

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DEL MICRO-RNA 170 (miR-170) DEL
GENOMA DEL VIRUS DENGUE-2 (vDEN-2), EN CÉLULAS DE MOSQUITO
C6/36 HT INFECTADAS.**

SANTIAGO FRANCO LÓPEZ

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2018**

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DEL MICRO-RNA 170 (miR-170) DEL
GENOMA DEL VIRUS DENGUE-2 (vDEN-2), EN CÉLULAS DE MOSQUITO
C6/36 HT INFECTADAS**

SANTIAGO FRANCO LÓPEZ

Trabajo de grado para optar por el título de pregrado en Biología

Dirigido por:

NATALIA CAMPILLO PEDROZA, BSc, MSc.

Co-dirigido por:

PAOLA ANDREA CAICEDO BURBANO, BSc, PhD

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2018**

APROBADO POR:

Nombre correspondiente
Evaluador

Nombre correspondiente
Evaluador

Nombre correspondiente
Director del Proyecto

Nombre correspondiente
Co-Director del Proyecto

SANTIAGO DE CALI, VIERNES, MAYO 11 DEL 2018

AGRADECIMIENTOS

La formación, en cualquier sentido, trae consigo tiempos de dificultad y satisfacción, de crisis y de orgullo. Hoy quiero agradecer a quienes han sido parte de este proceso, y han contribuido de forma incalculable a mi crecimiento personal, académico y profesional:

- A la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Icesi, por su apoyo y enseñanzas que han aportado a mi formación integral.
- A Leonardo Herrera, por permitirme aprender a su lado y a Thaura Ghneim, con cuyos consejos siempre pude contar.
- A Natalia Campillo y Paola Caicedo, por su compromiso y asesoría durante el desarrollo de este proyecto de grado.
- A mis compañeros de clase, con quienes he compartido los momentos más significativos durante mi carrera.
- A mi familia, con quienes sé que siempre puedo contar.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE GRÁFICAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
1. RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
2. INTRODUCCIÓN.....	11
3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	13
4. ESTADO DEL ARTE.....	15
4.1. Epidemiología.....	15
4.2. Virus dengue.....	15
4.3. MicroRNAs.....	17
4.4. MicroRNAs y Virus.....	18
5. OBJETIVOS.....	23
5.1. Objetivo General.....	23
5.2. Objetivos Específicos.....	23
6. METODOLOGÍA.....	24
6.1. Mantenimiento de células C6/36 HT.....	24
6.2. Infección de células C6/36 HT con vDEN-2.....	24
6.3. Titulación de vDEN-2.....	25
6.4. Extracción de RNA viral.....	27
6.5. Detección de miRNAs.....	27
7. RESULTADOS.....	31
7.1. Titulación de vDEN-2.....	31
7.2. Extracción de RNA.....	32
7.3. Detección de miRNAs.....	33
8. DISCUSIÓN.....	39
9. CONCLUSIONES.....	42
10. RECOMENDACIONES.....	43
11. REFERENCIAS.....	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de miRNAs maduros producidos por 29 virus diferentes.	18
Tabla 2. Diseño de primers para transcripción inversa y RT-qPCR.....	28
Tabla 3. Componentes de la reacción de transcripción reversa.	29
Tabla 4. Componentes de la reacción de transcripción reversa.	29
Tabla 5. Componentes de la reacción de amplificación de aal-miR-10-5p.	29
Tabla 6. Componentes de la reacción de amplificación de miR-170.	30
Tabla 7. Valores de las concentraciones de vDEN-2 tras 24, 48 y 72 horas de infección en células C6/36 HT. RB hace referencia a réplica biológica, RT a réplica técnica y H a horas post-infección.	31
Tabla 8. Cuantificación de la concentración de RNA (ng/ μ L). RB hace referencia a réplica biológica, RT a réplica técnica y H a horas post-infección.	32
Tabla 9. Cuantificación de la concentración de cDNA (ng/ μ L). RB hace referencia a réplica biológica, RT a réplica técnica y H a horas post-infección.	33
Tabla 10. Valores de Ct promedio y desviación estándar promedio para las muestras de 24, 48 y 72 horas post-infección con vDEN-2, mock, control positivo de miR-170, y controles negativos para aal-miR-10-5p y miR-170.....	34

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Comparación de valores Ct promedios para muestras de células 24, 48 y 72 horas post-infección para aal-miR-10-5p y miR-170.	38
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotulación de placa de 6 pozos de fondo plano	Error!	Marcador	no definido.
Figura 2. Titulación de vDEN-2.....			26
Figura 3. Ensayo de RT-qPCR stem-loop para miRNAs.			28
Figura 4. Inmunofluorescencia en células C6/36 HT infectadas con vDEN-2.....			32
Figura 5. Curva de fusión para controles negativos de aal-miR-10-5p y miR-170, y para control positivo de miR-170..			35
Figura 6. Curva de fusión muestras sin infección (mock) de aal-miR-10-5p (A) y miR-170 (B) y gráfica de la amplificación de aal-miR-10-5p (C) y miR-170 (D).....			36
Figura 7. Curva de fusión para las muestras de 24, 48 y 72 horas post-infección con vDEN-2 de aal-miR-10-5p (A) y miR-170 (B) y gráficas de la amplificación de muestras infectadas de aal-miR-10-5p (C) y miR-170 (D).....			37
Figura 8. Proceso de amplificación para las muestras controles negativas de aal-miR-10-5p y miR-170, y para la muestra control positiva de miR-170.....			47

1. RESUMEN

El virus dengue (vDEN), transmitido principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*, es el arbovirus más importante que causa enfermedad y muerte en los trópicos y subtrópicos. En Colombia, cerca de 25 millones de personas que habitan en zonas urbanas con transmisión endémica de dengue están en riesgo de adquirir la enfermedad, producto de la situación de su transmisión intensa y persistente en el país durante los últimos años. El Valle del Cauca ha sido uno de los departamentos con más casos de infección en la última década, tomando el primer lugar para diciembre de 2017.

En los últimos años se ha progresado de forma importante en el conocimiento sobre dengue, particularmente en el desarrollo de la vacuna y el entendimiento de la interacción virus-hospedero. No obstante, aún hay vacíos en los procesos moleculares que toman lugar durante la infección viral, lo que limita el desarrollo de herramientas efectivas de diagnóstico, tratamiento y control de la enfermedad. Recientemente, se han enfocado los esfuerzos en el estudio de las propiedades moleculares del virus, en donde destaca la evaluación de los miRNAs celulares y virales, moléculas con funciones claves de regulación de expresión genética durante el proceso patogénico viral.

Si bien los miRNAs han sido bien caracterizados en virus de DNA, este no es el caso para los virus de RNA con replicación citoplasmática como vDEN. Por lo anterior, y con el fin de generar información que permita ampliar el conocimiento sobre la interacción virus-hospedero, el presente proyecto de investigación buscó evaluar, en células C6/36 HT de mosquito infectadas, la presencia del micro-RNA 170 (miR-170), identificado previamente *in silico* en el genoma del vDEN-2. Para ello, se estandarizó el proceso de extracción de miRNAs y se determinó la existencia de miR-170 a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la infección por vDEN-2 a través de PCR en tiempo real (RT-qPCR).

Palabras clave: virus dengue-2, micro-RNA, miR-170, células C6/36 HT.

ABSTRACT

Dengue virus (vDEN), transmitted mainly by the *Aedes aegypti* mosquito, continues to be the most important arbovirus that causes disease and death in the tropics and subtropics. In Colombia, about 25 million people living in urban areas with endemic dengue transmission are at risk of acquiring the disease, product of its intense and ongoing transmission in the country during the last years. El Valle del Cauca has been one of the departments with more cases of infection in the last decade, taking the first place by December 2017.

In recent years, there has been significant progress in knowledge about dengue, particularly in the vaccine development and the understanding of the virus-host interaction. However, there are gaps of information in the molecular processes that take place during viral infection, what limits the creation of effective tools for diagnosis, treatment and control of the disease. Recently, efforts have been focused on the study of the molecular properties of the virus, where highlights the evaluation of cellular and viral miRNAs, molecules with key functions of gene expression regulation during the viral pathogenic process.

Although miRNAs have been well characterized in DNA viruses, this is not the case for RNA viruses with cytoplasmic replication as vDEN. For the above, and in order to generate information that allows to expand knowledge about the host-virus interaction, the present research project sought to evaluate, in infected C6/36 HT mosquito cells, the presence of micro-RNA 170 (miR-170), previously identified *in silico* in the vDEN-2 genome. To do this, the extraction process of miRNAs was standardized and the existence of miR-170 was determined at 24, 48 and 72 hours after infection with vDEN-2 through real-time PCR (RT-qPCR).

Keywords: dengue virus-2, micro-RNA, miR-170, mosquito cell line C6/36 HT

2. INTRODUCCIÓN

El dengue es un arbovirus (virus transmitido por vectores) de 11Kb aproximadamente, de RNA con sentido positivo (Attatippaholkun *et al.*, 2000). Existen cuatro serotipos del virus dengue, llamados DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4, pertenecientes al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, la cual contiene más de 70 virus. Todos los flavivirus poseen epítopes de grupo común en la proteína de la envoltura que dificulta los análisis serológicos ya que se generan reacciones cruzadas extensas. En los cuatro serotipos de dengue se destaca esta característica, pues la infección con un serotipo proporciona inmunidad de por vida para el mismo, pero no existe inmunidad de protección cruzada con los otros serotipos, haciendo posible que las personas de zonas endémicas del virus puedan infectarse por los cuatro serotipos de dengue en su vida (Gubler, 1998).

El virus dengue continúa siendo el arbovirus más importante en trópicos y subtropicos gracias a su alta tasa de infección, generando números importantes de muertes debido a la enfermedad del dengue. Esto acarrea con significativos esfuerzos económicos y sociales en las poblaciones de áreas endémicas, principalmente América y Asia. Se estima que 3.000 millones de personas viven en zonas donde hay riesgo de contraer dengue y que, aproximadamente, se dan 390 millones casos de infecciones (96 millones de ellas sintomáticas) y 20.000 muertes por dengue al año (Organización Mundial de la Salud, 2016). Alrededor de 1.800 millones (más del 70%) de la población en riesgo de contraer dengue en todo el mundo viven en estados miembros de la Región de Asia Sudoriental y la Región del Pacífico Occidental de la OMS, que soportan casi el 75% de la carga global actual de enfermedades debida al dengue (World Health Organization, 2009). En Colombia los casos de la enfermedad han ido en aumento durante la última década, siendo el Valle del Cauca uno de los departamentos más afectados, pues oscila entre los primeros tres puestos de mayor número de casos de infección por el virus (INS, 2017).

Por lo anterior, se hace importante la búsqueda de herramientas de control y diagnóstico para la enfermedad, para lo cual es fundamental el entendimiento de la interacción virus-hospedero. Durante el proceso de infección del virus en la célula, se han encontrado pequeños RNAs conocidos por direccionar la regulación post-transcripcional de la expresión genética: los micro-RNAs (miRNAs), los cuales pueden provenir de las células del huésped o ser de origen viral, y contar con la capacidad de regular la expresión de genes celulares o del virus para apoyar la replicación de este último (Castillo *et al.*, 2016).

El uso de herramientas bioinformáticas podrían ayudar en la identificación y/o predicción de posibles miRNAs que jueguen roles importantes durante el proceso de infección del virus en el vector, aportando información relevante para el entendimiento virus-hospedero que podría contribuir en el desarrollo de

tratamientos efectivos para la infección. Es por esto que el objetivo de este proyecto fue evaluar la presencia de miR-170, identificado *in silico* en el genoma del vDEN-2, en células C6/36 HT de mosquito infectadas, para lo que se requirió estandarizar el proceso de extracción de miRNA a partir de cultivos celulares C6/36 HT infectados con vDEN-2, y determinar su existencia por PCR en tiempo real. Para esto, se infectaron las células de mosquito con vDEN-2 cepa New Guinea C (donado por el CDC) y se colectaron pasadas 24, 48 y 72 horas la infección, junto con células no infectadas como controles. Para conocer los valores de las partículas infecciosas del dengue durante el experimento, se realizó una titulación del virus con inmunofluorescencia indirecta (IFI), haciendo uso de un anticuerpo monoclonal para vDEN-2 donado por el CDC. Tras esto, se extrajo el RNA total, se realizó transcripción inversa con primers específicos para el miR-10-5p como miRNA constitutivo de las células de *Aedes albopitus* (aa) y para el miR-170, y se corrió una PCR en tiempo real para la detección y cuantificación del miR-170.

3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

El virus dengue (vDEN), perteneciente a la familia *Flaviviridae*, es un virus de RNA responsable de 390 millones de infecciones humanas por año, de los cuales 96 millones se manifiestan de forma clínica, siendo así el virus transmitido por mosquito más prevalente en el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2017). Actualmente, se han identificado cuatro serotipos diferentes antigénicos, designados de 1 a 4 (vDEN-1 a 4) (Castillo *et al.*, 2016), cuyo vector principal es el mosquito *Aedes aegypti*, y en menor medida, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* y *Aedes scutellaris* (Organización Mundial de la Salud, 2017).

En Colombia, el dengue representa un problema prioritario en el campo de la salud pública debido a la infestación por *Ae. aegypti* en más del 90% del territorio nacional situado por debajo de los 2.200 msnm y la introducción de *Aedes albopictus*, además de otros factores como: la reemergencia e intensa transmisión con tendencia creciente del virus, el comportamiento de ciclos epidémicos cada dos o tres años de la enfermedad, el aumento en la frecuencia de brotes de dengue grave, la circulación simultánea de diferentes serotipos del virus (1-4), la reintroducción del serotipo tres, el cambio climático, el movimiento de poblaciones hacia las ciudades –el ecosistema de *Ae. aegypti*- (INS, 2014), así como las complicadas relaciones ecológicas y evolutivas entre virus y hospedero (Tuiskunen Bäck & Lundkvist, 2013).

Actualmente no hay forma de tratar el dengue a través de medicamentos antivirales o vacunas. El desarrollo de herramientas terapéuticas que permitan el control efectivo de los brotes de dengue depende, en gran medida, del entendimiento del proceso patogénico y de la interacción virus-hospedero que se presentan durante la infección (Bavia *et al.*, 2016). Por lo anterior, en la actualidad se han concentrado los esfuerzos en entender dichos procesos para contribuir al desarrollo de tratamientos efectivos para el control de la infección viral.

El estudio de los microRNAs (miRNAs) de origen viral y celular es un ejemplo de estos esfuerzos. Se ha encontrado que estas moléculas controlan la expresión de genes durante la infección viral y se ha evidenciado que pueden regular la patogénesis viral (Bavia *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta lo anterior, Ospina *et al.*, 2014 realizaron una predicción bioinformática (*In silico*) de miRNAs en el genoma del virus dengue-2, donde se encontraron ocho miRNAs que, en conjunto, podrían regular la expresión de 53 blancos celulares (Ospina *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta que los 53 blancos celulares probablemente pueden ser regulados por los miRNAs virales predichos por Ospina *et al.*, 2014 durante la infección con virus dengue y que esta regulación potencialmente podría contribuir al desarrollo de la infección viral, se hace necesario evaluar la existencia de estos

miRNAs *in vitro* en células infectadas con vDEN-2. Ospina *et al*, 2014, evaluó la presencia del miR-170 en células de mamífero Vero infectadas con el virus, y encontró la presencia de posibles precursores del miRNA tras 24 horas desde iniciada la infección. Debido a que las células de mosquito son más permisivas a la infección, es interesante continuar con la evaluación del miR-170 para determinar su presencia en la célula durante la infección por vDEN-2.

Enfocar esfuerzos para la determinación de la existencia de estos miRNAs identificados con métodos computacionales podría aportar al entendimiento de los procesos moleculares asociados con la patogénesis viral y la interacción virus-hospedero, información necesaria para la identificación de nuevos blancos dirigidos a atenuar o evitar la replicación del virus y para el desarrollo de posibles herramientas de diagnóstico (Bavia *et al.*, 2016).

4. ESTADO DEL ARTE

4.1. Epidemiología

El número de casos notificados por año de los Estados Miembros de tres regiones de la OMS (Organización Mundial de la Salud) pasó de 2.2 millones en 2010 a 3,2 millones en 2015. Este aumento, probablemente, se relaciona con la hiperendemicidad de los serotipos de vDEN en diversos países. Para 1970, solo 9 países habían llegado a sufrir epidemias de dengue grave. En la actualidad, más de 100 países de África, América y Asia son endémicas para la enfermedad, siendo estas dos últimas regiones las más afectadas. En 2008, para estas dos zonas se tuvieron registros de más de 1.2 millones de casos y, para el 2015, la cifra ya superaba los 3.2 millones de registros (2.35 millones de casos solo en América, de los cuales 10.200 casos se diagnosticaron como dengue grave y provocaron 1.181 defunciones) (Organización Mundial de la Salud, 2017).

En Colombia, en la última década el número de casos de infección por dengue va en aumento. El Instituto Nacional de Salud (INS) reportó, para el año 2000, 22.775 casos por dengue, de los cuales 1.093 fueron dengue grave, dejando 14 personas muertas. Para el 2010, se reportó una epidemia en la que se informaron más de 150.000 casos de dengue, de los cuales el 94 % (143.791) fue dengue clásico y el 6 % restante correspondió a dengue grave, con una mortalidad de 2,24 % (217 casos letales), valor superior a lo reportado normalmente (máximo, 2 %) (Velandia & Castellanos, 2011).

El Valle del Cauca ha sido uno de los departamentos más afectados por casos de infección en el país (principalmente por serotipos vDEN-1 y vDEN-2). En la semana epidemiológica 52 del 2017 (24 al 30 de diciembre), el departamento tomó la primera posición, con un 18,4% de los 26.279 casos de infección reportados-menores a los valores para la misma semana del 2016, 103.822 (INS, 2016), pero aún así alarmantes-, seguido por Antioquia (16,6%) y Tolima (11,1%) (INS, 2017). En lo corrido del 2018 (hasta abril 28), el Valle del Cauca toma el tercer lugar, con un 10,6% de los 8898 casos de dengue en el país, siendo Cali el municipio que presenta la mayor proporción de casos de dengue, con un 7,9% (INS, 2018).

4.2. Virus dengue

El virus dengue (vDEN), del género *Flavivirus* y familia *Flaviviridae*, como la mayoría de los virus de RNA exhibe una considerable diversidad genética en tanto que abarca cuatro serotipos (vDEN-1 – vDEN-4) que circulan periódicamente y de forma simultánea en zonas endémicas e hiperendémicas. Todos causan la enfermedad del dengue, ya sea una infección asintomática, enfermedad febril y/o casos graves que pueden conducir a la muerte (Velandia & Castellanos, 2011). No obstante, también hay una variación genética significativa dentro de cada serotipo.

Entre los cuatro serotipos, vDEN-2 ha sido el mejor caracterizado en este sentido, en donde estudios de las secuencias del gen de la envoltura viral (E) han revelado variación en una escala global (hasta de 6% de divergencia genética), y ha permitido agrupar 7 variantes genéticas de cepas aisladas “genotipos” (Twiddy *et al.*, 2002) o “subtipos”: Subtipo I (Asiático II o All), Subtipo II, Subtipo IIIa (Asiático I (AI)), Subtipo IIIb (Americano/Asiático (AA)), Subtipo IV (Cosmopolitan (C)), Subtipo V (Americano (AM)) y el genotipo Selvático (S) (Méndez *et al.*, 2012). All consiste de cepas de China, Filipinas, Sri Lanka, Taiwán, Vietnam, así como la cepa New Guinea C, usada como referencia en diversos estudios de vDEN-2 en el mundo, mientras AI contiene cepas de Tailandia y Malasia. AA incorpora cepas de Tailandia y Vietnam, así como de Latino América y el Caribe. C, como su nombre lo indica, contiene cepas de diversos lugares, entre los que se encuentran Australia, Islas del Pacífico, El sureste de Asia, el subcontinente de India y las islas del Océano Índico, el Medio Este y el oeste y este de África. AM está compuesto de cepas provenientes de Latino América, India, el Caribe e Islas del Pacífico. S, por otra parte, contiene muestras de Asia y el este de África (Twiddy *et al.*, 2002).

En Colombia, la presencia del virus dengue se detectó por primera vez en los años setenta, cuando se aislaron los serotipos 1, 2 y 3 y, posteriormente, en 1986 con la introducción del serotipo 4 (Cortés *et al.*, 2007). Según los resultados obtenidos por Méndez *et al.*, 2012, actualmente se encuentran en circulación en el país los genotipos Americano y Americano/Asiático, los cuales se han reportado en otros países de América. Interesantemente, la introducción del subtipo IIIb coincide con el primer reporte de dengue con fiebre hemorrágico en Colombia al final del 1989, y el incremento de casos en los años siguientes.

El vDEN es transmitido por mosquitos del género *Aedes* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* y *Aedes scutellaris*) (Organización Mundial de la Salud, 2017) distribuidos en países tropicales y subtropicales desde Asia hasta el Pacífico y América, donde se ha observado proliferación de los sitios de cría de mosquitos, aumentando su circulación junto con el virus con menos restricciones geográficas y/o ecológicas (Kyle & Harris, 2008) y conformando un ambiente que favorece el incremento de infecciones virales. En este punto, vacunas y tratamientos que permitan controlar los brotes infecciosos son una herramienta decisiva. No obstante, la falta de conocimiento en cuanto a la interacción virus-hospedero es una de las causas de que el desarrollo de herramientas terapéuticas, como vacunas y medicamentos antivirales sea limitado.

El vDEN cuenta con una envoltura lipídica que alberga un genoma de RNA en sentido positivo, con una longitud aproximada de 10.7 miles de bases (kb). La región codificante del genoma está flanqueada en sus extremos por regiones no traducidas (UTR) (Friebe & Harris, 2010). En estas, se encuentran estructuras secundarias en forma de tallo-bucle, así como secuencias conservadas que parecen estar relacionadas directamente con la circularización genómica necesaria para la replicación del virus (Campillo-Pedroza, 2015).

El vDEN es transmitido por las hembras del mosquito vector del género *Aedes*, infectado durante la alimentación con sangre de un hospedero, e ingresan a la célula blanco usando la vía endocitosis-mediada por receptor y tráfico de endosomas, donde el ambiente ácido inicia los mayores cambios conformacionales en la envoltura glicoprotéica, llevando a la liberación de la nucleocápside viral que a su vez es desensamblada por proteasas celulares, para finalmente liberar el RNA viral en el citoplasma (Campillo Pedroza, 2015). El virus codifica una poliproteína grande que se escinde co y postraduccionalmente en 10 proteínas virales (Friebe & Harris, 2010). Después de la traducción del RNA genómico que ha ingresado, la polimerasa RNA dependiente de RNA (RdRp) NS5, sintetiza cadenas de RNA en sentido negativo a partir del RNA genómico, que sirve como molde para la síntesis de nuevas cadenas en sentido positivo (Campillo-Pedroza, 2015).

4.3. MicroRNAs

Los miRNAs son nucleótidos cortos (de 21 a 24) de RNA no codificante (ncRNA) que se expresan en eucariotas y en diversos virus, que funcionan como reguladores transcripcionales de la expresión genética. Son conocidos por reprimir la traducción de RNA mensajeros (mRNA), inhibiendo así la expresión de proteínas (Ouellet & Provost, 2010). Estas moléculas también juegan un papel de gran importancia en varias vías regulatorias, como el desarrollo embrionario, apoptosis, división celular, diferenciación, muerte, hematopoyesis y el desarrollo de cáncer (Shunmin *et al.*, 2008).

La biogénesis de los miRNAs se ha clasificado en dos mecanismos celulares: canónico y no-canónico. La vía canónica, bien estudiada en células animales, inicia en el núcleo celular, en donde se produce el precursor de miRNA (pre-miRNA), a través de la escisión del miRNA primario por la proteína de unión a RNA de doble cadena Dgcr-8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) y Drosha. Posteriormente, el precursor de miRNA es llevado al citoplasma a través de la proteína Exportina, una vez reconocidos los nucleótidos característicos del corte de Drosha. Ya en el citoplasma, Dicer (endonucleasa) corta el pre-miRNA, lo que genera un RNA de doble cadena (RNA dúplex) que más tarde se asociará a una proteína AGO y se unirá al complejo de silenciamiento inducido por RNA (miRISC). Tras la maduración en miRISC, el RNA dúplex sufre una selección de cadenas. Aunque no está completamente entendido, este proceso se basa, en parte, en la estabilidad termodinámica 5' de extremo del RNA de doble cadena, mostrando un sesgo para la carga de miRISC a medida que se tiene menor energía libre media. La cadena estrella, definida como la cadena pasajera, se degrada. La cadena madura o guía cargada en miRISC es transportada y realiza un apareamiento de bases imperfecto con su RNA diana (Langlois *et al.*, 2012), principalmente en el

sitio complementario en la región 3' no traducida (3'UTR) del mRNA blanco (Campillo Pedroza, 2015). Dando como resultado la desestabilización del RNA y/o la represión traduccional (Langlois *et al.*, 2012). Los miRNAs también pueden unirse al mRNA a través de un complemento perfecto para inducir su escisión (Ouellet & Provost, 2010).

Tecnologías de secuenciación profunda han revelado diferentes clases de moléculas de RNA que estructuralmente y funcionalmente se asemejan a los miRNAs. Estas, sin embargo, omiten uno o más pasos en la vía de biogénesis canónica, y es por esto que se les denomina miRNAs no canónicos (Maher Abdelfattah *et al.*, 2014). Los procesos no canónicos de procesamiento de miRNAs parten de moléculas con estructuras tallo-bucle, que son similares a un precursor de miRNA (Miyoshi *et al.*, 2010). Dicer es casi siempre indispensable en la producción de miRNAs tanto canónicos como no canónicos, y sin él, es imposible la generación de la mayoría de miRNAs. Por otra parte, Drosha y Dgcr8 solo se necesitan en el procesamiento canónico de miRNAs, pues miRNAs no canónicos pueden generarse en su ausencia. En las rutas de biogénesis independientes de Drosha/Dgcr8 se han identificado: mirtrons, miRNAs derivados de pequeños RNAs nucleolares (snoRNAs), miRNAs de RNAs cortos endógenos con estructura tallo-bucle (shRNAs), miRNAs de tRNAs (Maher Abdelfattah *et al.*, 2014) y dependiente de tRNasaZ (Miyoshi *et al.*, 2010). Dentro de las rutas independientes de Dicer se encuentran: la ruta dependiente de AGO, y dependiente de tRNasaZ (Miyoshi *et al.*, 2010). Vías no canónicas similares pueden ser usadas por virus de RNA que se replican en el citoplasma para generar miRNAs funcionales (Hussain & Asgari, 2014).

4.4. MicroRNAs y Virus

Los virus, de forma similar a sus huéspedes, generan pequeños RNAs que se clasifican como RNAs pequeños de interferencia (siRNAs), miRNAs, RNAs asociados a Piwi (piRNAs), pequeños RNAs virales (vsRNAs) y RNAs inusualmente pequeños (usRNAs) (Hussain & Asgari, 2014). Entre ellos, los miRNAs de virus de DNA han sido bien caracterizados y pueden desempeñar funciones claves para controlar la expresión genética tanto viral como celular. Este es el caso de los Herpesvirus, virus de ADN bicatenario que están clasificados en 3 familias (α , β , y γ) basado en la secuencia genómica y la biología del virus, y en donde se han identificado miembros que expresan múltiples miRNAs (Skalsky & Cullen, 2010). En la Tabla 1 se expone una lista de miRNAs maduros producidos por diferentes virus, tanto de RNA como de DNA (Huang, *et al.*, 2017).

Tabla 1. Número de miRNAs maduros producidos por 29 virus diferentes.

Naturaleza	Virus	Abreviación del	MiRNA
------------	-------	-----------------	-------

		miRNA	Maduro
RNA	Bovine foamy virus	bfv	4
	Human inmunodeficiency virus 1	hiv1	4
DNA	Bandicoot papillopmatosis carciomatosis virus 1	bpcv1	1
	Bandicoot papillopmatosis carciomatosis virus 2	bpcv2	1
	BK polyomavirus	bkv	2
	Bovine herpesvirus 1	bhv1	12
	Bovine herpesvirus 2	bhv2	5
	Bovine leukemia virus	blv	10
	Duck enteritis virus	dev	33
	Epstein-Barr virus	ebv	44
	Herpes B virus	hbv	15
	Herpes simplex virus 1	hsv1	27
	Herpes simplex virus 2	hsv2	24
	Herpesvirus of turkeys	hvt	28
	Herpesvirus saimirí strain A11	hsva	6
	Human cytomegalovirus	hcmv	26
	Human herpesvirus 6B	hhv6b	8
	Infectious laryngotracheitis virus	iltv	10
	JC polyomavirus	jcv	2
	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus	kshv	25
	Mareks disease virus 1	mdv1	26
	Mareks disease virus 2	mdv2	36
	Merkel cell polvomavirus	mcv	2
	Mouse cytomegalovirus	mcmv	29
	Mouse gammaherpesvirus 68	mghv	28
	Pseudorabies virus	prv	13
Rhesus lymphocryptovirus	rlcv	68	
Rhesus monkey rhadinovirus	rrv	11	
Simian virus	sv	2	
	Total	502	

Por otra parte, si bien falta indagar a profundidad sobre los miRNAs de virus de RNA, se han reportado algunos de estos virus que interactúan directamente con los miRNAs de la célula, lo cual favorece su replicación (Skalsky & Cullen, 2010). Con esto se han relacionado diferentes procesos celulares que son controlados por miRNAs de origen viral durante su infección, tales como la reprogramación celular, la modulación de la respuesta inmune, la promoción de la replicación viral, entre otros (Ouellet & Provost, 2010).

Lo anterior es el caso del virus de la hepatitis C (HCV), un virus de RNA de cadena simple positiva de la misma familia del vDEN que no codifica miRNA viral; sin embargo, la infección por HCV altera la expresión de los miRNA del huésped, ya sea en cultivo celular o en pacientes con progresión de la enfermedad hepática, como fibrosis hepática, cirrosis y carcinoma hepatocelular. A su vez, los miRNAs del huésped regulan el ciclo de vida del HCV a través de la unión directa a los RNA del HCV o indirectamente dirigidos a los RNAm celulares (Li *et al.*, 2016). Janssen *et al.*, 2013, descubrieron la función del miRNA-122 celular en el ciclo de replicación del virus de RNA de la hepatitis C (HCV), el cual es esencial para su estabilidad y propagación. miRNA-122 se une a dos sitios diana en la región no traducida 5', formando un complejo oligomérico que protege al genoma del HCV de degradación nucleolítica o de respuestas inmunes en el hospedero. A partir de este descubrimiento, se pudo obtener un efecto terapéutico gracias al desarrollo de un inhibidor específico del miRNA en cuestión, por lo que se está evaluando actualmente en ensayo clínico un tratamiento con humanos en fase II (Janssen *et al.*, 2013).

En otros estudios, se ha encontrado una relación entre la promoción de la replicación de vDEN en el mosquito vector y miRNAs de células de mosquito y mamífero. Por ejemplo, el miRNA-281 (miR-281) es expresado en el intestino medio del mosquito hembra, donde el vDEN primero invade. Después de la infección, este miRNA es regulado positivamente. Análisis posteriores han llevado a la asociación del miR-281 con la potenciación de la replicación de vDEN-2 en *Aedes albopictus* (Yanhe Zhou *et al.*, 2014). En otra investigación, análisis bioinformáticos revelaron que la 3'UTR del genoma del vDEN de los cuatro serotipos es establecida como blanco de diversos miRNAs celulares, incluyendo el miRNA-133a. La sobre-expresión de este miRNA reprime la replicación del vDEN. Además, la transcripción de la proteína de unión al tracto de polipirimidina (PTB), un blanco del miRNA-133a, es regulada negativamente durante la infección por el virus. Esto permite pensar que la 3'UTR del vDEN regula negativamente la expresión endógena del miRNA-133a en células vero durante las primeras horas de la infección (Castillo *et al.*, 2016).

El procesamiento de miRNA en los virus RNA es un tema ampliamente discutido, en gran parte, debido a que la mayoría de los virus RNA se replican exclusivamente en el citoplasma (exceptuando a Retrovirus, como los expuestos en la Tabla 1 y Ortomixovirus), por lo que el genoma viral no interactúa con el complejo microprocesador del núcleo celular, encargado de iniciar el procesamiento del miRNA, y no se da una vía de desarrollo canónica del mismo. Sin embargo, algunos trabajos han demostrado la existencia de miRNAs provenientes de virus de RNA con replicación citoplasmática.

Por ejemplo, en una investigación de Hussain *et al.*, 2014, el objetivo principal fue la búsqueda de miRNAs funcionales codificados por vDEN. Se usaron datos de

secuenciación de mosquitos *A. aegypti* infectados por el virus, y se obtuvieron seis vsRNAs, con estructuras de horquillas en las regiones no traducidas 5' y 3' del RNA viral genómico. La inhibición de uno de ellos, vDEN-vsRNA-5, conllevó al incremento significativo de la replicación viral. Análisis posteriores llevaron a la conclusión de que Argonauta 2 está implicada en la biogénesis de la molécula, proceso que se asemeja a la generación de miRNAs. El impacto de los inhibidores de vDEN-vsRNA-5 en los niveles de RNA de vDEN reveló el papel del vsRNA en la autorregulación que tiene como blanco el gen 1 de la proteína no-estructural del virus. En este mismo estudio encontraron moléculas homólogas a vDEN-vsRNA-5 en los serotipos vDEN-1 a vDEN-4, pero no en vDEN-3, inhibiendo la replicación de vDEN-2. La producción de vDEN-vsRNA-5 en bajas cantidades podría beneficiar al virus gracias a la autorregulación de la replicación del mismo, evitando la sobrerreplicación y, con esto, la muerte prematura de las células hospederas y/o el mosquito vector. Así, se revela que vDEN es capaz de codificar vsRNA similares a miRNAs, donde uno de ellos tiene como blanco un gen viral, lo cual abre un abanico de posibilidades en el uso de estas moléculas para limitar la replicación de vDEN (Hussain & Asgari, 2014).

Por otro lado, Langlois *et al.*, (2012) describió la generación de un virus critoplasmático monocatenario de polaridad negativa capaz de producir miRNAs funcionales. Estos miRNAs se acumularon en altos niveles *in vitro*, generaron cantidades significativas de la cadena estrella de miRNA asociada con RISC, y confirieron silenciamiento genético post-transcripcional de forma específica. Estos resultados validan el procesamiento no-canónico de miRNAs derivados del citoplasma.

En Colombia, Ospina *et al.*, 2014, realizaron una predicción bioinformática de miRNAs en el genoma del vDEN-2, en donde encontraron ocho miRNAs que, en conjunto, según el trabajo *in silico*, podrían regular la expresión de cincuenta y tres blancos celulares (Ospina *et al.*, 2014). El estudio llevado a cabo muestra que, en células Vero de mamífero, probablemente se encuentra un muy bajo nivel del miRNA evaluado, el miR-170, el cual podría regular el Receptor del Factor de Crecimiento Fibroblástico tipo 2 (FGFR2, Fibroblast Growth Factor Receptor type 2), receptor tirosina-quinasa que activa las rutas Ras/Map y P13K/Akt, encargadas de regular procesos importantes como el remodelamiento del citoesqueleto de actina, sobrevivencia y apoptosis, corte y empalme de exones, entre otros (Campillo-Pedroza, 2015). En el estudio, se sugiere el uso de células de mosquitos debido a la alta sensibilidad y permisividad de las células (e.g., la línea celular C6/36 HT) a la infección viral, por lo que su uso puede ser más oportuno en pruebas *in vitro*, aumentando la posibilidad de encontrar una mayor concentración de los miRNAs evaluados en comparación a las células de mamífero.

En conclusión, el estudio de los miRNAs de virus de RNA es un campo poco explorado y con un gran potencial para el entendimiento de la relación virus-hospedero, que podría aportar en el desarrollo de herramientas terapéuticas, de

control o diagnósticas. Algunos trabajos han intentado demostrar la existencia de miRNAs de biogénesis no canónicas, pero aún falta mucho por entender. En Colombia, esta área es muy poco estudiada. Ospina *et al.*, 2014, hicieron un acercamiento que abre un abanico de oportunidades en la investigación de estos RNA no codificantes de origen viral.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar la presencia del micro-RNA 170 (miR-170), identificado *in silico* en el genoma del vDEN-2, en células C6/36 HT de mosquito infectadas.

5.2. Objetivos Específicos

1. Estandarizar el proceso de extracción de miRNAs a partir de cultivos celulares C6/36 HT infectados con vDEN-2.
2. Determinar la existencia del miR-170 durante el curso de la infección de células C6/36 HT con vDEN-2.

6. METODOLOGÍA

6.1. Mantenimiento de células C6/36 HT

El cultivo celular de *Aedes albopictus* C6/36 HT se mantuvo en flask (botella de plástico) de 50 mL, con 5 mL de medio de crecimiento celular Lebovitz (L-15 medium, Sigma Aldrich®) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (10%), penicilina/estreptomicina (1%), y L-glutamina (1%) a 31 ± 1 °C. Pasados 5 días se verificó en un microscopio invertido que se tuviese una confluencia celular superior al 80% para continuar con el proceso de infección con el vDEN-2.

6.2. Infección de células C6/36 HT con vDEN-2

El proceso de infección de células con el vDEN-2 se llevó a cabo en placas de 6 pozos, estériles, con fondo plano y tapa, donde se cultivaron las células conservando sus propiedades fisiológicas. En general, el proceso se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar. En primer lugar, se descartó el contenido de la botella donde se tenía el cultivo celular con una confluencia celular del 80%, se adicionó 1 mL de medio L-15 suplementado con SFB al 10% y se realizó un desprendimiento celular con la ayuda de un policia de vidrio estéril. Posteriormente, se tomó 1 mL del flask y se agregaron 3 gotas de dichas células a cada uno de los 6 pozos de la placa, seguido por 2 mL medio de crecimiento con SFB al 10%. La placa de 6 pozos fue rotulada en cada columna como 24, 48 y 72 horas, y se toma como una réplica biológica con dos réplicas técnicas por tiempo (Figura 1). Posteriormente, se agregaron 5 mL del mismo medio al flask, de tal forma que continuase el crecimiento del cultivo celular que se tomó como la muestra control sin infección, o mock. El flask fue rotulado con el nombre de la línea celular, número de pase y la fecha en el que este se realizó. El flask y la placa de 6 pozos fueron llevados a incubación a una temperatura de ± 31 °C. El proceso descrito se realizó dos veces, con el fin de obtener dos réplicas biológicas con su respectivo control.

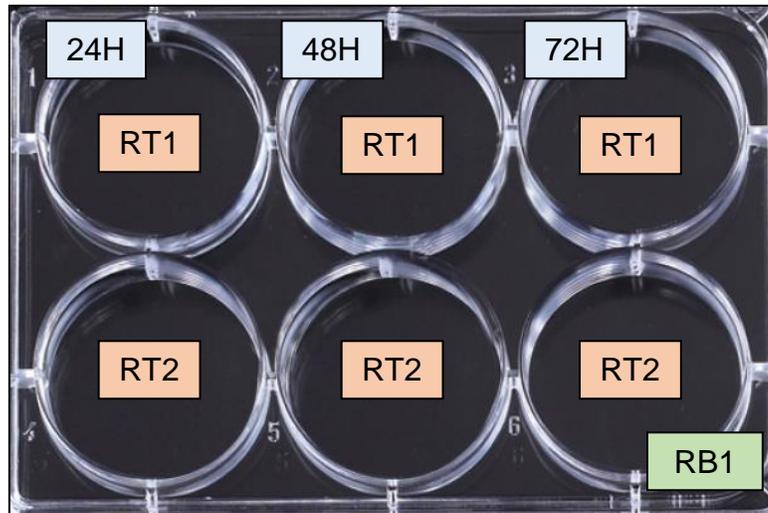


Figura 1. Rotulación de placa de 6 pozos de fondo plano. RB hace referencia a réplica biológica. 24H, 48H y 72H se refiere a los tiempos –en horas- de colección de las muestras post-infección con vDEN-2. RT representa la réplica técnica de cada fila por cada tiempo.

Transcurridos 2 días de incubación para la placa, y al alcanzarse al menos un 80% de confluencia celular en las monocapas de los cultivos, se procedió a realizar la infección de las células en cada uno de los 6 pozos con el sobrenadante que contiene el virus DEN-2 cepa New Guinea C (CDC) (almacenado a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$). El sobrenadante del virus fue descongelado lentamente a temperatura ambiente. Posteriormente, en la cabina con nivel de bioseguridad tipo II, se adicionaron 200 μL del virus a cada pozo de la placa y se incubaron por 1 hora a 37°C con agitación constante, con el fin de facilitar la penetración del virus en las células. Transcurrido el tiempo, se eliminó el sobrenadante del virus, se adicionaron 2 mL de medio L-15 suplementado con SFB al 2% a cada pozo, y se incubó a $31 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, a las 24, 48 y 72 horas post-infección se recolectaron las células y el medio de cultivo con la ayuda de un policía de vidrio en tubos de 1.5 mL. De la misma manera se recolectaron las células cultivadas como control en los flask. Todas las muestras se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.3. Titulación de vDEN-2

La presencia del virus en las células infectadas y no infectadas se determinó a través de titulación por inmunofluorescencia indirecta (IFI), haciendo uso de un anticuerpo monoclonal específico para el vDEN-2, donado por el CDC.

Se hizo uso de una placa de 96 pozos de fondo plano con tapa (Figura 2), en donde se sembraron 100 μ L de las muestras a evaluar por triplicado en la primera fila (tres muestras por placa, 5 placas en total evaluando las 14 muestras), teniendo en cuenta los controles negativos en donde no se sembró muestra. En los pozos restantes, se sembraron 90 μ L del medio L-15 suplementado con SFB al 10%. Posterior a esto, se realizaron diluciones seriadas de 10 μ L de las muestras virales de la primera fila a lo largo de toda la placa. Terminadas estas diluciones, se adicionó a cada pozo 100 μ L de células cultivadas en flask con la metodología ya mencionada (numeral 6.1), con la diferencia de que se adicionaron 5 mL de medio suplementado con SFB al 2% a los 5 mL de medio de crecimiento suplementado con SFB al 10% que ya contiene el flask, de tal forma que se obtuviese un volumen de 10 mL, suficiente para adicionar células en los 96 pozos de la placa. Finalizada la siembra de células, se llevó a incubación durante 7 días a \pm 31°C. Cada una de las placas utilizadas para la titulación del vDEN-2 fue rotulada con el nombre de las muestras evaluadas y selladas con papel parafilm.

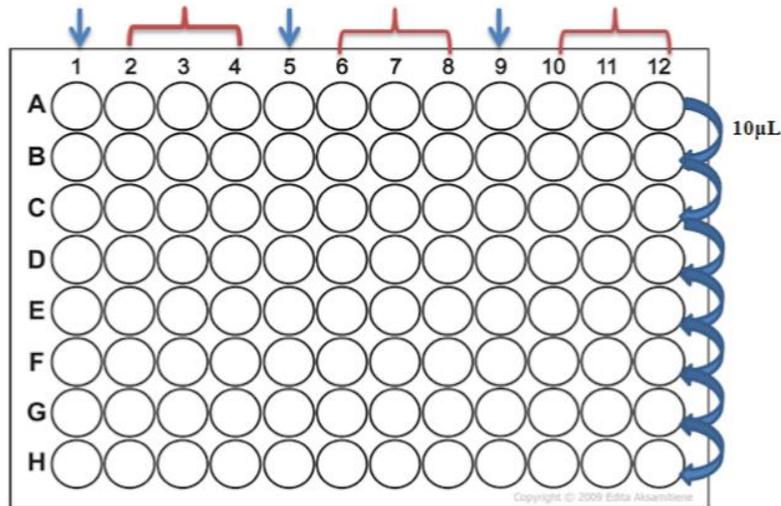


Figura 2. Titulación de vDEN-2. Placa de 96 pozos de fondo plano con tapa. Las flechas señalando las columnas 1, 5 y 9 indican los controles negativos. Los corchetes hacen referencia a cada muestra sembrada por triplicado. Las flechas curvas muestran las diluciones seriadas de 10 μ L.

Finalizado el tiempo de incubación, se procedió a la visualización del virus dengue en las muestras evaluadas. Para esto, se descartó el contenido de la placa en una bandeja, las células se fijaron y permeabilizaron con 50 μ L de acetona-PBS (3:1) (90 mL de acetona y 30 mL de PBS) por pozo. La placa se guardó a 4°C durante 30 minutos. Pasado el tiempo, se descartó el contenido y se adicionaron 20 μ L del anticuerpo monoclonal específico para vDEN-2 en una relación 1:200 con PBS, y se llevó a incubación durante 45 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo, se descartó el anticuerpo y se realizaron dos lavados con PBS por placa y agitando

durante 1 minuto, a lo cual le siguió un lavado con agua destilada con agitación de 1 minutos. Posteriormente, se adicionó fluorocromo (FITC) (1:200) y azul de Evans, que sirve como contraste, a una relación de 1:200 con PBS y se incubó por 1 hora a 37°C. Una vez realizado esto, se lavó dos veces cada placa con agua destilada durante 1 minuto de agitación y se le adicionaron 20 µL de glicerina-agua destilada (9:1) (90 mL de glicerina y 10 mL de agua destilada) a cada pozo para su visualización en el microscopio de fluorescencia.

De acuerdo al número de pozos positivos para cada una de las muestras tituladas, la concentración del virus dengue - 2 se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Log} \left(10^{-\left(\frac{\text{Tissue culture Infective Dose/mL (TCID50)}{\text{(titulación positiva en los tres pozos)}} \right)} - \text{Log}(10) * \left(1 + \left(\frac{\text{\#pozos positivos}}{\text{\#total de pozos}} \right) - 0.5 \right) \right)$$

Ecuación 1. Fórmula para determinar la concentración del vDEN-2.

6.4. Extracción de RNA viral

La extracción de RNA se realizó con trizol (TRI-reagent® (Sigma)), como se describe brevemente a continuación. La extracción se realizó con 400 µL de cada muestra, en donde se adicionaron 700 µL de TRI-reagent®. Se agitó brevemente, y se dejó en reposo 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 200 µL de cloroformo, se mezcló suavemente y se dejó en reposo durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Después, se transfirió cuidadosamente la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo, y se adicionaron 500 µL de isopropanol, se mezcló suavemente y se dejó en reposo durante 10 minutos nuevamente. Una vez pasado el tiempo, se llevó a centrifugación con las mismas condiciones anteriores. Luego, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol frío al 75%. Una vez más se llevó a centrifugación con las condiciones descritas y se pasó a descartar el sobrenadante y remover los restos de etanol hasta que se evaporase completamente. Por último, se adicionaron 15 µL de agua libre de RNAsas estéril, y se almacenó a -80 °C. La pureza y concentración del RNA fue determinada a través de un lector de placa Synergy H1 a partir de 1 µL de muestra.

6.5. Detección de miRNAs

La expresión de los miRNAs a evaluar en cada una de las 14 muestras fue detectada a través de la estandarización de un proceso de 3 pasos reportado por Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007. Primero, se realizó el diseño de primers stem-loop, directos e inversos (universal) para aal-miR-10-5p (miRNA de referencia, constitutivo en las células de *Ae. Albopictus*) (Batz *et al.*, 2017) y miR-170 (secuencia de interés que, además, se sintetizó como control positivo del experimento) mediante la herramienta virtual miRNA Primer Design Tool, proveída

por el laboratorio AstridBio para la generación de primers para miRNAs (Astrid Research, 2013) (Tabla 2).

Tabla 2. Diseño de primers para transcripción inversa y RT-qPCR.

miRNA	Oligonucleótido	Secuencia
aal-miR-10-5p	Primer Stem-loop	5' – GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACA ACA AA – 3'
	Primer universal	5' – GTG CAG GGT CCG AGG T – 3'
	Primer directo	5' – GTG ACC CTG TAG ATC CGA A – 3'
miR-170	miR-170	5' – ACG GGA CTG CCG AGC AAA TGG C – 3'
	Primer Stem-loop	5' – GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACG CCA TT – 3'
	Primer universal	5' – GTG CAG GGT CCG AGG T – 3'
	Primer directo	5' – TTG TAC GGG ACT GCC GAG – 3'

En el segundo paso se realizó la transcripción reversa de RNA a DNA complementario (cDNA) haciendo uso de un primer stem-loop específico para cada uno de los dos miRNAs a evaluar y una enzima transcriptasa inversa SuperScript II (Thermo Fisher Scientific). Por último, se amplificó el cDNA producto a través de RT-qPCR usando un ensayo de SYBR Green con un primer universal inverso, la secuencia del loop, y un primer directo específico (Figura 3).

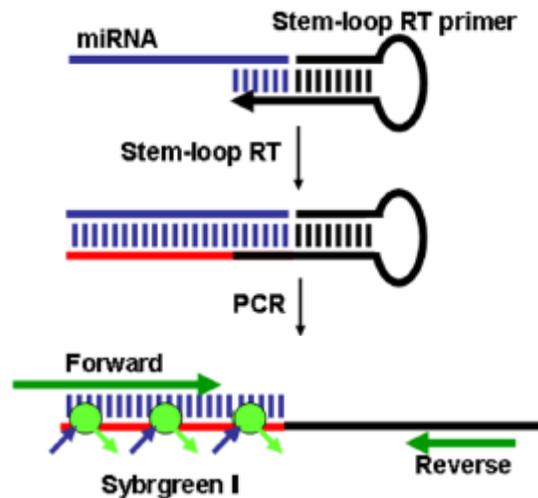


Figura 3. Ensayo de RT-qPCR stem-loop para miRNAs (Tomado de Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007).

Para la transcripción reversa, se preparó un coctel de reacción para cada miRNA: aa-miR-10-5p (miRNA de referencia) y miR 170 (secuencia de interés) que contenía los siguientes reactivos para una reacción (Tabla 3):

Tabla 3. Componentes de la reacción de transcripción reversa.

Reactivos	Volumen (μL)
Mezcla de dNTP 10 mM	7
Agua libre de nucleasas	156.1
Primer stem-loop	14

Se calentó la mezcla a 65 °C durante 5 minutos en una plancha, y se incubó en hielo durante 2 minutos. Se centrifugó brevemente para llevar la solución al fondo del tubo, y se agregaron reactivos para una reacción (Tabla 4).

Tabla 4. Componentes de la reacción de transcripción reversa.

Reactivos	Volumen (μL)
Buffer First-Strand 5x	56
DTT 0,1 M	28
Agua libre de nucleasas	1.4
SuperScript II RT	1.4

Se mezcló suavemente y se centrifugó para llevar la solución al fondo del tubo. Posteriormente, se alicuotaron 19 μL del cocktail de reacción en tubos de microcentrífuga y se agregó 1 μL de la muestra plantilla de RNA a transcribir. El miR-170 sintético, como control positivo, fue adicionado como muestra en un tubo con el cocktail de reacción. Posteriormente, las muestras, se centrifugaron y en un termociclador se incubaron durante 30 minutos a 16 °C, seguido de 60 ciclos a 30 °C durante 30 segundos, 42 °C durante 30 segundos y 50 °C durante 1 segundo. Finalmente se incubaron a 85 °C durante 5 minutos para inactivar la transcriptasa inversa.

Una vez obtenido el cDNA de las muestras a evaluar, se analizó la pureza y concentración a través de un lector de placa Synergy H1 a partir de 1 μL de muestra. Después, se pasó a preparar el cocktail necesario de reactivos para la RT-qPCR. Se realizaron dos repeticiones técnicas para la PCR por cada muestra a evaluar. Para las muestras en donde se evaluó aal-miR-10-5p, se adicionaron reactivos para una reacción en un tubo de 1.5 mL como se lista en la Tabla 5.

Tabla 5. Componentes de la reacción de amplificación de aal-miR-10-5p.

Reactivos	Volumen (μL)
Agua libre de nucleasas	4,55
SYBR Green	6,25
ROX	0,2
Primer inverso (universal)	1

Primer directo	1
----------------	---

Para las muestras en donde se evaluó el miR-170, se adicionaron reactivos para una reacción en un tubo 1.5 mL como se lista en la Tabla 6.

Tabla 6. Componentes de la reacción de amplificación de miR-170.

Reactivos	Volumen (µL)
Agua libre de nucleasas	4,55
SYBR Green	6,25
ROX	0,2
Primer inverso (universal)	1
Primer directo	1

Posteriormente, se adicionó en una placa para RT-qPCR 13 µL de cocktail por pozo y 1 µL de muestra del cDNA correspondiente a amplificar. Como control negativo de la reacción se usó coctel de reacción sin muestra.

La RT-qPCR se realizó con el siguiente perfil térmico: 2 minutos a 50 °C y 2 minutos a 95 °C, a los cuales le siguieron 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minutos a 60 °C. Para cada tiempo de 24, 48 y 72 horas post-infección, el número de ciclo umbral (Ct) fue determinado por el promedio de las réplicas técnicas de las dos réplicas biológicas. La curva de fusión fue calculada una vez terminada la reacción de PCR.

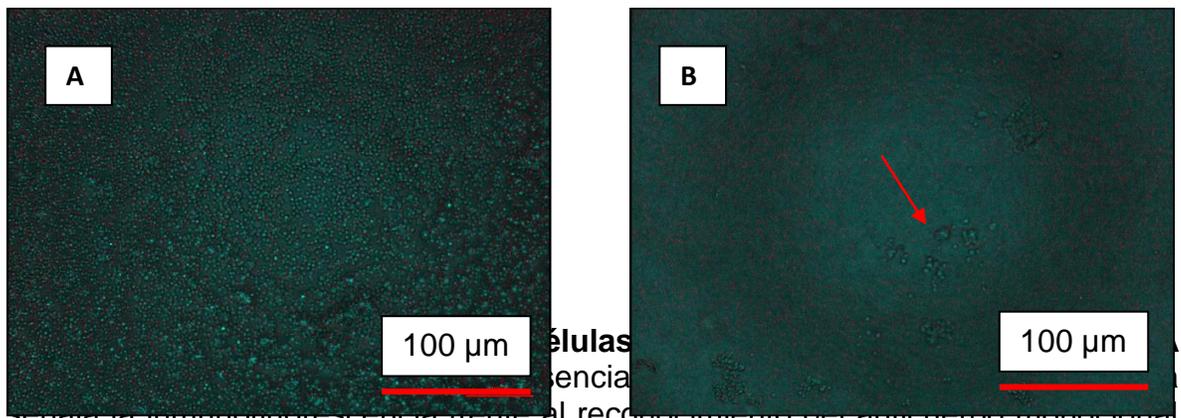
7. RESULTADOS

7.1. Titulación de vDEN-2

El resultado de la titulación por IFI del vDEN-2 con el que se infectaron cultivos celulares C6/36 HT dio a conocer las concentraciones del virus empleadas en el estudio y en las muestras colectadas a las 24, 48 y 72 horas post-infección. En la Tabla 7 se presentan las concentraciones obtenidas para cada una de las muestras tituladas en términos de TCID50/mL a través del cálculo generado por la Ecuación 1. La concentración del vDEN-2 se mantuvo constante en $10^{-9.5}$ TCID50/mL en las muestras infectadas, presentando los valores más altos de concentración vírica, mientras en las muestras control fue de $10^{-0.5}$ TCID50/mL, valor que representa la ausencia de carga viral. En la Figura 5 se observa el resultado de la prueba de inmunofluorescencia.

Tabla 7. Valores de las concentraciones de vDEN-2 tras 24, 48 y 72 horas de infección en células C6/36 HT. RB hace referencia a réplica biológica, RT a réplica técnica y H a horas post-infección.

Muestras tituladas		Concentración (TCID50/mL)
RB1	24H RT1	$10^{-9.5}$
	24H RT2	$10^{-9.5}$
	48H RT1	$10^{-9.5}$
	48H RT2	$10^{-9.5}$
	72H RT1	$10^{-9.5}$
	72H RT2	$10^{-9.5}$
Control	-	$10^{-0.5}$
RB2	24H RT1	$10^{-9.5}$
	24H RT2	$10^{-9.5}$
	48H RT1	$10^{-9.5}$
	48H RT2	$10^{-9.5}$
	72H RT1	$10^{-9.5}$
	72H RT2	$10^{-9.5}$
Control	-	$10^{-0.5}$



señala la inmunofluorescencia frente al reconocimiento del anticuerpo monoclonal al antígeno del virus. La magnitud del objetivo utilizado fue 10X.

7.2. Extracción de RNA

Tras confirmar la infección de los cultivos celulares por vDEN-2 a través de la titulación por IFI, se procedió a la extracción de RNA total de las muestras obtenidas. En la Tabla 8 se muestran las concentraciones de RNA en ng/µL junto con las relaciones de pureza 260/280 y 260/230. Los valores de concentración presentaron valores muy variables, desde 337.309 hasta 2514.9 ng/µL, obteniéndose concentración suficiente de RNA para los procesos a seguir. Los valores de 260/280 para el RNA extraído presentaron valores comprendidos entre 1.887 y 2.01, indicando la obtención de muestras de calidad óptima. Los valores para la relación 260/230 estuvieron entre 0.296 y 1.78, sugiriendo la presencia de compuestos orgánicos debido a la metodología de extracción utilizada.

Tabla 8. Cuantificación de la concentración de RNA (ng/µL). RB hace referencia a réplica biológica, RT a réplica técnica y H a horas post-infección.

Muestra	260/280	260/230	ng/µL	Muestra	260/280	260/230	ng/µL
24H RB1 RT1	1.948	0.591	831.076	24H RB2 RT1	1.972	1.361	2514.9
48H RB1 RT1	2.006	0.647	659.096	48H RB2 RT1	2.013	1.287	1980.983
72H RB1 RT1	1.989	0.715	378.021	72H RB2 RT1	1.993	1.366	2478.303
24H RB1 RT2	2.01	0.76	606.073	24H RB2 RT2	2.05	1.78	1218.234
48H	2.004	0.878	1316.677	48H	1.934	0.663	1158.764

RB1 RT2				RB2 RT2			
72H RB1 RT2	1.887	0.517	610.611	72H RB2 RT2	1.897	0.855	1134.388
Mock RB1	1.984	0.944	1176.504	Mock RB2	1.904	0.296	337.309

7.3. Detección de miRNAs

Una vez extraído el RNA total de las muestras con calidad y en cantidades adecuadas, se realizó la transcripción inversa para la obtención de cDNA, en donde se hizo uso de primers stem-loops específicos previamente diseñados para la amplificación de cada uno de los miRNAs a evaluar: aal-miR-10-5p (miRNA de referencia) y miR-170 (miRNA de interés). En la Tabla 9 se muestran las concentraciones de cDNA en ng/ μ L para cada una de las muestras obtenidas. Los valores fluctuaron entre 248.489 y 601.18 ng/ μ L, obteniéndose así muestras con concentraciones suficientes para la reacción de PCR en tiempo real.

Tabla 9. Cuantificación de la concentración de cDNA (ng/ μ L). RB hace referencia a réplica biológica, RT a réplica técnica y H a horas post-infección.

miRNA	Muestra réplica biológica 1	ng/ μ L	Muestra réplica biológica 2	ng/ μ L
aa-miR-10- 5p	24H RB1 RT1	601.18	24H RB2 RT1	544.024
	48H RB1 RT1	488.4	48H RB2 RT1	584.898
	72H RB1 RT1	464.315	72H RB2 RT1	543.23
	24H RB1 RT2	444.433	24H RB2 RT2	390.229
	48H RB1 RT2	516.475	48H RB2 RT2	377.796
	72H RB1 RT2	402.633	72H RB2 RT2	414.132
	Mock RB1	368.341	Mock RB2	250.101
miR-170	24H RB1 RT1	505.084	24H RB2 RT1	412.052
	48H RB1 RT1	428.877	48H RB2 RT1	459.249
	72H RB1 RT1	416.768	72H RB2 RT1	480.22
	24H RB1 RT2	408.198	24H RB2 RT2	381.643
	48H RB1 RT2	385.587	48H RB2 RT2	370.069
	72H RB1 RT2	370.679	72H RB2 RT2	347.121
	Mock RB1	373.405	Mock RB2	248.489
	Control Positivo	362.865		

Tras la obtención de muestras de cDNA de los miRNAs a evaluar, se realizó la RT-qPCR para la determinación de la presencia de miR-170, usando a aal-miR-

10-5p como miRNA constitutivo. En la Tabla 10 se exponen los datos obtenidos de los promedios de Ct de las muestras de 24, 48 y 72 horas post-infección con vDEN-2, de las células sin infección por el virus (mock), y de los controles negativos de aal-miR-10-5p y miR-170 (cocktail de amplificación sin muestra de cDNA), así como del control positivo para miR-170 (miRNA sintético). En la sección de Anexos se presentan los resultados de amplificación para las muestras controles negativas de aal-miR-10-5p y miR-170, y para la muestra control positiva de miR-170.

Tabla 10. Valores de Ct promedio y desviación estándar promedio para las muestras de 24, 48 y 72 horas post-infección con vDEN-2, mock, control positivo de miR-170, y controles negativos para aal-miR-10-5p y miR-170.

miRNA	Muestra	Ct promedio	Desviación Estándar Promedio
aal-miR-10-5p	Mock	No determinado	No determinado
	24H	35.11	1.58
	48H	36.49	2.02
	72H	35.00	1.14
	Control negativo	No determinado	No determinado
miR-170	Mock	29.75	0.67
	24H	26.39	1.50
	48H	27.33	1.36
	72H	28.53	1.10
	Control positivo	27.90	0
	Control negativo	36.19	0.26

El control positivo de miR-170 (oligo sintético) presentó un Ct promedio de 27.90 con 0 desviación estándar promedio, con una curva de fusión (Figura 6) bien definida a 84 °C aproximadamente, sin presencia de dímeros de primers. El control negativo para miR-170 (cocktail sin muestra) presentó una amplificación con un Ct promedio de 36.19 y 0.26 de desviación estándar promedio. Su curva de fusión (Figura 6) presenta un pico pequeño a 76 °C (amplificación de dímeros de primers). Por otro lado, el control negativo para aal-miR-10-5p no presentó amplificación alguna, como se puede apreciar en su curva de fusión (Figura 6), en donde solo se presentó un pico a una temperatura de 78 °C aproximadamente, el cual hace referencia a la amplificación de dímeros de primers y no del miRNA en cuestión.

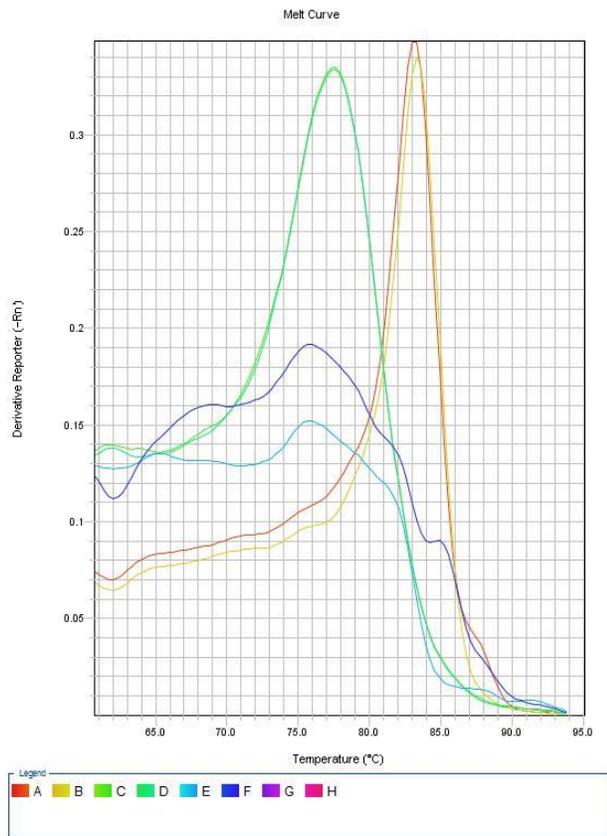


Figura 5. Curva de fusión para controles negativos de aal-miR-10-5p y miR-170, y para control positivo de miR-170. La curva roja y amarilla pertenecen al control positivo de miR-170; la curva azul claro y oscuro pertenecen al control negativo de miR-170 y la curva verde clara y oscura pertenecen al control negativo de aal-miR-10-5p.

Las muestras de células sin infección (mock) en donde se evaluó la presencia de miR-170 presentó un Ct promedio de 29.75, con una desviación estándar promedio de 0.67. Su curva de fusión (Figura 7-B) presentó dos picos de amplificación: a 80 °C (dímeros de primers) y 85 °C (miR-170). Por otro lado, la muestra mock para la evaluación de aal-miR-10-5p no presentó amplificación alguna. En la Figura 7-A se puede observar la curva de fusión para el resultado de amplificación de este miRNA, en donde se presentó un pico bien definido en 76 °C, aproximadamente, referido a dímeros de primers.

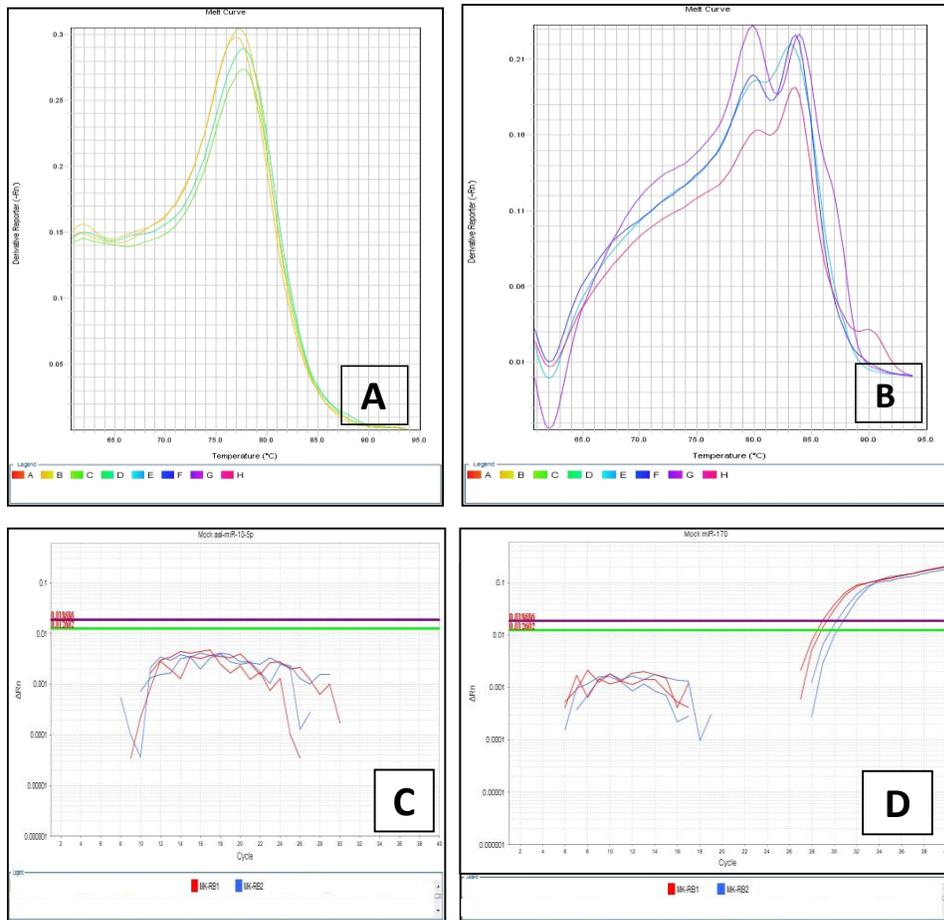


Figura 6. Curva de fusión muestras sin infección (mock) de aal-miR-10-5p (A) y miR-170 (B) y gráfica de la amplificación de aal-miR-10-5p (C) y miR-170 (D). En A se presenta un pico de amplificación a 76 °C (dímero de primers), sin amplificación de aal-miR-10-5p. B, por otra parte, presentó dos picos de amplificación: a 80 (dímero de primers) y 85 °C (miR-170), aproximadamente. En C el gráfico ΔRn vs el número de ciclos muestra las curvas de amplificación para estimar los valores de Ct. La línea horizontal verde hace referencia al threshold, se presentan las muestras sin amplificación alguna. En D el gráfico ΔRn vs el número de ciclos muestra las curvas de amplificación para estimar los valores de Ct. La línea horizontal morada hace referencia al threshold para el miRNA amplificado. Se presenta amplificación en ciclos 27 y 28, aproximadamente.

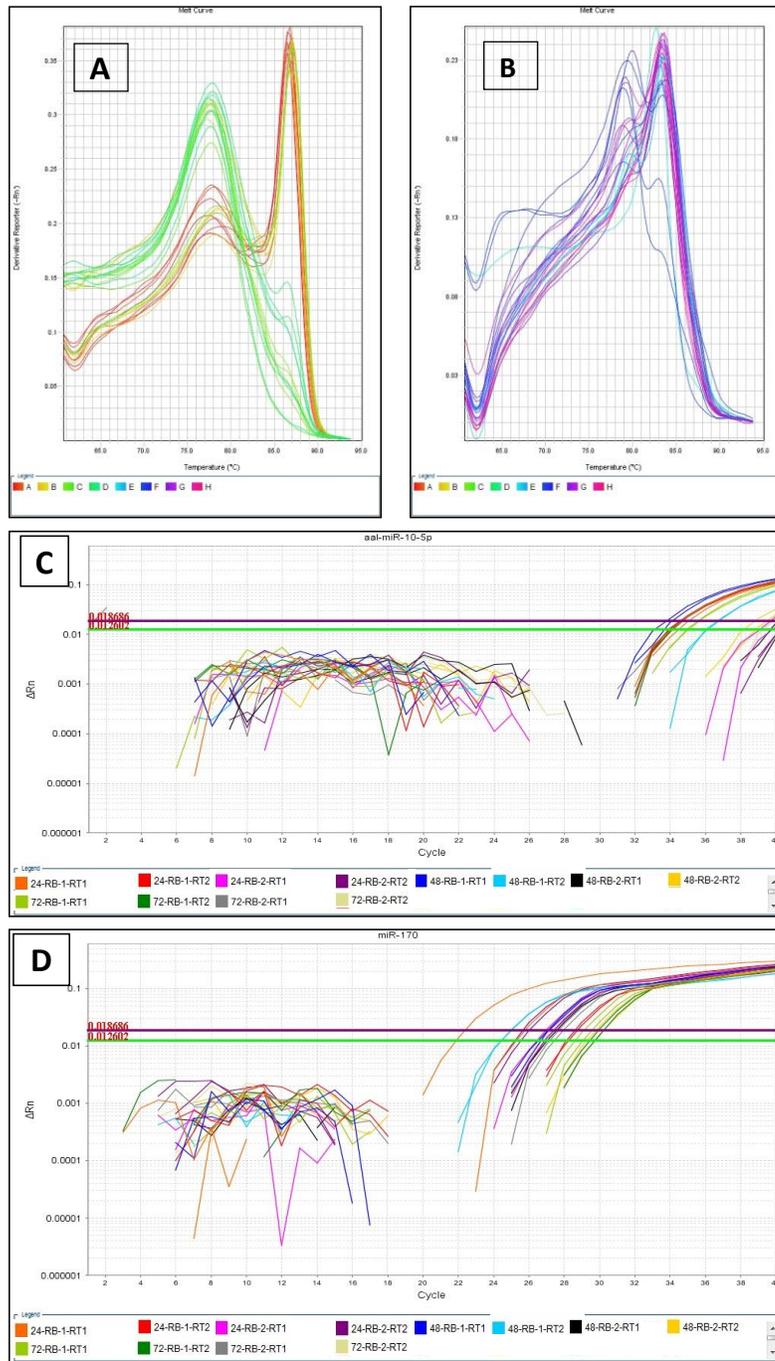
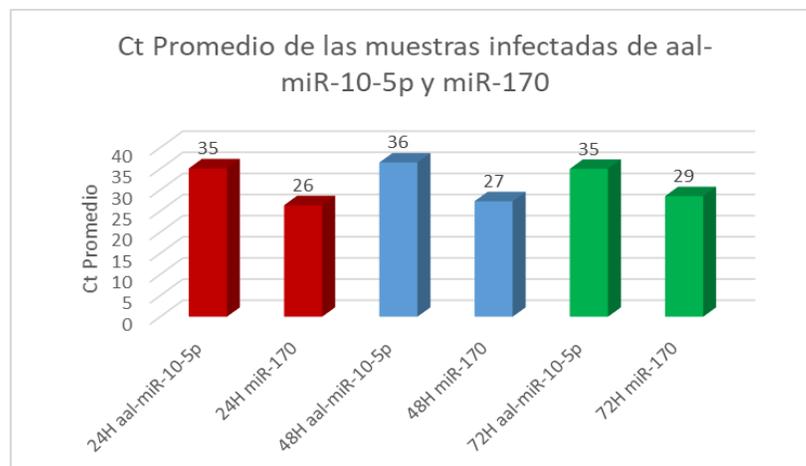


Figura 7. Curva de fusión para las muestras de 24, 48 y 72 horas post-infección con vDEN-2 de aal-miR-10-5p (A) y miR-170 (B) y gráficas de la amplificación de muestras infectadas de aal-miR-10-5p (C) y miR-170 (D). En A se presentan dos picos de amplificación: 78 (dímero de primers) y 86 °C (aal-miR-10-5p), aproximadamente. B presentó dos picos de amplificación: a 80 (dímero de primers) y 84 °C (miR-170), aproximadamente. En C el gráfico ΔRn vs

el número de ciclos muestra las curvas de amplificación para estimar los valores de Ct. La línea horizontal verde hace referencia al threshold. Se presentan las muestras sin amplificación alguna. En D el gráfico ΔRn vs el número de ciclos muestra las curvas de amplificación para estimar los valores de Ct. La línea horizontal morada hace referencia al threshold para el miRNA amplificado. Se presenta amplificación en ciclos tempranos, desde el número 20 aproximadamente.

Las muestras infectadas por vDEN-2 en donde se evaluó la presencia de aal-miR-10-5p presentaron amplificación en Ct promedios 35 a 36.49, con una desviación estándar promedio que varió desde 1.14 hasta 2.02. En la Figura 8-A se presenta la curva de fusión para el resultado de amplificación de este miRNA en células infectadas por vDEN-2, en donde se pueden observar dos picos a 78 (amplificación de dímeros de primers) y 86 °C (amplificación de miRNA), aproximadamente. Por otro lado, la amplificación de miR-170 se dió en Ct promedios que fueron desde 26.39 (24H) hasta 28.52 (72H), mostrando una tendencia ascendente en el tiempo, con una curva de fusión que presentó dos picos a 80 (amplificación de dímero de primers) y 84 °C (amplificación de miRNA), aproximadamente (Figura 8-B). En la Gráfica 1 se comparan los comportamientos de los Ct promedio para cada hora post-infección de las muestras de aal-miR-10-5p y miR-170. Debido a la no amplificación de las muestras mock para el gen de referencia, no se pudo realizar la cuantificación relativa a través del método propuesto por Livak *et al.*, (2001).



Gráfica 1. Comparación de valores Ct promedios para muestras de células 24, 48 y 72 horas post-infección de aal-miR-10-5p y miR-170.

8. DISCUSIÓN

Para la titulación de vDEN-2, se determinó la concentración del mismo como la media dosis infecciosa en tejido tisular por mililitro (TCID₅₀/mL). Los resultados arrojados mostraron una alta viremia (en la escala de la técnica de titulación) en las muestras evaluadas de células C6/36 HT infectadas por vDEN-2. Para las muestras control (células no infectadas) se obtuvieron los valores más bajo de viremia, indicando la ausencia del virus (Tabla 7). Estos resultados confirman la obtención de muestras adecuadas para el objetivo del estudio.

Tras la obtención de células infectadas por vDEN-2, se obtuvieron los valores resultantes de la cuantificación del RNA extraído de las muestras, los cuales presentan concentraciones variables, desde 378 hasta 2514.9 ng/μL (Tabla 8). Diversas razones pudieron influir en la concentración de RNA obtenido tras el proceso de extracción y purificación, como la cantidad de células en la muestra, o el proceso de extracción manual, en donde se hizo uso de compuestos orgánicos (fenol, cloroformo) que pueden llevar a la degradación del material y a una baja relación de análisis 230/260 (Maniatis *et al.*, 1982). Para el experimento, se obtuvieron valores entre 0.57 y 1.36, lo cual indica una pureza variable en las muestras y relativamente baja. Por otro lado, la relación 260/280 se utiliza para evaluar la contaminación por proteínas en las extracciones de RNA, las cuales pueden quedar durante el proceso de aislamiento de ácidos nucleicos. Cuando este valor es cercano a 2, se considera una pureza adecuada del RNA extraído (Osorio *et al.*, 2013). Al momento del análisis, se obtuvieron valores entre 1.88 y 2.01, lo cual indica un RNA de buena calidad. El mismo comportamiento sigue el cDNA resultante de la transcripción inversa, con valores de concentración variables desde 248 hasta 601 ng/μL (Tabla 9). Es importante tener en cuenta estos parámetros, debido a que la pureza del ARN puede afectar la eficiencia de la transcripción reversa y, por consiguiente, la reacción de qPCR.

Teniendo en cuenta lo anterior, los valores de Ct promedios obtenidos durante la RT-qPCR (Tabla 10) para las muestras del control negativo del miRNA de referencia (constitutivo), aal-miR-10-5p, no se determinaron pues no hubo una amplificación del miRNA durante los ciclos establecidos. Como se puede observar en la Figura 6, el pico de su curva de fusión se encuentra en una temperatura de 78 °C, correspondiente a los dímeros de primers. Lo mismo ocurrió con el mock para el mismo miRNA (Figura 7-A), en donde se tuvo un pico a una temperatura de 76 °C y no hubo amplificación alguna (Figura 7-C). Para corroborar que no fuese un error de metodología, se utilizó el control positivo para miR-170, el cual constó de un oligo sintetizado con la secuencia del miRNA. Este tuvo una amplificación con un Ct promedio de 27.90 y 0 desviación estándar promedio (Tabla 10), lo cual indica que la transcripción inversa con el uso de primers stem-loop fue exitosa, y que la estandarización de la metodología como un paso inicial fue acertada. En el control negativo de miR-170 se obtuvo un Ct promedio durante

la amplificación de 36.19; sin embargo, al analizar la curva de fusión (Figura 6), se encuentra un pico con una temperatura de fusión de 76 °C, diferente al pico de amplificación del control positivo, con una temperatura de fusión alrededor de los 84 °C, lo cual indica una amplificación de dímeros de primers más no del miR-170, por lo que el ciclo de amplificación que arrojan los resultados puede deberse a esta señal de dímeros.

Si bien el caso de las muestras control del miRNA de referencia, aal-miR-10-5p, se presentó para algunas de las muestras infectadas por vDEN-2 en donde se evaluó la presencia del mismo, los Ct promedio para las muestras que se amplificaron presentan valores altos, entre 35.00 y 36.49 (Figura 8-C), con una desviación estándar promedio que va desde 1.14 hasta 2.02 (Tabla 10), lo cual sugiere una poca concentración del miRNA en las células evaluadas aún con el mejor dato obtenido. En la Figura 8-A se presenta la curva de fusión correspondiente, en donde se pueden observar dos picos muy pronunciados a 78 y 86 °C, referentes a la amplificación de dímero de primers y del miRNA en cuestión, respectivamente, lo cual permitiría recomendar una modificación en la preparación del cocktail de PCR para prevenir la síntesis de los dímeros de primers que pueden sesgar los resultados cuando se usa un intercalante fluorescente tan inespecífico como SYBR Green. A pesar de que Batz *et al.*, 2017, obtuvieron una eficiencia de PCR del 102% durante su estudio para este miRNA como housekeeping en un ensayo con células C6/36 HT infectadas por vDEN, es evidente que en este caso no se puede considerar válido como una molécula constitutiva en las células de *Ae. albopictus*, impidiendo así la cuantificación relativa del miRNA de estudio a través de métodos como el de Livak *et al.*, 2001. Se sugiere, para futuros trabajos, el uso de la proteína ribosomal S17 (RPS17) y actina como genes de referencia para una reacción de PCR (Dzaki, *et al.*, 2017), lo cual podría ayudar a obtener mejores resultados y lograr la cuantificación relativa de la expresión de miR-170.

Los valores de Ct promedio para las muestras infectadas por vDEN-2 de 24, 48 y 72 post-infección fueron cercanos a los presentados por la muestra control (miR-170 sintético): 26.39, 27.33 y 28.53, respectivamente, con desviaciones estándar promedio de 1.50, 1.36 y 1.10 (Tabla 10, Figura 8-D). Estos resultados podrían indicar una concentración considerable del miR-170 en las células de mosquito infectadas, dándose así una amplificación en ciclos relativamente tempranos durante la PCR (Figura 8-D). En la curva de fusión (Figura 8-B) se presentaron dos picos correspondientes a la amplificación de dímeros de primers, a una temperatura de 80 °C, y a la amplificación del miRNA en cuestión, a 84 °C, lo cual podría sugerir una mejora en el proceso de amplificación a través de la disminución de la cantidad de primers agregada al cocktail de amplificación, y de un aumento en la cantidad de muestra de cDNA evaluada, así como la modificación del programa térmico seguido en la reacción de PCR. Sin embargo, no todas las muestras evaluadas presentaron el pico correspondiente a dímero de primers, lo cual podría calificar como aceptable la metodología seguida como un ensayo preliminar.

En la Gráfica 1 se puede observar una comparación de los resultados obtenidos para las muestras infectadas evaluadas para el miRNA de referencia y el de estudio. Teniendo en cuenta las dificultades obtenidas con el aal-miR-10-5p, los valores de Ct promedio no fluctúan en gran medida entre sí: varían en poco más de una unidad entre las 24, 48 y 72 horas desde que ocurre la infección por el vDEN-2. Sin embargo, los valores de Ct promedio para miR-170 parecen aumentar conforme avanza el tiempo de infección en la célula, lo cual podría sugerir una mayor concentración de miR-170 a las 24 horas en comparación a las 48 y 72 horas post-infección, en el primer ciclo de replicación del virus.

Para las muestras mock control de miR-170, se obtuvo un valor promedio de Ct de 29,75, con una desviación estándar promedio de 0.67 (Tabla 10). Al analizar la curva de fusión (Figura 7-B) se obtuvieron dos picos, lo cual sugiere que la señal de amplificación pudo deberse a dímeros de primers (Figura 7-D), ya que se usó una cantidad considerable de los mismos, siendo poco significativo este resultado. Campillo-Pedroza, 2015, encontró la expresión de miR-170 en células Vero sin infección con un Cq promedio de 38.77, lo cual no se consideró como una amplificación significativa. No obstante, si este no fuese del todo el caso, se abre una incógnita frente al origen del miRNA y su presencia en células no infectadas, tanto de mosquito como de mamífero.

Cabe anotar que estos resultados podrían estar sesgados ya que, una vez extraído el RNA total de las muestras, no se homogeneizó la concentración a un único valor en las mismas y, al tomar 1 μ L para la transcripción inversa para obtener cDNA, pudo haberse tomado más RNA en algunas muestras, dando lugar a una variación significativa en la concentración del cDNA y afectando de la misma forma la cantidad de muestra a evaluar en la PCR.

En general, este proyecto es un ejercicio inicial de estandarización para la extracción y determinación de miRNAs a partir de RNA total. La presencia de miR-170 en células de *Aedes albopictus* C6/36 HT fue determinada a través de la amplificación por RT-qPCR, pero no se logró cuantificar su nivel de expresión. Aunque es necesaria la estandarización de la metodología utilizada, este estudio permite pensar en el área de la bioinformática como un gran apoyo en la búsqueda de métodos que permitan el desarrollo de herramientas diagnóstico y control para la infección por vDEN-2.

9. CONCLUSIONES

- El miRNA 170, predicho *in silico*, se detectó en células C6/36 HT infectadas por vDEN-2 mediante PCR en tiempo real.
- La amplificación de miR-170 se observó en ciclos tempranos, lo que podría indicar alta expresión en las células infectadas.
- La expresión de miR-170 podría ser mayor a las 24 horas post-infección, cuando empieza el ciclo de replicación del virus, y disminuye con el tiempo a medida que se establece en el organismo huésped del mosquito.
- El miRNA aal-miR-10-5p, no es un buen miRNA de referencia en células C6/36 HT de *Aedes albopictus* debido a que no se amplificó en ciclos tempranos durante la RT-qPCR para las muestras infectadas por vDEN-2, ni se amplificó en las muestras mock.
- Con el desarrollo de este trabajo se logró iniciar la estandarización de una metodología de bajo costo para la detección de miRNAs, a través de la extracción de miRNAs a partir de RNA total con primers stem-loop y su amplificación por RT-qPCR.

10.RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos con este trabajo, para proyectos futuros se recomienda:

- Se debe homogeneizar la concentración de RNA total que se va a someter a transcripción inversa para la generación de cDNA, de tal forma que se parta de una misma concentración y se disminuya el sesgo muestral por el azar.
- Se debe contar con más de un gen de referencia para evitar la no determinación de datos y la falta de resultados importantes. Para las células C6/36 HT se recomienda actina y la proteína ribosomal S17 (RPS17).
- Se sugiere estandarizar el ensayo de la reacción de amplificación con el objetivo de disminuir la proporción de dímeros de primers y aumentar los valores de Ct obtenidos por muestra.
- Sintetizar un control positivo para el gen de referencia (en este caso aal-miR-10-5p).
- El producto de la amplificación por RT-qPCR de las muestras evaluadas con primers para miR-170 debe ser secuenciado para verificar los resultados.
- Evaluar miR-170 en células de mosquito infectadas con los serotipos de vDEN 1,3 y 4.

11.REFERENCIAS

- Astrid Research. (Enero de 31 de 2013). miRNA Design Tool developed. Obtenido de <http://genomics.dote.hu:8080/mirnadesigntool/index.jsp>
- Attatippaholkun WH, A. M. (2000). A novel method for the preparation of large cDNA fragments from dengue-3 RNA genome by long RT-PCR amplification. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 126-133.
- Batz, Z., Goff, A., & Armbruster, P. (2017). MicroRNAs are differentially abundant during *Aedes albopictus* diapause maintenance but not diapause induction. *Insect Molecular Biology*, 721 - 733.
- Berezikov, E., Cuppen, E., & Plaste, R. (2006). Approaches to microRNA discovery. *Nature Genetics*, 52 - 57.
- Caicedo Burbado, P. A. (2016). *Identificación de genes relacionados con la respuesta inmune innata de Aedes aegypti a la infección por virus dengue*. Cali: Universidad del Valle.
- Campillo Pedroza, N. (2015). *IDENTIFICACIÓN DE UN PEQUEÑO RNA VIRAL TPO miRNA DE DENV2 Y SU BLANCO FUNCIONAL MEDIANTE BIOLOGÍA COMPUTACIONAL Y MOLECULAR*. Medellín.
- Castillo, J. A., Castrillón, J. C., Diosa-Toro, M., Betancur, J. G., St Laurent III, G., Smit, J., & Urcuqui-Inchima, S. (2016). Complex interaction between dengue virus replication and expression of miRNA-133a. *BMC Infectious Diseases*, 1 - 12.
- Cortés, F. M., Gómez, S. Y., Ocazonez, R. E. (2007). Subtipos de virus dengue serotipos 2, 3 y 4 aislados en el Departamento de Santander, Colombia. *Rev Cubana Med Trop*, 186-192.
- Dzaki, N., Ramli, K. N., & Azzam, G. (2017). Evaluation of reference genes at different developmental stages for quantitative real-time PCR in *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, 1-13.
- Friebe, P., & Harris, E. (2010). Interplay of RNA Elements in the Dengue Virus 5' and 3' Ends Required for Viral RNA Replication. *Journal of Virology*, 6103 - 6118.
- Gubler, D. J. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 480 - 496.
- Huang, J., Borchert, G. M., Dou, D., Huan, J., Lan, W., Tan, M., & Wu, B. (2017). *Bioinformatics in MicroRNA Research*. New York: Springer Nature.
- Hussain, M., & Asgari, S. (2014). MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2746 – 2751.
- INS. (11 de Junio de 2014). *DENGUE*. Obtenido de Instituto Nacional de Salud: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Dengue.pdf>
- INS. (25 de Diciembre de 2016). *Boletín Epidemiológico Semana*. Obtenido de Instituto Nacional de la Salud: <http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Vista-Boletin-Epidemilogico.aspx>

- INS. (25 de Diciembre de 2017). *Boletín Epidemiológico Semanal*. Obtenido de Instituto Nacional de Salud: <http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Vista-Boletin-Epidemiologico.aspx>
- INS. (22 de Abril de 2018). *Boletín Epidemiológico Semanal*. Obtenido de Instituto Nacional de Salud: <http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%202017.pdf>
- Janssen, H., Reesink, H., Lawitz, E., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., . . . Hodges, M. (2013). Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *The New England Journal of Medicine*, 1685 - 1694.
- Kyle, J., & Harris, E. (2008). Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol.*, http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.micro.62.081307.163005?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&
- Langlois, R., Shapiro, J., Pham, A., & tenOever, B. (2012). In vivo delivery of cytoplasmic RNA virus-derived miRNAs. *Molecular Therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 367 - 375.
- Li, H., Jiang, J.-D., & Peng, Z.-G. (2016). MicroRNA-mediated interactions between host and hepatitis C virus. *World Journal of Gastroenterology*, 1487 - 1496.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2002). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-(delta(deltaCt)) Method. *Applied Biosystems*, 402-408.
- Maher Abdelfattah, A., Park, C., & Choi, M. Y. (2014). Update on non-canonical microRNAs. *Biomol Concepts*, 275 - 287.
- Méndez, J. A., Usme-Ciro, J. A., Domingo C., Rey, G. J., Sánchez J. A., Tenorio, A., Gallego-Gómez, J. C. (2012). Phylogenetic reconstruction of dengue virus type 2 in Colombia. *Virology Journal*, 1-11.
- Miyoshi, K., Miyoshi, T., & Siomi, H. (2010). Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics*, 95 - 103.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *DENGUE: GUÍAS PARA LA ATENCIÓN DE ENFERMOS EN LA REGIÓN DE LAS AMÉRICAS. 2nd Edición*. Obtenido de Hospital Infantil Dr. Robert Reid Cabral: <http://www.hirrc.org/Gu%C3%ADa%20dengue%20OPS%202016.pdf>
- Ospina Bedoya, M., Campillo Pedroza, C., Franco Salazar, J. P., Gallego Gómez, J. C. (2014). *Computational Identification of Dengue virus MicroRNA-Like Structures and their Cellular Targets. Bioinformatics and Biology Insights*, 169-176.
- Osorio, J., Pachajoa, H., & Hurtado, P. (2013). Concentración y pureza del ADN de muestras sanguíneas en papel Whatman FTA almacenadas entre 1 a 3 años. *Revista Estomatología*, 21(1).
- Ouellet, D. L., & Provost, P. (2010). MicroRNAs and non-coding RNAs in virus-infected cells. *Methods Mol Biol.*, 35-65.

- Pabón Martínez, V. (2011). MicroARNs: una visión molecular. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 289 - 297.
- Shunmin, H., Zhen, Y., Geir, S., Fei, R., Hongliang, C., Haitao, Z., . . . Yi, Z. (2008). The Properties and Functions of Virus Encoded microRNA, siRNA, and Other Small Noncoding RNAs. *Critical Reviews in Microbiology*, 175 - 188.
- Skalsky, R., & Cullen, B. (2010). Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annu Rev Microbiol.*, 123 - 141.
- Tuiskunen Bäck, A., & Lundkvist, Å. (2013). Dengue viruses – an overview, Infection Ecology & Epidemiology. *Infection Ecology & Epidemiology - Volume 3*, 1 - 21.
- Twiddy, S. S., Farrar, J. J., Chau Vinh, N., Wills, B., Gould, E. A., Gritsun, T., Lloyd, G., Holmes, E. C. (2002). Phylogenetic Relationships and Differential Selection Pressures among Genotypes of Dengue-2 Virus. *Virology – Volume 298*, 63-72.
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., & Hellens, R. P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3 - 12.
- Yanhe Zhou, Y. L. (2014). miR-281, an abundant midgut-specific miRNA of the vector mosquito *Aedes albopictus* enhances dengue virus replication. *Parasites & Vectors*, 1 - 11.

ANEXO

En la Figura 9 se muestra el proceso de amplificación para los controles negativos de aal-miR-10-5p y miR-170 (coctel de amplificación sin muestra de cDNA), así como del control positivo para miR-170 (miRNA sintético).

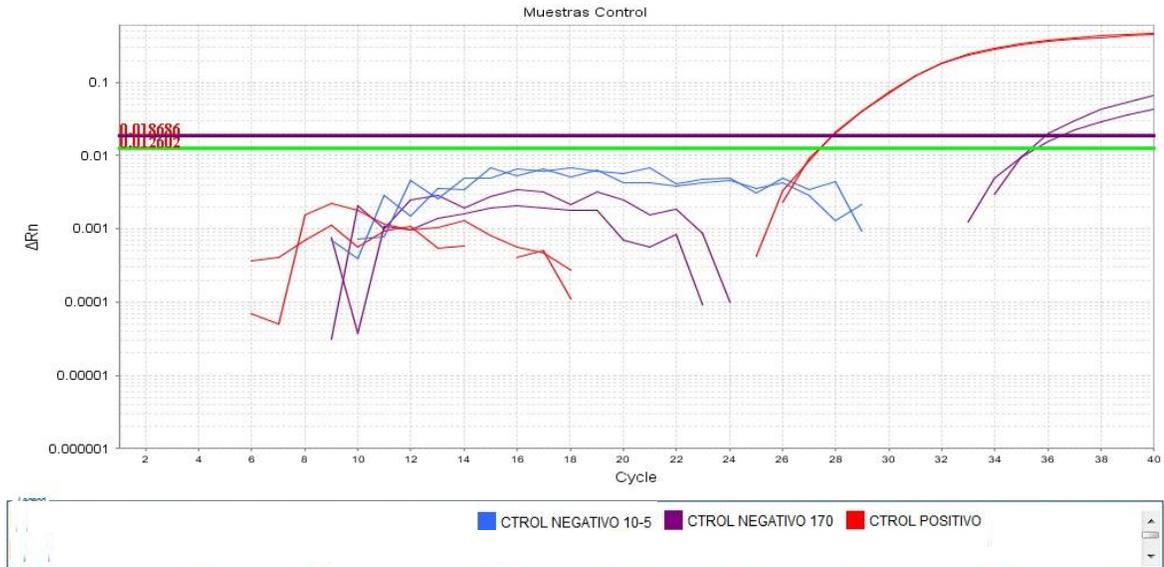


Figura 9. Proceso de amplificación para las muestras controles negativas de aal-miR-10-5p y miR-170, y para la muestra control positiva de miR-170. El gráfico ΔR_n vs el número de ciclos muestra las curvas de amplificación para estimar los valores de Ct. Las líneas horizontales morada y verde hacen referencia al threshold para miR-170 y aal-miR-10-5p, respectivamente.