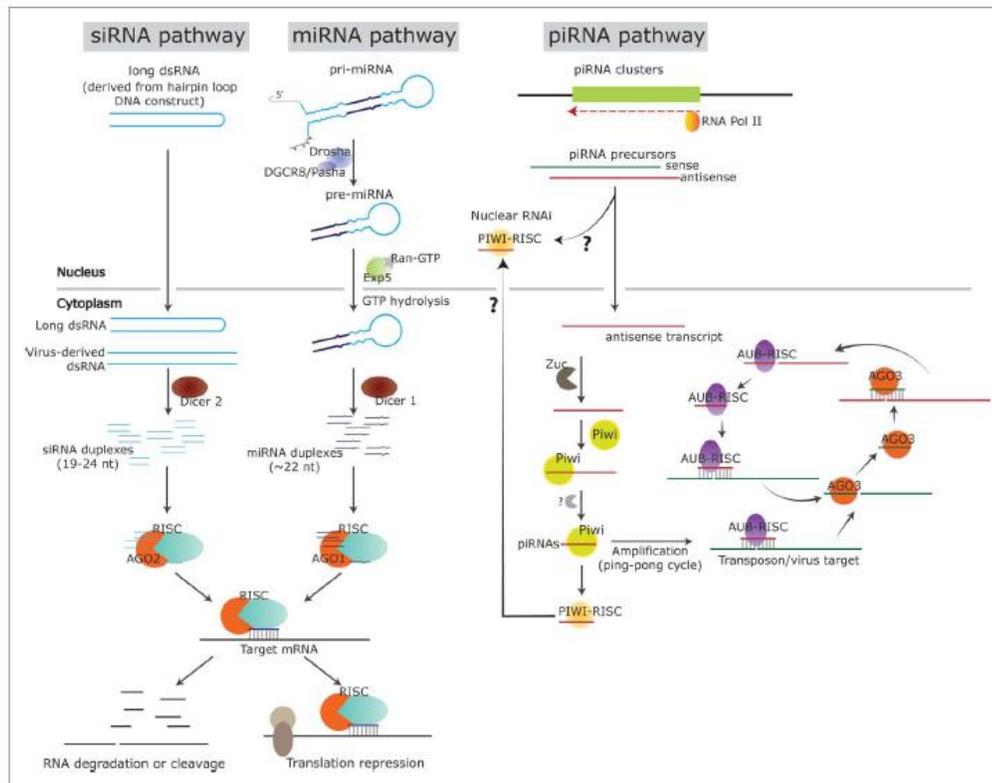
#### **2.5.1.2 siRNA**

Los siRNA al igual que los miRNA son dependientes del procesamiento por Dicer, con una longitud de 19-24 nucleótidos. El origen de los siRNA es dsRNA ya sea de virus, transcritos endógenos, pseudogenes o de repeticiones invertidas. Estos dsRNA son procesados en el citoplasma por Dicer 2 en 21 nucleótidos de longitud. Estos siRNA posteriormente son asociados a la proteína AGO 2 ó 5. Por último, los dúplex de siRNA se unen a RISC, donde de igual manera que en el proceso de miRNA, RISC sólo utiliza la cadena guía para dirigirse al mRNA diana (Wynant *et al.*, 2014; Nandety *et al.*, 2015).

#### **2.5.1.3 piRNA**

Los piRNA en comparación con los siRNA y miRNA son independientes de las enzimas Dicer y son un poco más largos (de 24-31 nucleótidos de longitud). Su objetivo es el silenciamiento de transposones y retrotansposones. El grupo de proteínas que participa en esta biogénesis son: PIWI, Aubergina (AUB) y AGO 3. Los pequeños RNAs que se asocian a Piwi son llamados piRNAs. Los cluster de piRNA (es decir secuencias

que abarcan gran parte de los transposones) son transcritos por la RNA pol II en dirección sentido y antisentido, la cual cada una servirá para la producción de piRNA. Existen dos vías de producción, una en la cual el transcrito de transposon es cortado en el citoplasma por la nucleasa zucchini (Zuc) generando los piRNA primarios, los cuales posteriormente son cortados por las proteínas piwi en dos ocasiones para producir los piRNA maduros y otra en donde los piRNA primarios son unidos específicamente a PIWI, dirigiéndose al núcleo para inducir RNAi en blancos nucleares (Nandety *et al.*, 2015) (Figura 8).



**Figura 8. Vías de RNAi en insectos.** Se muestra las vías de biogénesis de siRNAs, miRNAs y piRNAs en insectos. Tomada de Nandety *et al.*, 2015.

## 2.6 Silenciamiento de genes mediante RNAi

Una de las principales aplicaciones del RNA de interferencia que ha aportado grandes avances en la genómica funcional y en biología del desarrollo es la represión de forma

específica de los genes para estudiar su función. Esto se logra introduciendo siRNA o dsRNA a la célula activándose, por consiguiente, el sistema Dicer-RISC. De esta manera se ha conseguido silenciar una gran cantidad de genes en células en cultivo, así como también en gran cantidad de organismos diferentes y, esencialmente, se puede silenciar cualquier gen de interés en un organismo, siempre y cuando se conozca la secuencia del mRNA para ser utilizado para el diseño de los siRNA o dsRNA. Esta técnica explota un sistema intrínseco de “Knock Down” conocido también como “silenciamiento”, debido a que la inhibición artificial de la expresión de genes mediante este método no es total (Fakhr *et al.*, 2016).

Investigaciones en el área terapéutica-clínica y en el control de plagas son otros de los enfoques en los que se está trabajando actualmente con esta técnica. El potencial de RNAi en el desarrollo de métodos alternativos para el control de insectos tales como *Ae. aegypti* ha sido evaluado mediante administración oral de dsRNA dirigidos a genes que codifican diversas proteínas esenciales tales como la  $\beta$ -tubulina, quitina sintasa, ATPasa vascular (Singh *et al.*, 2012; Coy *et al.* 2012), mediante aplicación tópica como lo demuestran Pridgeon *et al.*, en el 2008 al aplicar dsRNA específicos para el gen inhibidor de la proteína de apoptosis, o bien con la sumersión de larvas en soluciones con dsRNA dirigidos a genes como el canal de sodio controlado por voltaje (VGSC), glicoproteína P, y enzimas detoxificantes citocromo p450 (Bona *et al.*, 2016).

Como se observa el mecanismo de RNAi ofrece un gran potencial para el control de plagas de insectos como *Ae. aegypti*, pero sólo se logrará mediante el conocimiento, la comprensión de la especificidad y de la actividad, para poder aprovechar las oportunidades para el desarrollo de aplicaciones sostenibles y ambientalmente racionales.

## 2.7 Producción de dsRNA

Actualmente, los dsRNA se pueden producir mediante tres métodos: 1) Mediante moldes de ADN lineal usando la ARN polimerasa del fago T7, 2) Sintetizados químicamente y, 3) Mediante vectores de expresión de doble cadena (Guan 2006; Papić *et al.*, 2015).

- 1) Los dsRNAs generados enzimáticamente involucran una transcripción *in vitro* mediada por la polimerasa del fago T7. Se obtienen como producto de la transcripción pequeños RNAs repetidos invertidos que se denominan small hairpin RNAs (shRNAs) o lineales que, posteriormente, son cortados por Dicer. Es el método más rápido de siRNA. Sin embargo, la pureza y especificidad en este tipo de síntesis es variable y se puede obtener resultados de una inhibición no específica (Duxbury y Whang, 2004).
- 2) Los dsRNAs sintetizados químicamente son introducidos directamente en el citoplasma de la célula evitando el paso por la enzima Dicer. Por su tamaño corto les denomina siRNA. Estos pueden ser sintetizados en gran cantidad y se ha probado que son más eficientes en la degradación del mRNA secuencia-específica, pero presenta problemas como el alto costo económico y el tiempo de síntesis, lo que no lo hace factible para producciones a gran escala y, aún menos cuando se tienen múltiples blancos y se requiere que múltiples siRNA se produzcan (Duxbury y Whang, 2004).
- 3) El uso de vectores plasmídicos de DNA que poseen el promotor T7 también son utilizados para generar dsRNA. Los dsRNA se producen y, posteriormente, son procesados por Dicer en siRNA. El uso de estos plásmidos permite una expresión estable de dsRNA por al menos 2 meses post-transfección y es económico al generar múltiples secuencias que son obtenidas por la propia maquinaria de RNAi, sin necesitar de un procesamiento externo. Su principal desventaja es que el éxito es dependiente del proceso de transfección (Duxbury y Whang, 2004). El uso de

sistemas *in vivo* mediante estos vectores es otra estrategia empleada para generar dsRNA. Para este método el uso de bacterias recombinantes son una buena opción como sistemas de producción, debido a su rápido crecimiento, fácil manipulación y es económico ya que no requiere de medios especiales para su cultivo (Papić *et al.*, 2015).

Cada una de las estrategias descritas anteriormente presentan ciertas ventajas y desventajas, pero si lo que se requiere es la producción a gran escala de dsRNA, la estrategia de sistemas *in vivo* representa la opción más rápida, fácil y económicamente viable para producir los dsRNA (Papić *et al.*, 2015).

## **2.8 Entrega de dsRNA**

En muchos vertebrados, el mecanismo de RNAi puede ser inducido en el organismo o la célula mediante la inyección de dsRNA en el sistema circulatorio por medio de transfección, mediante la alimentación con bacterias productoras de dsRNA e incluso mediante solo incubar al organismo en la solución que contenga los dsRNA o siRNA (Wynant *et al.*, 2014).

En estudios sobre insectos, inyecciones directas de dsRNA sintetizados *in vitro* en cualquier etapa del desarrollo puede producir la pérdida de función génica, sin embargo, presenta algunas dificultades tales como ser un método técnicamente exigente, laborioso, muchos insectos no sobreviven al proceso de inyección y existen limitaciones en ciertas especies de insectos pequeños y acuáticos (Zhang *et al.*, 2010; Wynant *et al.*, 2014). La entrega a través de un método de incubación del organismo en una solución que contiene dsRNA (soaking) es otra estrategia empleada para inducir el silenciamiento.

Incubación directa en gusanos, planarias, y en larvas de *Ae. aegypti* ha demostrado inducir interferencia específica (Tabara *et al.*, 1998; Orii *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2012).

Otras investigaciones también demuestran que el dsRNA puede ser fácilmente introducido a través de la ingestión de bacterias *E. coli* que expresan dsRNA a través de vectores con doble promotor T7 (Timmons *et al.*, 2001; Guan, 2006; Honggang *et al.* 2009).

## 2.9 Genes Halloween

*Ae. aegypti*, así como todos los insectos tienen un exoesqueleto (cutícula) por el cual solo pueden crecer hasta cierto punto por la restricción en el área de ésta. Por ello deben sintetizar periódicamente una nueva cutícula más grande y reemplazar la anterior, en el proceso llamado ecdisis o muda. El iniciador de este proceso es el esteroide polihidroxiado, 20-hidroxiecdisona (20E), hormona de muda que además participa en procesos morfogénicos que comprenden el crecimiento del insecto y la metamorfosis.

La hormona prototorácica (PTTH) se libera en la hemolinfa estimulando las glándulas protorácicas para que los productos de los genes *Cyp306a1*, *Cyp302a1* y *Cyp315a1* catalicen tres hidroxilaciones secuenciales para la producción de ecdisona (E). En dos pasos finales en la biosíntesis de la ecdisona se utiliza el gen *dib* (*Cyp302a1*) para mediar en la conversión de la cetotriol a 2-deoxiecdisona y *sad* (*Cyp315a1*) para mediar en la conversión de este último a la ecdisona. Finalmente, el gen *shade* (*Cyp314a1*) sintetiza para la enzima 20-hidroxilasa que hidroxila la ecdisona obteniendo la 20-hidroxiecdisona (20E). Estos genes son expresados tanto en el desarrollo embrionario y larval así como en los ovarios en hembras adultas del insecto (Petryk *et al.*, 2003; Gilbert 2004; Rewitz *et al.*, 2007) (Figura 9).

Estos genes han sido utilizados como blanco para el silenciamiento mediante RNAi en diferentes organismos como *Plutella xylostella* (Bautista *et al.*, 2009), *Diaphorina citri* (Killiny *et al.*, 2014) *Sogatella furcifera* (Wan *et al.*, 2014), *Laodelphax striatellus* (Wan *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2015), y *Helicoverpa armígera* (Jin *et al.*, 2015).

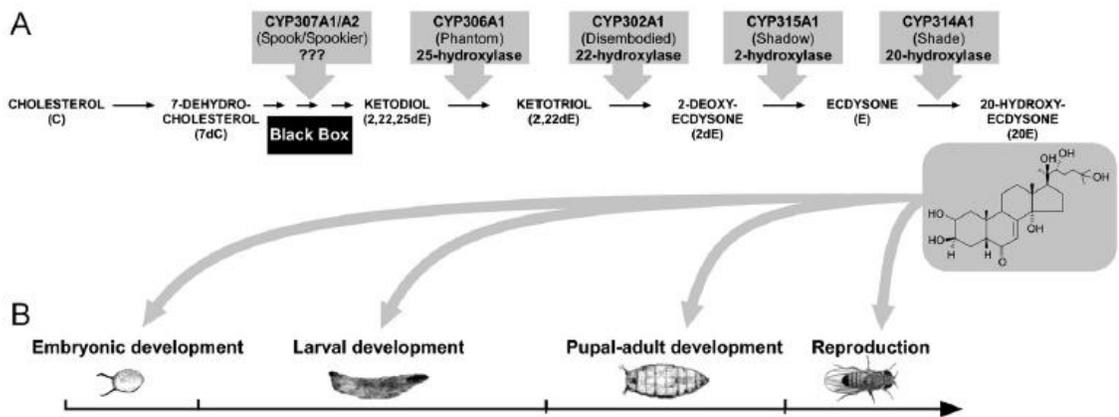


Figura 9. Esquema de biosíntesis con las funciones de las P450 codificadas por los genes Halloween. Tomada de Rewitz *et al.*, 2007.

## 2.10 Gen acetilcolinesterasa (*Ache*)

El gen *Ache* codifica para la enzima acetilcolinesterasa la cual participa en la terminación sináptica de la sinapsis colinérgica en el sistema nervioso central de los insectos y es uno de los blancos principales de los insecticidas carbamatos y organofosforados. Esta enzima cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (Ach) permitiendo la terminación de las señales nerviosas. La interrupción de este mecanismo genera una acumulación de Ach provocando una sobre-estimulación y, posteriormente, un bloqueo de la neurotransmisión (Anthony *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2013; Engdahl *et al.*, 2015). En un estudio en el 2009 por Kumar *et al.*, demostraron la capacidad de siRNA específicos para silenciar este gen y provocar mortalidad, inhibición

del crecimiento, malformación y fecundidad reducida en larvas de *Helicoverpa armígera* (Kumar *et al.*, 2009).

### **2.11 Gen *ChsA***

La quitina es un polímero lineal de N-acetilglucosamina unidos mediante enlaces  $\beta$ -(1, 4), encontrado en los artrópodos y hongos. El crecimiento y la metamorfosis de los insectos son estrictamente dependientes de los cambios estructurales en los tejidos y órganos que contienen quitina, tales como el exoesqueleto, la tráquea y el intestino de insectos que cuentan con matriz peritrófica. La quitina sintasa (CHS) es una enzima esencial que participa en la etapa final de la ruta biosintética de quitina, es codificada por los genes *ChsA* responsable de la producción de quitina que se necesita en la cutícula y el revestimiento cuticular del intestino y en tráquea y *ChsB* que se limita a células epiteliales intestinales que producen la matriz peritrófica del intestino medio. Debido a esto, es posible controlar el crecimiento, desarrollo y vida de insectos manipulando la síntesis o degradación de quitina (Merzendorfer 2006; Souza *et al.*, 2014; Zhuo *et al.*, 2014). Algunos de los estudios con silenciamiento de este gen han sido en *Spodoptera exigua* (Chen *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2009) y *Rhodnius prolixus* (Mansur *et al.*, 2014).

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Ae. aegypti* es uno de los principales vectores transmisores de arbovirus como el virus dengue (DENV). Estimaciones recientes indican que alrededor de 390 millones infecciones y 22 000 defunciones ocurren por dengue cada año, aunado a la carga económica de 2.1 billones de dólares generada por año tan solo en América. Programas de saneamiento, así como aplicación de insecticidas químicos son estrategias empleadas para controlar al vector, sin embargo, han generado resistencia a éstos, aunado al daño ambiental.

Por otro lado, la técnica de RNA de interferencia ha demostrado ser altamente eficaz y específica para el silenciamiento de genes en una gran diversidad de organismos, incluido mosquitos *Ae. aegypti*. Sin embargo en estos estudios han empleado dsRNA producidos de manera *in vitro*. Por ello, en el presente trabajo se empleará la estrategia económicamente viable de un sistema *in vivo* para la producción de dsRNA dirigidos a los genes *Cyp302a1*, *Cyp314a1*, *ChsA* y *Ache* que servirán para una futura evaluación del silenciamiento de estos genes en larvas de *Ae. aegypti* y, por consiguiente, su posible empleo como herramienta de control del vector.

#### **4. HIPÓTESIS**

La construcción e inducción de un sistema *in vivo* permitirá la síntesis y acumulación de dsRNA específicos contra los genes *Cyp302a1*, *Cyp314a1*, *ChsA* y *Ache* de *Ae. aegypti*.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo General**

Obtener fragmentos de dsRNA específicos contra los genes *Cyp302a1*, *Cyp314a1*, *Ache* y *ChsA* de *Ae. aegypti* mediante un sistema transcripcional bacteriano.

##### **5.2 Objetivos Particulares**

1. Clonar los genes *Cyp302a1*, *Ache* de *Ae. aegypti* y *F2* de humano como control negativo en el vector de expresión pL4440.
2. Inducir los sistemas de expresión para la obtención de los fragmentos dsRNA específicos de los genes *Cyp302a1*, *Cyp314a1*, *Ache*, *ChsA* y *F2*.
3. Extraer los fragmentos dsRNA del sistema bacteriano.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Material biológico**

Se utilizaron las construcciones pL4440\_ChxA y pL4440\_Cyp314a1, desarrolladas por Guevara R. H., 2015, las cuales están en el sistema de expresión bacteriano *E. coli* HT115 (DE3) para la producción de cadenas de dsRNA.

Cepas: DH5 $\alpha$ , especie: *E. coli*, genotipo: F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+),  $\lambda$ - y HT115 (DE3), especie: *E. coli*, genotipo: [F<sup>-</sup>, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14:Tn10 (DE3 lysogen: lavUV5 promoter -T7 polymerase)].

Las larvas de moscos de *Ae. aegypti* se obtuvieron del insectario del Laboratorio de Biomedicina Molecular del Centro de Biotecnología Genómica.

### **6.2 Metodología**

#### **6.2.1 Construcción de vectores de expresión de dsRNA**

##### **6.2.1.2 Obtención de fragmentos específicos para la producción de dsRNA**

Para la obtención de los fragmentos específicos de los genes *Cyp302a1*, *Ache* y *F2* primero se obtuvieron los iniciadores mediante el programa E-RNAi a los cuales se les agregó dos sitios de restricción en el extremo 5': *HindIII* para el iniciador derecho y *XhoI* para el iniciador izquierdo. Posteriormente, se llevó a cabo extracción de ARN y síntesis de cDNA para utilizarlo en la amplificación por PCR. Una vez amplificado los fragmentos, éstos fueron clonados en pGEM-T y subclonados en pL4440 para su expresión y obtención de dsRNA.

#### 6.2.1.2.1 Síntesis de cDNA

Para los genes *Cyp302a1* y *Ache* se realizó extracción de RNA total a partir de larvas de *Ae. aegypti* de tercer estadio mediante RNazol®RT de la siguiente manera: Se colocaron 12 larvas en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se les agregó 100 µL de solución RNazol para macerar el tejido mediante pistilo estéril. Una vez maceradas, se agregó 900 µL de la solución RNazol y 400 µL de agua libre de nucleasas, se mezcló en Vortex durante 15 seg e incubó por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm por 15 min, el sobrenadante se transfirió a otro tubo para precipitar el RNA mezclando con 1 mL de isopropanol. Por último, el pellet fue lavado con etanol al 75% (v/v) dos veces y resuspendido con 20 µL de agua mQ estéril. Mientras que para la obtención del fragmento específico para el gen *F2*, a utilizar como control negativo en futuros bioensayos, se realizó extracción de RNA a partir de sangre humana por medio de RNA Extraction Solution de GeneReach Biotechnology Corp. Para esto se colocaron 400 µL de sangre en un tubo Eppendorf de 1.5 mL al cual se le agregó 500 µl de solución de extracción de RNA y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, se adicionó 100 µL de cloroformo frío y se mezcló con Vortex durante 20 seg, se incubó temperatura ambiente durante 3 min y se centrifugó por 15 min a 12,000 rpm. 200 µL del sobrenadante fueron transferidos a un tubo de 1.5 mL con 200 µl de isopropanol frío, se dio Vortex y centrifugó por 10 min a 12, 000 rpm y se decantó el isopropanol. El pellet fue lavado con etanol al 75% y resuspendido con 20 µL de agua tratada con DEPC. Todas las extracciones de ARN fueron observadas en un gel de agarosa al 1 % con TAE 1X.

El RNA se utilizó para llevar a cabo una PCR re-trotranscriptasa (RT-PCR) mediante el estuche comercial Transcription System A3500 de Promega®, siguiendo las condiciones descritas en el cuadro 1.

**Cuadro 1. Mezcla de reacción para la RT-PCR.**

Componente	Concentración	Cantidad
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	5 mM	4 µL
Reverse transcription 10X Buffer	1 X	2 µL
DNTp's 10 mM	1 mM	2 µL
Recombinant RNasin® Ribonuclease inhibitor	1 u/µl	0.5 µL
AMV reverse transcriptase	15 u/µg	1 µL
Random primers	0.5 µg	0.5 µL
Templado (RNA) Precautado a 70 °C	1µg	2.5/1.0 µL
H <sub>2</sub> O		9.0 µL
Volumen total		20 µL

La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente por 10 min, después a 42 °C durante 15 minutos. Posteriormente, la mezcla fue calentada a 95 °C durante 5 minutos e incubada a 5 °C por 5 minutos. Al terminar, la mezcla fue diluida a un volumen de 100 µL de agua libre de nucleasas.

#### **6.2.1.2.2 Amplificación mediante PCR**

La amplificación por PCR de los fragmentos Cyp302a1, Ache y F2 se realizó agregando los sitios de restricción *HindIII* y *XhoI* a los iniciadores indicados en el cuadro 2 los cuales se obtuvieron por medio del programa E-RNAi (<http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/>) el cual diseña y evalúa fragmentos de dsRNA con la secuencia de GenBank depositada en el programa. Además, se realizó una PCR virtual mediante el programa Serial Cloner 2.6.1 para obtener el tamaño del fragmento a amplificar. Las condiciones utilizadas para la amplificación se describen en los cuadros 3 y 4.

**Cuadro 2. Iniciadores empleados en la síntesis de los fragmentos para obtención de dsRNA.**

Gen	Secuencia	Longitud	Gen Bank
<i>Cyp302a1</i>	F: GACA <u>AAGCTT</u> CCTGCATGAGTCTGGACAAG R: GGGCTCGAGCGATACACATTGGGACGGT	222 pb	XM_001647515.2
<i>Ache</i>	F: GACA <u>AAGCTT</u> GTTGCTGATCACCACGGATA R: GGGCTCGAG ACCCGAAAGTCACCAAATA	247 pb	EF209048.1
<i>F2</i>	F: GACA <u>AAGCTT</u> ACTGTAGCGATGACTCCACG R: GGCTCGAGAGTTGAGGTCGCAGTACCCA	313 pb	NM_000506.4

Iniciadores obtenidos mediante el programa E-RNAi para la síntesis de los fragmentos de dsRNA (*Cyp3102a1*, *Ache* y *F2*). Iniciador derecho con sitio de restricción para *HindIII* (subrayado), iniciador izquierdo con sitio de restricción para *XhoI* (subrayado).

**Cuadro 3. Mezcla de reacción para amplificación de los fragmentos específicos para los dsRNA.**

Componente	Concentración	Cantidad
H <sub>2</sub> O		13 µL
Buffer 5X	1 X	5 µL
DNTp's 10 mM	200 µM	0.5 µL
FHINthum 25 µM	0.5 µM	2.5 µL
RXHOthum 25µM	0.5 µM	2.5 µL
Taq DNA polimerasa 5 u	2.5 u	0.5 µL
cDNA	<10 ng/µL	1 µL
Volumen total		25 µL

**Cuadro 4. Condiciones en el termociclador para la amplificación de los fragmentos específicos para los dsRNA.**

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 Seg	
Alineamiento	Cyp302a1, Ache: 60°C F2: 62 °C	1.0 min	30
Extensión	72 °C	30 seg	
Extensión final	72 °C	10 min	1

### 6.2.1.3 Clonación de los fragmentos en el vector pGEM-T

Se realizó la clonación de los fragmentos obtenidos en el vector pGEM-T Easy para posteriormente corroborar, por corte enzimático y secuenciación de ADN plasmídico, que la secuencia de los fragmentos amplificados de los genes *Cyp302a1*, *Ache* y *F2* estuvieran correctas y que además permitiera la sub-clonación en pL4440.

#### 6.2.1.3.1 Ligación

Para realizar la clonación se llevó a cabo la ligación de los fragmentos y el vector pGEM-T siguiendo la proporcionalidad 3:1 recomendada por el estuche comercial pGEM®-T Easy Vector de Promega™ de la siguiente manera:

**Cuadro 5. Mezcla para ligación de los fragmentos amplificados en pGEM-T Easy.**

Componente	Concentración	Cantidad
Buffer de ligación rápida, T4 ADN ligasa	2X	5 µL
pGEM-T Easy Vector	50 ng	1 µL
Producto de PCR	<i>Cyp302a1</i> , <i>Ache</i> : 12.5 ng/µL <i>F2</i> : 15 ng/µL	1 µL
T4 ADN ligasa	3 u/µL	1 µL
H <sub>2</sub> O	x	2 µL
Volumen total		10 µL

La mezcla anterior fue incubada durante toda la noche a 4 °C.

#### 6.2.1.3.2 Transformación en *E. coli* DH5α

Se realizó la transformación de *E. coli* DH5α con las ligaciones realizadas anteriormente de la siguiente manera: en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se agregó 10 µL de la ligación a 100 µl de células DH5α competentes, incubándose la mezcla en hielo

durante 20 minutos, seguido de un choque térmico de 60 segundos a 42 °C (sin agitar), tras lo cual de inmediato se colocó en hielo por 2 minutos. Posteriormente, se añadió 950 µL de caldo LB y se incubó 2 horas a 37 °C con agitación (300 rpm). Después de este tiempo se centrifugó por 3 minutos a 13 000 rpm eliminando 850 µL del medio LB y del resto se tomó 100 µL para dispersar las células en placas LB con ampicilina (100 µg/µL)/X-Gal (80 µg/µL)/IPTG (0.5 mM) y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

#### **6.2.1.3.3 Confirmación de colonias positivas mediante PCR de colonia y a partir de plásmido**

Para confirmar que las colonias obtenidas anteriormente realmente presentaran el vector pGEM-T con los insertos, se seleccionaron las de color blanco (de acuerdo a lo establecido por el mecanismo de  $\alpha$ -complementación) y fueron sub-cultivadas en tubos falcón con 5 mL de caldo LB adicionado con ampicilina (100 µg/µL) y se incubó a 37 °C con agitación durante 24 horas. De los cultivos se tomó 1 mL para obtener el paquete celular mediante centrifugación a 10 000 rpm durante 3 minutos. El precipitado celular se re-suspendió con 15 µL de agua mQ estéril pipeteando varias veces para lisar las células y de éste, 2 µL fueron tomados como templado para la realización de la PCR de colonia mediante las condiciones descritas en los cuadros 3 y 4. De los cultivos positivos a la PCR de colonia se procedió a la extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina (Sambrook, *et al.*, 1989) y, se prosiguió con la PCR mediante las condiciones descritas anteriormente en los cuadros 3 y 4.

#### **6.2.1.3.4 Confirmación de colonias positivas mediante digestión enzimática y secuenciación plasmídica**

Parte del ADN plasmídico fue sometido a una digestión doble con las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI* como se muestra en el cuadro 6. Además, para confirmar

mediante secuenciación la presencia de los insertos, se realizó otra extracción mediante el estuche comercial “QIAprep® Spin Miniprep” siguiendo el protocolo establecido por el fabricante y fue enviado a secuenciar a Eurofins Operon con el iniciador universal M13.

**Cuadro 6. Mezcla para la digestión de pGEM-T + insertos.**

Componente	Cantidad
H <sub>2</sub> O	Volumen final de 40 µL
Buffer 10x	4 µL
ADN plasmídico	8.0-13 µL (1-2 µg/µL)
<i>HindIII</i>	1.5-2 µL (1-2 U)
<i>XhoI</i>	1.5-2 µL (1-2 U)
Volumen total	40 µL

Incubación a 37 °C durante 4 horas

#### 6.2.1.4 Subclonación de los fragmentos en pL4440

Se realizó sub-clonación de los insertos en el vector de expresión pL4440 ya que contiene dos promotores T7 inducibles mediante Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) utilizando las células *E. coli* HT115 (DE3) deficientes de RNAsa III para la producción de RNA de doble cadena.

##### 6.2.1.4.1 Generación de extremos cohesivos en pL4440 y liberación de los insertos mediante las enzimas *HindIII* y *XhoI*

El plásmido pL4440 al igual que las construcciones pGEM-T\_Cyp302a1, pGEM-T\_Ache y pGEM-T\_F2 fueron digeridos con las enzimas *HindIII* y *XhoI* para generar así los extremos cohesivos para la ligación de los dos componentes. Estas digestiones se realizaron con las condiciones descritas anteriormente en el cuadro 6.

Una vez realizada la mezcla se incubó a 37 °C durante 4 horas. Al terminar el tiempo de incubación se purificó la digestión mediante el estuche comercial QIAquick® gel extraction, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### 6.2.1.4.2 Ligación

Se llevó a cabo la ligación de los fragmentos previamente digeridos y purificados, en el vector de expresión pL4440 como se muestra en el cuadro 7.

**Cuadro 7. Mezcla de ligación de los insertos Cyp302a1, Ache y F2 en pL4440.**

Componente	Cyp302a1	Ache	F2
Buffer 10x	1 µL	1 µL	1 µL
pL4440	2 µL (30 ng/µL)	2 µL (28 ng/µL)	1 µL (15.3 ng/µL)
Insertos	6 µL (30 ng/µL)	2 µL (28 ng/µL)	1 µL (9.1 ng/µL)
T4 ligasa	1 µL	1 µL	1 µL
H <sub>2</sub> O	----	4 µL	6 µL
Volumen total	10 µL	10 µL	10 µL

Una vez preparada la reacción se dejó incubando durante toda la noche a 4 °C.

#### 6.2.1.4.3 Transformación en *E. coli* HT115 (DE3)

Se realizó la transformación de *E. coli* HT115 (DE3) con las ligaciones realizadas anteriormente de la siguiente manera: en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se agregó 10 µL de cada la ligación a 200 µL de células HT115 (DE3) competentes, incubando la mezcla en hielo durante 20 minutos, seguido de un choque térmico de 90 segundos a 42 °C (sin agitar), tras lo cual de inmediato se colocó en hielo por 2 minutos. Posteriormente, se añadió 800 µL de caldo LB y se incubó durante 2 horas a 37°C con agitación (300 rpm). Después de este tiempo se centrifugó por 3 minutos a 8 000 rpm eliminando 800 µL del

medio LB y del resto se tomó 100  $\mu\text{L}$  para dispersar las células en placas LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y tetraciclina (12.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y se incubó a 37 °C durante 18 horas.

#### **6.2.1.4.4 Confirmación de colonias positivas mediante PCR, digestión enzimática y secuenciación plasmídica**

Para confirmar que las colonias obtenidas anteriormente realmente presentasen el vector pL4440 con los insertos, las colonias recombinantes fueron sub-cultivadas en tubos falcón con 5 mL de caldo LB adicionado con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y tetraciclina (12.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y se incubó a 37 °C con agitación durante 24 horas. De los cultivos, se realizó extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina (Sambrook, *et al.*, 1989) utilizándolo como templado para la realización de PCR como se indica en los cuadros 3 y 4. Además, también se realizó una digestión del vector con *XhoI* y *HindIII* como se muestra en el cuadro 6 y, por último, se mandó secuenciar con el iniciador M13 para corroborar la secuencia correcta.

#### **6.2.2 Inducción de los dsRNA**

Para la expresión de los dsRNA, una colonia de *E. coli* HT115 (DE3) conteniendo cada una de las construcciones correspondientes (pL4440\_F2, pL4440\_Cyp302a1, pL4440\_Ache, pL4440-Cyp314a1 y pL4440\_ChSA) y un control negativo (HT115 transformado sólo con pL4440) fueron inoculadas por separado en 20 mL de caldo LB adicionado con ampicilina a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y tetraciclina a una concentración de 12.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , y éstos fueron cultivados a 37 °C durante 18 horas en agitación a 200 r.p.m.

Del cultivo de toda la noche se hizo una dilución 1:100 en caldo LB adicionado con ampicilina (100 mg/mL) y tetraciclina (12.5 mg/mL) y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una O.D.<sub>600</sub> por arriba de 0.6, donde fueron tomados 3 mL de cada cultivo y colocados en tubos Eppendorf y centrifugados a 4 °C. El pellet se guardó a -20 °C y, al resto del cultivo en matraz se le agregó IPTG a una concentración final de 0.8 mM y se incubó a 37 °C en

agitación (200 rpm) durante 4 horas más. Después del tiempo de inducción de 4 horas se procedió a recolectar las células de 3 mL de cada uno de los cultivos mediante centrifugación a 4 °C. El pellet fue guardado a -20 °C hasta el día siguiente para la extracción de ARN total.

### **6.2.3 Extracción de dsRNA**

Se realizó extracción de ARNt de cada uno de los pellets (con y sin IPTG) mediante el protocolo Tri-reagent® de SIGMA. El ARNt fue re-suspendido en 20 µL de agua libre de nucleasas estéril. A 15 µL de las muestras les fueron agregadas 1 µL de DNase I RQI de Promega, con buffer 10 X a una concentración final de 2 X y H<sub>2</sub>O para un volumen final de 20 µL. Las reacciones fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos, después de transcurrido el tiempo de digestión se les agregó 1µL de solución de parada (EDTA 25 mM) y éstas se incubaron a 65 °C durante 10 minutos. Las muestras fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1.2 % con buffer de corrida TAE 1X y las concentraciones de dsRNA fueron estimados por espectrofotometría.

### **6.2.4 Obtención de dsRNA de las construcciones mediante transcripción *in vitro***

Una manera de corroborar que los tamaños de los fragmentos de dsRNA obtenidos mediante transcripción *in vivo* correspondían al tamaño del transcrito, éstos fueron comparados con el tamaño de los dsRNA producidas *in vitro* mediante el estuche comercial AmpliScribe™ T7 High Yield. Para ello, se realizó una PCR punto final de cada una de las construcciones con los iniciadores M13 fwd y T7 con las condiciones

descritas en los cuadros 8 y 9. Posteriormente, estos productos fueron utilizados como molde para la transcripción *in vitro* (Cuadro 10) la cual se incubó a 37 °C durante 4 hrs. Los productos de la transcripción fueron visualizados en un gel de agarosa 1.2 % TAE 1X.

**Cuadro 8. Mezcla de reacción para amplificación con M13 fwd y T7 a partir de las construcciones.**

Componente	Concentración	Cantidad
H <sub>2</sub> O		14.3 µL
Buffer 5X	1 X	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	2.0 µL
DNT's 10 mM	200 µM	0.5 µL
T7 10 µM	0.4 µM	1.0 µL
M13 10 µM	0.4 µM	1.0 µL
Taq DNA polimerasa 5 u	2.5 u	0.5 µL
Templado (ADN plasmídico)		0.70 µL
Volumen total		25 µL

**Cuadro 9. Condiciones en el termociclador para la amplificación con M13 fwd y T7 a partir de las construcciones.**

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 Seg	
Alineamiento	52 °C	1.0 min	35
Extensión	72 °C	30 seg	
Extensión final	72 °C	10 min	1

**Cuadro 10. Mezcla de reacción para transcripción *in vitro* de dsRNA.**

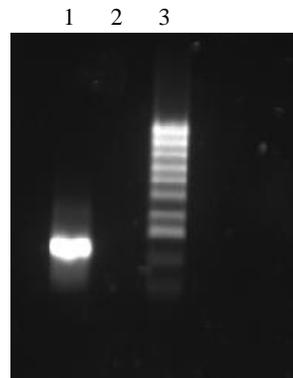
Componente	Cantidad
H <sub>2</sub> O	3.5 µL
Templado	4.0 µL
Buffer 10x	2.0 µL
ATP 100 mM	1.5 µL
CTP 100 mM	1.5 µL
GTP 100 mM	1.5 µL
UPT 100 mM	1.5 µL
DTT 100 mM	2.0 µL
Riboguard RNase inhibitor	0.5 µL
AmpliScribe T7 enzyme solution	2.0 µL
Volumen total	20 µL

## 7. RESULTADOS

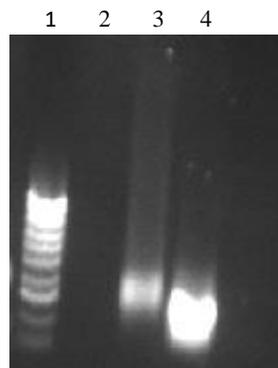
### 7.1 Amplificación mediante PCR

Para amplificación por PCR, los fragmentos Cyp302a1, Ache y F2 al igual que los iniciadores fueron obtenidos por medio del programa E-RNAi a los cuales se le agregaron dos sitios de restricción (*HindIII* para el iniciador derecho y *XhoI* para el iniciador izquierdo).

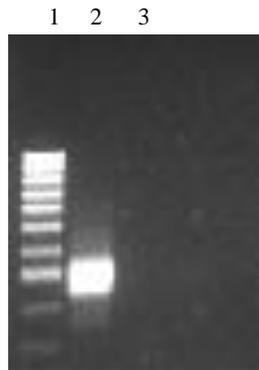
Se extrajo ARN y, posteriormente, se generó cDNA, el cual fue utilizado para la amplificación mediante PCR obteniendo así un fragmento de 222 pb para el gen *Cyp302a1* (Figura 10), 247 pb para el gen *Ache* (Figura 11) y 313 pb para el gen *F2* (Figura 12).



**Figura 10. Amplificación del fragmento Cyp302a1.** Agarosa TAE 1.2 %. 1: Fragmento Cyp302a1 alrededor de 222 pb; 2: Control (-); 3: Marcador de peso molecular 100 pb.



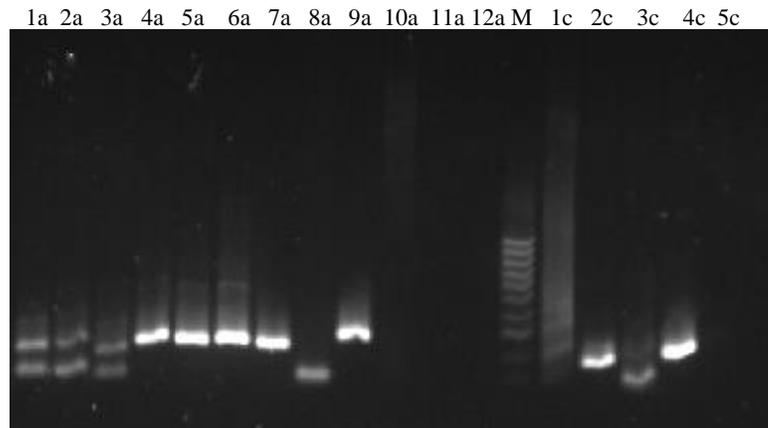
**Figura 11. Amplificación del fragmento Ache.** Agarosa TAE 1.2 %. 1: Marcador de peso molecular 100 pb; 2: Control (-); 3, 4: Fragmento Ache alrededor de 247 pb.



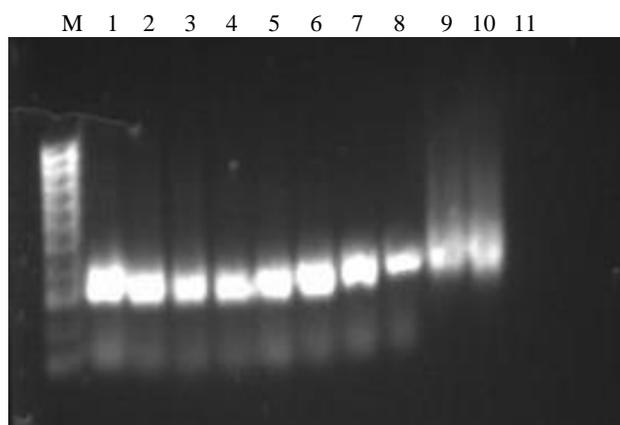
**Figura 12. Amplificación del fragmento F2.** Agarosa TAE 1.2 %. 1: Marcador de peso molecular 100 pb; 2: Fragmento *F2* de 313 pb; 3: Control (-).

## 7.2 Clonación de los fragmentos en el vector pGEM-T

Para corroborar que las secuencias amplificadas fueran las correctas para los genes *Cyp302a1*, *Ache* y *F2* y con los respectivos sitios de restricción *HindIII* y *XhoI* en los extremos, se llevó a cabo la ligación de los fragmentos en pGEM-T y la transformación en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Una vez obtenidas las células transformantes se procedió a la selección de colonias mediante  $\alpha$ -complementación, las cuales fueron sub-cultivadas en medio LB adicionado con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) para la realización de PCR de colonia y a partir de plásmido, mediante las condiciones descritas en el cuadro 3 y cuadro 4. Los productos de PCR de colonia obtenidos de las transformantes pGEM-T\_*Cyp302a1*, pGEM-T\_*Ache* son mostrados en la figura 13 y pGEM-T-*F2* se muestra en la figura 14.



**Figura 13. PCR de colonia de DH5 $\alpha$  transformantes con plásmido pGEM-T\_Ache y pGEM-T\_Cyp302a1.** 1a-11a: colonias transformadas con pGEM-T\_Ache; 12a: control (-); M: marcador de peso molecular 100 pb; 1c-4c: colonias transformadas con pGEM-T\_Cyp302a1; 5c: control (-).

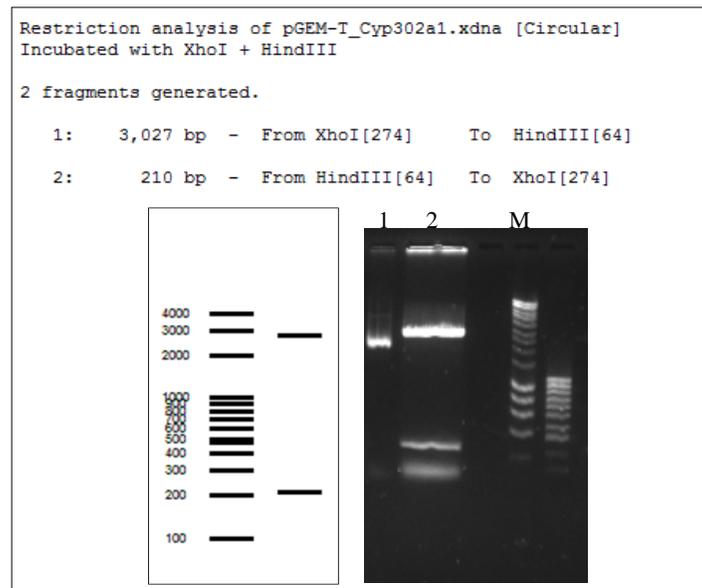


**Figura 14. PCR de colonia de DH5 $\alpha$  transformantes con plásmido pGEM-T\_F2.** M: marcador de peso molecular 100 pb; 1-10: colonias transformadas con pGEM-T\_F2; 11: control (-).

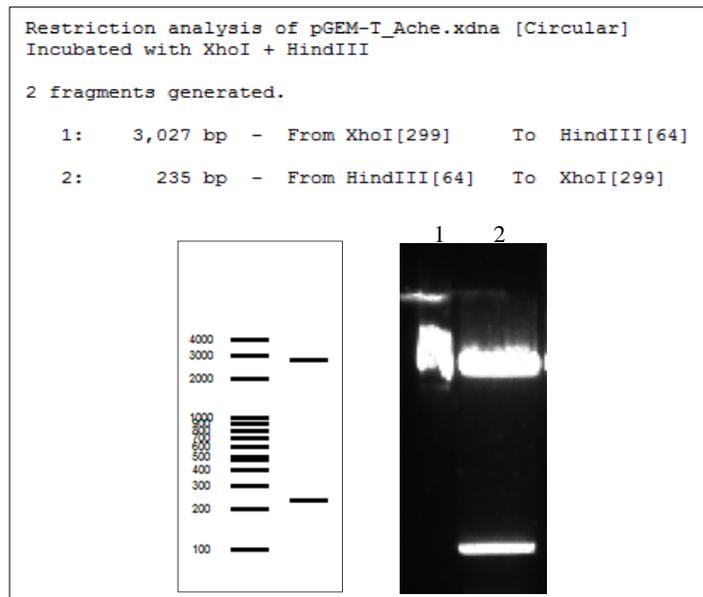
### 7.2.1 Confirmación de colonias positivas mediante digestión y secuenciación plasmídica

Para confirmar las secuencias con los sitios de restricción *HindIII* y *XhoI*, se realizó extracción plasmídica a partir de los cultivos anteriores (pGEM-T\_Cyp302a1, pGEM-

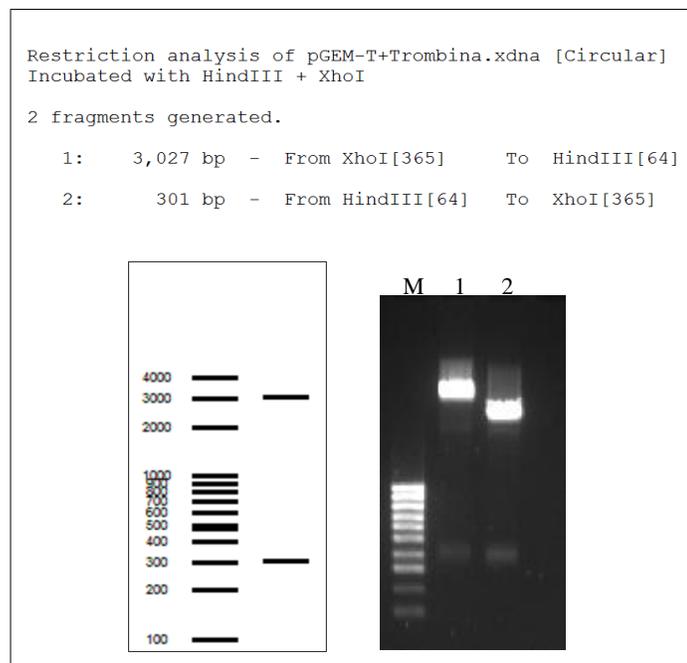
T\_Ache y pGEM-T\_F2) mediante lisis alcalina (Sambrook, *et al.*, 1989), de la cual se realizó una digestión doble con las enzimas *HindIII* y *XhoI*, y comparando los patrones obtenidos del corte virtual mediante Serial Cloner® contra los obtenidos en el análisis electroforético (Figura 15, 16 y 17). Además, con el estuche comercial “QIAprep® Spin Miniprep” se extrajo más ADN plasmídico de cada una de las construcciones y fueron enviados a secuenciar a Eurofins Operon con el iniciador universal M13. La secuencia obtenida (Sbjct) se analizó mediante un alineamiento local con el programa en línea BLAST generando de un 99-100 % de identidad con las secuencias obtenidas en el programa E-RNAi para la producción de dsRNA\_Cyp302a1, dsRNA\_Ache y dsRNA\_F2 con las respectivas secuencias de los sitios de corte *HindIII* y *XhoI* (Query) (Figura 18, 19 y 20).



**Figura 15. Digestión enzimática de ADN plasmídico pGEM-T\_Cyp302a1 con *HindIII* y *XhoI*.** En la figura se muestra el corte enzimático virtual mediante Serial Cloner y el análisis electroforético. 1: pGEM-T\_Cyp302a1 sin digerir; 2: pGEM-T\_Cyp302a1 digerido con *HindIII* y *XhoI*; M: 100 pb y 1 Kb.



**Figura 16. Digestión enzimática de ADN plasmídico pGEM-T\_Ache con *HindIII* y *XhoI*.** En la figura se muestra el corte enzimático virtual mediante Serial Cloner y el análisis electroforético. 1: pGEM-T\_Ache sin digerir; 2: pGEM-T\_Ache digerido con *HindIII* y *XhoI*.



**Figura 17. Digestión enzimática de ADN plasmídico pGEM-T\_F2 con *HindIII* y *XhoI*.** Se muestra el análisis de la digestión virtual mediante serial cloner y el análisis electroforético del ADN plasmídico pGEM-T\_F2 (M: marcador peso molecular 100 pb; 1-2 ADN plasmídico digerido con *HindIII* y *XhoI*).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
366 bits(198)	8e-106	214/222(96%)	0/222(0%)	Plus/Minus
Query 1	GACAAGCTTCCTGCATGAGTCTGGACAAGACAAGTACGAAAAGTATGGGCCGATCGTACG	60		
Sbjct 296	GACAAGCTTCCTGCATGAGTCTGGACAAGACAAGTACGAAAAGTATGGGCCGATCGTACG	237		
Query 61	TGAAACCATGGTCCCCGGTCAGGACATCGTTTGGCTGTACGATCCAAACGACATCGCCGC	120		
Sbjct 236	TGAAACCATGGTCCCCGGTCAGGACATCGTTTGGCTGTACGATCCAAACGACATCGCCGC	177		
Query 121	CGTATTGAATGACAAAACGCCCGGAATCTATCCTTCGCGTCGAAGTCATACAGCTCTCGC	180		
Sbjct 176	TGTATTGAATGACAGAACGCCCGGAATCTATCCATCGCGTCGAAGTCATACAGCACTCGC	117		
Query 181	CAAGTATCGTAGAGACCGTCCCAATGTGTATCGCTCGAGCCC	222		
Sbjct 116	CAAGTACCGCAGAGACCGTCCCAATGTGTATCGCTCGAGCCC	75		

**Figura 18. Alineamiento local de la secuencia de *Cyp302a1* mediante BLAST:** Se observa un 96 % de identidad del fragmento *Cyp302a1* generado en E-RNAi (Query) respecto a la secuencia clonada en pGEM-T (Sbjct).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
446 bits(241)	1e-129	245/247(99%)	0/247(0%)	Plus/Minus
Query 1	GACAAGCTTGTTGCTGATCACCACGGATAAAGGTAAGGTACGAGGACTCACACTCGAAGC	60		
Sbjct 322	GACAAGCTTGTTGCTGATCACCACGGATAAAGGTAAGGTACGAGGACTCACACTCGAAGC	263		
Query 61	TCCAAGTGGAAAGAAAGTAGACGCATGGCTTGGCATCCCATACGCACAGCCTCCTCTGGG	120		
Sbjct 262	TCCAAGTGGATAGAAAGTAGACGCATGGCTTGGCATCCCATACGCACAGCCTCCTCTAGG	203		
Query 121	GCCATTGAGATTCGGCATCCCCGACCAGTCGAAAAATGGACGGGAGTGCTGAACGCCAC	180		
Sbjct 202	GCCATTGAGATTCGGCATCCCCGACCAGTCGAAAAATGGACGGGAGTGCTGAACGCCAC	143		
Query 181	AACGCCACCGAACTCTTGCCTCCAGATTGTGGACACAGTATTTGGTGACTTTCGGGTCT	240		
Sbjct 142	AACGCCACCGAACTCTTGCCTCCAGATTGTGGACACAGTATTTGGTGACTTTCGGGTCT	83		
Query 241	CGAGCCC	247		
Sbjct 82	CGAGCCC	76		

**Figura 19. Alineamiento local de la secuencia de *Ache* mediante BLAST:** Se observa un 99 % de identidad del fragmento *Ache* generado en E-RNAi (Query) respecto a la secuencia clonada en pGEM-T (Sbjct).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
569 bits(308)	8e-167	308/308(100%)	0/308(0%)	Plus/Plus
Query 3	CAAGCTTACTGTAGCGATGACTCCACGCTCCGAAGGCTCCAGTGTGAATCTGTCACCTCC			62
Sbjct 614	CAAGCTTACTGTAGCGATGACTCCACGCTCCGAAGGCTCCAGTGTGAATCTGTCACCTCC			673
Query 63	ATTGGAGCAGTGTGTCCCTGATCGGGGGCAGCAGTACCAGGGGGCGCTGGCGGTGACCAC			122
Sbjct 674	ATTGGAGCAGTGTGTCCCTGATCGGGGGCAGCAGTACCAGGGGGCGCTGGCGGTGACCAC			733
Query 123	ACATGGGCTCCCCGCTGGCCTGGGCCAGCGCACAGGCCAAGGCCCTGAGCAAGCACCA			182
Sbjct 734	ACATGGGCTCCCCGCTGGCCTGGGCCAGCGCACAGGCCAAGGCCCTGAGCAAGCACCA			793
Query 183	GGACTTCAACTCAGCTGTGCAGCTGGTGGAGAACTTCTGCCGCAACCCAGACGGGGATGA			242
Sbjct 794	GGACTTCAACTCAGCTGTGCAGCTGGTGGAGAACTTCTGCCGCAACCCAGACGGGGATGA			853
Query 243	GGAGGGCGTGTGGTGCTATGTGGCCGGGAAGCCTGGCGACTTTGGGTACTGCGACCTCAA			302
Sbjct 854	GGAGGGCGTGTGGTGCTATGTGGCCGGGAAGCCTGGCGACTTTGGGTACTGCGACCTCAA			913
Query 303	CTCTCGAG 310			
Sbjct 914	CTCTCGAG 921			

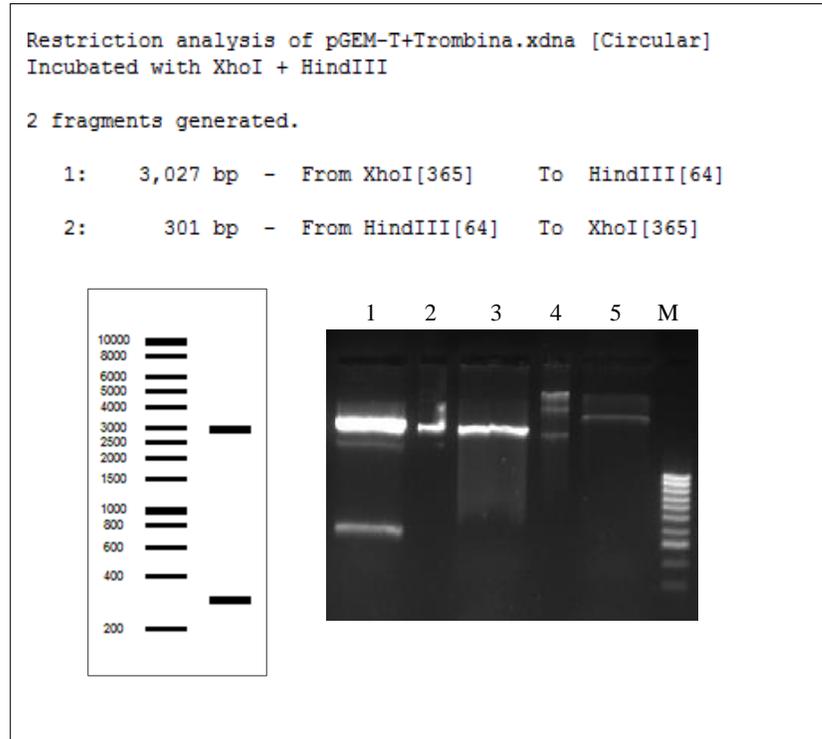
**Figura 20. Alineamiento local de la secuencia de F2 mediante BLAST:** Se observa un 100 % de identidad del fragmento F2 generado en E-RNAi (Query) respecto a la secuencia clonada en pGEM-T (Sbjct).

### 7.3 Sub-clonación de los fragmentos en pL4440

Para la obtención de dsRNA específicos para los genes Cyp302a1, Ache y F2 se realizó sub-clonación de los insertos en el vector de expresión pL4440. Se generaron extremos cohesivos liberando los fragmentos de las construcciones pGEM-T mediante digestión enzimática con *HindIII* y *XhoI*. Asimismo, el vector de expresión pL4440 fue digerido con las enzimas antes mencionadas (Figuras 21, 22).

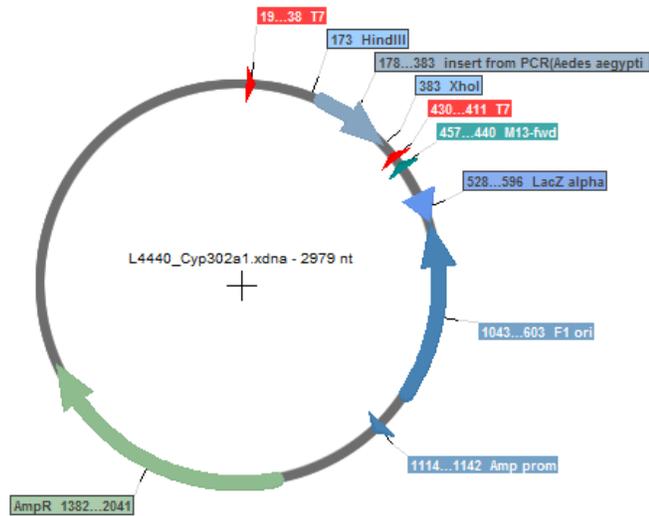


**Figura 21.** Digestión enzimática con *HindIII* y *XhoI* de pGEM-T\_Cyp302a1, pGEM-T\_Ache y pL4440. 1: pGEM-T\_Cyp302a1 sin digerir; 2: pGEM-T\_Cyp302a1 digerido con *HindIII* y *XhoI*; 3: pGEM-T\_Ache sin digerir; 4: pGEM-T\_Ache digerido con *HindIII* y *XhoI*; 5: pL4440 sin digerir; 6: pL4440 digerido con *HindIII* y *XhoI*; M: marcador de peso molecular 100 pb.

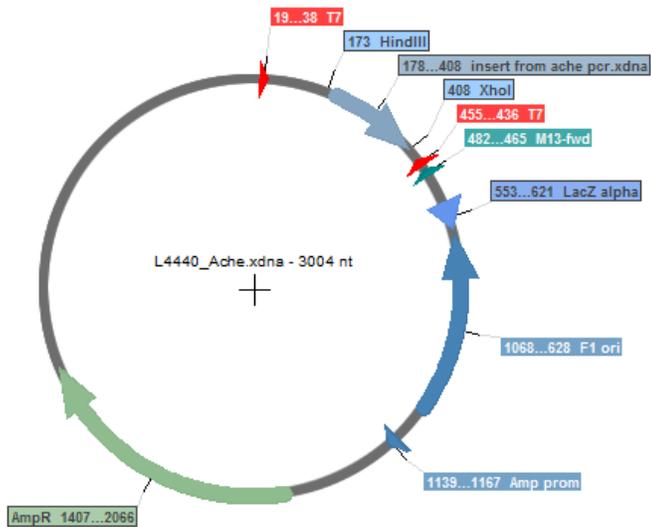


**Figura 22. Digestión enzimática con *HindIII* y *XhoI* de pGEM-T\_F2 y pL4440.** 1: pGEM-T\_F2 digerido con *HindIII* y *XhoI*; 2: pGEM-T\_F2 sin digerir; 3: pL4440 digerido con *HindIII* y *XhoI*; 4: pL4440 sin digerir; 5: pL4440 digerido con *HindIII* y *XhoI*; M: marcador de peso molecular 100 pb.

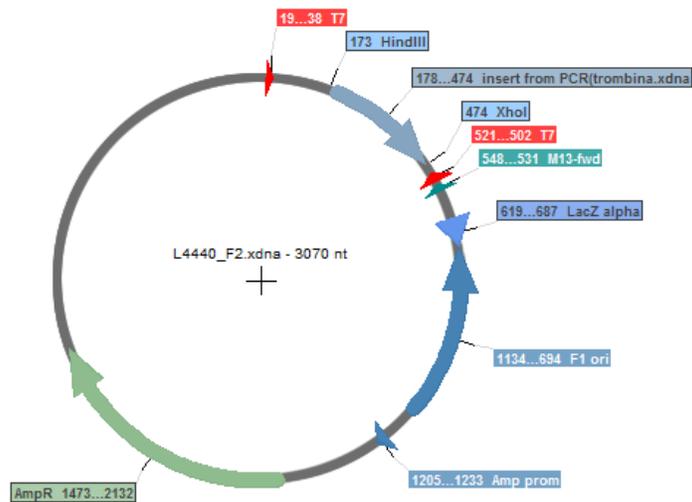
Una vez realizada la digestión se procedió al corte y purificación de la banda liberada, se realizó la ligación de cada uno de los fragmentos en el vector de expresión pL4440 (pL4440\_Cyp302a1; pL4440\_Ache; pL4440\_F2) (Figuras 23, 24 y 25) y transformación de células HT115 (DE3) con estas construcciones.



**Figura 23. Mapa de construcción de pL4440\_Cyp302a1.** Se muestra el inserto Cyp302a1 ligado al vector de expresión pL4440 flanqueado por los dos promotores T7.



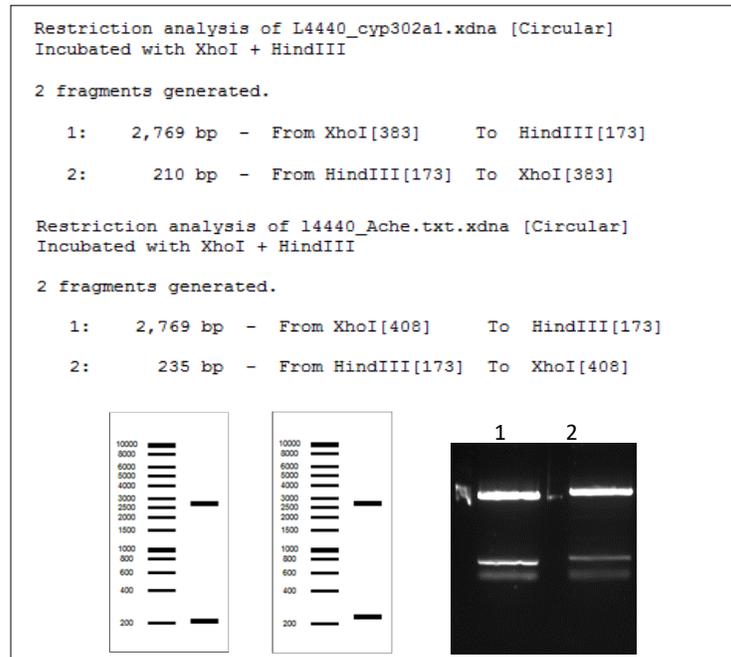
**Figura 24. Mapa de construcción de pL4440\_Ache.** Se muestra el inserto Ache ligado al vector de expresión pL4440 flanqueado por los dos promotores T7.



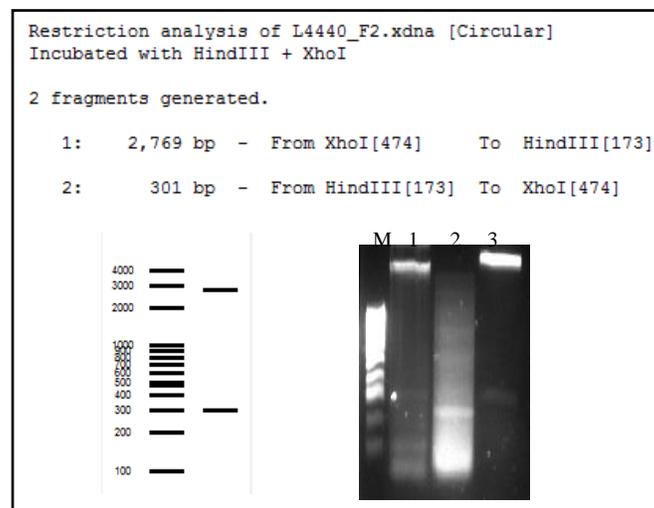
**Figura 25. Mapa de construcción de pL4440\_F2.** Se muestra el inserto F2 ligado al vector de expresión pL4440 flanqueado por los dos promotores T7.

### 7.3.1 Confirmación de colonias positivas mediante digestión y secuenciación

A las colonias obtenidas en la transformación se les realizó extracción de ADN plasmídico para posteriormente realizar una digestión con *HindIII* y *XhoI* con la finalidad de confirmar la presencia de los fragmentos de interés Cyp302a1, Ache y F2 (Figuras 26 y 27). Además, estos mismos plásmidos fueron empleados para secuenciar el inserto y de esta manera corroborar la correcta sub-clonación (Figuras 28, 29 y 30).



**Figura 26.** Digestión enzimática de ADN plasmídico pL4440\_Cyp302a1 y pL4440\_Ache con *HindIII* y *XhoI*. Se muestra el análisis de la digestión virtual mediante serial cloner y el análisis electroforético del ADN plasmídico (1: pL4440\_Cyp320a1; 2: pL4440\_Ache digerido con *HindIII* y *XhoI*).



**Figura 27.** Digestión enzimática de ADN plasmídico pL4440\_F2 con *HindIII* y *XhoI*. Se muestra el análisis de la digestión virtual mediante serial cloner y el análisis electroforético del ADN plasmídico (M: marcador pesos molecular 100 pb; 1-3 ADN plasmídico digerido con *HindIII* y *XhoI*).

Aedes aegypti AEEL015655-RA (CYP302A1), partial mRNA  
 Sequence ID: [XM\\_001647515.2](#) Length: 1548 Number of Matches: 1

Range 1: 183 to 387 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
335 bits(181)	3e-88	197/205(96%)	0/205(0%)	Plus/Minus
Query 1	GCGATACACATTGGGACGGTCTCTGCGGTA	ACTTGGCGAGTGTGTATGACTTCGACGCGA	60	
Sbjct 387	GCGATACACATTGGGACGGTCTCTACGATACTTGGCGAGAGCTGTATGACTTCGACGCGA	328		
Query 61	TGGATAGATTCCGGGCGTTCTGTCATTCAATACAGCGGCGATGTCGTTTGGATCGTACAG	120		
Sbjct 327	AGGATAGATTCCGGGCGTTTTGTCATTCAATACGGCGGCGATGTCGTTTGGATCGTACAG	268		
Query 121	CCAAACGATGTCCTGACCGGGGACCATGGTTTCACGTACGATCGGGCCATACTCTTCGTA	180		
Sbjct 267	CCAAACGATGTCCTGACCGGGGACCATGGTTTCACGTACGATCGGGCCATACTTTTCGTA	208		
Query 181	CTTGTCTTGTCCAGACTCATGCAGG	205		
Sbjct 207	CTTGTCTTGTCCAGACTCATGCAGG	183		

**Figura 28. Alineamiento local de la secuencia de Cyp302a1 mediante BLAST:** Se observa un 96 % de similitud del fragmento Cyp302a1 generado en la sub-clonación con la reportada en GenBank (XM\_001647515.2) utilizada para la amplificación de Cyp302a1.

Aedes aegypti AEEL000511-RA partial mRNA  
 Sequence ID: [XM\\_001656927.2](#) Length: 1596 Number of Matches: 1

Range 1: 6 to 234 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
412 bits(223)	1e-111	227/229(99%)	0/229(0%)	Plus/Minus
Query 2	ACCCGGAAAAGTCACCAAATACTGTGTCCACAATCTGGACGCAAGAGTTCGGTGGCGTTGT	61		
Sbjct 234	ACCCGGAAAAGTCACCAAATACTGTGTCCACAATCTGGACGCAAGAGTTCGGTGGCGTTGT	175		
Query 62	GGCGTTCAGCACTCCCGTCCATTTTTCGACTGGTCGGGGATGCCGGAATCTCAATGGCCC	121		
Sbjct 174	GGCGTTCAGCACTCCCGTCCATTTTTCGACTGGTCGGGGATGCCGGAATCTCAATGGCCC	115		
Query 122	TAGAGGAGGCTGTGCGTATGGGATGCCAAGCCATGCGTCTACTTTCTATCCACTTGGAGC	181		
Sbjct 114	CAGAGGAGGCTGTGCGTATGGGATGCCAAGCCATGCGTCTACTTTCTTCCACTTGGAGC	55		
Query 182	TTCGAGTGTGAGTCTCGTACCTTACCTTTATCCGTGGTGATCAGCAAC	230		
Sbjct 54	TTCGAGTGTGAGTCTCGTACCTTACCTTTATCCGTGGTGATCAGCAAC	6		

**Figura 29. Alineamiento local de la secuencia de Ache mediante BLAST:** Se observa un 99 % de identidad del fragmento Ache generado en la sub-clonación con la reportada en GenBank (XM\_001656927.2) utilizada para la amplificación de Ache.

Homo sapiens coagulation factor II, thrombin (F2), transcript variant 1, mRNA  
 Sequence ID: [NM\\_000506.4](#) Length: 2057 Number of Matches: 1

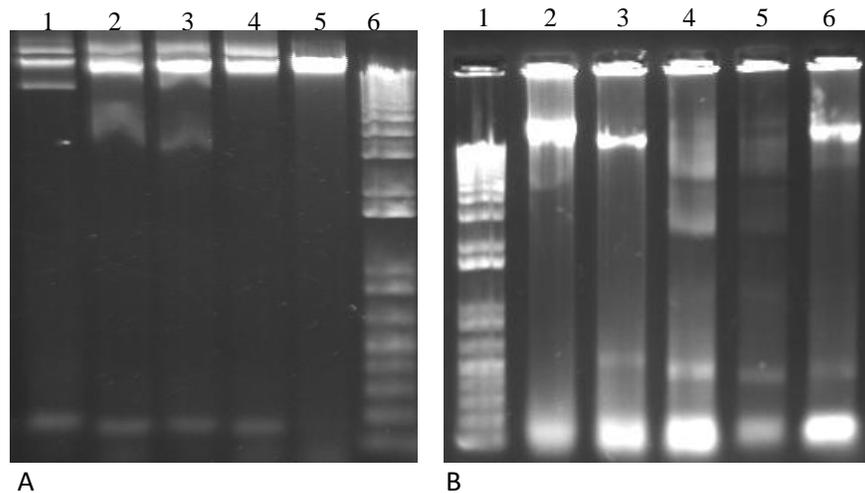
Range 1: 644 to 938 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
540 bits(292)	8e-150	294/295(99%)	0/295(0%)	Plus/Minus
Query 9	AGTTGAGGTCGCAGTACCCAAAGTCGCCAGGCTTCCC	GGCCACATAGCACACACGCCCT	68	
Sbjct 938	AGTTGAGGTCGCAGTACCCAAAGTCGCCAGGCTTCCC	GGCCACATAGCACACACGCCCT	879	
Query 69	CCTCATCCCCGCTCTGGGTTGCGGCAGAAAGTTCT	CACAGCTGCACAGCTGAGTTGAAGT	128	
Sbjct 878	CCTCATCCCCGCTCTGGGTTGCGGCAGAAAGTTCT	CACAGCTGCACAGCTGAGTTGAAGT	819	
Query 129	CCTGGTGCTTGCTCAGGGCCTTGGCCTGTGCGCT	GGCCAGGCCAGGCAGGGGAGCCCAT	188	
Sbjct 818	CCTGGTGCTTGCTCAGGGCCTTGGCCTGTGCGCT	GGCCAGGCCAGGCAGGGGAGCCCAT	759	
Query 189	GTGTGGTCACCGCCAGGCGCCCTGGTACTGCT	GCCCCGATCAGGGACACACTGCTCCA	248	
Sbjct 758	GTGTGGTCACCGCCAGGCGCCCTGGTACTGCT	GCCCCGATCAGGGACACACTGCTCCA	699	
Query 249	ATGGGGGTGACAGATTCACTGGAGCCTTCGGAG	CGTGGAGTCATCGCTACAGT	303	
Sbjct 698	ATGGAGGTGACAGATTCACTGGAGCCTTCGGAG	CGTGGAGTCATCGCTACAGT	644	

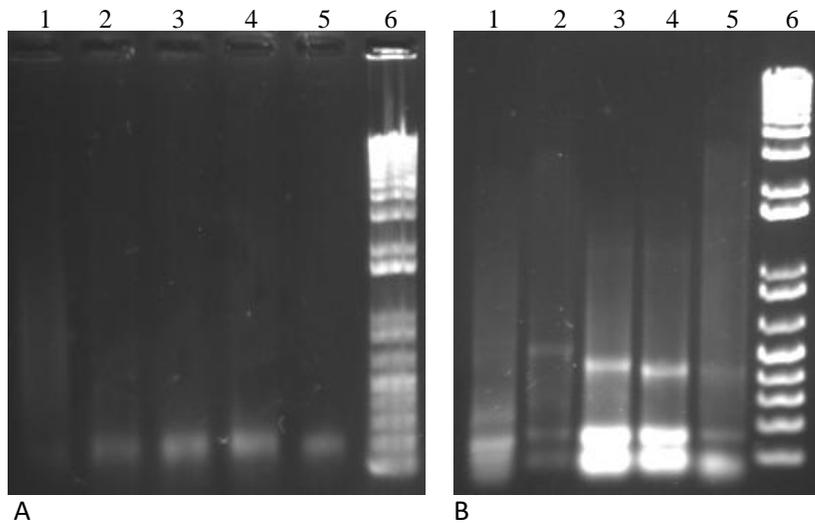
**Figura 30. Alineamiento local de la secuencia de F2 mediante BLAST:** Se observa un 99 % de identidad del fragmento F2 generado en la sub-clonación con la reportada en GenBank (NM\_000506.4) utilizada para la amplificación de F2.

## 7.4 Inducción y extracción de dsRNA

Para la obtención de dsRNA a partir del sistema *in vivo* se llevó a cabo la inducción de un cultivo bacteriano una vez que este alcanza una OD<sub>600</sub> arriba de 0.6 mediante la adición de IPTG a una concentración de 0.8 mM. El ARN total fue extraído a partir de células sin inducir e inducidas con IPTG durante 4 hrs a 37 °C empleado el protocolo de Tri Reagent® de Sigma Aldrich, el cual posteriormente fue incubado con DNAsa I RQI. Las extracciones fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1.2 % con TAE 1X. Los resultados mostraron la inducción de dsRNA en todas las construcciones excepto para el vector L4440\_ChxA. Los tamaños obtenidos de los fragmentos de dsRNA fueron mayores al tamaño del fragmento clonado, sumando alrededor de 198 pb adicionales (Figuras 31 y 32). La concentración de dsRNA producidos por 3 mL de cultivo fueron estimados por espectrofotometría (Figura 33).



**Figura 31. Extracción ARN total sin tratamiento con DNase I.** A) Sin inducir. 1: L4440; 2: L4440\_F2 (511 pb); 3: L4440\_Ache (445 pb); 4: L4440\_Cyp302a1 (420 pb); 5: L4440\_Cyp314a1 (403 pb); 6: Marcador de peso molecular 1 kb. B) Con inducción. 1: Marcador de peso molecular 1 kb; 2: L4440; 3: L4440\_F2 (511 pb); 4: L4440\_Ache (445 pb); 5: L4440\_Cyp302a1 (420 pb); 6: L4440\_Cyp314a1 (403 pb).



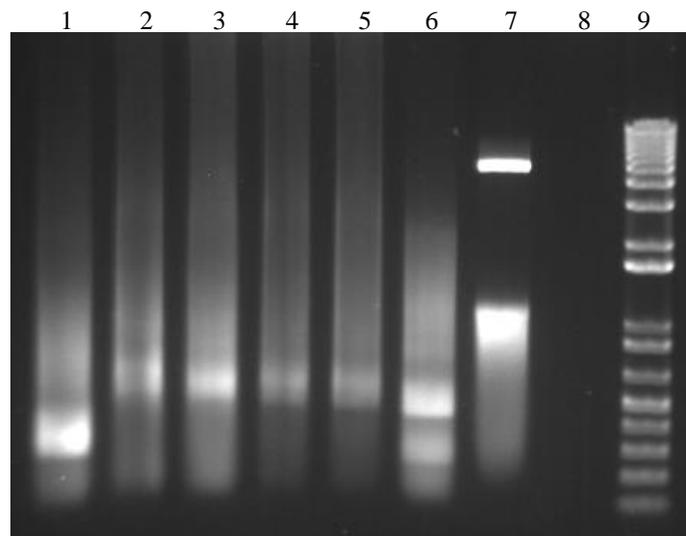
**Figura 32. Extracción ARN total tratado con DNasa I.** A) Sin inducir. 1: L4440; 2: L4440\_F2 (511 pb); 3: L4440\_Ache (445 pb); 4: L4440\_Cyp302a1 (420 pb); 5: L4440\_Cyp314a1 (403 pb); 6: Marcador de peso molecular 1 kb. B) Con inducción. 1: L4440; 2: L4440\_F2 (511 pb); 3: L4440\_Ache (445 pb); 4: L4440\_Cyp302a1 (420 pb); 5: L4440\_Cyp314a1 (403 pb); 6: Marcador de peso molecular 1 kb.

**Cuadro 11. Cuantificación de dsRNA obtenido mediante transcripción *in vivo*.**

dsRNA	Concentración (ng/ $\mu$ L)
L4440	985.3
F2	3250.1
Ache	1855.3
Cyp302a1	1342.7
Cyp314a1	1840.9

### 7.5 Obtención de dsRNA de las construcciones mediante transcripción *in vitro*

El ADN plasmídico fue utilizado para amplificar el fragmento correspondiente al inserto más los promotores T7, mediante PCR punto final y, con los iniciadores M13 Fwd y T7. Se utilizaron los productos para la transcripción *in vitro* mediante el estuche comercial AmpliScribe™ T7 High Yield Transcription. Los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.2 % TAE 1X (Figura 33).



**Figura 33. Transcripción *in vitro* a partir de los productos de PCR de M13 Fwd y T7.** Carril 1: L4440; Carril 2: L4440\_F2; Carril 3: L4440\_Ache; Carril 4: L4440\_Cyp302a1; Carril 5: L4440\_Cyp314a1; Carril 6: L4440-ChsA; Carril 7: Control (+); Carril 8: Control (-) H<sub>2</sub>O; Carril 9: Marcador de peso molecular 1 kb.

**Cuadro 12. Cuantificación de dsRNA obtenido mediante transcripción *in vitro*.**

<b>dsRNA</b>	<b>Concentración (ng/<math>\mu</math>L)</b>
L4440	17,565.3
F2	18,222.7
Ache	15,001.2
Cyp302a1	18,176.8
Cyp314a1	17,702.4
ChsA	17,034.1

## 8. DISCUSIÓN

Actualmente el dengue es una de las arbovirosis más importantes debido al gran número de casos registrados en México, así como en el estado de Tamaulipas, radicando su importancia en los cuadros clínicos que éste presenta. Al no existir vacuna o tratamiento actualmente disponible contra el virus, se han centrado los esfuerzos en el control del principal vector transmisor “*Ae. aegypti*”.

Estudios recientes han utilizado la técnica de RNAi para controlar poblaciones de larvas y adultos de *Ae. aegypti* o bien para aumentar la susceptibilidad a insecticidas (Pridgeon 2008; Coy *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013; Bona *et al.* 2016), sin embargo, estos estudios han utilizado siRNA, sintetizados químicamente, o bien dsRNA obtenidos a través de una transcripción *in vitro* mediante la T7 RNA polimerasa, siendo solo un estudio el que reporta un sistema *in vivo* para la producción de dsRNA (Kumar *et al.*, 2016). Este sistema de producción *in vivo* ha sido empleado en el control de otros insectos, coincidiendo los autores en que es una estrategia conveniente debido a que se obtiene mayor cantidad de dsRNA, es una técnica económica, relativamente sencilla y rápida (Kamath *et al.*, 2000; Ongvarrasopone *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2011; Timmons *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015; Schumpert *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016). En este trabajo se llevó a cabo la producción de dsRNA específicos contra genes necesarios para el desarrollo y sobrevivencia de *Ae. aegypti* a través de un sistema de expresión bacteriano, el cual será posteriormente evaluado como posible empleo en el control del vector del dengue.

### 8.1 Construcción de vectores de expresión de dsRNA

Los genes utilizados para la construcción de los sistemas de expresión fueron elegidos en base a estudios previos donde utilizan genes del sistema citocromo p450 y *Ache* como blancos para el bloqueo génico en plagas de insectos (Kumar *et al.*, 2009; Killiny *et al.*,

2014; Jin *et al.*, 2015). Algunos insecticidas han sido desarrollados para dirigir su acción contra productos de estos genes, además de que estos genes son expresados durante el desarrollo larvario por lo que su bloqueo producirá su muerte antes de que pueda infectar al humano en fase adulta. También se realizó una construcción con un fragmento del gen de trombina humana (*F2*), esto con el objetivo de obtener dsRNA de un gen no presente en *Ae. aegypti* para utilizarlo como control negativo en bioensayos futuros.

Los iniciadores utilizados para la amplificación de los fragmentos de los genes *Ache*, *Cyp302a1* y *F2* fueron diseñados mediante el programa E-RNAi a partir de las secuencias reportadas por Nene *et al.*, 2015 para el gen *Cyp302a1*, Mori *et al.*, 2007 para el gen *Ache* e Ismail *et al.*, 2017 para el gen *F2*. Este programa evalúa la secuencia de entrada para poder determinar si el dsRNA diseñado no afecta a algún otro gen y realiza un corte *in silico* de la secuencia en fragmentos de 18 a 25 nt (siRNA) evaluando así la eficiencia y especificidad de los fragmentos (Arziman Z. *et al.*, 2005). El tamaño de los fragmentos obtenidos en la PCR fue de 222 pb del gen *Cyp302a1*, 247 pb del gen *Ache* y 313 pb del gen *F2*, los mismos fueron clonados en pGEM-T.

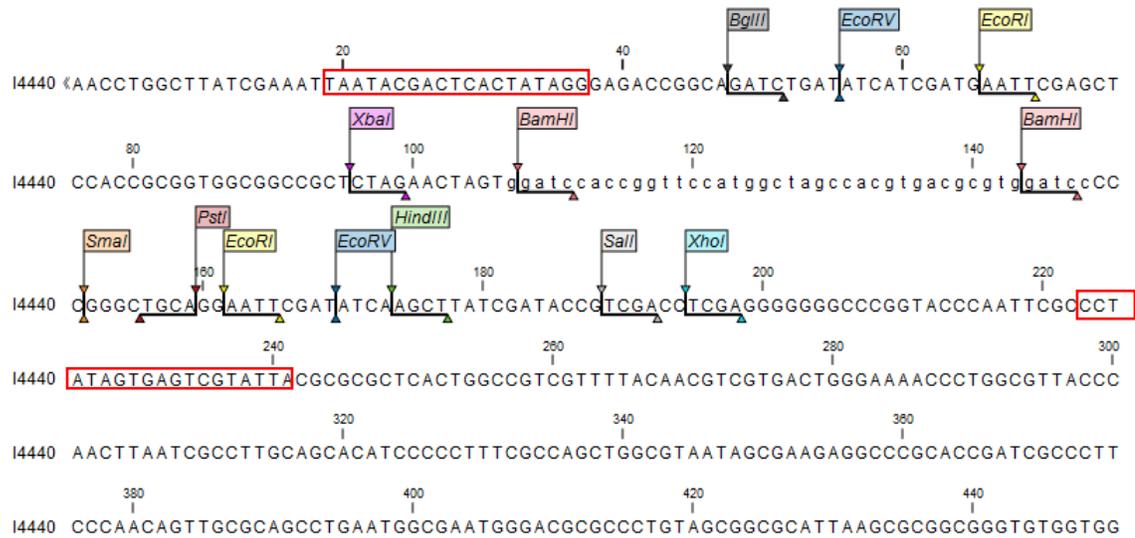
Se utilizó el plásmido de expresión L4440 ya que es específico para la producción de dsRNA debido a que contiene dos secuencias promotoras T7 para expresión bidireccional flanqueando el fragmento de interés. Células HT115 (DE3) fueron utilizadas para la transformación de estas construcciones, ya que es una cepa especializada en la producción de dsRNA por la mutación en el gen que codifica para RNasa III (*rnc14*), lo cual permite la acumulación de dsRNA sin ser degradado enzimáticamente. Aunado a esto, expresa la T7 RNA polimerasa bajo el promotor *LacUV5* inducible mediante lactosa o un análogo como el IPTG, la cual es necesaria para la transcripción a partir de plásmidos que posean el promotor T7.

La transformación mediante choque térmico permitió la internalización de cada una de las construcciones y colonias recombinantes fueron obtenidas. La secuenciación del ADN

plasmídico confirmó la correcta sub-clonación de los fragmentos de los genes *Cyp302a1*, *Ache* y *F2* obteniendo una identidad de 96, 99 y 99 % respectivamente respecto a las secuencias de estos genes reportadas en NCBI.

## 8.2 Inducción y extracción de dsRNA

Para la obtención de los fragmentos dsRNA a partir del sistema bacteriano, como se mencionó anteriormente, el vector posee la característica de tener dos promotores T7 que en posición invertida conduciendo a la producción de dsRNA sin necesidad de pasos adicionales. De acuerdo con trabajos anteriores (Ongvarrasopone C., *et al.*, 2007), se realizó la inducción en el momento en que el cultivo llegó a O. D.<sub>600</sub> de 0.4 a una concentración de 0.4 mM de IPTG y 4 hrs de inducción, sin embargo, los resultados no fueron favorables ya que no se observó las bandas correspondientes a los dsRNA, por lo que se probaron otras concentraciones de IPTG (0.01, 1 y 2 mM) (Kim E., *et al.*, 2015, Lima P. *et al.*, 2014, Zhu F. *et al.*, 2010) y aumentando el tiempo de inducción 1 hr adicional. Los resultados mostraron una banda en la construcción L4440\_ *ChsA* en todas las concentraciones de IPTG, sin embargo, ésta estaba presente incluso en las muestras de ARN extraído a partir del cultivo sin inducir, por lo que se llegó a la conclusión de que no era dsRNA. Posteriormente, se probó la inducción cuando el cultivo alcanzó la O.D<sub>600</sub> por arriba de 0.6 con una concentración final de 0.8 mM de IPTG y tiempo de inducción de 4 hrs a 37 °C (Zhang Y. *et al.*, 2014). Los resultados de la extracción de ARNt muestran bandas en la inducción de las células HT115 transformadas con las construcciones L4440\_F2, L4440\_Ache, L4440\_Cyp302a1, L4440\_Cyp314a1 y en las células HT115 transformadas únicamente con el vector L4440 sin ningún inserto. Esto se explica debido al sitio de clonación múltiple (223 pb) que se encuentra en medio de los promotores T7 y, por lo tanto, también es transcrito (Figura 34). En las células transformadas con la construcción L4440\_ *ChsA* no se visualizó ninguna banda.



**Figura 34. Parte de la secuencia del vector de expresión L4440.** Se muestra en los recuadros rojos la posición de los promotores T7 y entre estos el sitio de clonación múltiple (223 pb).

El tamaño de las bandas observadas en las construcciones fue alrededor de 198 pb mayor al tamaño esperado, esto ocasionado por la posición del inserto después de los promotores T7, ya que los insertos fueron clonados en los sitios de restricción *XhoI* y *HindIII* quedando una parte de la secuencia del vector (155 pb) entre el promotor T7 y el sitio *HindIII* y otra parte de la secuencia del vector (43 pb) entre el promotor T7 y el sitio *XhoI*, ésto también se puede observar en la figura 34. Por lo tanto, los productos obtenidos para cada construcción son: dsRNA\_L4440: 223 pb, dsRNA\_F2: 511 pb, dsRNA\_Ache: 445 pb, dsRNA\_Cyp302a1: 420 pb y dsRNA\_Cyp314a1: 403 pb.

La transcripción *in vitro* se realizó para tener un control positivo y reafirmar que el tamaño de las bandas obtenidas en la transcripción *in vivo* correspondían a los dsRNA de las construcciones, además, serviría para comparar la concentración de dsRNA obtenido en cada metodología (tanto *in vivo* como *in vitro*). La visualización en el gel de agarosa mostró el mismo tamaño de las bandas que en la transcripción *in vivo*, además se

logró obtener el dsRNA-*ChsA* no obtenida anteriormente en el sistema bacteriano. Dado los resultados observados en el control negativo (HTT15 L4440 sin inserto) y al tratamiento con DNasa I se puede concluir que los fragmentos obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro* corresponden a los dsRNA\_F2, dsRNA\_Ache, dsRNA\_Cyp320a1 y dsRNA-Cy314a1.

Al cuantificar las concentraciones de dsRNA obtenido mediante el sistema bacteriano se observan cantidades inferiores a las obtenidas *in vitro* pero mayores a las obtenidas en el trabajo de Kim E., *et al.*, 2015, para el gen Integrina  $\beta$ 1 (*SeINT*) de *Spodoptera exigua*, produciendo un poco más de 500 ng/ $\mu$ L de dsRNA y a las concentraciones obtenidas por Romo C., 2014, para el gen *wsv151* del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) del camarón, obteniendo un promedio de 958 ng/ $\mu$ L de dsRNA. Según lo reportado por Kim E., *et al.*, 2015, una concentración de 350 ng/ $\mu$ L fue suficiente para producir actividad máxima de insecticida mediante la alimentación con *E. coli* transformada e inducida, por lo que las concentraciones obtenidas en este trabajo podrían ser suficientes para realizar los bioensayos futuros. Sin embargo, comparando éstas con las de algunos otros estudios como los de los de Tenllado F., *et al.*, 2003, Ongvarrasopone C., *et al.*, 2007, Zhang Y., *et al.*, 2012 y Posisri P., *et al.*, 2013, en los que obtienen altas concentraciones desde 4  $\mu$ g/mL hasta 30  $\mu$ g/mL, si lo que se pretende es la producción a una mayor escala, nuestros valores resultan bajos, por ello se debe trabajar en la optimización de la inducción para lograr la obtención de una mayor cantidad de dsRNA que pueda ser utilizado en estudios de laboratorio y campo y que resulte más económico.

## 9. CONCLUSIONES

1. Se logró la construcción de los sistemas de producción *in vivo* mediante la amplificación y clonación de los fragmentos de los genes *Cyp302a1*, *Ache* y *F2* en el vector de expresión pL4440, denominándose pL4440\_Cyp302a1, pL4440\_Ache y pL4440\_F2.
2. Se consiguió la producción *in vivo* de dsRNA de las construcciones pL4440\_Cyp302a1, pL4440\_Ache, pL4440\_F2 y pL4440\_Cyp314a1, obteniendo en promedio 1.8 µg de dsRNA por 3 ml de cultivo celular con O.D<sub>600</sub> de 1.
3. Se obtuvieron dsRNA sintetizados de manera *in vitro* a través de la enzima T7 de AmpliScribe utilizando las construcciones, obteniendo en promedio 20 µg/µL a partir de 1 µg de producto de PCR.
4. A pesar de obtener mayor concentración de dsRNA a través de la transcripción *in vitro*, considerando los costos en reactivos y los procesos para la obtención del templado a transcribir y la transcripción por RNA polimerasa T7, la producción de dsRNA mediante un sistema de transcripción bacteriano sigue siendo una alternativa económica, fácil y eficiente, por ello es importante implementar una estrategia para la mejora de su producción a partir de las construcciones realizadas en este trabajo.

## 10. PERSPECTIVAS

1. Optimizar las condiciones de inducción y extracción de dsRNA de las células HT115 (DE3) para la obtención de una mayor cantidad.
2. Llevar a cabo la evaluación biológica con cada dsRNA producidos en este trabajo (dsRNA-L4440, dsRNA-F2, dsRNA-Ache, dsRNA-Cyp302a1 y dsRNA-Cyp314a1) en larvas de *Ae. aegypti* neonatas, así como en otros organismos cercanos para evaluar la especificidad de estos dsRNAs.
3. Realizar la evaluación biológica de los dsRNA producidos *in vitro* en larvas de *Ae. aegypti* neonatas, comparando su efecto con los dsRNA producidos *in vivo*.
4. Estudiar el efecto de estos dsRNA en un formulado que evite su degradación en el agua, y que contenga un atrayente para una mayor ingestión por las larvas.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Anthony N., Rocheleau T., Mocelin G., Lee H. J., and Ffrench-Constant R. 1995. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *FEBS Letters*. 368: 461-465.

Zeynep Arziman, Thomas Horn, and Michael Boutros. 2005. E-RNAi: a web application to design optimized RNAi constructs. *Nucleic Acids Research. Web Server issue*. 33.

Badii P. M., Garza V., Landeros J. y Quiroz H. 2006. Diversidad y relevancia de los mosquitos. *CULCyT/Binomia*. 13:4-16.

Bautista M. A., Miyata T., Miura K., Tanaka T. 2009. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome *P450*, *CYP6BG1*, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 39: 39-46.

Bhatt S., Gething P., Brady O., Messina J., Farlow A., Moyes C., Drake J., Brownstein J., Hoen A., Sankoh O, Myers M., George D., Jaenisch T, Wint W., Simmons C., Scott T., Farrar J., and Hay S. 2016. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 496: 504-507.

Bolling B., Weaver S., Tesh R., and Vasilakis Nikos. 2015. Insect-specific virus discovery: significance for the arbovirus community. *Viruses* 7(9): 4911-4928.

Brady O., Gething P., Bhatt S., Messina J., Brownstein J., Hoen A., Moyes C., Farlow A., Thomas W., Scott Simon I., and Hay. 2012. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(8): 1760.

Carvajal A., Peña S., and Oletta S. 2015. Infección por Virus Zika (VZIK): Arbovirosis emergente en las Américas. *Med Interna* (Caracas) 31 (1): 8-15.

Chen X., Tian H., Zou L., Tang B., Hu J. and Zhang W. 2008. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. *Bulletin of Entomological Research*. 98: 613-619.

Ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti*. 2016. CDC; Centro Nacional para Enfermedades Infecciosas Emergentes y Zoonóticas; División de Enfermedades Transmitidas por Vectores.

Dalla-Bona A. C., Faitta-Chitolina R., Lopes-Fermino M., De Castro-Poncio L., Weiss A., Pereira-Lima J. B., Paldi N., Soares-Bernardes E., Henen J and Maori E. 2016. Larval application of sodium channel homologous dsRNA restores pyrethroid insecticide susceptibility in a resistant adult mosquito population. *Parasites and vectors*. 9: 397.

Dash A.P, Bhatia R., Sunyoto T., and Mourya D.T. 2013. Emerging and re-emerging arboviral diseases in Southeast Asia. *J Vector Borne Dis*. 50: 77–84.

DengueMap. Disponible en <http://www.healthmap.org/dengue/es/> Fecha de consulta: Junio 2016.

Eiman M., Introini M. V., y Ripoll C. 2002. Directrices para la prevención y control de *Aedes aegypti*. 79.

Eisen L., and Moore C. 2013. *Entomological Society of America*.

Engdahi C., Knutsson S., Fredriksson S. A., Linusson A., Bucht G., and Ekström F. 2015. Acetylcholinesterases from the disease vectors *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*:

functional characterization and comparisons with vertebrate orthologues. *Plos One*. 10 (10): e0138598.

Fajardo-Dolci F., Meljem-Moctezuma J., Vicente-González E., Venegas-Páez F. V., Mazón-González B., and Aguirre-Gas H. G. 2012. El dengue en México. Conocer para mejorar la calidad de la atención. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 50 (6): 631-639.

Fakhr F. Z., and Teimoori T. L. 2016. Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. *Cancer Gene Therapy*. 23: 73–82.

Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., and Mello C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391: 806–811.

Franz A., Kantor A., Passarelli L., and Clem R. 2015. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*. 7: 3741-3767.

Guan H. 2006. Double-stranded RNA induced gene silencing of neuropeptide genes in sand shrimp, *Metapenaeus ensis* and development of crustacean primary cell culture. The University of Hong Kong. 22-30.

Guevara-Hernandez R. 2016. Silenciamiento de genes relacionados con el desarrollo post-embrionario de *Aedes aegypti* mediante RNA de interferencia y su aplicación potencial en biocontrol. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica. Reynosa Tamaulipas., Mexico.

Guzmán M., and Harris E. 2014. Dengue. Seminar. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60572-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60572-9).

Guzmán M.G., Halstead S.B., Artsob H., Buchy P., Farrar J., Gubler D. J, Hunsperger E., Kroeger A., Margolis H.S., Martínez E., Nathan M.B., Pelegrino J. L., Simmons C., Yoksan S., and Peeling R. W. 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews, microbiology*. 7-16.

Hans Merzendorfer. 2006. Insect chitin synthases: a review. *J Comp Physiol B*. 176: 1–15.

Hemingway J., Field L., and John Vontas. 2002. An Overview of Insecticide Resistance. *Science*. 298: 96-97.

Honggang T., Han P., Qion Y., Hongxin C., Bin T., Wenqing Z. 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PlosOne*. 4(7): e6225.

Ismail M., Morsi H., Abdulateef N., Noaman M., and El-Ella G. 2017. Evaluation of prothrombin induced by vitamin K absence, macrophage migration inhibitory factor and golgi protein-73 versus alpha fetoprotein for hepatocellular carcinoma diagnosis and surveillance. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 77:3.

Jia S., Wan P. J., Zhou L. T., mu L. L and Li G. Q. 2015. RNA interference-mediated silencing of a Halloween gene *spookier* affects nymph performance in the small brown planthopper *Laodelphax striatellus*. *Insect Science*. 22: 191-202.

Jin S., Singh N. D., Li L., Zhang X and Daniell H. 2015. Engineered chloroplast dsRNA silences *cytochrome p450 monooxygenase*, *V-ATPase* and *chitin synthase* genes in the insect gut and disrupts *Helicoverpa armigera* larval development and pupation. *Plant Biotechnol J*. 13 (3): 435-446.

Kamath R., Campos M., Zipperlen P., Fraser A., and Ahringer J. 2000. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biology*. 2 (1).

Killiny N., Hajeri S., Tiwari S., Gowda S. and Stelinski L. L. 2014. Double-stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five CYP4 genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*. *PloS One*. 9 (10): e10536.

Kim E., Park Y., and Kim Y. 2015. A transformed bacterium expressing double-stranded RNA specific to integrin B1 enhances Bt toxin efficacy against a polyphagous insect pest, *Spodoptera exigua*. *Plos One*. 10 (7).

Kim Y. H., and Lee S. H. 2013. Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the class insecta?. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 43: 47-53.

Kumar M., Gupta G. P., and Rajam M. V. 2009. Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *Journal of Insect Physiology*. 55: 273-278.

Kumar R., Kumar S., Gandhi R., and Paulraj S. 2016. Delivery of chitosan/dsRNA nanoparticles for silencing of wing development vestigial (vg) gene in *Aedes aegypti* mosquitoes. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Lawrence I. G. 2004. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 215: 1–10.

Liang G., Gao X., and Gould E. 2015. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect.* 4(3): 18.

Lima P., Botwright N., Harris J., and Cook M. 2014. Development of an *in vitro* model system for studying bacterially expressed dsrna-mediated knockdown in *neoparamoeba* genus. *Mar Biotechnol.* 16: 447-455.

M. R. Coy., N. D. Sanscrainte., K. C. Chalaire., A. Inberg., I. Maayan, E. Glick., N. Paldi and J. J. Becnel. 2012. Gene Silencing in adult *Aedes aegypti* mosquitoes through oral delivery of double-stranded RNA. *J. Appl. Entomol.* 136: 741-748.

Mansur J. F., Alvarenga E. S. L., Mansur J. F., Franco T. A., Ramos I. B., Masuda H., Melo A. C. A., and Moreira M. F. 2014. Effects of chitin synthase double-stranded RNA on molting and oogenesis in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry ad Molecular Biology.* 51: 110-121.

Marín-Rodríguez R., Díaz-Ríos M., Álvarez-Gutiérrez Y., y Calderón-Arguedas. 2014. Sitios de cría de *Aedes aegypti* (*Linnaeus*) y distribución geográfica de *Aedes albopictus* (*Skuse*) en la provincia de Limón, Costa Rica. 2012. *Rev Cubana Med Trop.* 66 (2): 219-227.

Mark S. Duxbury M.A., and Whang E. E. 2004. RNA interference: a practical approach. *J. Surg. Res.* 117: 339-344.

Monitoreo de Resistencia a insecticidas (adulticidas) utilizados en el Programa Nacional de Control de Vectores en México. Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud, Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE).

Mora-Covarrubias A., Jiménez-Vega F., y Treviño-Aguilar S. M. 2010. Distribución geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Salud pública de México*. 52 (2): 127-133.

Mori A., Lobo N., Debruyne B., and Severson D. 2007. Molecular cloning and characterization of complete acetylcholinesterase gene (*Ache1*) from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insecto Biochem Mol Biol*. 37 (7): 667-674.

Mustafa M.S., Rasotgi V., Jain J., and Gupta V. 2015. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical journal armed forces India*. 71: 67 -70.

Nandety R. S., Kuo Y. W., Nouri S., and Falk B. W. 2015. Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. *Bioengineered*. 6 (1): 8-19.

Napoli C., Lemieux C., and Jorgensen R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 2: 279-289.

Nelson M. J. 1986. *Aedes aegypti*: Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud: 50.

Nelson MJ. 1986. *Aedes aegypti*: Biología y ecología. OPS, Washington, D.C. 50.

Nene V., *et al.* 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*. 316 (5832): 1718-1723.

Nicholson G. M. 2007. Fighting the global pest problem: Preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon*. 49: 413–422.

Omar Olguín Rodríguez. 2015. Estudio fenológico de *Aedes (Stegomyia) aegypti* y su probable infección con el virus del dengue en una comunidad de Reynosa, Tamaulipas.

Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Reynosa, Tamaulipas, México. 10.

Ongvarrasopone C., Roshorm Y., and Panyim Sakol. 2007. A simple and cost effective method to generate dsRNA for RNAi studies in vertebrates. *ScienceAsia*. 33: 35-39.

Orii H., Mochii M., and Watanabe K. 2003. A simple soaking method for RNA interference in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev Genes Evol*. 213: 138-141.

Ortiz-Quintero B. 2009. RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes. *Revista de Investigación Clínica*. 61 (5): 412-427.

Paoletti M. G., and Pimentel D. 2000. Environmental risks of pesticides versus genetic engineering for agricultural pest control. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*. 12: 279–303.

Papić L., García K., and Jaime Romero. 2015. Avances y limitaciones en el uso de los dsRNA como estrategias de control y prevención de enfermedades virales en sistemas acuícolas. *Lat. Am. J. Aquat. Res*. 43 (3): 388-40.

Petryk A., Warren J. T., Marque G., Jarcho M. P., Lawrence I. G., Kahler J., Philippe-Parvy J., Li Y., Dauphin-Villemant C., and O'Connor M. B. 2003. Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *PNAS*. 100 (24):13773–13778.

Phillips S.L., Soderblom E. J., Bradrick S.S., and Garcia-Blanco M.A. 2016. Identification of proteins bound to dengue viral RNA *in vivo* reveals new host proteins important for virus replication. *mBIO*. 7: Issue 1 e01865-15.

Pridgeon J. W., Zhao L., Becnel J. J., Strickman D. A., Clark G. G., and Linthicum K. J. 2008. Topically Applied *AaeIAP1* double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*. *J. Med. Entomol.* 45 (3): 414-420.

Rewitz K. F., Michael B., O'Connor., and Lawrence I. Gilbert. Molecular evolution of the insect Halloween family of cytochrome P450s: Phylogeny, gene organization and functional conservation. 2007. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37: 741–753.

Rivera A., Hammel J., Haen K., Danka E., Cieniewicz B., Winters I., Posfai D., Worheide G., Lavrov D., Knight S., Hill M., and Nickel M. 2011. *BMC biotechnology*. 11:67.

Romano N., and Macino G. 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6: 3343-3353.

Santos N. D., and Broeck J. V. 2014. Biological Mechanisms Determining the Success of RNA Interference in Insects. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 312: 1937-6448.

Schumpert C., Dudycha J., and Patel R. 2015. Development of an efficient RNA interference method by feeding for the microcrustacean *Daphnia*. *BMC Biotechnology*. 15:91.

Senapedis W. T., Kennedy C. J, Boyle P. M., and Silver P. A. 2011. Whole genome siRNA cell-based screen links mitochondria to Akt signaling network through uncoupling of electron transport chain. *Mol. Biol. of the Cell*. 22:1791-1805.

Singh A. D., Wong S., Ryan C. P., and Whyard S. 2012. Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: Implications for pest mosquito control. *Journal of Insect Science*. 13 (69). 1-18.

Souza-Ferreira P. S., Mansur J. F., Berni M., Moreira M. F., Eizemberg-Dos Santos R., Marcolla-Araújo H. M, Souza W., Ramos I. B., and Masuda H. 2014. Chitin deposition on the embryonic cuticle of *Rhodnius prolixus*: The reduction of CHS transcripts by CHSdsRNA injection in females affects chitin deposition and eclosion of the first instar nymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 51: 101-109.

Stahl A. 2002. The Health Effects of Pesticides Used for Mosquito Control. Citizens Campaign for the Environment and Citizens Environmental Research Institute.

Tabara H., Grishok A., and Mello C. C. 1998. RNAi in *C. elegans*: Soaking in the genome sequence. *Science*. 282: 430-431.

Thiri6n-Icaza J. 2010. El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en M6xico. *Bayer Environmental Science*. 10.

Tian H., Peng H., Yao Q., Chen H., Tang B., and Zhang W. 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *Plos One*. 4 (7): e6225.

Timmons L., Court D., and Fire A. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263: 103-112.

Wan P. J., Jia S., Li N., and Fan J. M. Li G. Q. 2014. RNA interference depletion of the Halloween gene disembodied implies its potential application for management of planthopper *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus*. *Plos One*. 9 (1): e86675.

Weill M., Fort P., Berthomieu A., Dubois M. P., Pasteur N and Raymond M. 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the *ace* gene in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 269: 2007-2016.

World Health Organization. TDR. 2011. Operational guide for assessing the productivity of *Aedes aegypti* breeding sites. 6-9.

Wynant N., Santos D., and Broeck J. V. 2014. Biological Mechanisms determining the success of RNA interference in insects. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 312: 139-166.

Zhang X., Zhang J., and K. Zhu Y. 2010. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology*. 19 (5): 683–693.

Zhu F., Xu J., Palli R., Ferguson J., and Palli S. 2010. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Manag Sci*. 67:175-182.

Zhuo W., Fang Y., Kong L., Li X., Sima Y., and Xu S. 2014. Chitin synthase A: a novel epidermal development regulation gene in the larvae of *Bombyx mori*. *Mol Biol Rep.*