

**EVALUACIÓN FUNCIONAL DE UN GEN ASOCIADO A LA RESPUESTA
INMUNE INNATA DE DOS CEPAS DE *Aedes aegypti* QUE DIFIEREN EN
SU SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE-2.**

KATHEREEN GONZÁLEZ RÍOS

CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES
MÉDICAS (CIDEIM)
UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
SANTIAGO DE CALI
2018

**EVALUACIÓN FUNCIONAL DE UN GEN ASOCIADO A LA RESPUESTA
INMUNE INNATA DE DOS CEPAS DE *Aedes aegypti* QUE DIFIEREN EN
SU SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE-2.**

Katherineen González Ríos

Proyecto de grado para optar al título de pregrado en biología

Dirigido por:

Paola Andrea Caicedo Burbano, PhD

CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES
MÉDICAS (CIDEIM)
UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
SANTIAGO DE CALI
2018

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme tener vida y salud, además de brindarme la fortaleza, capacidad y la esperanza para culminar este trabajo.

A mi madre Leonor y mi padre Mauricio, que han sabido formarme con buenos valores, hábitos y sentimientos, lo cual me ha ayudado a afrontar cualquier situación, además de enseñarme a no desfallecer ni rendirme ante los obstáculos y siempre perseverar a través de su apoyo, amor incondicional y la sabiduría de sus consejos, los amo inmensamente.

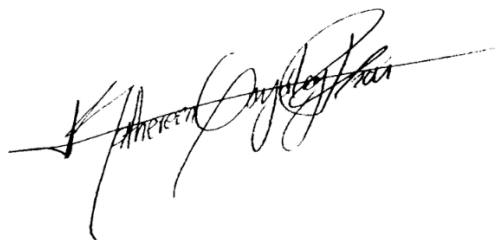
A mi enamorado Luis, por el apoyo, la paciencia, motivación y el amor que me has brindado durante estos años, el cual ha sido fundamental, y por tus ánimos y buenos deseos para finalizar con éxito este trabajo, muchas gracias amor.

A mi hermano Andrés, por ser un gran amigo para mí, que junto con tus ideas y travesuras hemos compartido momentos inolvidables y te has convertido en uno de los seres más importantes en mi vida.

A mi abuelita Ana Nelly, que a pesar de que no te tuve en mi vida por mucho tiempo, te recuerdo con mucho amor durante tu ayuda en mi crianza y la excepcional persona que eras. Y a mi abuelito Julio, por su constante amor y apoyo y por ser el que siempre buscó satisfacer hasta los más pequeños antojos de su querida nieta.

A mi familia en Francia, que a pesar de la distancia que nos separan, siempre han estado presentes en mi vida, brindándome su amor y apoyo.

“La paz eterna es vivir con amor el presente”- Siddharta Gautama

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'K. A. M. R. P.' with a long horizontal line extending to the right.

AGRADECIMIENTOS

Muchas veces la vida pasa sin advertirnos del alto valor que tienen las personas que nos rodean. El papel que desempeñan en nuestras vidas, hasta en el más pequeño detalle de nuestros momentos cotidianos. Solo esperamos de momentos especiales para reconocer alguna fortuita o inverosímil acción que hayamos percatado, y así realizar dicha acción de gratitud. Por esta razón quiero entregar mis disculpas y a su vez ofrecer un inmenso agradecimiento a todas las personas que me han brindado su amor, paciencia, apoyo, comprensión y tiempo en el transcurso de mi vida y formación profesional.

En primer lugar, agradezco a la Universidad ICESI por haberme aceptado ser parte de ella y formarme en el ámbito científico. Al Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones médicas (CIDEIM) por permitirme realizar mi trabajo de grado en su institución y brindarme las herramientas para culminar este proceso.

Debo agradecer de manera especial y sincera a la Profesora Paola Andrea Caicedo por aceptarme como estudiante para realizar este proyecto de grado bajo su dirección. Por su dedicación, apoyo, paciencia y confianza en mí, además de sus innumerables esfuerzos por la revisión que ha realizado en este trabajo y sus apreciables sugerencias en situaciones de duda.

Un sincero agradecimiento por los amigos que he encontrado en el transcurso de mi carrera universitaria, a mis compañeros y a todas aquellas personas que de una u otra manera me han ayudado para el logro de mis objetivos y el éxito de mi trabajo.

A todos ustedes mi mayor y profundo agradecimiento.

APROBADO POR:



(Juliana Rengifo Gómez)

Evaluador



(Paola Andrea Caicedo Burbano)

Tutor del Proyecto.



(Clara Ocampo)
Co-Tutor del Proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE ANEXOS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	14
2.1 Planteamiento del problema de investigación y justificación.....	14
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	16
3.1 El dengue – enfermedad.....	16
3.2 El virus dengue.....	16
3.3 El vector y ciclo de transmisión.....	18
3.4 Epidemiología del dengue.....	19
3.5 Interacción vector-patógeno.....	21
3.5.1 Competencia vectorial:.....	21
3.5.2 Respuesta inmune innata en insectos.....	23
3.5.3 Gen <i>Antibacterial peptide</i> (AAEL000598).....	25
4. OBJETIVOS.....	26
5. METODOLOGÍA UTILIZADA.....	27
5.1 Mantenimiento de cepas de <i>Aedes aegypti</i>	27
5.2 Cultivo celular.....	28
5.3 Amplificación del vDEN-2 en cultivos celulares C6/36 HT.....	28
5.5 Silenciamiento génico mediante RNA de interferencia (RNAi).....	29
- <i>Síntesis de dsRNA y microinyección en cepas de mosquitos</i>	29
- <i>Evaluación del silenciamiento génico</i>	30
- <i>Evaluación del efecto del silenciamiento génico en el proceso infeccioso</i>	32
- <i>Titulación del virus dengue-2</i>	32
- <i>Prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para evaluar la CV de Aedes aegypti a la infección por vDEN-2</i>	34
6. RESULTADOS.....	36
7. DISCUSIÓN.....	45
8. CONCLUSIONES.....	48
9. RECOMENDACIONES.....	49
REFERENCIAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Replicación del virus dengue en la célula huésped (Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann, 2005)	17
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> . (CDC, 2016).....	18
Figura 3. Ciclo de transmisión del virus dengue.....	19
Figura 4. Incidencia de dengue por entidad territorial de procedencia, Colombia, Semana epidemiológica 01-52, 2016. (INS, 2016).	20
Figura 5. Incidencia de dengue por entidad territorial de procedencia, Colombia, Semana epidemiológica 01-52, 2017. (INS, 2017).	21
Figura 6. Barreras tisulares en <i>Aedes aegypti</i> a la transmisión de vDEN (Caicedo et al., 2018)	22
Figura 7. Mecanismo de RNA de interferencia.....	24
Figura 8. Principales vías inmunes innata de <i>Aedes aegypti</i>	25
Figura 9. Alimentador de vidrio cubierto con intestino de cerdo como membrana para la alimentación de mosquitos.....	27
Figura 10. Alimentación artificial en cepas de <i>Aedes aegypti</i> a través de alimentadores de vidrio.....	28
Figura 11. (A) Mosquito microinyectado. (B) Equipos para realizar microinyección manual de mosquitos.....	30
Figura 12. Esquema de placa para titulación de vDEN-2.....	33
Figura 13. Disección de intestinos de <i>Ae. aegypti</i>	35
Figura 14. Visualización del gen + T7 en gel de agarosa al 2%.....	36
Figura 15. Evaluación de la calidad del dsRNA sintetizado..	37
Figura 16. Titulación del vDEN-2.	38
Figura 17. Visualización prueba de actina.	40
Figura 18. Evaluación del silenciamiento del gen <i>Antibacterial peptide</i> en las cepas Cali-S (susceptible), Cali-MIB (Refractaria) y Rockefeller (48 horas post inyección).	42
Figura 19. Prueba de IFI en cabezas e intestinos medios de mosquitos de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller.....	43
Figura 20. Efecto del silenciamiento del gen <i>Antibacterial peptide</i> en la susceptibilidad o la CV en mosquitos de <i>Ae. aegypti</i>	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Primers específicos del gen (Caicedo PA et al., 2018).....	29
Tabla 2. Evaluación de barreras de infección por vDEN-2 en <i>Ae. aegypti</i> . (Basado en (Caicedo PA et al, 2018.)).....	34
Tabla 3. Concentración viral del vDEN-2 expuesto durante proceso de alimentación artificial de las cepas de <i>Ae. aegypti</i>	39
Tabla 4. Individuos totales microinyectados en las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller.....	38
Tabla 5. Extracción de RNA de mosquitos completos colectados a las 48 horas después de la microinyección de las cepas Cali-MIB, Cali-S y Rockefeller.....	39
Tabla 6. Volúmenes de RNA y agua para síntesis de cDNA.....	40
Tabla 7. Valores cuantificación cDNA.	40
Tabla 8. Evaluación de la expresión genica del gen <i>Antibacterial peptide</i>	41
Tabla 9. Efecto del silenciamiento del gen <i>Antibacterial peptide</i> en la CV en mosquitos de <i>Ae. aegypti</i>	43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Genes seleccionados para su caracterización temporal y funcional mediante PCR en tiempo real y RNA de interferencia. (Caicedo PA et al., 2018).	58
Anexo 2. Formato de registro titulación de virus dengue-2 en células c6/36 HT ..	59
Anexo 3. Formato de registro IFI para cabezas e intestinos de mosquitos – CV. (Caicedo PA et al, 2018)	60

RESUMEN

Los virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) representan una amenaza significativa para la salud mundial, especialmente para las regiones tropicales y subtropicales. El virus dengue (vDEN) es un ejemplo de estos, el cual es transmitido principalmente por mosquitos *Aedes aegypti*, y es el agente causal de la enfermedad conocida con el mismo nombre. En la actualidad, se conoce que los mosquitos son capaces de protegerse a la infección del virus, de tal manera que han desarrollado mecanismos para controlar específicamente la replicación del virus y contrarrestar sus efectos, por lo que los factores genéticos juegan un papel muy importante en este proceso. No obstante, es necesario seguir investigando en dichos mecanismos genéticos involucrados en el control de la habilidad de un mosquito vector para adquirir, replicar y transmitir el virus, conocido como competencia vectorial (CV). En CIDEIM se han realizado investigaciones enfocadas en la relación virus-vector a través de mosquitos de *Aedes aegypti* colectados en campo, donde se obtuvieron dos cepas que difieren en su susceptibilidad a la infección por vDEN-2: una cepa susceptible (Cali-S) y otra refractaria (Cali-MIB). En estudios posteriores se identificaron doce genes asociados a la respuesta inmune del mosquito, y se evaluaron cuatro de ellos con la finalidad de brindar información importante de su papel asociado a la respuesta a la infección por vDEN-2. Siguiendo este enfoque, en este estudio se evaluó uno de los ocho genes restantes, el cual corresponde al gen *Antibacterial peptide*, con la finalidad de conocer el papel que desempeña en el proceso de infección por virus dengue en las cepas (Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller), a través del silenciamiento génico utilizando RNA de interferencia (RNAi). En general, se observó que el silenciamiento del gen *Antibacterial peptide* produjo un cambio en el fenotipo de las cepas Cali-S y Rockefeller, disminuyendo su susceptibilidad a la infección por vDEN-2 de 100% a 22% y de 75% a 35%, respectivamente. Mientras que la cepa Cali-MIB no obtuvo ninguna variación (22,2% a 20%). El presente estudio brinda un conocimiento básico sobre el papel que juega el gen *Antibacterial peptide* en el proceso infeccioso por vDEN y en la respuesta inmune asociada a la infección tanto en las cepas seleccionadas (Cali-S y Cali-MIB) como en la cepa de referencia Rockefeller. Esta información podría ser útil para el desarrollo de herramientas que permitan el control de la transmisión del virus.

Palabras claves: Competencia vectorial, virus dengue, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Viruses transmitted by arthropods (arboviruses) represent a significant threat to global health, especially for tropical and subtropical regions. Dengue virus (vDEN) is an example of these, which is transmitted mainly by *Aedes aegypti* mosquitoes, and is the causal agent of the disease known by the same name. At present, it is known that mosquitoes are able to protect themselves against the virus, in such a way that they have been developed to control the replication of the virus and counteract its effects, so that genetic factors are a very important role in this process. However, it is necessary to continue investigating these genetic mechanisms involved in the control of the ability of a vector mosquito to acquire, replicate and transmit the virus, known as vectorial competence (CV). In CIDEIM, investigations focused on the virus-vector relationship have been carried out through *Aedes aegypti* mosquitoes collected in the field, where two strains were obtained that differ in their susceptibility to infection by vDEN-2: a susceptible strain (Cali-S) and another refractory (Cali-MIB). In subsequent studies, twelve genes associated with the mosquito immune response were identified, and four of them were evaluated in order to provide important information on their role associated with the response to vDEN-2 infection. Following this approach, in this study one of the eight remaining genes was evaluated, which corresponds to the *Antibacterial peptide* gene, with the purpose of knowing the role it plays in the process of dengue virus infection in the strains (Cali-S, Cali -MIB and Rockefeller), through gene silencing using RNA interference (RNAi). In general, it was observed that the silencing of the *Antibacterial peptide* gene produced a change in the phenotype of the Cali-S and Rockefeller strains, decreasing their susceptibility to infection by vDEN-2 from 100% to 22% and from 75% to 35%, respectively. While the Cali-MIB strain did not obtain any variation (22.2% to 20%). The present study provides a basic knowledge on the role played by the *Antibacterial peptide* gene in the infectious process by vDEN and in the immune response associated with the infection in both the selected strains (Cali-S and Cali-MIB) and in the strain of Rockefeller reference. This information could be useful for the development of tools that allow the control of the transmission of the virus.

Key words: Vector competition, dengue virus, *Aedes aegypti*.

1. INTRODUCCIÓN

El virus Dengue (vDEN) es un virus de ARN de cadena positiva, el cual pertenece a la familia Flaviviridae, y al género Flavivirus (Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann, 2005). En la actualidad, existen cuatro serotipos del virus estrechamente relacionados, pero antigénicamente distintos, (Dengue-1, -2, -3 y -4) (Sim & Dimopoulos, 2010). A causa del amplio rango de distribución y la constante circulación de los cuatro serotipos en regiones específicas se ha asociado a este virus con un alto potencial pandémico (Padilla JC et al, 2012), lo que conlleva al estudio de las interacciones virus-vector como un particular interés en nuestro país. El virus dengue tiene como vectores principales los mosquitos del género *Aedes*, especialmente *Aedes aegypti*, seguido de *Aedes albopictus*. Por lo general, estos mosquitos se encuentran distribuidos en zonas por debajo de los 2000 msnm, sin embargo, en nuestro país se han encontrado registros en zonas hasta los 2200 msnm (Rodríguez G. & De La Hoz R., 2005).

En Colombia, el dengue es una enfermedad de gran importancia en la salud pública, debido a que es endémica en conjunto a una alta tasa de propagación y transmisión (Padilla JC et al, 2012). En estudios efectuados por la organización panamericana de la salud (OPS), se mostró en Colombia un total de 1.099.333 de casos registrados entre 1978 a 2012. De igual manera, estudios similares exhibieron que en nuestro país existe un predominio hiperendémico principalmente en las regiones de centro oriental y centro occidental, a causa de la circulación simultánea de los cuatro serotipos, además de otros aspectos que contribuyen a la problemática, como lo son la ausencia de una vacuna efectiva, la falta de programas efectivos para el control del vector, los cambios de clima, la urbanización no planificada, entre otros (Padilla JC et al, 2012).

En consecuencia, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) recomiendan realizar investigaciones orientadas en otros aspectos, como lo es la relación vector-patógeno. En la actualidad se conoce que los mosquitos son capaces de protegerse ante la infección por patógenos por medio de su sistema inmune, el cual muestra una respuesta rápida y con similitudes a la respuesta inmune innata de los vertebrados (Lowenberger C., 2001), de tal manera que han desarrollado mecanismos para controlar específicamente la replicación del virus ARN y contrarrestar sus efectos. De este modo, se han encontrado que existen variaciones en diferentes poblaciones de mosquitos en su competencia vectorial (CV), habilidad que tienen para adquirir, replicar y transmitir un patógeno (Caicedo PA et al., 2018). Esta competencia vectorial está implicada por factores genéticos donde está asociado el sistema inmune del mosquito y por las diferentes barreras anatómicas del mosquito que impiden la multiplicación del virus, tales como como la barrera de infección del intestino medio (MIB), la barrera de escape del intestino medio (MEB), La barrera de infección de glándulas salivales (SGIB) y barrera de escape de glándulas salivales (SGEB) (Franz, Kantor, Passarelli & Clem, 2015).

Continuando este enfoque, en el centro de investigación CIDEIM se han realizado investigaciones en la relación virus-patógeno (Barón, Ursic-Bedoya, Lowenberger & Ocampo, 2010; Ocampo C et al, 2013; Caicedo PA et al, 2013), en donde se seleccionaron mosquitos de *Ae. aegypti* colectados en campo para obtener cepas que difieren en su competencia vectorial o susceptibilidad a la infección por el vDEN, una cepa susceptible (Cali-S) y otra refractaria (Cali-MIB). Luego, a través de estas cepas, con el uso de microarreglos, lograron encontrar doce genes asociados a la respuesta inmune del mosquito ante la infección por el virus y evaluaron cuatro genes para conocer el papel en el proceso infectivo por el vDEN-2 (**Anexo 1**) (Caicedo PA et., 2018). En el estudio evidenciaron que los mecanismos de inmunidad no actúan independientemente, si no que existe interacciones entre ellos, que en ultimas van a determinar la competencia vectorial del vector.

Teniendo en cuenta lo anterior, el propósito del presente proyecto fue evaluar el papel de uno de los ocho genes restantes, correspondiendo al gen *Antibacterial peptide* en las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller a través del mecanismo de RNA de interferencia (RNAi). Esto con la intención de contribuir al conocimiento sobre el papel del sistema inmune del mosquito en la defensa antiviral y a su vez brindar información para el futuro desarrollo de inhibidores y/o estrategias que permita inhibir el proceso infectivo, y con ello, la transmisión del virus a los humanos.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento del problema de investigación y justificación

Los virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) representan una amenaza significativa para la salud mundial, especialmente para los países tropicales debido a que estos arbovirus causan enfermedades infecciosas que prevalecen en climas calientes y húmedos, afectando tanto las zonas urbanas como semiurbanas (OMS,2017). El virus dengue (vDEN) es un ejemplo de estos arbovirus, el cual es transmitido principalmente por mosquitos *Aedes aegypti*, y es el agente causal de la enfermedad conocida con el mismo nombre. En la actualidad, existen billones de personas que viven en áreas de riesgo de la transmisión del virus dengue, convirtiéndose en la enfermedad viral más importante transmitida por mosquitos que afecta a los seres humanos (OMG, 2016).

En el caso de Colombia, Hasta la semana 52 del 2017 se reportaron aproximadamente 26,276 casos de dengue (INS, 2017). Estos datos exhiben un panorama desalentador, dado que, a pesar de los esfuerzos para lograr una disminución en la propagación de la enfermedad, siguen existiendo factores como los cambios demográficos, ambientales, la urbanización descontrolada, problemas económicos, la poca efectividad de los programas de control del vector junto con una resistencia a los insecticidas y la ausencia de una vacuna efectiva, lo que dificulta severamente la transmisión e incidencia de la enfermedad (Padilla JC et al, 2012).

En la actualidad se conoce información relevante acerca del virus y el desarrollo de la enfermedad, que permite la investigación para el desarrollo de vacunas o métodos de control que permitan reducir la propagación de la enfermedad. No obstante, aún quedan muchos aspectos que investigar, por ejemplo, aquellos involucrados en la relación vector-virus. Aunque se ha avanzado en este sentido es necesario conocer los elementos y mecanismos genéticos que controlan la habilidad de un mosquito vectores para adquirir, mantener y transmitir un virus, conocido como competencia vectorial (CV) (Franz, Kantor, Passarelli & Clem, 2015).

Siguiendo este enfoque, en CIDEIM se han realizado investigaciones orientadas en la relación virus-vector (Barón O et al, 2010; Ocampo C et al, 2013; Caicedo PA et al, 2013), en las cuales se seleccionaron mosquitos *Ae. aegypti* colectados en campo en la ciudad de Cali para obtener una cepa susceptible a la infección por vDEN-2 (Cali-S) y otra refractaria (Cali-MIB) (Caicedo PA et al, 2013). En estudios posteriores se identificaron genes asociados a la apoptosis en la cepa Cali-MIB sugiriendo un mecanismo de eliminación del virus. Finalmente, a través de análisis transcriptómicos se encontraron doce genes asociados a la respuesta inmune del mosquito ante la infección por vDEN-2 (Caicedo PA et al., 2018) y su expresión diferencial ante la infección por el vDEN fue corroborada a través de qPCR. Cuatro de estos genes fueron evaluados funcionalmente por RNA de interferencia (**Anexo 1**), con la finalidad de brindar información importante de su papel asociado a la

respuesta por parte del mosquito a la infección por vDEN-2. Teniendo este precedente, el objetivo de este trabajo fue evaluar funcionalmente un gen de los doce mencionados previamente. Esto con el propósito de contestar la pregunta de investigación: ¿Cumple este gen un papel en el proceso infectivo del virus dengue en *Aedes aegypti*? Los resultados adquiridos en esta investigación son importantes para entender la funcionalidad del gen *Antibacterial peptide* en el proceso infectivo de *Aedes aegypti*, y de esta manera contribuir al entendimiento de las interacciones virus-vector, específicamente los mecanismos génicos utilizados por el mosquito para protegerse de las infecciones víricas. Este conocimiento aportará al diseño de estrategias de control vectorial que conlleven a la disminución de la transmisión del virus por el vector, el cual beneficiaría especialmente a la problemática de salud pública del dengue que se presenta en la actualidad en nuestro país.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1 El dengue – enfermedad

El dengue es una antigua enfermedad causada por el virus dengue, la cual se empezó a dispersar en todo el mundo principalmente en los trópicos durante los siglos XVIII y XIX (Gubler, Nalim, Saroso, Saipan & Tan, 1979). En la actualidad, existen cuatro serotipos del virus estrechamente relacionado, pero antigénicamente distintos (Dengue-1, -2, -3 y -4) (Sim & Dimopoulos, 2010), el cual es transmitido principalmente por mosquitos del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti*.

Esta es una enfermedad de tipo viral febril aguda que afecta a bebés, niños pequeños y adultos, y en algunos casos resulta ser mortal cuando se desarrolla en dengue grave (OMS, 2017). Cabe resaltar que, la infección por uno de los serotipos conlleva a adquirir inmunidad permanente del serotipo. Sin embargo, esto no garantiza una exoneración a infecciones posteriores con los otros serotipos del virus, lo que representa un factor de riesgo para desarrollar las formas graves de la enfermedad (OMS, 2017).

Por último, cabe destacar que la no disponibilidad de medicamentos específicos y/o vacunas efectivas para tratar la enfermedad, en conjunto al amplio rango de distribución y constante circulación de los cuatro serotipos en regiones específicas, ha asociado a este virus con un alto potencial pandémico (Padilla et al, 2012)

3.2 El virus dengue

El virus dengue (vDEN) es un virus de ARN de cadena positiva de la familia Flaviviridae, del género *Flavivirus*, el cual presenta una morfología esférica con 50nm de diámetro, y está constituido por un núcleo (nucleocápside), genoma viral y la cápside (Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann, 2005). El virión maduro contiene tres proteínas estructurales: la proteína C de la cápside, la proteína M y la proteína E, además de proteínas no estructurales como NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Henchal & Putnak, 1990). Cabe resaltar que todas estas proteínas son formadas a partir de una gran poliproteína (5´ C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 3´), codificada por el genoma del virus (Leitmeyer KC et al, 1999). Es importante mencionar que los ácidos nucleicos del virus por si solo llegan a ser infecciosos, por lo que las autoridades de salud advierten manejar el virus con un nivel de bioseguridad 2 (Valle & Falgout, 1998; Yábar C et al, 1999; Leitmeyer et al, 1999; Acosta C & Gómez, 2005).

La replicación del vDEN comienza por la entrada del virus mediada por endocitosis (**Figura 1**). Una vez el virus se encuentra dentro de la célula, el entorno ácido del endosoma provoca una trimerización irreversible de la proteína E, trayendo como consecuencia la fusión de las membranas vírica y celular (Stiasny, Allison, Mandl & Heinz, 2001). Pasada esta fusión, la nucleocápside se libera al citoplasma. Este evento trae consigo la disociación de la cápside y el ARN junto con el inicio de la replicación del genoma del ARN y el ensamblaje de las partículas (Brinton MA.,

2002; Lindenbach & Rice, 2003; Rodenhuis-Zybert, Wilschut & Smit, 2010). Cuando el genoma es liberado completamente en el citoplasma, el ARN de sentido positivo se traduce en una única poliproteína, la cual se procesa co-y post-traduccionalmente por proteasas celulares y derivadas de virus en tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales (Rodenhuis-Zybert, Wilschut & Smit, 2010).

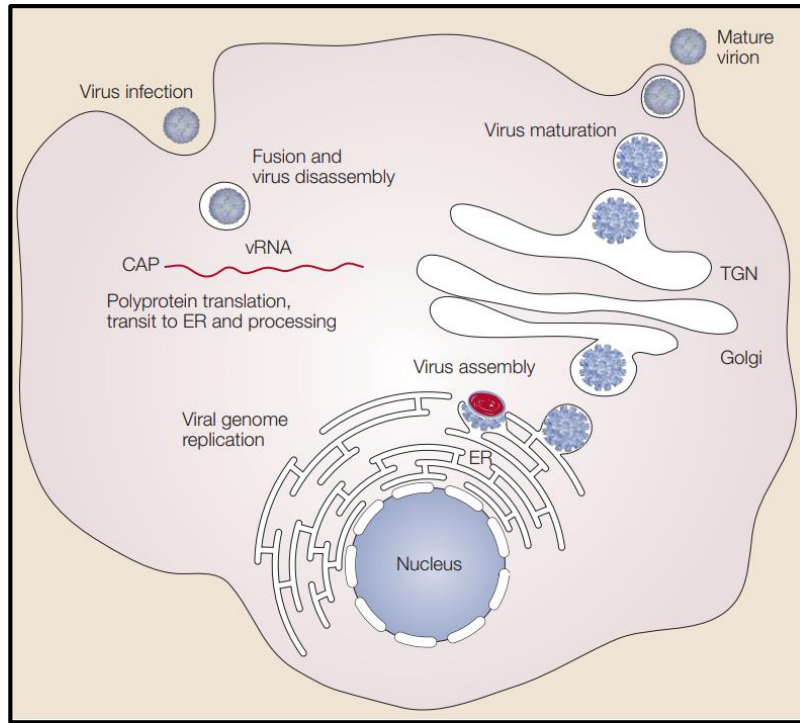


Figura 1. Replicación del virus dengue en la célula huésped (Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann, 2005)

Luego de llevar a cabo la traducción de las proteínas y el plegado de las proteínas individuales, las proteínas no estructurales inician la replicación del genoma viral (Clyde, Kyle & Harris, 2006). Posteriormente, el ARN recién sintetizado es empaquetado por la proteína C para formar una nucleocápside. Por otra parte, las proteínas prM y E forman heterodímeros que están orientados en el lumen del retículo endoplasmático, de manera que los heterodímeros de prM / E se asocian en trímeros, por lo que se cree que estas interacciones oligoméricas inducen a una red superficial curva que guían a la construcción del virión (Rossmann et al., 2002; Zhang Y et al, 2004; Rodenhuis-Zybert, Wilschut & Smit, 2010). En ese momento las partículas inmaduras contienen proteínas E y prM, membrana lipídica y nucleocápside, pero no pueden inducir la fusión célula-huésped, encontrándose en un estado no infeccioso (Guirakhoo, Heinz, Mandl, Holzmann & Kunz, 1991; Guirakhoo, Bolin & Roehrig, 1992). Por otro lado, las partículas subvirales solo están compuestas por glicoproteínas y la membrana, pero carecen de la proteína de la cápside y el ARN genómico, provocando que estas partículas sean no infecciosas (Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann, 2005)

Por último, las partículas de virión inmaduras y partículas subvircas llegan a la red trans-Golgi, lugar donde son divididas por la proteasa huésped furina, conllevando a la producción de partículas infecciosas maduras (Stadler et al, 1997; Elshuber, Heinz & Mandl, 2003; Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann, 2005). Posteriormente, los viriones maduros y las partículas subvirales son liberados por exocitosis para continuar el proceso infeccioso en las demás células.

3.3 El vector y ciclo de transmisión

El virus dengue es transmitido principalmente por los mosquitos del género *Aedes*, siendo *Aedes aegypti* su principal vector (Guzman & Istúriz, 2010; Rey & Lounibos, 2015). *Ae. aegypti* es un díptero perteneciente a la familia Culicidae originario de África, y el más distribuido en el planeta debido a la exitosa colonización de sitios fuera de sus hábitats nativos (Braks et al, 2003; Juliano & Lounibos, 2005).

El ciclo de vida de *Aedes aegypti* presenta una metamorfosis completa, pasando de una fase acuática en las primeras etapas, hasta una aérea en la última (Rey & Lounibos, 2015) (**Figura 2**). De este modo, en la fase acuática manifiesta las formas de huevo, larva y pupa. Posteriormente, en la fase aérea presenta la etapa adulta. Por lo general, el ciclo de vida es en 10 días, no obstante, tanto la rapidez del desarrollo de las larvas y pupas como la longevidad del mosquito va a estar estrechamente relacionado con las condiciones ambientales tales como la temperatura, la humedad y la alimentación (Mirsa, 1956; Horsfall, 1972; Gubler, 1995)

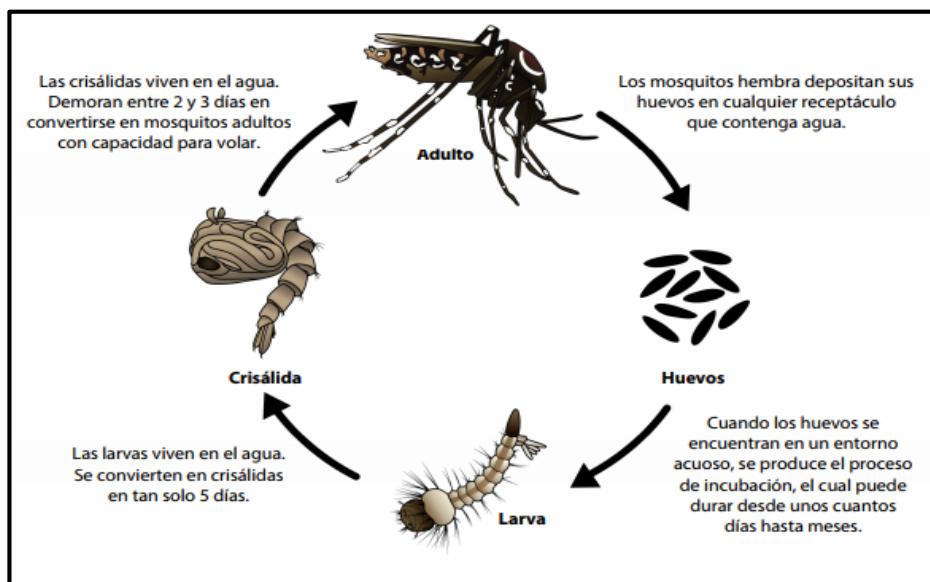


Figura 2. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*. (CDC, 2016).

El ciclo de transmisión del dengue empieza con una persona infectada con dengue, la cual tendrá el virus en la sangre, cabe resaltar que la viremia dura aproximadamente cinco días (Méndez & González, 2003). De este modo, el mosquito hembra de *Ae. aegypti* ingiere la sangre infectada (debido a que es

hematófaga obligada), de tal forma que el virus entra y se multiplica en el epitelio intestinal, en los ganglios nerviosos, cuerpo graso, cerebro, esófago y glándulas salivales cumpliendo así el ciclo de replicación extrínseco (**Figura 3**) (Gibbons & Vaughn, 2002; Acosta & Gómez, 2005).

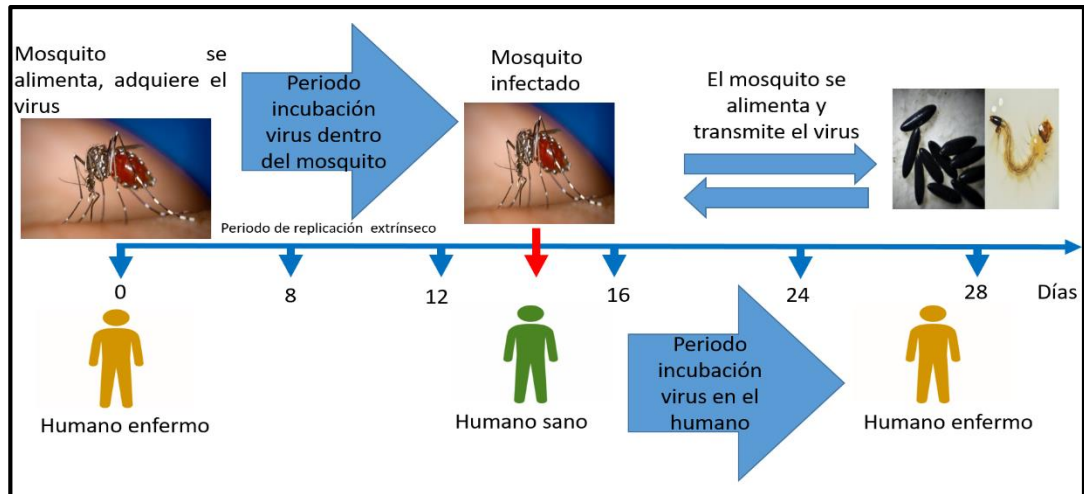


Figura 3. Ciclo de transmisión del virus dengue.

Posteriormente, el virus es inoculado en un nuevo hospedero por la saliva del mosquito. De este modo, el virus se localiza y se replica en varios órganos diana, como lo son los nódulos linfáticos y el hígado. Por consiguiente, este se libera y se difunde por la sangre para infectar los leucocitos y tejidos linfáticos (Acosta & Gómez, 2005). La replicación viral en el hospedero humano se conoce como periodo de incubación intrínseca. Por último, otro mosquito ingiere la sangre infectada y continua el ciclo.

3.4 Epidemiología del dengue

El dengue es una de las enfermedades tropicales emergentes y reemergentes de mayor prevalencia para el siglo XXI, a causa del gran impacto que genera tanto económico como socialmente. De este modo, la emergencia y reemergencia del dengue estuvo relacionada con el mal manejo de control del vector *Ae. aegypti* y la globalización (Halstead, Heinz, Barrett & Roehrig, 2005). En las últimas décadas la incidencia del dengue ha incrementado considerablemente en el mundo. No obstante, los números de casos reales de esta enfermedad son insuficientes y mal notificados. Estudios recientes estiman que en el mundo se producen alrededor de 390 millones de infecciones por dengue cada año, de los cuales 96 millones tienen una manifestación clínica de la enfermedad (Bhatt S et al., 2013). De igual modo, Brady OJ et al. (2012) afirman que 3,900 millones de personas, de 128 países tienen un potencial alto de contraer el virus del dengue.

En las últimas décadas, en las Américas se ha registrado un drástico incremento en la actividad del dengue, especialmente en los países de Brasil, Colombia, Cuba, Ecuador, Perú, Venezuela y Paraguay (Díaz-Quijano, Villar-Centeno & Martínez-

Vega, 2006). Reportes actuales del año 2016, se reportaron en la región de las Américas más de 2,380, 000 casos, así mismo, se notificaron 1032 muertes por dengue. (OMS, 2017). También, según reportes generados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), corrobora el aumento drástico de la incidencia del virus a través del tiempo en la región de las Américas, pasando de los 1,033, 417 casos durante la década de los años 80 hasta un total de casos de 8,483,895 en la primera década del siglo XXI (Serrano & Camargo, 2013). Siguiendo este contexto, se han reportado un incremento en la manifestación clínica grave de la enfermedad desde un registro de 13,398 casos en la década de los 80's hasta 215,278 durante los años 2000 y 2010 (Guzmán & Istúriz, 2010), con un número total 5,554 muertes entre los años 1995 y 2012 (OMS, 2009).

En Colombia, el dengue es una enfermedad de gran interés en salud pública, dado que es endémica con una alta tendencia creciente, en conjunto a patrones de transmisión heterogéneos. En las regiones centro oriental del país y centro occidental se evidencia un predominio de transmisión hiperendémica a causa de la circulación simultanea de los cuatro serotipos del virus, en donde la población joven es la más vulnerable y con mayor frecuencia de casos graves y mortalidad (Padilla et al, 2012). Ahora bien, según la OPS, en Colombia se han registrado 1.099.333 casos de dengue de 1978 a 2012. En el año 2016, se reportaron para la semana 52 un total de 103,822 casos de dengue junto con 289 muertes según estudios realizados por INS, de igual modo, se estableció que para ese año la incidencia nacional de dengue es de 3666,6 casos por 100,000 habitantes en riesgo, principalmente en los departamentos con mayor incidencia del virus como lo son Boyacá, Guainía, Cundinamarca, Putumayo, Valle del cauca, Vichada, Tolima, Antioquia, Guaviare y Quindío (**Figura 4**).

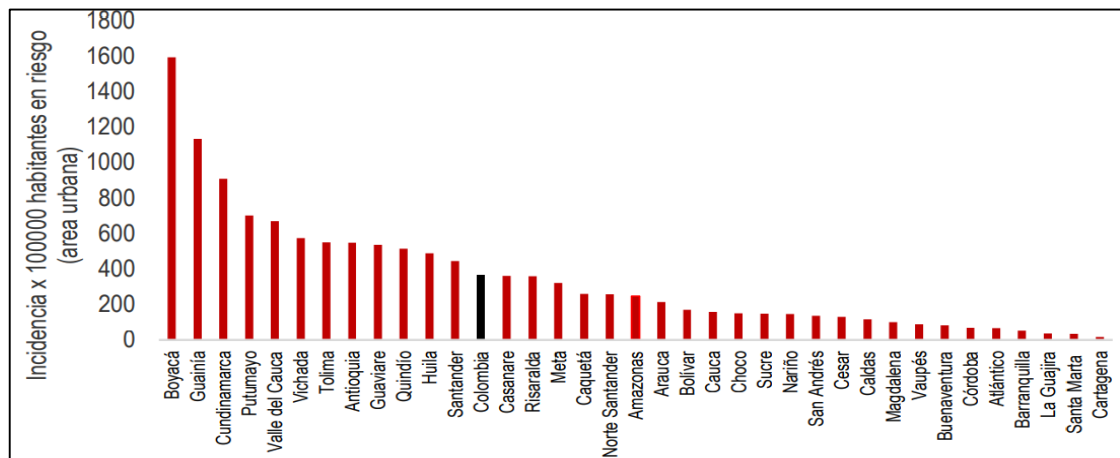


Figura 4. Incidencia de dengue por entidad territorial de procedencia, Colombia, Semana epidemiológica 01-52, 2016. (INS, 2016).

Por último, en el boletín epidemiológico de la semana 40 del 2017 según el INS, se han notificado al SIVIGILA 497 casos probables de dengue, en contraste con la semana 12 del 2016 el cual se notificaron 554 casos. A la fecha se han ingresado

un total de 21, 646 casos junto con 95 muertes, en donde los departamentos de Tolima, Boyacá, Guaviare, Cundinamarca, Casanare, Vichada, Arauca, Putumayo, Meta, Huila, Valle del Cauca, Santander, Quindío, Norte de Santander son los que registran las mayores incidencias (**Figura 5**). Por último, hasta el momento se obtiene una incidencia nacional del virus de 78,1 casos por 100,000 habitantes en riesgo.

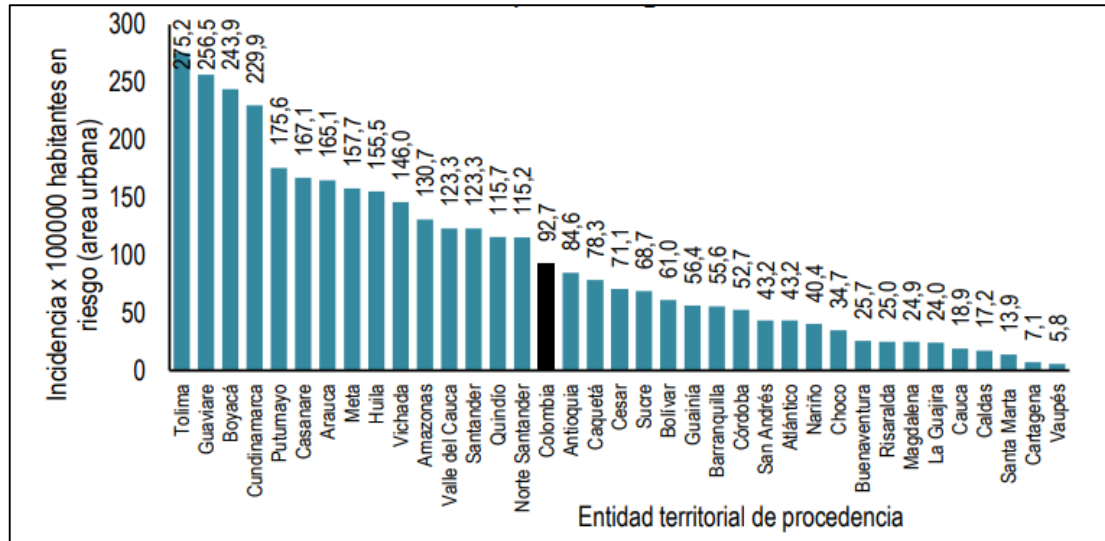


Figura 5. Incidencia de dengue por entidad territorial de procedencia, Colombia, Semana epidemiológica 01-52, 2017. (INS, 2017).

3.5 Interacción vector-patógeno

3.5.1 Competencia vectorial: La competencia vectorial (CV) es definida como la habilidad intrínseca de un vector para transmitir patógenos que causan enfermedades (Higgs & Beaty, 2005). De este modo, la competencia vectorial involucra la relación vector-patógeno, las cuales están ligadas a factores genéticos propios del vector y el patógeno. Ahora bien, en *Ae. aegypti* se observa que existe una variación de su CV por flavivirus (Caicedo PA et al, 2018). Esto es atribuido en gran parte por los aspectos mencionados anteriormente, donde las vías relacionadas con la inmunidad innata y las barreras tisulares desempeñan un papel fundamental.

Las barreras tisulares que emplean los mosquitos para contrarrestar la infección de los virus en sus organismos se encuentran: La barrera de infección del intestino medio (MIB), la barrera de escape del intestino medio (MEB), la barrera de infección de las glándulas salivales (SGIB) y la barrera de escape de las glándulas salivales (SGEB) (**Figura 6**) (Franz, Kantor, Passarelli & Clem, 2015).

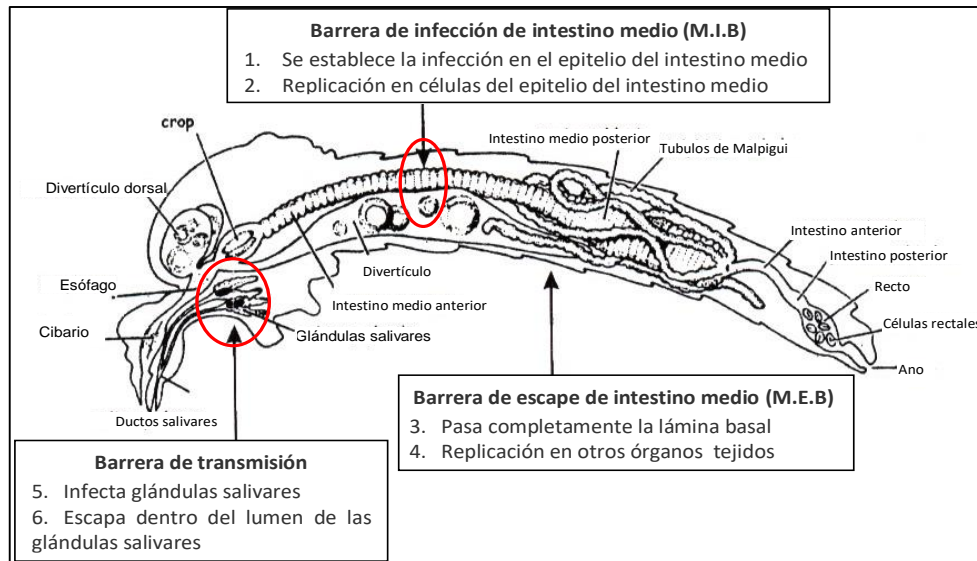


Figura 6. Barreras tisulares en *Aedes aegypti* a la transmisión de vDEN (Caicedo et al., 2018)

La barrera de infección del intestino medio (MIB), para flavivirus y alfavirus depende del reconocimiento del receptor como un requisito previo para una exitosa endocitosis del virus en las células epiteliales del intestino medio. Sin embargo, con estudios realizados se ha concluido que las interacciones receptor-virión son a menudo muy específicas de la cepa/especie y que estos receptores están compuestos por complejos de proteínas en vez de proteínas individuales (Romoser, 1996; Okuda, Caroci, Ribolla, de Bianchi & Bijovsky, 2002). Por último, las cepas de mosquitos que exhiben una MIB fuerte pueden ser causado por las conformaciones de proteína del receptor causado por los polimorfismos, lo que produce que el virus ya no pueda utilizar el receptor de entrada y por lo tanto no infectar el mosquito (Romoser et al, 2004). Cabe resaltar que el MIB es un determinante fundamental de la CV para flavivirus tales como vDEN (Gluber et al, 1979; Bosio, Beaty & Black, 1998). Por lo que las diferencias en la CV del mosquito pueden atribuirse a los receptores epiteliales del intestino medio específicos del arbovirus (Mercado-Curiel, Black & Muñoz, 2008).

La barrera de escape del intestino medio (MEB) está asociada con un mecanismo controlado genéticamente que modula la replicación de arbovirus en el intestino medio del mosquito. No obstante, este también involucra la estructura de otros componentes como lo es la lámina basal (Khoo et al, 2010). La lamina basal genera un límite de exclusión de tamaño por debajo del tamaño de los viriones, evitando la entrada del virus. No obstante, algunos arbovirus infectan células epiteliales traqueales tras infecciones de células de intestino medio de sus mosquitos vectores (Khoo, Piper, Sanchez-Vargas, Olson & Franz, 2010). Por lo tanto, se especula que la infección es generada a través del sistema traqueal que rodea el tejido del intestino medio, lo que puede ser causado por los factores de crecimiento de fibroblastos o por otras moléculas de señalización, tales como MMPs y caspasas efectoras que pueden activarse en presencia de arbovirus replicantes y remodelan

la lámina basal de tal forma que los viriones puedan pasar a través de ella e infectar (Bennett, 2005; Khoo, Piper, Sanchez-Vargas, Olson & Franz, 2010). Por otro lado, un determinante clave para predecir cuando el virus está listo para infectar las glándulas salivales es cuando existe una amplificación del virus en el cuerpo graso (Franz, Kantor, Passarelli & Clem, 2015). De este modo, las barreras SGIB y SEGB se han descrito similarmente a las del intestino medio, ya que ésta es mediada por receptores. Aunque se ha descrito que la liberación de la saliva que contiene el virus a través de los conductos salivales de las glándulas infectadas puede ser dependiente de la apoptosis, la cual puede ser causada por el virus para interrumpir las células acinares de las glándulas (Dourado et al, 2011; Franz, Kantor, Passarelli & Clem, 2015). Sin embargo, el papel de la apoptosis en la infección por arbovirus aún no está muy claro.

En general, la competencia vectorial de *Ae. aegypti* para vDEN es un tema en el cual todavía falta mucho por explorar, a causa de los factores genéticos relacionados con la CV, puesto que estos pueden discernir ampliamente entre especies de mosquitos, poblaciones o cepas. Teniendo en cuenta que solo las especies y/o cepas de arbovirus específicas están adaptadas para superar exitosamente los factores genéticos relacionados con la CV, lo que sugiere que los arbovirus y sus vectores están constantemente evolucionando (Hardy, Houk, Kramer & Reeves, 1983). Por lo que conlleva a que se sigan desconociendo mecanismos específicos, moléculas y genes involucrados en las interacciones vector-patógeno.

3.5.2 Respuesta inmune innata en insectos

Los insectos tienen la capacidad de protegerse ante la invasión por patógenos de una forma rápida y efectiva. Este sistema de defensa tiene muchas similitudes con la respuesta inmune de los vertebrados y en los insectos se le conoce como inmunidad innata (Boman, 1998). La inmunidad innata es descrita en insectos como la respuesta anti infecciosa codificada en línea germinal del huésped, la cual resulta en la generación de potentes péptidos (Boman, 1998).

Las características de las defensas inmunológicas innatas de los insectos contra los virus se han estudiado especialmente en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, la cual parece emplear diversas vías inmunes contra diferentes tipos de virus, además de un sistema de defensa basado en la interferencia de RNA (Xi & Dimopoulos, 2008). Con respecto a *Ae. Aegypti*, en la actualidad se han descrito tres vías de señalización implicados en la inmunidad del vDEN: la vía Toll, la JAK-STAT y la vía del RNA de interferencia (Xi & Dimopoulos, 2008; Sanchez et al, 2009; Brackney et al, 2010; Khoo, Piper, Sanchez-Vargas, Olson & Franz, 2010).

El mecanismo de interferencia antiviral RNA, es considerado como un importante modulador de las infecciones en los mosquitos (Khoo, Piper, Sanchez-Vargas, Olson & Franz, 2010), debido a que la respuesta de RNAi es desencadenada por RNA de doble cadena (dsRNA) (**Figura 7**), que es producido en el citoplasma como respuesta de una infección por el virus RNA de sentido positivo, la cual conlleva a

la producción de pequeños RNA interferentes (siRNA). De tal manera que, estos siRNAs son instrumentales en la degradación del mRNA vírico y por lo tanto a la inhibición de la replicación del virus (Khoo, Piper, Sanchez-Vargas, Olson & Franz, 2010). No obstante, se ha encontrado que la vía RNAi en *Ae. aegypti* no protege totalmente al mosquito contra la infección por vDEN-2, a pesar de modular la replicación del virus, lo que sugiere que el virus se ha adaptado a la respuesta del RNAi del vector principal (Khoo, Piper, Sanchez-Vargas, Olson & Franz, 2010). Lo anterior puede ser causado por la variabilidad de expresión de los genes implicados en la actividad de la vía de RNAi, lo que puede explicar diferencias en la CV entre poblaciones de vectores (Bennett et al, 2002).

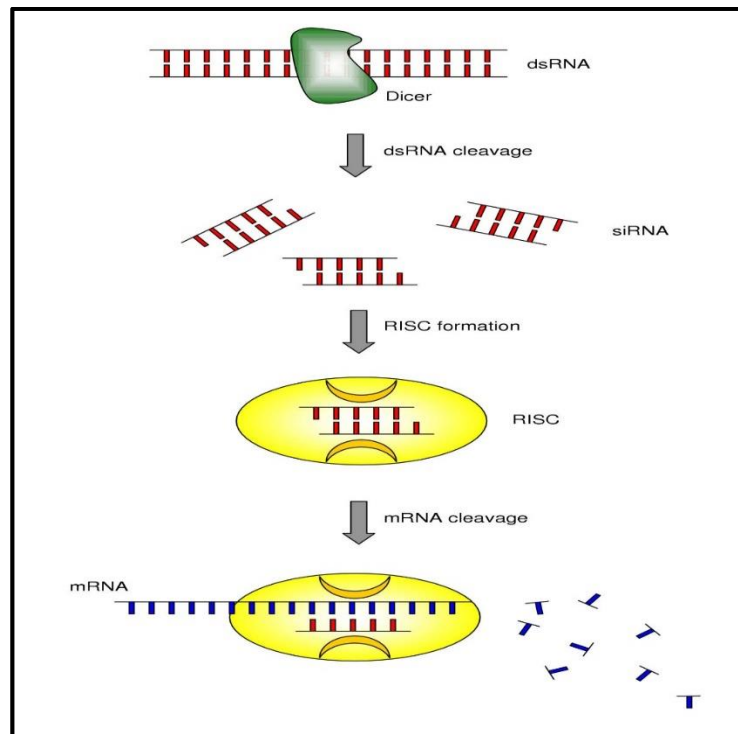


Figura 7. Mecanismo de RNA de interferencia. La aparición de un RNA bicatenario (dsRNA) dentro de la célula desencadena una respuesta compleja, que incluyen una cascada de eventos moleculares conocida como RNAi. Durante este proceso, los dsRNA son cortados por la enzima Dicer generando múltiples trozos cortos de aproximadamente 20 Pb de nucleótidos conocidos como pequeños RNA interferentes (siRNAs). Estos siRNAs se asocian a la enzima celular denominada complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el cual trabaja en conjunto con las proteínas Ago. Luego, RISC separa las dos hebras del siRNA y deja sola la hebra antisentido asociada al complejo como guía para identificar el ARN mensajero complementario (ARNm). De este modo, el complejo RISC cataliza el corte del ARNm complementario, que son degradados posteriormente por la maquinaria celular y de esta manera, bloquea la expresión del gen (Tomado de Mocellin & Provenzano, 2004).

Otro mecanismo que ha sido involucrado en la respuesta antiviral en insectos es la apoptosis, la cual causa la muerte y eliminación de la célula infectada junto al patógeno (Liu et al, 2013). Sin embargo, no se ha entendido muy bien la contribución de todas las moléculas apoptóticas específicas y otras vías durante la infección por patógenos. Por último, se tiene evidencia que todos estos mecanismos de

inmunidad no actúan independientemente, si no que existe interacciones, que en últimas pueden determinar la CV del vector (Ocampo et al, 2013).

3.5.3 Gen *Antibacterial peptide* (AAEL000598)

El péptido antibacteriano (*AAEL000598*) es una cecropina perteneciente a la familia de los péptidos antimicrobianos cationicos, involucrado en la vía de inmunodeficiencia (IMD)(Figura 8). La vía IMD induce en insectos una respuesta inmune ante lesiones hipodérmicas o contra las infecciones por bacterias Gram-positivas y/o Gram-negativas (Boman et al., 1991; Hoffmann and Hetru, 1992; Cociancich et al., 1994^a; Hoffman et al., 1999). No obstante, se ha evidenciado una participación activa ante las infecciones por hongos, protozoos y virus ((Bevins & Zasloff, 1990; Ahmad et al., 1995; Wachinger M et al., 1998; Caicedo PA et al., 2018). De igual forma, el gen *Antibacterial peptide* se ha visto implicado en la respuesta ante la infección por virus dengue, de modo que puede implicar la inhibición de la replicación del virus en las glándulas salivales y en el intestino medio de *Aedes aegypti* (Luplertlop N et al., 2011; Caicedo PA et al., 2018).

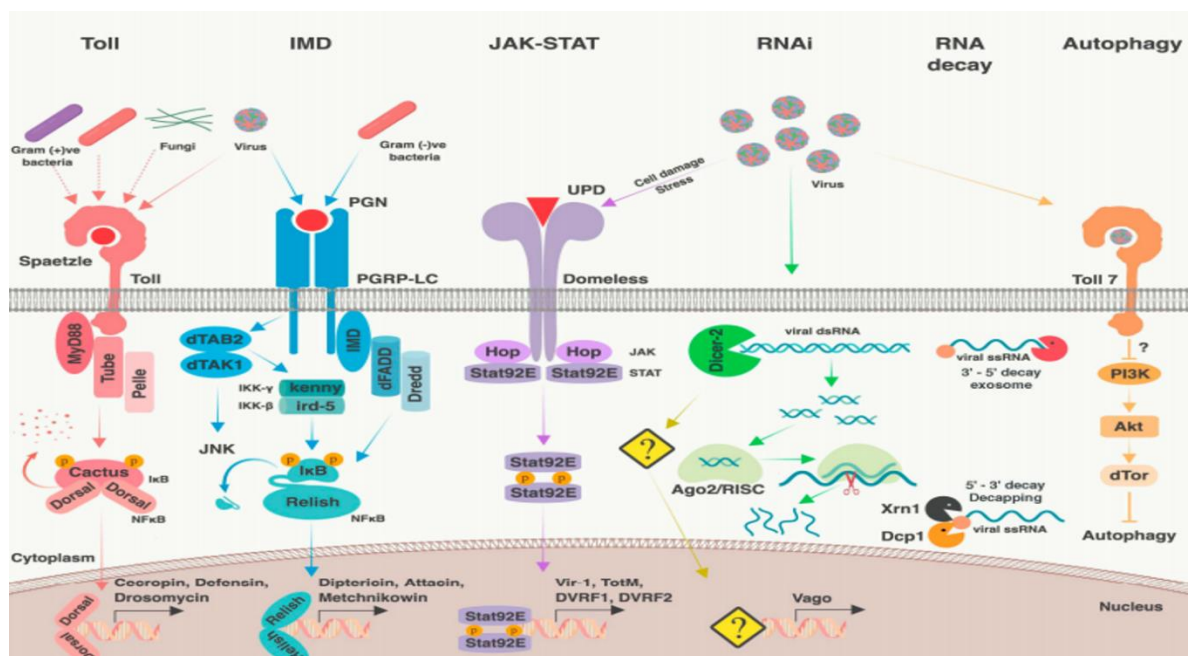


Figura 8. Principales vías inmunes innata de *Aedes aegypti*. Las vías principales de la respuesta inmune innata en *Aedes aegypti* incluyen la Toll, la vía de inmunodeficiencia (IMD), activador del transductor de señal de quinasa de Janus de transcripción (JAK / STAT) y la ruta de RNAi. Cada una de estas rutas tiene una especificidad con respecto al tipo de patógeno (bacterias, virus u hongos) pero varias de estas vías no han sido completamente definidas. También, existen evidencias de la interacción entre estas para respuestas antimicrobianas o antivirales, tales como las vías Toll e IMD que son principalmente antibacterianas, pero se ha visto relacionada con la respuesta antiviral, específicamente a la infección con vDEN. Tomado de (Palmer, Varghese & van Rij, 2018).

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el papel del gen *Antibacterial peptide* en dos cepas de *Aedes aegypti* que difieren en su susceptibilidad a la infección por vDEN-2.

Objetivos específicos

1. Realizar el silenciamiento génico de *Antibacterial peptide* en las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller de *Aedes aegypti*.
2. Analizar el efecto del silenciamiento génico en la susceptibilidad de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller ante la infección por vDEN-2.

5. METODOLOGÍA UTILIZADA

5.1 Mantenimiento de cepas de *Aedes aegypti*

Las cepas de mosquitos (Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller) fueron alimentadas con una solución de agua azucarada al 10% y mantenidas bajo condiciones estándar de laboratorio: Temperatura ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 70% humedad relativa, y un ciclo luz: oscuridad de 12:12 horas en el insectario del centro internacional de entrenamiento e investigaciones médicas (CIDEIM) (Caicedo PA et al., 2018).

Para la obtención de mosquitos adultos, primero se necesitó de la adquisición de huevos, el cual se obtuvo por la alimentación artificial de las hembras de *Ae. aegypti* con sangre desfibrada de conejo. Este procedimiento se llevó a cabo por medio de un alimentador artificial de membrana (**Figura 9**), el cual consiste en campanas de vidrio, donde la parte central tiene el espacio de almacenamiento de la sangre (feeder), la cual es introducida por una abertura superior en la campana.



Figura 9. Alimentador de vidrio cubierto con intestino de cerdo como membrana para la alimentación de mosquitos.

La parte inferior es cubierta por algún tipo de membrana (intestino de animal o parafina). Esta membrana fue conectada con tubos a una bomba de succión la cual impulsa agua a $37\text{-}38^\circ\text{C}$, con la finalidad de darle una temperatura corporal a la sangre (González & Arias, 2015). Por último, este sistema se colocó en cada una de las jaulas correspondientes a cada cepa (**Figura 10**).



Figura 10. Alimentación artificial en cepas de *Aedes aegypti* a través de alimentadores de vidrio

Una vez ocurrida la ovipuesta, se colectaron los huevos en servilletas ubicadas en las paredes de un recipiente de ovipostura, los huevos fueron almacenados en el insectario de CIDEIM a una temperatura entre 25°C y 28°C con una humedad relativa de 70% a 80%. Para la obtención de adultos se eclosionaron los huevos en bandejas plásticas con 1L de agua de clorada y se cubrieron con una malla de tela. Las larvas se alimentaron con una solución de hígado (DIFCOTM Liver), luego de pasar al estado de pupas, estas fueron separadas de las larvas y se depositaron en un vaso con agua y se mantuvieron en una jaula para que emergieran al estadio adulto.

5.2 Cultivo celular

Para la amplificación del virus dengue se empleó la línea celular C6/36 HT de *Ae. albopictus*- Las células se mantuvieron en flask de 50 mL con 5mL de medio de crecimiento celular Lebovitz (L-15 medium, Sigma Aldrich), suplementando con suero fetal bovino (SFB) (10%), penicilina/estreptomicina (1%), y L-glutamina (1%) a 31 ± 1 C°. Para finalizar, se realizó un pase celular cada 7 días con la finalidad de conservar el cultivo de células *In vitro* en monocapas en conjunto con sus propiedades fisiológicas (Caicedo, 2008).

5.3 Amplificación del vDEN-2 en cultivos celulares C6/36 HT

Para la amplificación del vDEN-2, se infectaron las células C6/36 HT con el sobrenadante del virus dengue cepa New Guinea C, el cual se encontraba almacenado a una temperatura de -45°C. La infección se llevó a cabo por medio de la adición de 800 uL del virus a cada flask con monocapa celular sin medio y se incubó por el lapso de una hora con una agitación suave y constante a una temperatura de 37°C, con el fin de que el virus penetre en las células (Caicedo, 2008). Una vez pasado la hora, se descartó el sobrenadante del virus y se

agregaron 6 mL de medio L-15 con SFB al 2% y se incubó nuevamente a $31 \pm 1\text{C}^\circ$ por 14 días, tiempo necesario para la replicación del virus en las células (Caicedo, 2008). Todo este procedimiento se efectuó en una cabina de flujo laminar tipo II disponible en el laboratorio de biología molecular de la universidad ICESI.

5.5 Silenciamiento génico mediante RNA de interferencia (RNAi)

El efecto del silenciamiento del gen *Antibacterial peptide* (AAEL000598) se realizó a través de la evaluación del cambio que se produce en la susceptibilidad o refractariedad al vDEN-2 en las cepas de mosquitos (Cali-S, Cali-MIB y como control se evaluó la cepa Rockefeller, una cepa de referencia en laboratorio la cual es 97% susceptible a la infección por vDEN). Para ello, se sintetizó el RNA de doble cadena correspondiente al gen de interés. Después, se realizaron las microinyecciones en los mosquitos para obtener el silenciamiento. Luego se infectaron los mosquitos artificialmente con vDEN-2 y se prosiguió a evaluar el efecto del silenciamiento génico en el proceso de infección del virus o la competencia vectorial en las cepas de *Ae. aegypti* mediante Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

- **Síntesis de dsRNA y microinyección en cepas de mosquitos**

Para llevar a cabo el silenciamiento génico mediante la técnica de RNAi fue necesario elaborar RNA de doble cadena que permitiera el reconocimiento el gen de interés, en este caso el *Antibacterial peptide* (AAEL000598).

Para el desarrollo de este trabajo se tomó la secuencia de DNA molde del gen *Antibacterial peptide* de aproximadamente 377 pares de bases (pb), además de los primers correspondientes al gen para su posterior amplificación (**Tabla 1**), los cuales fueron obtenidos en trabajos previos realizados en CIDEIM (Caicedo PA et al., 2018).

Tabla 1. Primers específicos del gen *Antibacterial peptide* (Caicedo PA et al., 2018)

Gen	ID	Primers	
<i>Antibacterial peptide</i>	AAEL000598	Forward	GCTAGGTCAAACCGAAGC
		Reverse	GACGAAAGCTGCGAATC

Posteriormente, se procedió a amplificar el fragmento de DNA utilizando las siguientes condiciones de PCR con volumen de reacción final de 24 uL, el cual contuvo: taq DNA polimerasa (Invitrogen), dNTPs, MgCl₂, PCR Buffer 10X, Agua libre de RNAsas y DNAsas, los respectivos primers del gen y el DNA obtenidos en trabajos anteriores a partir de mosquitos sin infectar (Caicedo PA et al., 2018). Una vez amplificado el gen, se verificó el producto de PCR por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 2%, se purifico siguiendo el protocolo del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System y se envió a secuenciación.

Luego, el producto purificado se empleó para generar dsRNA mediante la adhesión de un promotor T7 en cada hebra. Para la adición de las secuencias promotoras T7 se realizó una PCR, donde se utilizó primers específicos del gen con la secuencia promotora T7 añadida al extremo 5' y 3' del primer, obtenidos de estudios anteriores (Caicedo PA et al., 2018). Los primers de PCR que contienen el promotor T7 (forward and reverse) se realizaron en una única PCR con un Tm: 60° a 35 ciclos para generar un molde de transcripción para ambas cadenas. Posteriormente, se efectuó la síntesis de dsRNA siguiendo el protocolo descrito por el kit MEGAscript RNAi, Ambion® usando 1 ug de DNA molde a través de un proceso in vitro a 37°C. El DNA molde y RNA molde restante de la reacción se degradó con DNase I (Invitrogen®) y RNase (Invitrogen®) respectivamente. El dsRNA fue purificado por centrifugación por medio de un sistema de lavados con tubos con filtros y posteriormente se diluyó en 30 µL de 10 mM Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA. Finalmente, se cuantificó por espectrofotometría y se verificó a través de una reacción en un gel de agarosa al 2%, en buffer TBE 0.5X.

Para la microinyección de los mosquitos se inyectaron 100ng de dsRNA en el cuello de los insectos (**Figura 11A**) utilizando un microinyector manual (**Figura 11B**). Se emplearon aproximadamente 100 individuos por cepa (Caicedo PA et al, 2018) junto con un grupo control de mosquitos inyectados con agua.

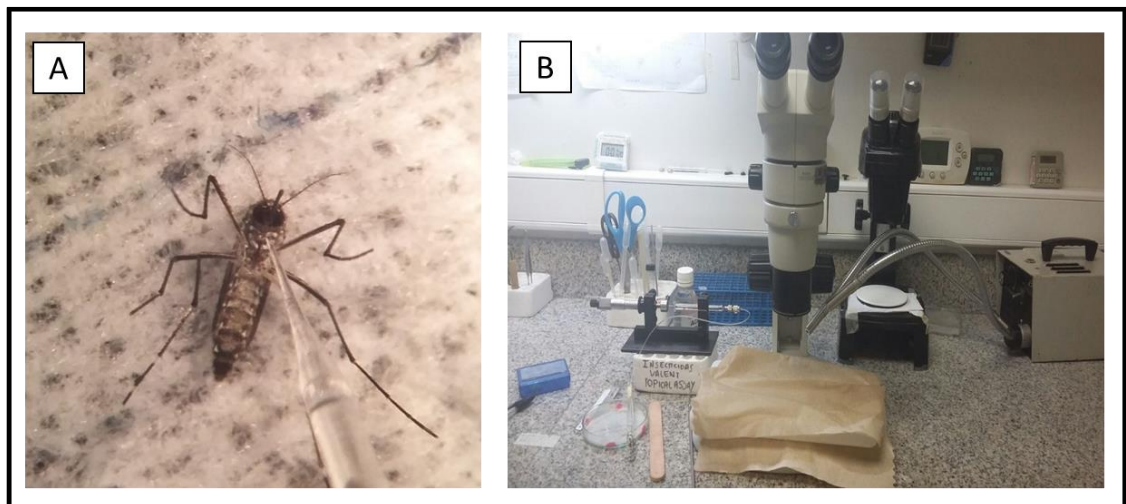


Figura 11. (A) Mosquito microinyectado. (B) Equipos para realizar microinyección manual de mosquitos.

- ***Evaluación del silenciamiento génico***

En estudios previos se determinó que el silenciamiento génico a través de RNA de interferencia en *Aedes aegypti* dura aproximadamente entre 48 y 72 horas (Caicedo et al., 2018), por lo que una vez microinyectados los mosquitos, fue necesario confirmar en un grupo de 5 mosquitos el silenciamiento del gen *Antibacterial peptide* (AAEL000598) a través de qPCR a las 48 horas después de realizar el procedimiento de microinyección, y de esta manera determinar la disminución de la

expresión génica. Para esto, se realizó la extracción de RNA de los mosquitos en estadio adulto y a partir de este se llevó a cabo la síntesis de cDNA.

La extracción de RNA se realizó en mosquitos completos con trizol® (Sigma, Aldrich). Este proceso consiste en utilizar un volumen total de 750 µL de trizol por muestra, seguido de la maceración del mosquito para homogeneizar los tejidos por medio de un pestle y se dejó reposar la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente, para así tener una disociación completa del tejido. Posteriormente, se agregaron 200 µL de cloroformo y se mezcló suavemente por 10 minutos a temperatura ambiente. Seguido a esto, se centrifugó la muestra a 12000-rpm por 15 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, la muestra presentó dos fases (Roja e incolora), se tomó y transfirió la fase incolora a un tubo eppendorf debido a que allí se encuentra el RNA. A la muestra se le adicionaron 500 µL de alcohol isopropílico y se mezcló nuevamente a temperatura ambiente por 10 minutos. Una vez pasado el tiempo, se centrifugó nuevamente la muestra a 12000- rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó y se adicionó 1 mL de etanol frío al 75% y se centrifugó otra vez con las condiciones mencionadas anteriormente. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la muestra de RNA en agua libre de RNasas y se almacenó a -80°C.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, adicionando una mezcla de buffer 5X (50 mM Tris-HCl), 2.5 mM de cada dNTPs, DTT 0.1 M, 50ng de primer Oligo(dT) (5'-CGGGCAGTGAGCGCAACGTTTTTTTTTTTTTTT-3') y 200 unidades de Transcriptasa reversa (Superscript II Reverse Transcriptase, Life Technologies, Grand Island, NY). Esta reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: 65°C por 5 minutos, 42°C por 2 minutos y una incubación de 42° C por 50 minutos seguidos de un incremento de temperatura a 70°C por 15 minutos en un termociclador (Caicedo PA et al., 2018).

Por último, para realizar la qPCR se dispusieron de primers específicos para el gen (Tabla 1). Asimismo, se utilizó el SYBR Green como herramienta de detección y cuantificación. Las condiciones que se usaron para la realizar la qPCR fueron de: 50°C: 2 min, 35 ciclos de 95°C: 2 min, Tm del primer: 57°C: 1,30 min, 72°C: 20s en 12 µL de reacción final utilizando 1 µL del cDNA sintetizado y Express SYBR GreenER qPCR Super-Mix Universal (Invitrogen) en el equipo CFX Real-Time PCR (Bio-Rad) (Caicedo PA et al, 2018).

Los resultados se analizaron por medio del método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ propuesto por Livak et al, (2001).

Método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

$\Delta Ct_{\text{silenciamiento}}$ = Ct (gen interés tratamiento) – Ct (gen control tratamiento).

$\Delta Ct_{\text{control}}$ = Ct (gen interés tratamiento control) – Ct (gen control tratamiento control).

$\Delta\Delta Ct$ = ($\Delta Ct_{\text{silenciamiento}}$) - ($\Delta Ct_{\text{control}}$)

Cuantificación expresión génica = $2^{(-\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{silenciamiento}}) - (\Delta Ct_{\text{control}}))}$

- **Evaluación del efecto del silenciamiento génico en el proceso infectivo**

La infección de los mosquitos de *Ae. aegypti* (Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller) se realizó con el sobrenadante del vDEN-2 obtenido en el proceso descrito anteriormente en el numeral 5.3, mezclado con sangre de conejo desfibrada en una proporción 1:1. Una vez pasadas las 24 horas después de la microinyección, las hembras fueron alimentadas con esta mezcla a través de los alimentadores artificiales de membrana mencionados anteriormente y se expusieron a un tiempo de aproximadamente de 2 horas de alimentación para obtener un alto porcentaje de individuos infectados (Caicedo et al., 2018). Por último, se recogieron cuatro muestras: Sangre sola, sobrenadante del vDEN-2, mezcla de virus y sangre antes de la alimentación y mezcla de virus y sangre post alimentación, para así evaluar la esterilidad de la sangre y estimar la concentración del virus. Todo este proceso se desarrolló en el insectario del CIDEIM catalogado como laboratorio de seguridad 2+ (BSL 2+), puesto que tiene los requerimientos y condiciones necesarias para realizar las infecciones, de manera tal que evita el escape de individuos.

Para evaluar el papel del gen *Antibacterial peptide* (AAEL000598) en el proceso infectivo por vDEN-2, una vez se cumplió el periodo de incubación del virus en el mosquito (10-14 días), se realizó la prueba de Inmunofluorescencia (IFI) para evaluar la CV de las cepas a la infección por vDEN-2 y determinar la variación en el fenotipo de las cepas Cali-MIB, Cali-S y Rockefeller.

- **Titulación del virus dengue-2**

La titulación del vDEN-2 se realizó para determinar la concentración de virus empleado durante la infección artificial de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller. Para este procedimiento se separaron y almacenaron cuatro muestras usadas durante la infección artificial, las cuales fueron el sobrenadante del virus, una muestra de sangre sin virus (control), una muestra de sangre con virus al inicio y otra al final de la alimentación. Posteriormente, las titulaciones de estas muestras se realizaron en placas de 96 pozos de fondo plano con tapa.

En primer lugar, se sembraron 100 μ L de cada una de las muestras, cada una por triplicado y con sus respectivos controles negativos en las columnas siguientes a estas (**Figura 12**). Luego, en los pozos restantes se agregaron 90 μ L de medio L-15 al 10%. Acto seguido, se realizaron diluciones consecutivas de 10 μ L partiendo de la primera fila (fila A) donde se encuentra la muestra, hasta la última fila (fila H). Después, se adicionaron 100 μ L de células resuspendidas con medio al 2% a toda la placa y se selló con papel plástico. Finalmente se incubó por 7 días a 31°C.

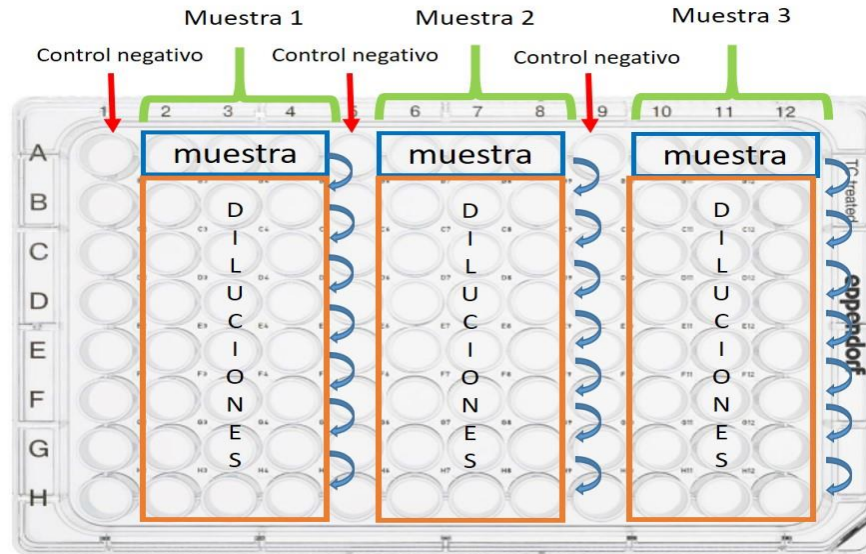


Figura 12. Esquema de placa para titulación de vDEN-2.

Una vez pasado el tiempo de incubación, se procedió a descartar el contenido de la placa para luego fijar las células de cada pozo por medio de la adición de acetona-PBS (3:1) y se almacenaron a 4 °C por 30 minutos. Se descartó la acetona-PBS y se comenzó a realizar la prueba de Inmunofluorescencia indirecta. Para ello se preparó una solución de anticuerpo monoclonal contra el serotipo 2 [1:200] suministrado por el CDC junto con PBS 1X estéril, el cual se agregó a los pozos que contenían las muestras y se incubó durante 45 minutos a 37°C. Finalizada la incubación, se realizaron dos lavados con PBS 1X estéril y uno con agua destilada, cada uno por un minuto. Luego, se preparó otra solución de fluorocromo Anti-se añadieron a los respectivos pozos con las muestras. Se Incubó por 45 minutos a 37°C nuevamente para así realizar los respectivos lavados con PBS y agua como se describió previamente. Por último, se secaron las placas a temperatura ambiente y se añadieron 20 µL de glicerina tamponada al 90% en todos los pozos de la placa para su posterior visualización en el microscopio de Inmunofluorescencia.

La concentración del vDEN-2 fue estimada de acuerdo a la siguiente formula:

Tissue culture infective Dose/mL (TCID50) =

$$\text{Log} (10^{-(\text{titulación positiva en los tres pozos})}) - \log(10) \times \left(1 + \left(\frac{\# \text{ pozos positivos}}{\# \text{ total de pozos}} \right) - 0.5 \right)$$

Ecuación 1. Formula estimación concentración vDEN-2

- **Prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para evaluar la CV de *Aedes aegypti* a la infección por vDEN-2.**

La Inmunofluorescencia se utilizó para evaluar la CV en las cepas de *Ae. aegypti*, la cual permitió determinar el fenotipo susceptible o refractario de los mosquitos ante la infección por el virus a través de la evaluación de las barreras de infección en el mosquito, esto directamente brindó la información sobre el fenotipo del mismo o su capacidad de infectarse o eliminar el virus. Para empezar, pasaron los 14 días post-infección se sacrificaron las hembras de *Ae. aegypti* por congelación y se realizaron disecciones de las cabezas (Caicedo et., 2018), esto para determinar si el virus se encuentra presente en las glándulas salivales, lo cual indicaría que infectó todo el organismo del mosquito y superó la barrera del intestino medio. Del mismo modo, se diseccionarán los intestinos al encontrar un resultado negativo para la IFI en las glándulas salivales, para evaluar si el virus se eliminó por completo, o si bien, los mosquitos presentan una barrera de escape en el intestino medio.

Determinación de fenotipos susceptibles y/o refractarios

Los resultados obtenidos mediante los análisis de IFI nos especifica el fenotipo de cada uno de los individuos evaluados. Estos fueron determinados por la tabla 2.

Tabla 2. Evaluación de barreras de infección por vDEN-2 en *Ae. Aegypti*. (Basado en (Caicedo PA et al, 2018.))

Inmunofluorescencia indirecta para la detección de vDEN-2	
Disección de cabezas	
Resultado positivo (+)	Resultado negativo (-)
Fenotipo susceptible por vDEN-2	Proceder disección de intestino
Disección de intestino	
Resultado positivo (+)	Resultado negativo (-)
Fenotipo refractario con MEB	Fenotipo refractario con MIB

Disección de cabeza de mosquitos hembras infectadas

La disección de la cabeza consistió en colocar al mosquito sobre una lámina portaobjetos en frío (para evitar la degradación del virus) y con ayuda del estereoscopio y de las pinzas de disección se sujeta el cuerpo y se eliminan en primer lugar las patas y luego se extrae la cabeza, para así obtener las glándulas salivales. Para cada proceso se llevó un registro de las placas (anexo 1). También, se guardaron los abdómenes de las hembras en tubos Eppendorf marcados con el correspondiente individuo, cepa y fecha de infección y se almacenaron en una nevera a -45°C para evitar la degradación del virus, con el fin de utilizarlo para posteriores análisis (Caicedo, 2008).

Una vez obtenidas las muestras, se aplastaron los tejidos y se extendieron para tener una buena lectura de los mismos. La placa se colocó en una solución de acetona: PBS (3:1) por treinta minutos a 4°C para fijar los tejidos, se secó a

temperatura ambiente y se delimitó el área de la muestra para evitar derrames del anticuerpo (Caicedo PA et al, 2018). Se empleó un anticuerpo monoclonal para el serotipo 2 del vDEN donado por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention), el fluorocromo Anti-Mouse IgG y azul de Evans [1:200]. En primer lugar, se preparó el anticuerpo [1:200] en una solución de PBS 1X estéril y se incubó a 37°C por 40 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de la incubación se realizaron dos lavados: uno con PBS 1X estéril y el otro con agua destilada, por un minuto cada uno. Luego, se adicióno una solución de Azul de Evans [1:200] y el fluorocromo [1:200] y se incubó nuevamente a 37°C por 40 minutos. Finalmente, se realizaron nuevamente los lavados y se adiciónó en cada pozo una gota de glicerina tamponada al 90%, se cubrieron con una lámina cubreobjetos y se procedió a realizar la lectura en el microscopio para IFI (Caicedo et al, 2018).

Disección de intestinos de mosquitos con IFI negativo de cabeza

Para la disección del intestino, se colocaron los abdómenes de los mosquitos previamente almacenados sobre una lámina de objetos. La disección se realizó sobre PBS 1X estéril. Luego, con la ayuda del estereoscopio y los alfileres para disección fina se cortaron los últimos segmentos del abdomen, para proseguir a retirar el intestino empujando suavemente desde la parte superior hasta la inferior (**Figura 13A**). Una vez el intestino se encuentre afuera se retiran los túbulos de Malpighi y se aísla el intestino medio (**Figura 13B**) (Caicedo, 2008). Por último, una vez obtenidos todos los intestinos a evaluar en la lámina, se llevó a cabo el análisis de IFI siguiendo el mismo proceso que se usó con las cabezas de mosquitos.

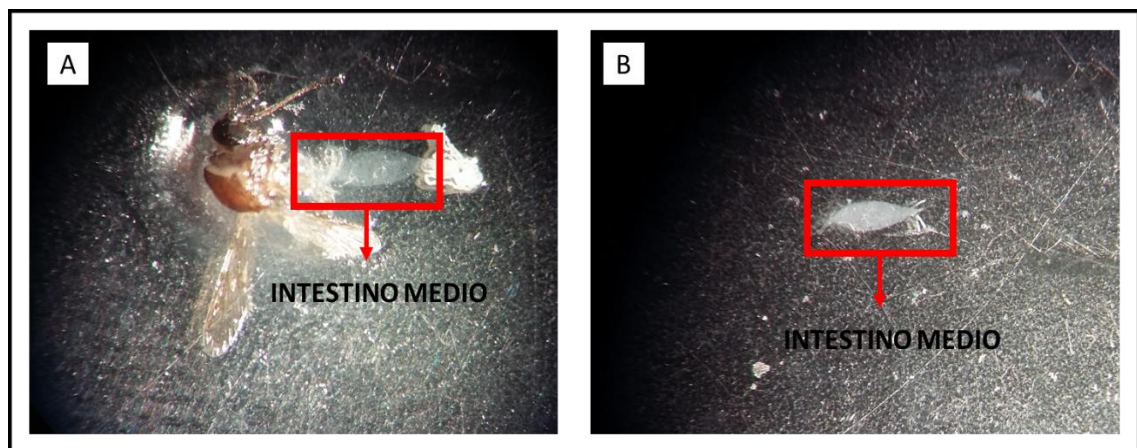


Figura 13. Disección de intestinos de *Ae. aegypti*. (A) mosquito de *Ae. aegypti* en proceso de disección (B) Intestino medio de *Ae. aegypti*.

6. RESULTADOS

6.1 Síntesis dsRNA

La síntesis de dsRNA se inició a partir de un producto de PCR amplificado y purificado del gen *Antibacterial peptide*, en trabajos realizados anteriormente en CIDEM (Caicedo PA et al., 2018). Este producto contenía una secuencia T7 en cada extremo (5' y 3') con un tamaño total de 477 Pb (377 Pb del gen más 100 Pb de la secuencia T7) aproximadamente. Con el fin de obtener mayor concentración de este producto, se realizó la reamplificación en 16 reacciones de PCR para purificarlas y verificar su integridad por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 2% (**Figura 14**). Luego, se midió la concentración del producto gen amplificado + T7 y se obtuvo un total de 228,1 ng/ μ L. Después de realizar el proceso de síntesis de dsRNA siguiendo el protocolo descrito por el kit MEGAscript RNAi, Ambion®, se obtuvo una concentración final de 226,368 ng/ μ L, la cual era insuficiente para realizar el silenciamiento génico puesto que no se alcanzaba la concentración necesaria de 100ng/ μ L por mosquito para poder realizar el procedimiento.

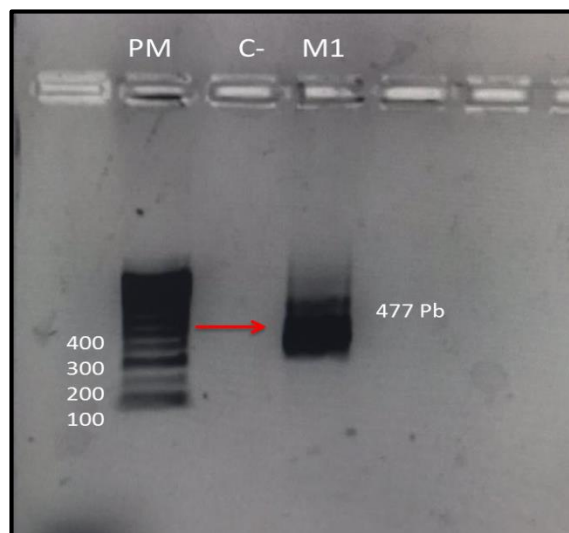


Figura 14. Visualización del gen + T7 en gel de agarosa al 2%. PM: marcador de peso molecular. C-: control negativo. M1: gen *Antibacterial peptide* (*Crecropina*) amplificado + T7.

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó un segundo ensayo, en donde nuevamente se amplificó el gen+T7 en 30 reacciones de PCR. La muestra se purificó y se verificó su integridad por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% (**Figura 15A**). No obstante, se observó una banda en el control negativo, por lo cual se secuenció tanto el control negativo como la muestra. Ambos resultados arrojaron que la contaminación era el mismo gen (*Antibacterial peptide*) (**Figura 15B**). Luego, se cuantificó la muestra y se obtuvo una concentración de 306,1 ng/ μ L. Posteriormente, se realizó la síntesis de dsRNA con el kit MEGAscript RNAi, Ambion®. El dsRNA fue cuantificado por espectrofotometría arrojando una

concentración de 661,4 ng/μL y fue verificada su integridad en una electroforesis en gel de agarosa al 2% (**Figura 15C**).

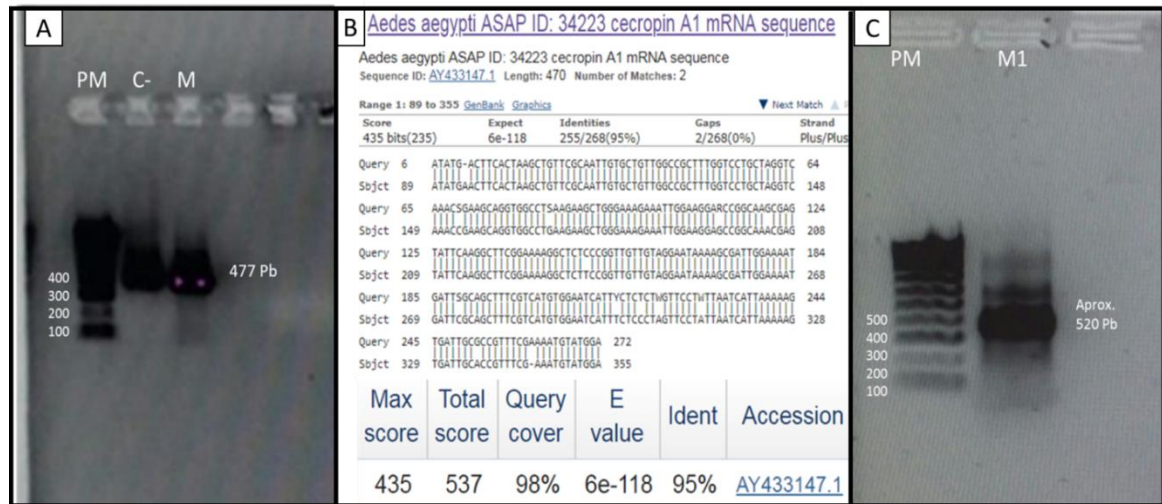


Figura 15. Evaluación de la calidad del dsRNA sintetizado. (A) Visualización en gel de agarosa. PM: marcador de peso molecular. C-: control negativo. M: gen *Antibacterial peptide* (cecropina) amplificado + T7. Durante el procedimiento se encontró una contaminación en el control negativo. (B) Resultado de la secuenciación del control negativo y la muestra (gen *Antibacterial peptide* + T7) (C) Visualización en gel de agarosa del dsRNA sintetizado PM: marcador de peso molecular. C-: control negativo. M1: dsRNA del gen *Antibacterial peptide*.

Por último, se comprobó que la concentración obtenida era útil para realizar el silenciamiento. No obstante, la concentración sintetizada alcanzó solo para realizar la dilución en el microinyector manual, puesto que en este dispositivo se necesita de un total de 100ng/0,33μL, a diferencia del microinyector electrónico que requiere de un producto más concentrado (por encima de los 1000 ng/μL) debido a que utiliza en cada microinyección una concentración de 100 ng/0,1μL.

6.2 Microinyección de dsRNA en mosquitos de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller.

Para este procedimiento se inyectaron 100ng/0,33μL del dsRNA en el cuello de los mosquitos a través de un microinyector manual. Para este proceso se utilizaron 110 individuos en la cepa Cali-MIB, 102 en Cali-S y 220 en la cepa Rockefeller. El número de individuos vario debido a la disponibilidad de mosquitos en cada cepa. Para el procedimiento los mosquitos fueron dormidos, colocándolos en frio por aproximadamente 1 minuto en una nevera portátil. Cabe mencionar que los mosquitos fueron dormidos en grupos de 7 individuos para descartar que la muerte de los mismos haya sido causada por el frio, tal como sucedió en pruebas anteriores (datos no reportados). Los resultados obtenidos en la **Tabla 4** muestran el número total de individuos obtenidos tras el proceso, en conjunto al total de mosquitos alimentados y seleccionados para la evaluación del silenciamiento génico.

Tabla 3. Total de individuos microinyectados y evaluados en las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller.

Cepa	Cali-MIB		Cali-S		Rockefeller	
	Agua	dsRNA	Agua	dsRNA	Agua	dsRNA
Microinyección	Agua	dsRNA	Agua	dsRNA	Agua	dsRNA
n- microinyectados	50	60	50	52	103	117
n-vivos	12	14	4	15	29	25
n-muertos	38	46	46	37	74	92
n-alimentados	10	13	3	12	24	20
n-colectados a las 48 horas	2	1	1	3	5	4

Como se puede observar en la **Tabla 4**, la mortalidad del procedimiento es alta con respecto al número de individuos microinyectados vs el total de individuos vivos, por lo que se obtuvieron pocos individuos principalmente en las cepas Cali-S y Cali-MIB. De este modo, se colectó menos individuos en estas cepas para realizar la extracción de RNA para la evaluación del silenciamiento. Los individuos restantes fueron alimentados con el vDEN-2 a través de la alimentación artificial después de las 24 horas de la microinyección. Por último, los mosquitos alimentados fueron puestos en jaulas de plástico durante 15 días, tiempo correspondiente al periodo extrínseco de incubación del virus (10-15 días).

6.3 Titulación del vDEN-2

A partir del resultado de la titulación del vDEN-2 por IFI, se determinó la concentración de virus a la que fueron expuestos los mosquitos de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller durante las alimentaciones artificiales (**Figura 16**).

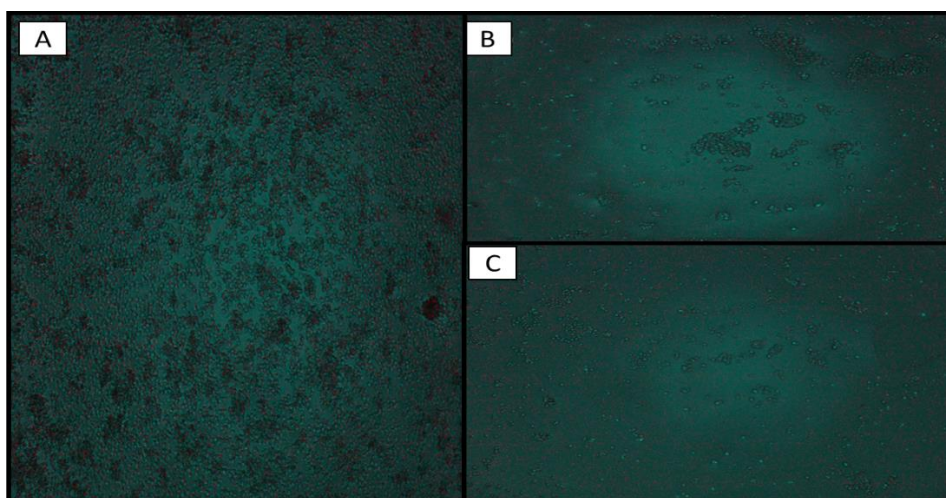


Figura 16. Titulación del vDEN-2. Se utilizó la prueba IFI para observar la presencia de partículas virales en las muestras empleadas para las alimentaciones artificiales de las cepas de *Ae. aegypti*. (A) muestra de sangre sola empleada como el control negativo. (B) Presencia de partículas virales en muestra de sangre mezclada con vDEN-2 antes de la alimentación. (C) Presencia de partículas virales en muestra de sangre mezclada con vDEN-2 post-alimentación.

En la **Tabla 3** se muestran las concentraciones obtenidas a través del cálculo generado por la **ecuación 1**, donde $10^{-0.5}$ es el menor valor, representando ausencia de carga viral y $10^{-9.5}$ es el mayor valor, constituyendo como la concentración vírica más alta de acuerdo a los términos de TCID50/mL (**Ecuación 1**).

Tabla 4. Concentración viral del vDEN-2 en las muestras de sobrenadante de virus, sangre sola y sangre mezclada con virus empleados durante el proceso de alimentación artificial de las cepas de *Ae. aegypti*.

Muestras tituladas	Concentraciones (TCID50/mL)	
	Alimentación Cepas Cali-S y Cali-MIB	Alimentación cepa Rockefeller
Sobrenadante vDEN-2	$10^{-9.5}$	$10^{-9.5}$
Sangre sin virus (control negativo)	$10^{-0.5}$	$10^{-0.5}$
Sangre + vDEN-2 (antes de la alimentación)	$10^{-9.5}$	$10^{-9.5}$
Sangre + vDEN-2 (post-alimentación)	$10^{-9.5}$	$10^{-8.5}$

Los resultados arrojados por las pruebas indicaron una alta concentración viral durante el proceso de infección artificial, debido a que tanto el sobrenadante como ambas muestras antes y después de la alimentación exhibieron una concentración viral del $10^{-9.5}$, a excepción de la post-alimentación en la cepa Rockefeller con una concentración vírica de $10^{-8.5}$, sin embargo, representa una alta concentración viral.

6.4 Evaluación del silenciamiento génico

Los mosquitos colectados a las 48 horas después de la microinyección se utilizaron para confirmar el silenciamiento del gen *Antibacterial peptide* a través de una qPCR. Una vez realizada la extracción de RNA con trizol en mosquitos completos de las cepas Cali-S, Cali-MiB y Rockefeller de *Ae. aegypti*, se cuantificaron las muestras y los datos se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Extracción de RNA de mosquitos completos colectados a las 48 horas después de la microinyección de las cepas Cali-MIB, Cali-S y Rockefeller. Para cada cepa se le registraron las relaciones 260/280 y 260/230 como indicadores de la calidad del RNA extraído.

Cuantificación de RNA	mosquitos completos (n)					
	Cali-MIB		Cali-S		Rockefeller	
	Agua	dsRNA	Agua	dsRNA	Agua	dsRNA
Concentración de RNA total (ng/ μ L)	152,9	417,5	108,8	193,3	707,9	732,3
Relación 260/280	2,1	1,9	2,2	1,5	2,1	2,0
Relación 260/230	0,4	0,3	0,7	0,1	1,4	1,9

Como se puede observar en la **Tabla 5**, se presenta una variación en la concentración de RNA total a causa del número de mosquitos empleados por cada cepa. Una vez extraído el RNA se procedió a realizar la síntesis de cDNA. Para ello se igualaron las concentraciones a 100 ng/10 μ L (**Tabla 6**).

Tabla 6. Volúmenes de RNA y agua para síntesis de cDNA.

Muestra	Cepa	ng/ μ L	RNA	Agua
1	Cali-S Agua	157,9	6,3	3,7
2	Cali-S. dsRNA	417,5	2,4	7,6
3	Cali-MIB Agua	108,8	9,2	0,8
4	Cali-MIB dsRNA	193,3	5,2	4,8
5	Rockefeller Agua	707,9	1,4	8,6
6	Rockefeller dsRNA	732,3	1,4	8,6

Posteriormente se cuantificó las seis muestras de cDNA (**Tabla 7**).

Tabla 7. Valores cuantificación cDNA. Para cada muestra se le registró las relaciones 260/280 y 260/230 como indicadores de la calidad de la síntesis de cDNA.

Cuantificación de cDNA	Cali-MIB		Cali-S		Rockefeller	
	Agua	dsRNA	Agua	dsRNA	Agua	dsRNA
Concentración de cDNA total (ng/ μL)	698,6	616,6	647,1	551,4	593,3	357,8
Relación 260/280	1,6	1,6	1,6	1,7	1,6	1,6
Relación 260/230	2,2	1,8	2,9	5,1	1,0	8,3

Luego, se realizó una PCR convencional con primers de actina para verificar la calidad de los cDNAs sintetizados, donde se esperaba un tamaño de aproximadamente de 300 Pb (**Figura 17**).

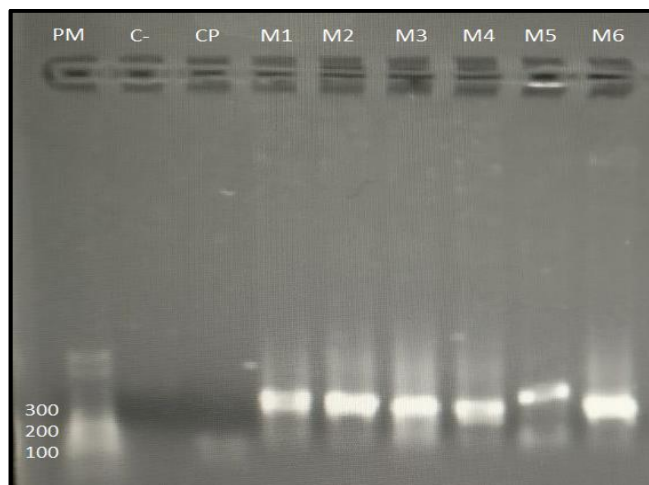


Figura 17. Visualización prueba de actina. PM: marcador de peso molecular. C-: control negativo. CP: control de la PCR. M1: muestra de cDNA obtenido de la cepa Cali-S (agua). M2:

muestra de cDNA obtenido de la cepa Cali-S (dsRNA). M3: muestra de cDNA obtenido de la cepa Cali-MIB (agua). M4: muestra de cDNA obtenido de la cepa Cali-MIB (dsRNA). M5: muestra de cDNA obtenido de la cepa Rockefeller (agua). M6: muestra de cDNA obtenido de la cepa Rockefeller (dsRNA).

Consecutivamente, se realizó la qPCR para cuantificar la expresión génica del gen *Antibacterial peptide* y de esta manera, evaluar el silenciamiento génico. Los resultados obtenidos se evaluaron por el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ propuesto por Livak et al, (2001) reportado en la **tabla 8** en donde:

$\Delta Ct_{\text{silenciamiento}} = Ct (\text{Antibacterial peptide dsRNA}) - Ct (\beta\text{-actina dsRNA})$.

$\Delta Ct_{\text{control}} = Ct (\text{Antibacterial peptide agua}) - Ct (\beta\text{-actina agua})$.

$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{silenciamiento}}) - (\Delta Ct_{\text{control}})$

Cuantificación expresión génica = $2^{(-\Delta\Delta Ct)} = 2^{(\Delta Ct_{\text{silenciamiento}}) - (\Delta Ct_{\text{control}})}$

Tabla 8. Evaluación de la expresión génica del gen *Antibacterial peptide*. Los valores en negrilla son los resultados del método de cuantificación relativa del gen *Antibacterial peptide*. La expresión génica para el gen se comparó con un grupo control microinyectados con agua. La expresión relativa fue medida por qPCR, el cual se usó como normalizador el gen β -actina. Los datos obtenidos se analizaron usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et al., 2001).

Replica	Cepa	Tratamiento	Gen	Ct	Promedio Ct	Ct SD	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
1	Susceptible	Agua	β -actina	19,14	19,11	0,03			
1	Susceptible	Agua	β -actina	19,09					
2	Susceptible	dsRNA	β -actina	16,28	16,28	0,01			
2	Susceptible	dsRNA	β -actina	16,29					
3	Refractaria	Agua	β -actina	19,81	19,55	0,37			
3	Refractaria	Agua	β -actina	19,30					
4	Refractaria	dsRNA	β -actina	17,54	17,67	0,18			
4	Refractaria	dsRNA	β -actina	17,80					
5	Rockefeller	Agua	β -actina	26,35	25,70	0,93			
5	Rockefeller	Agua	Actina	25,04					
6	Rockefeller	dsRNA	Actina	18,78	18,78	0,00			
6	Rockefeller	dsRNA	Actina	18,78					
1	Susceptible	Agua	<i>Antibacterial peptide</i>	19,41	19,41	0,00	0,29		
1	Susceptible	Agua	<i>Antibacterial peptide</i>	19,41					
2	Susceptible	dsRNA	<i>Antibacterial peptide</i>	16,50	16,45	0,07	0,17	-0,12	1,09

2	Susceptible	dsRNA	<i>Antibacterial peptide</i>	16,40					
3	Refractaria	Agua	<i>Antibacterial peptide</i>	19,61	19,53	0,12	- 0,0 3		
3	Refractaria	Agua	<i>Antibacterial peptide</i>	19,44					
4	Refractaria	dsRNA	<i>Antibacterial peptide</i>	17,77	17,69	0,11	0,0 2	0,05	0,97
4	Refractaria	dsRNA	<i>Antibacterial peptide</i>	17,62					
5	Rockefeller	Agua	<i>Antibacterial peptide</i>	24,49	23,91	0,83	- 1,7 9		
5	Rockefeller	Agua	<i>Antibacterial peptide</i>	23,32					
6	Rockefeller	dsRNA	<i>Antibacterial peptide</i>	17,72	17,82	0,14	- 0,9 7	0,82	0,57
6	Rockefeller	dsRNA	<i>Antibacterial peptide</i>	17,91					

El análisis efectuado por el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak et al., 2001) permitió confirmar el silenciamiento del gen evaluado, no obstante, en la cepa susceptible el gen muestra un cambio en la expresión superior a 1 (1,09) (**Figura 18**).

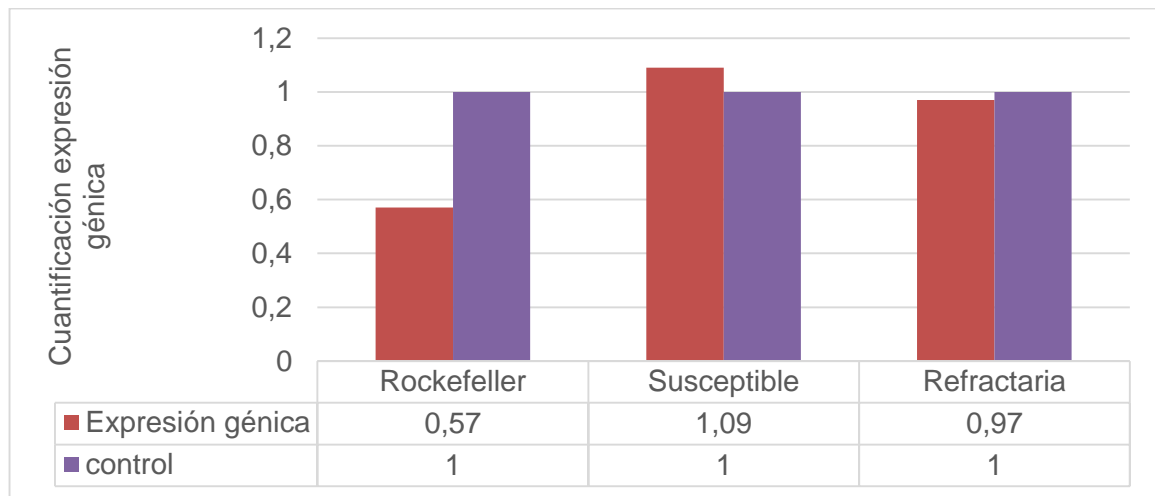


Figura 18. Evaluación del silenciamiento del gen *Antibacterial peptide* en las cepas Cali-S (susceptible), Cali-MIB (Refractaria) y Rockefeller (48 horas post inyección). Los niveles de expresión para determinar el silenciamiento se establecieron de acuerdo al método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak et al., 2001). La expresión del gen *Antibacterial peptide* se comparó con un grupo control de mosquitos microinyectados con agua (control), en donde 1 representa el menor nivel de expresión génica.

6.4 Evaluación de la Competencia Vectorial en mosquitos de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller.

Una vez se cumplió el periodo de incubación del virus en el mosquito (10-14) días, se procedió a realizar la prueba de IFI (**Figura 19**), en donde se observó en que parte del tejido del mosquito (cabeza o intestino medio) se encontraba el vDEN-2. De este modo, se estimaron los fenotipos de los mosquitos evaluados de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller.

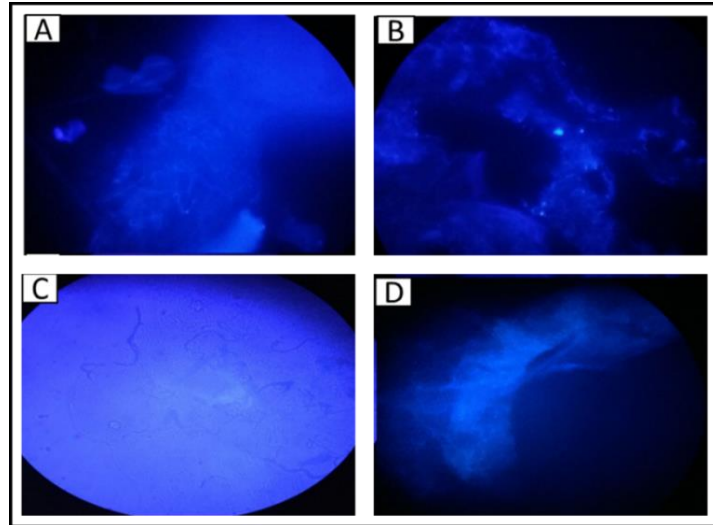


Figura 19. Prueba de IFI en cabezas e intestinos medios de mosquitos de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller. A: Prueba IFI negativa para cabeza. B: Prueba IFI positiva para cabeza. C: Prueba IFI negativa para intestino medio. D: Prueba IFI positiva para intestino medio.

De este modo, se estimó el porcentaje de la CV (**Tabla 9**), y se determinó el efecto del silenciamiento en el cambio del fenotipo de las tres cepas evaluadas (Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller).

Tabla 9. Efecto del silenciamiento del gen Antibacterial peptide en la CV en mosquitos de *Ae. aegypti*. IFI: Inmunofluorescencia indirecta, % S: porcentaje de mosquitos susceptibles a la infección con vDEN-2, % MIB: porcentaje de mosquitos con barrera de infección en intestino medio, % MEB: porcentaje de mosquitos con barrera de escape en intestino medio.

Cepa	Tratamiento	mosquitos infectados (n)	IFI cabeza (n)	IFI intestino (n)	% S	% MIB	% MEB
Cali-S	Control	3	+ (3)	+ (3)	100,0	0,0	0,0
			- (0)	- (0)			
Cali-S	dsRNA	9	+ (3)	+ (5)	22,2	44,4	33,3
			- (6)	- (4)			
Cali-MIB	Control	10	+ (2)	+ (4)	20,0	60,0	20,0
			- (8)	- (6)			
Cali-MIB	dsRNA	11	+ (3)	+ (5)	27,3	63,6	9,0
			- (8)	- (6)			
Rockefeller	Control	24	+ (18)	+ (19)	75,0	20,8	4,2
			- (6)	- (5)			

	dsRNA	20	+ (7)	+ (11)	35,0	45,0	20,0
			- (13)	- (9)			

Los resultados obtenidos con el silenciamiento del gen *Antibacterial peptide* exhiben que una intervención con este gen representa una disminución en la competencia vectorial de las cepas Cali-S y Rockefeller (**Figura 20**), puesto que para cada cepa se evidencia un incremento en la capacidad de los mosquitos de eliminar el virus (mayor refractariedad). Sin embargo, el silenciamiento del gen para la Cepa Cali-MIB no represento ningún cambio.

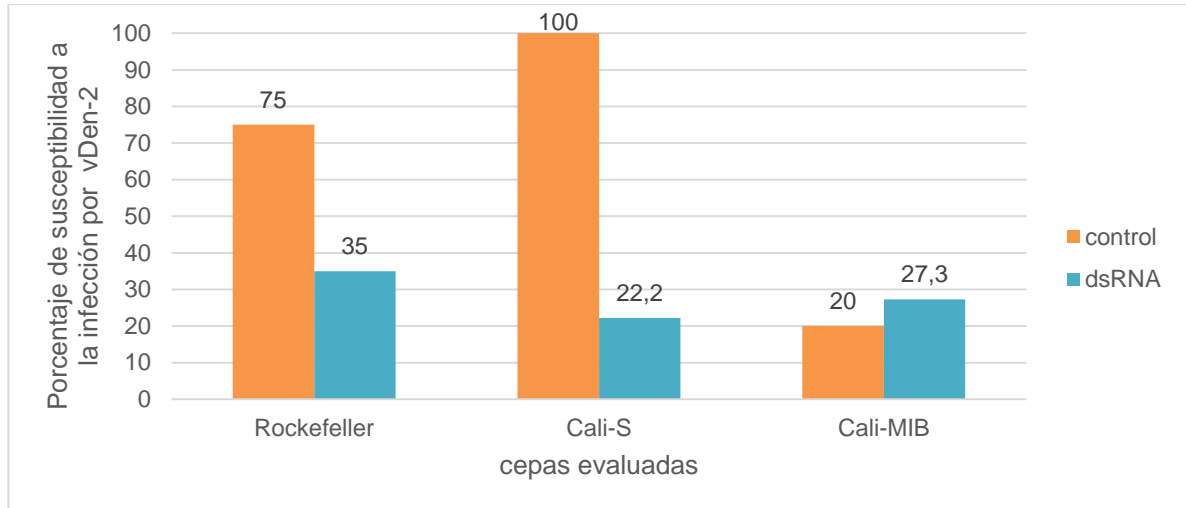


Figura 20. Efecto del silenciamiento del gen *Antibacterial peptide* en la susceptibilidad o la CV en mosquitos de *Ae. aegypti*. Los resultados se estimaron a partir de los datos obtenidos por la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), en donde el porcentaje de susceptibilidad a la infección por vDEN-2 representa la disminución de los fenotipos susceptibles al efectuarse el silenciamiento del gen *Antibacterial peptide*.

7. DISCUSIÓN

El mosquito *Ae. aegypti* es el vector responsable de la transmisión del virus dengue que causa la enfermedad conocida por el mismo nombre. No obstante, el mosquito utiliza su sistema inmune innato para controlar la infección en su organismo, lo que da como resultado la activación de respuestas inmunitarias y mecanismos genéticos que limitan la infección con el virus (Zhiyong Xi et al., 2008). En este estudio se realizó y describió el cambio en la CV que tiene el silenciamiento de un gen asociado a la respuesta inmune de *Ae. aegypti* ante la infección por el vDEN-2 en tres cepas (Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller) con distintas susceptibilidad o CV al virus.

El uso de RNAs de interferencia es una herramienta muy importante para la elaboración de estudios que involucren procesos de regulación de la expresión génica. En invertebrados se ha planteado que el silenciamiento con RNAi en estos organismos representan un cambio en sus mecanismos de defensa innato contra infecciones virales (Xi, Ramírez & Dimopoulos, 2008). En nuestro trabajo ésta técnica permitió realizar efectivamente el silenciamiento del gen de interés *Antibacterial peptide*.

Por medio de la técnica qPCR se determinaron los niveles de expresión del gen de interés, donde se verificó el silenciamiento del mismo en las tres cepas evaluadas dado que el nivel de expresión fue igual o menor a 1 (**Figura 18**). Sin embargo, para la cepa susceptible (Cali-S) se encontró que el nivel de la expresión del gen es de 1,09. No obstante, en estudios anteriores se ha encontrado que cuando el mosquito se encuentra infectado con el vDEN-2, el gen *Antibacterial peptide* se encuentra sobre-expresado (Caicedo PA et al., 2018), por lo cual un desfase del 0,09 no es significativo y se asume que el gen para esta cepa se encontraba silenciado. Una razón por la cual se cree que se obtuvo este nivel de expresión (1,09) en la cepa Cali-S, es debido a que no se inyectó la concentración adecuada de dsRNA para silenciar totalmente el gen, o en su defecto, la poca cantidad de réplicas fueron insuficientes para determinar eficazmente la evaluación del silenciamiento, puesto como se explicó anteriormente, la alta mortalidad del proceso solo permitió coleccionar tres individuos a las 48 horas post inyección de esta cepa.

En relación al gen *Antibacterial peptide* (AAEL000598), este es una cecropina perteneciente a una amplia familia de péptidos antimicrobianos (AMPs) constituyentes de las defensas claves en insectos en respuesta a las infecciones contra bacterias Gram-positivas y/o Gram-negativas (Boman et al., 1991; Hoffmann and Hetru, 1992; Cociancich et al., 1994a); no obstante, en estudios previos se ha visto actividad en la respuesta inmune contra hongos, protozoos, y virus (Bevins & Zasloff, 1990; Ahmad et al., 1995; Wachinger M et al., 1998; Caicedo PA et al., 2018). Por este motivo, este gen fue escogido para ser evaluado, debido a que se ha encontrado una participación activa en respuesta a la infección por virus dengue en el modelo *Aedes aegypti*-vDEN-2 (Luplertlop N et al., 2011; Caicedo PA et al., 2018).

En estudios relacionados con la función de la actividad de los péptidos en mosquitos de *Aedes aegypti* infectados con virus dengue (Ribeiro JM et al., 2007; Luplertlop N et al., 2011; Caicedo PA et al., 2018), han corroborado que los péptidos antimicrobianos (AMP) se encuentran comúnmente en las glándulas salivales (Luplertlop N et al., 2011) y en el intestino medio (Caicedo PA et al., 2018) lo cual indica que la vía IMD está implicada en la defensa del mosquito contra el vDEN.

Los resultados obtenidos por medio de la prueba de IFI (**Figura 20**) demostraron que el silenciamiento del gen *Antibacterial peptide*, reduce significativamente la susceptibilidad de las cepas susceptible (Cali-S) y Rockefeller a la infección por el vDEN-2, de 100% a 22% y de 75% a 35% respectivamente, mientras que la susceptibilidad de la cepa refractaria (Cali-MIB) no tuvo cambios significativos (22,2% a 20%).

Es importante tener en cuenta que, la diseminación del virus en el mosquito depende de cuatro eventos principales: el primero reside en el ingreso e infección del virus en las células epiteliales del intestino medio, el segundo depende de la efectividad que tenga el sistema inmune versus la resistencia del virus para replicarse en las células epiteliales, el tercero involucra la evasión a la barrera de escape del intestino medio (MEB) para ingresar al hemocele, y el último, la entrada directa al hemocele a través del epitelio intestinal en la hemolinfa (Liu et al., 2018). De esta manera, las cepas susceptibles pueden presentar distintos factores como mal funcionamiento de las barreras tisulares, una respuesta inmune ineficiente o cambios a nivel de receptores que posibilitan el desarrollo de algunos de los cuatro eventos mencionados anteriormente. Teniendo en cuenta lo anterior, se puede suponer que en las cepas refractarias, los mecanismos genéticos que poseen para defenderse contra infecciones virales son más efectivos comparado con las cepas susceptibles. Siguiendo esta idea, esto podría explicar porque en nuestro estudio el silenciamiento gen *Antibacterial peptide* no representó un cambio significativo en la CV de la cepa refractaria, Cali-MIB, debido a que este gen no podría desempeñar un papel primordial en la defensa viral, si no que actúa en conjunto con otros genes que activan otras vías del sistema inmune del mosquito, como la vía Toll, JAK/STAT o la misma IMD a través de otros receptores (**Figura 8**).

En el caso de las cepas Cali-S y Rockefeller, la disminución de la susceptibilidad de dichas cepas a causa del silenciamiento de *Antibacterial peptide*, a pesar de que no es un comportamiento esperado teniendo en cuenta la función antiviral del gen, se podría plantear la hipótesis que el silenciamiento del gen induce la expresión de otros genes asociados con diferentes vías del sistema inmune del mosquito, de tal manera que desencadena respuestas inmunes específicas y diferentes a la que se encuentra asociado el gen (Toll, JAK/STAT y la RNAi)(**Figura 8**), lo que permitiría combatir eficazmente la infección del vDEN. Por lo tanto, se podría concluir que al igual que estudios anteriores (Waldock et al., 2012), los genes asociados a la vía IMD, y la vía en sí, a pesar de estar involucrados en el efecto antiviral, tiene una limitación en la contribución de defensa en el mosquito. Sin embargo, para comprobar dicha hipótesis es necesario evaluar genes específicos asociados

directamente a las rutas mencionadas de manera simultánea en el silenciamiento del gen *Antibacterial peptide*.

En resumen, el presente estudio ofrece un conocimiento básico sobre el papel que juega el gen *Antibacterial peptide* en el proceso infeccioso por vDEN tanto en las cepas seleccionadas (Cali-S y Cali-MIB) como en la cepa de referencia Rockefeller, el cual puede dar una idea sobre los efectos que pueden tener el silenciamiento en genes involucrados en la regulación de los mecanismos génicos asociados con las infecciones víricas. También, cabe mencionar que el gen *Antibacterial peptide* puede llegar a ser un objetivo blanco que permita el estudio para desarrollar herramientas que disminuyan la competencia vectorial de los mosquitos y de esta manera, modificar los fenotipos susceptibles por organismos refractarios al vDEN. Sin embargo, es importante resaltar que los resultados están basados en una muestra poblacional pequeña, por lo que se recomienda seguir realizando estudios en dicho gen.

8. CONCLUSIONES

En este estudio se logró efectuar el silenciamiento del gen *Antibacterial peptide* a través de la técnica de RNAi y corroborar dicho silenciamiento por medio de una qPCR en las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller.

El silenciamiento del gen *Antibacterial peptide* redujo la susceptibilidad o competencia vectorial hacia la infección por el virus dengue en las cepas Cali-S y Rockefeller, lo que indica que este gen podría cumplir un papel en el proceso infeccioso por vDEN. En la cepa refractaria no se observó un cambio significativo en la CV. Teniendo en cuenta lo anterior, se debe continuar con la investigación en relación al modo de acción del gen *Antibacterial peptide* y como está relacionado en la respuesta a infecciones virales, debido a que los resultados observados no fueron los esperados según estudios previos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye que las infecciones virales están mediadas por distintos mecanismos que interactúan entre sí, por lo que es importante evaluar los genes específicos asociados a las vías principales de respuesta inmune de *Aedes aegypti*, que proporcionen el entendimiento de estas interacciones virus-patógeno, y así poder desarrollar herramientas de control vectorial que permitan una disminución de la enfermedad.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda en estudios posteriores realizar dsRNA con una concentración igual o mayor a 1000 ng/ μ L, puesto que esto permite tener una mejor concentración para microinyectar a los mosquitos y garantizar un efectivo silenciamiento génico, además de garantizar el uso del micromanipulador electrónico, el cual facilitaría el procedimiento y reduciría la mortalidad del proceso.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio, se recomienda evaluar nuevamente el silenciamiento del gen *Antibacterial peptide* con un tamaño poblacional más grande, con la finalidad de corroborar la información obtenida.

Por último, es necesario evaluar genes específicos asociados directamente a las rutas Toll, JAK/STAT y la RNAi de manera simultánea en el silenciamiento del gen *Antibacterial peptide*, para corroborar la hipótesis mencionada en este trabajo. Además de obtener información pertinente que permita conocer qué vías se encuentran asociadas directamente con la respuesta a la infección por el vDEN.

REFERENCIAS

Ahmad, I., Perkins, W., Lupan, D., Selsted, M., & Janoff, A. (1995). Liposomal entrapment of the neutrophil-derived peptide indolicidin endows it with in vivo antifungal activity. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, 1237(2), 109-114. doi: 10.1016/0005-2736(95)00087-j

Arca, B. (2005). An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Anopheles gambiae*. *Journal of Experimental Biology*, 208(20), 3971-3986. doi: 10.1242/jeb.01849

Barón, O., Ursic-Bedoya, R., Lowenberger, C., & Ocampo, C. (2010). Differential Gene Expression from Midguts of Refractory and Susceptible Lines of the Mosquito, *Aedes aegypti*, Infected with Dengue-2 Virus. *Journal of Insect Science*, 10(41), 1-23. doi: 10.1673/031.010.4101

Bennett, K. (2005). Quantitative Trait Loci That Control Dengue-2 Virus Dissemination in the Mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*, 170(1), 185-194. doi: 10.1534/genetics.104.035634

Bennett, K., Farfan-Ale, J., Fernandez-Salas, I., Black, W., Higgs, S., & Beaty, B. et al. (2002). Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(1), 85-92. doi: 10.4269/ajtmh.2002.67.85

Bevins, C., & Zasloff, M. (1990). Peptides from Frog Skin. *Annual Review of Biochemistry*, 59(1), 395-414. doi: 10.1146/annurev.biochem.59.1.395

Bhatt, S., Gething, P., Brady, O., Messina, J., Farlow, A., & Moyes, C. et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504-507. doi: 10.1038/nature12060

Boman, H. (1998). Gene-Encoded Peptide Antibiotics and the Concept of Innate Immunity: An Update Review. *Scandinavian Journal of Immunology*, 48(1), 15-25. doi: 10.1046/j.1365-3083.1998.00343.x

Boman, H., Faye, I., Gudmundsson, G., Lee, J., & Lidholm, D. (1991). Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *European Journal Of Biochemistry*, 201(1), 23-31. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16252.x

Bosio, C., Beaty, B., & Black, W. (1998). Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 59(6), 965-970. doi: 10.4269/ajtmh.1998.59.965

Brackney, D., Scott, J., Sagawa, F., Woodward, J., Miller, N., & Schilkey, F. et al. (2010). C6/36 *Aedes albopictus* Cells Have a Dysfunctional Antiviral RNA Interference Response. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 4(10), e856. doi: 10.1371/journal.pntd.0000856

Brady, O., Gething, P., Bhatt, S., Messina, J., Brownstein, J., & Hoen, A. et al. (2012). Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6(8), e1760. doi: 10.1371/journal.pntd.0001760

Braks MA, Honorio NA, Lourenço-de-Oliveira R, Juliano SA, Lounibos LP. (2003). Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *J Med Entomol.* 40:785-94

Brinton, M. (2002). The Molecular Biology of West Nile Virus: A New Invader of the Western Hemisphere. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 371-402. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160654

Caicedo, P., Barón, O., Pérez, M., Alexander, N., Lowenberger, C., & Ocampo, C. (2013). Selection of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains that are susceptible or refractory to Dengue-2 virus. *The Canadian Entomologist*, 145(03), 273-282. doi: 10.4039/tce.2012.105

Caicedo, P.A, Idalba Mildred Serrato Shuzhen Sim George Dimopoulos Heather Coatsworth Carl Lowenberger Clara B. Ocampo (2018). Immune response-related genes associated to blocking midgut dengue virus infection in *Aedes aegypti* strains that differ in susceptibility. *Insect Sci.* doi: 10.1111/1744-7917.12573.

Caicedo, P.A. (2008). Selección por isofamilias de cepas susceptibles y refractarias de *Aedes aegypti* a infección con virus Dengue-2, a partir de una población obtenida en la ciudad de Cali (tesis de pregrado). Universidad del Cauca, Cauca, Colombia.

Carmen Acosta & Ivonne Gómez. (2005). Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Rev Biomed*; 16:113-137.

Center for disease control and prevention. (2016). Dengue. Recuperado de: https://www.colorado.gov/pacific/sites/default/files/OEPR4_ZTK_MosquitoLifeCycle_Spanish_1.pdf

Clyde, K., Kyle, J., & Harris, E. (2006). Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology*, 80(23), 11418-11431. doi: 10.1128/jvi.01257-06

Cociancich, S., Bulet, P., Hetru, C., & Hoffmann, J. (1994). The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitology Today*, 10(4), 132-139. doi: 10.1016/0169-4758(94)90260-7

- Díaz-Quijano, F., Villar-Centeno, L., & Martínez-Vega, R. (2006). Complicaciones asociadas a la trombocitopenia profunda en pacientes con dengue. *Revista Médica De Chile*, 134(2). doi: 10.4067/s0034-98872006000200005
- Dourado, L., Ribeiro, L., Brancalhão, R., Tavares, J., Borges, A., & Fernandez, M. (2011). Silkworm salivary glands are not susceptible to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Genetics And Molecular Research*, 10(1), 335-339. doi: 10.4238/vol10-1gmr996
- Elshuber, S., Heinz, F., & Mandl, C. (2003). Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *Journal of General Virology*, 84(1), 183-191. doi: 10.1099/vir.0.18723-0
- Franz, A., Kantor, A., Passarelli, A., & Clem, R. (2015). Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*, 7(7), 3741-3767. doi: 10.3390/v7072795
- Gateff, E. (1978). Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila Melanogaster*. *Science*, 200(4349), 1448-1459. doi: 10.1126/science.96525
- Gibbons, R. (2002). Dengue: an escalating problem. *BMJ*, 324(7353), 1563-1566. doi: 10.1136/bmj.324.7353.1563
- Gluber D, Nalim S, Tan R, Saipan H, Sulianté SJ. (1979). Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 28(6): 1045-52.
- González, E.L., & Arias, A.F. (2015). Montaje, implementación y mantenimiento de una colonia de mosquitos género *anopheles* para investigaciones en el laboratorio de zoonosis y salud pública y montaje de un sistema de alimentación artificial de insectos hematófagos (tesis de pregrado). Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, Colombia.
- Gubler, D. (1995). Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. *Emerging Infectious Diseases*, 1(2), 55-57. doi: 10.3201/eid0102.950204
- Gubler, D. (1997). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 8(1), 3-9. doi: 10.1016/s1045-1870(97)80003-9
- Gubler, D., Nalim, S., Saroso, J., Saipan, H., & Tan, R. (1979). Variation in Susceptibility to Oral Infection with Dengue Viruses among Geographic Strains of *Aedes Aegypti* *. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 28(6), 1045-1052. doi: 10.4269/ajtmh.1979.28.1045
- Guirakhoo, F., Bolin, R., & Roehrig, J. (1992). The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression

of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology*, 191(2), 921-931. doi: 10.1016/0042-6822(92)90267-s

Guirakhoo, F., Heinz, F., Mandl, C., Holzmann, H., & Kunz, C. (1991). Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. *Journal of General Virology*, 72(6), 1323-1329. doi: 10.1099/0022-1317-72-6-1323

Guzman, A., & Istúriz, R. (2010). Update on the global spread of dengue. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, S40-S42. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.018

Guzmán, M., García, G., & Kourí, G. (2006). El dengue y el dengue hemorrágico: prioridades de investigación. *Revista Panamericana De Salud Pública*, 19(3), 204-215. doi: 10.1590/s1020-49892006000300015

Halstead, S., Heinz, F., Barrett, A., & Roehrig, J. (2005). Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis. *Vaccine*, 23(7), 849-856. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.03.069

Hardy, J., Houk, E., Kramer, L., & Reeves, W. (1983). Intrinsic Factors Affecting Vector Competence of Mosquitoes for Arboviruses. *Annual Review of Entomology*, 28(1), 229-262. doi: 10.1146/annurev.en.28.010183.001305

Henchal EA & Putnak JR. (1990). The Dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* 3:376-96.

Higgs S & Beaty BJ. (2005). Natural cycles of vector-borne pathogens. En: Marquardt WC, editor. *Biology of Disease Vectors*. 2nd Edition. Elsevier Academic Press. p. 167-185.

Hoffmann, J., & Hetru, C. (1992). Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunology Today*, 13(10), 411-415. doi: 10.1016/0167-5699(92)90092-I

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284: 1313–1318.

Horsfall, W. R. (1972). *Mosquitoes. Their binomics and relation to disease*. New York, Hefner Publishing Company, Inc. 723 p.

Instituto Nacional de Salud (INS). (2016). Boletín epidemiológico semana 52. [Archivo PDF]. Recuperado de: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2016%20Bolet%20C3%ADn%20epidemiol%20C3%B3gico%20semana%2052%20-.pdf>

Instituto Nacional de Salud (INS). (2017). Boletín epidemiológico semana 17. [Archivo PDF]. Recuperado de: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Paginas/default.aspx>

Isturiz RE, Gubler DJ & Brea del Castillo J. (2000). Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. *Infect Dis Clin North Am*; 14:121-40.

Juliano SA & Lounibos LP. (2005). Ecology of invasive mosquitoes: Effects on resident species and on human health. *Ecol Lett.* 8:558-74. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00755>

Khoo, C., Piper, J., Sanchez-Vargas, I., Olson, K., & Franz, A. (2010). The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiology*, 10(1), 130. doi: 10.1186/1471-2180-10-130

Leitmeyer, K. C., Vaughn, D. W., Watts, D. M., Salas, R., Villalobos, I., de Chacon, ... Rico-Hesse, R. (1999). Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. *Journal of Virology*, 73(6), 4738–4747.

Lindenbach, B. D. & Rice, C. (2003). M. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 59, 23–61

Lindenbach, B., & Rice, C. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, 23-61. doi: 10.1016/s0065-3527(03)59002-9

Liu B, behura SK, Clem RJ, Schneemann A, Becnel J, Severson DW, et al. (2013). P53-mediated rapid induction of apoptosis conveys resistance to viral infection in *Drosophila melanogaster*. *PLoS pathogens*. 9(2): e1003137.

Liu, B., Behura, S., Clem, R., Schneemann, A., Becnel, J., Severson, D., & Zhou, L. (2013). P53-Mediated Rapid Induction of Apoptosis Conveys Resistance to Viral Infection in *Drosophila melanogaster*. *Plos Pathogens*, 9(2), e1003137. doi: 10.1371/journal.ppat.1003137

Liu, T., Xu, Y., Wang, X., Gu, J., Yan, G., & Chen, X. (2018). Antiviral systems in vector mosquitoes. *Developmental & Comparative Immunology*, 83, 34-43. doi: 10.1016/j.dci.2017.12.025

Lowenberger, C. (2001). Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(3), 219-229. doi: 10.1016/s0965-1748(00)00141-7

Luplertlop, N., Surasombatpattana, P., Patramool, S., Dumas, E., Wasinpiyamongkol, L., & Saune, L. et al. (2011). Induction of a Peptide with Activity against a Broad Spectrum of Pathogens in the *Aedes aegypti* Salivary Gland, following Infection with Dengue Virus. *Plos Pathogens*, 7(1), e1001252. doi: 10.1371/journal.ppat.1001252

Maestre-Serrano Ronald & Gómez-Camargo Doris. (2013). Dengue: epidemiología, políticas públicas y resistencia de vectores a insecticidas. *Rev. cienc. biomed.* 4(2): 302-317.

Méndez A & González G. (2003). Dengue haemorrhagic fever in children: ten years of clinical experience. *Biomedica.* 23:180-93.

Mercado-Curiel, R., Black, W., & Muñoz, M. (2008). A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiology*, 8(1), 118. doi: 10.1186/1471-2180-8-118

Mirsa, A. (1956). Datos experimentales sobre los aspectos bioecológicos del *Aedes aegypti* (Linn), desarrollados en laboratorio. Revista de sanidad y asistencia social. Instituto Nacional de Higiene. Venezuela. 341 p.

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R., & Rossmann, M. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13-22. doi: 10.1038/nrmicro1067

Nadia y. Castañeda, Jaime e. castellanos, Angela c. zapata & Felio sello. (2007). Línea celular de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) AEGY-28 refractaria a la infección con los virus dengue 2J Fiebre amarilla. Acta. Colombia., Vol. 12. 47-58.

Ocampo, C., Caicedo, P., Jaramillo, G., Ursic Bedoya, R., Baron, O., & Serrato, I. et al. (2013). Differential Expression of Apoptosis Related Genes in Selected Strains of *Aedes aegypti* with Different Susceptibilities to Dengue Virus. *Plos ONE*, 8(4), e61187. doi: 10.1371/journal.pone.0061187

Okuda, K., Caroci, A., Ribolla, P., de Bianchi, A., & Bijovsky, A. (2002). Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. *Tissue And Cell*, 34(3), 210-219. doi: 10.1016/s0040-8166(02)00032-0

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Dengue y dengue grave. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Dengue y dengue grave. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Enfermedades Tropicales. Recuperado de http://www.who.int/topics/tropical_diseases/es/

Organización Mundial de la Salud (OMS); Programa Especial para la Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales (TDR). (2009). Dengue: Guía para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. First Ed.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). Situación del dengue en las Américas. Recuperado de: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=922&Itemid=99999999.

Padilla JC, Rojas DP & Sáenz-Gómez R. (2012). Dengue en Colombia: Epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Primera Edición. Bogotá D.C. ISBN: 978-958-46-0661-7

Rey, J., & Lounibos, P. (2015). Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y la transmisión de enfermedades. *Biomedica*, 35(2). doi: 10.7705/biomedica.v35i2.2514

Rodenhuis-Zybert, I., Wilschut, J., & Smit, J. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 67(16), 2773-2786. doi: 10.1007/s00018-010-0357-z

Rodríguez G., H., & De La Hoz R., F. (2005). Dengue and dengue and vector behaviour in Cádiz, Colombia, 2004. *Revista De Salud Pública*, 7(1). doi: 10.1590/s0124-00642005000100001

Romoser W.S. (1996). The vector alimentary system. In: Beaty B.J., Marquardt W.C., editors. *The Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado; Niwot, CO, USA. pp. 298–317.

Romoser, W., Wasieloski, L., Pushko, P., Kondig, J., Lerdthusnee, K., Neira, M., & Ludwig, G. (2004). Evidence for Arbovirus Dissemination Conduits from the Mosquito (Diptera: Culicidae) Midgut. *Journal of Medical Entomology*, 41(3), 467-475. doi: 10.1603/0022-2585-41.3.467

Rossmann, M., Kuhn, R., Zhang, W., Pletnev, S., Corver, J., & Lenches, E. et al. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Acta Crystallographica Section a Foundations of Crystallography*, 58(s1), c6-c6. doi: 10.1107/s0108767302085343

Sánchez-Vargas, I., Scott, J., Poole-Smith, B., Franz, A., Barbosa-Solomieu, V., & Wilusz, J. et al. (2009). Dengue Virus Type 2 Infections of *Aedes aegypti* Are Modulated by the Mosquito's RNA Interference Pathway. *Plos Pathogens*, 5(2), e1000299. doi: 10.1371/journal.ppat.1000299

Sim S & Dimopoulos G (2010) Dengue Virus Inhibits Immune Responses in *Aedes aegypti* Cells. *PLoS ONE* 5(5): e10678. doi: 10.1371/journal.pone.0010678

Sim S, Jupatanakul N & Dimopoulos G. (2014). Mosquito Immunity against Arboviruses. *Viruses*, 6(11), 4479-4504. <http://dx.doi.org/10.3390/v6114479>

Stadler K, Allison SL, Schalich J & Heinz FX. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J. Virol.* 71, 8475–8481.

Stiasny, K., Allison, S., Mandl, C., & Heinz, F. (2001). Role of Metastability and Acidic pH in Membrane Fusion by Tick-Borne Encephalitis Virus. *Journal Of Virology*, 75(16), 7392-7398. doi: 10.1128/jvi.75.16.7392-7398.2001

Tamay de Dios L, Ibarra C & Velasquillo C (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Vol. 2, 70-78.

Valle RP & Falgout B. (1998). Mutagenesis of the NS3 Protease of Dengue Virus Type 2. *J Virol*; 72: 624-32.

Wachinger, M., Brack-Werner, R., Erfle, V., von Pechmann, N., Neumann, M., & Winder, D. et al. (1998). Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *Journal of General Virology*, 79(4), 731-740. doi: 10.1099/0022-1317-79-4-731

Waldock, J., Olson, K., & Christophides, G. (2012). *Anopheles gambiae* Antiviral Immune Response to Systemic O'nyong-nyong Infection. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6(3), e1565. doi: 10.1371/journal.pntd.0001565

Xi, Z., Ramirez, J., & Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. *Plos Pathogens*, 4(7), e1000098. doi: 10.1371/journal.ppat.1000098

Yábar C, Carrillo C, Nolasco O, García M & Montoya Y. (1999). Diagnóstico temprano del virus Dengue 1 usando RT-PCR y perspectivas para la caracterización molecular de cepas autóctonas. *Rev Med Exp*; XV (1-2).

Zhang, Y., Zhang, W., Ogata, S., Clements, D., Strauss, J., & Baker, T. et al. (2004). Conformational Changes of the Flavivirus E Glycoprotein. *Structure*, 12(9), 1607-1618. doi: 10.1016/j.str.2004.06.019

Anexo 1. Genes seleccionados para su caracterización temporal y funcional mediante PCR en tiempo real y RNA de interferencia. (Caicedo PA et al., 2018). Los genes resaltados en color rosado especifican los 4 genes que fueron evaluados a través del mecanismo de RNA de interferencia, en donde el silenciamiento de estos generó un cambio en la susceptibilidad o competencia vectorial de las cepas, por lo cual, representan un papel importante en el proceso infeccioso en el modelo *Aedes aegypti*-vDEN-2. El gen resaltado en rojo fue el que se escogió para este trabajo.

Gen	ID
1. <i>Caspase-1</i>	AAEL014348
2. <i>Apoptosis stimulating of P53</i>	AAEL013338
3. <i>Niemann Pick Type C2</i>	AAEL015136
4. <i>Gram-negative bacteria binding protein</i>	AAEL009176
5. <i>Keratinocyte lectin</i>	AAEL009842
6. <i>Fibrinogen and fibronectin</i>	AAEL006702
7. <i>Cathepsin- b</i>	AAEL007585
8. <i>Trypsin</i>	AAEL013703
9. <i>Metalloproteinase, putative</i>	AAEL014516
10. <i>Serine-type endopeptidase</i>	AAEL001674
11. <i>Antibacterial peptide</i>	AAEL000598
12. <i>Lethal (2)essential for life, l2efl</i>	AAEL011277

Anexo 2. Formato de registro titulación de virus dengue-2 en células c6/36 HT

FOR09004-VER: 01 (CIDEM)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
E	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
F	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
G	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
H	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

RESULTADOS:

OBSERVACIONES:

Anexo 3. Formato de registro IFI para cabezas e intestinos de mosquitos – CV.
(Caicedo PA et al, 2018)

Código: **FOR 090**

Creado por:

Fecha de creación:

Aprobación del Garante de Calidad: Clara Ocampo, Mayo/2006

Fecha: _____

Localidad: _____

Responsable: _____

Versión: 01

Modificado por:

Última modificación:

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL- CIDEIM