

**Identificación de genes relacionados con la respuesta inmune innata de
Aedes aegypti a la infección por virus dengue**

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas

PAOLA ANDREA CAICEDO BURBANO

Dirigido por:

CLARA BEATRIZ OCAMPO DURÁN MSc, PhD.

Asesor:

CARL LOWENBERGER, MSc., PhD

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES
MÉDICAS CIDEIM
CALI
2016**

DEDICATORIA

*A **Dios**, por darme la oportunidad de vivir, por su infinita bondad y amor. Por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.*

*A **mis padres Gladys y Orlando**, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, pero más que nada, por su amor.*

*A **mi hijo adorado, Martin**, quien ha sido y es mi mayor motivación, inspiración y felicidad.*

*A **mi esposo Andrés**, por construir conmigo una nueva familia, por tu paciencia, por estar siempre presente, brindándome su apoyo y acompañándome día a día a la distancia en mi desarrollo profesional y personal. Gracias amor*

*A **mi hermano, Willian**, por su apoyo incondicional, y estar a mi lado en cada momento de la vida. Y cómo no, a **mis sobrinos Juan Camilo y Mariana**, por darme esa felicidad y su amor, los quiero mucho.*

*A **mi gran amiga, Neila**, con quien nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y en nuestra vida en general. Gracias por tu apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida.*

*A **mis maestros Clara y Carl**, por creer en mí, por su gran apoyo y motivación para la culminación de mis estudios y para la elaboración de esta tesis. Muchas gracias por su tiempo y enseñanzas compartidas, por su paciencia, su cariño y por impulsar el desarrollo de mi formación profesional.*

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos

Paola

La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar". Thomas Chalmers

AGRADECIMIENTOS

Durante estos 5 años son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que quiero agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

En primer lugar quiero agradecer a la Universidad del Valle y al Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas-CIDEIM por su acogida y el apoyo recibido durante los largos y fructíferos periodos que he desarrollado en ellos mi labor investigadora. Debo un especial reconocimiento a Colciencias por la confianza que mostraron en mí al concederme una beca con la cual fue posible aventurarme en esta travesía. Además agradezco al Gobierno de Canadá, que me facilitaron a través del ELAP los fondos suficientes para desarrollar la pasantía de investigación en la Universidad Simon Fraser. Recuerdo con gratitud los meses pasados en el laboratorio del Dr. Carl Lowenberger.

Un sincero agradecimiento a mis Directores, Clara Ocampo y Carl Lowenberger, por todo el tiempo que me han dado, por sus sugerencias e ideas de las que tanto provecho he sacado, por el respaldo y la amistad.

No puedo olvidar a mis compañeros y amigos en CIDEIM, en especial a los del grupo de Biología y control de vectores, con los cuales he compartido incontables horas de trabajo y momentos especiales. Fueron mi segunda familia.

A todos ustedes mi mayor reconocimiento y gratitud.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABLAS	8
ABREVIATURAS.....	9
ABSTRACT.....	10
RESUMEN	11
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	12
INTRODUCCIÓN	13
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVOS.....	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
ESTADO DEL ARTE	19
<i>El Dengue.....</i>	<i>19</i>
<i>Virus Dengue</i>	<i>19</i>
<i>Mosquitos vectores.....</i>	<i>20</i>
<i>La replicación viral y el ciclo de transmisión.....</i>	<i>21</i>
<i>Epidemiología</i>	<i>22</i>
<i>Prevención y control</i>	<i>26</i>
<i>Componentes biológicos en la transmisión de patógenos por vectores.....</i>	<i>28</i>
<i>Competencia vectorial.....</i>	<i>29</i>
<i>Respuesta inmune en insectos.....</i>	<i>31</i>
CONEXIÓN 1. DISEÑO METODOLÓGICO	34
DISEÑO METODOLÓGICO.....	35
<i>Análisis estadístico</i>	<i>37</i>
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
<i>Mantenimiento de las cepas de Aedes aegypti.</i>	<i>39</i>
<i>Cultivo celular</i>	<i>39</i>
<i>Replicación de vDEN-2 en células C6/36HT e infección de mosquitos mediante alimentadores de vidrio con membrana.</i>	<i>40</i>
<i>Obtención del material biológico para los ensayos con microarreglos.</i>	<i>40</i>
<i>Microarreglos</i>	<i>41</i>
RESULTADOS.....	42
<i>Concentración del virus en las infecciones artificiales</i>	<i>42</i>
<i>Identificación de genes asociados a la respuesta anti vDEN-2 en las cepas Cali-S y Cali-MIB de Ae. aegypti.</i>	<i>42</i>
CAPÍTULO 3. CONFIRMACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN TEMPORAL DE LOS 12 GENES ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR VDEN-2 EN MOSQUITOS DE LAS CEPAS CALI-MIB Y CALI-S, MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (QPCR).	48

MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
<i>Caracterización temporal de genes por PCR en tiempo real (qPCR)</i>	49
RESULTADOS.....	50
<i>Perfil de expresión temporal de doce genes asociados a la respuesta a la infección por vDEN-2</i>	50
CAPÍTULO 4. EVALUACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES CATHEPSIN-B, GRAM NEGATIVE BACTERIA BINDING PROTEIN, NIEMANN PICK TYPE C2, Y KERATINOCYTE LECTIN ANTE LA INFECCIÓN POR VIRUS DEN-2 EN LAS CEPAS CALI-MIB, CALI-S Y ROCKEFELLER DE AE. AEGYPTI	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
<i>Silenciamiento de genes mediante RNA de interferencia (RNAi)</i>	58
<i>Generación de dsRNA y microinyección de mosquitos</i>	58
<i>Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para evaluar la CV de Aedes aegypti a la infección por vDEN-2</i>	59
RESULTADOS.....	63
<i>Evaluación del silenciamiento génico en las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller</i>	63
<i>Evaluación funcional de los genes Cathepsin-b, Gram-negative bacteria binding protein, Niemann Pick Type C2, y Keratinocyte lectin en el proceso de infección del vDEN-2 en los mosquitos de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller</i>	64
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	67
DISCUSIÓN	68
RECOMENDACIONES	75
PERSPECTIVAS	76
REFERENCIAS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> .	20
Figura 2. Mapa de la actividad global del dengue en el 2013.	23
Figura 3. Evolución de la incidencia de dengue en las Américas 1980 – 2014.	24
Figura 4. Situación de alarma y brote de dengue en Colombia.	25
Figura 5. Barreras anatómicas en <i>Aedes aegypti</i> a la transmisión de vDEN.	30
Figura 6. Diseño metodológico. p.e: post-emergencia; h.p.a: horas post-alimentación; s+v: sangre con vDEN; azú: azúcar; IFI: inmunofluorescencia; qPCR: PCR en tiempo real, Cali-MIB: cepa refractaria con barrera de escape en intestino medio, Cali-S: cepa susceptible.	36
Figura 7. Equipo de alimentación artificial con alimentadores de vidrio.	39
Figura 8. Número total de genes expresados en los microarreglos	43
Figura 9. Genes asociados con la respuesta inmune en los tratamientos evaluados: Cali-MIB _(azu) Vs. Cali-S _(azu) , Cali-MIB _(s) Vs. Cali-S _(s) , y Cali-MIB _(s+v) Vs. Cali-S _(s+v) . Flechas rojas: genes sobre regulados, flechas verdes: genes bajo regulados. Azu: tratamiento con azúcar, s: tratamiento con sangre, s+v: tratamiento con sangre con virus.	45
Figura 10. Expresión relativa de los receptores de patrones de reconocimiento (RPR), serin proteasas y otros genes en los intestinos de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> de las cepas Cali-MIB y Cali-S a diferentes tiempos post-alimentación con sangre (barras blancas) o sangre con vDen-2 (barras negras). Todos los genes fueron normalizados usando el gen constitutivo β -actina. Los datos fueron analizados usando la ecuación $2^{(-\Delta\Delta Ct)} \pm SD$.	51
Figura 11. Expresión génica de Receptores de patrones de reconocimiento (RPR), serin proteasas y otros genes en los intestinos de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> de la cepa Cali-BIM (barras negras) vs. la cepa Cali-S (barras blancas) a diferentes tiempos post-alimentación con sangre. La expresión relativa fue medida usando PCR en tiempo real (qPCR). Todos los genes fueron normalizados usando el gen constitutivo β -actina. Los datos fueron analizados usando la ecuación $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$.	54
Figura 12. Expresión génica de Receptores de patrones de Reconocimiento (PRR), serin proteasas y otros genes en los intestinos de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> de la cepa Cali-BIM (barras negras) vs la cepa Cali-S (barras blancas) a diferentes tiempos post-alimentación con sangre infectada con vDen-2. Todos los genes fueron normalizados usando el gen constitutivo β -actina. Los datos fueron analizados usando la ecuación $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$.	55
Figura 13. Disección de cabezas de hembras de <i>Aedes aegypti</i> .	60
Figura 14. Disección de intestinos de <i>Ae. aegypti</i> .	61
Figura 15. Evaluación de las barreras a la infección por vDEN-2 en <i>Aedes aegypti</i> .	62
Figura 16. Evaluación del silenciamiento de los genes <i>GNBP</i> , <i>Niemann Type C2</i> , <i>Cathepsin-b</i> y <i>Keratinocyte lectin</i> , durante los ensayos de silenciamiento génico (RNAi) en las cepas Cali S, Cali MIB y Rockefeller, 48h.p.i. La expresión para cada gen se comparó con un grupo control de mosquitos microinyectados con el gen	

Nautilus, los niveles de expresión para este grupo de mosquitos se establecieron arbitrariamente a 1 (línea continua). La expresión relativa fue medida usando qPCR. Todos los genes fueron normalizados usando el gen constitutivo β -actina. Los datos fueron analizados usando la ecuación $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$64

Figura 17. Efecto del silenciamiento de los genes *Keratinocyte lectin*, *GNBP*, *Cathepsin-b*, *Niemann Pick Type C2* y *Nautilus* en la susceptibilidad de los mosquitos de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller a la infección por el vDEN-2. La susceptibilidad a la infección por el vDEN se mide mediante IFI para obtener porcentajes de individuos positivos o negativos a la infección.66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de genes bajo o sobre regulados en la cepa Cali-MIB comparado con la cepa Cali-S, en los 3 grupos evaluados en los microarreglos.	44
Tabla 2. Genes bajo o sobre regulados en el grupo funcional respuesta inmune en los grupos de comparación: Cali-MIB _(azu) Vs. Cali-S _(azu) , Cali-MIB _(s) Vs. Cali-S _(s) , and Cali-MIB _(s+v) Vs. Cali-S _(s+v) . Listado basado en el diagrama de Venn de la figura 8.	46
Tabla 3. Genes seleccionados para su caracterización temporal y funcional mediante PCR en tiempo real y RNA de interferencia.	47
Tabla 4. Primers empleados en los ensayos de PCR cuantitativa (qPCR)	50
Tabla 5. Modelo de regresión múltiple para el análisis de la expresión de los genes <i>Keratinocyte lectin</i> , <i>Cathepsin-b</i> , <i>Niemann Pick Type C2</i> , <i>Trypsin</i> , <i>Antibacterial peptide</i> , <i>Fibrinogen and fibronectin</i> , <i>GNBP</i> y <i>Serin type endopeptidase</i> entre las cepas Cali-S y Cali-MIB.	52
Tabla 6. Comparación entre los resultados obtenidos en los microarreglos y los ensayos por qPCR de los 12 genes asociados a la respuesta de <i>Ae. aegypti</i> a la infección por vDen-2.	56
Tabla 7. Primers para generar dsRNA	58
Tabla 8. Evaluación de silenciamiento génico en mosquitos en las cepas Cali-S y Cali-MIB.	65

ABREVIATURAS

PAHO: Pan American Health Organization

WHO: World Health Organization

OMS: Organización Mundial de la Salud

vDEN: virus dengue

CV: Competencia Vectorial

RNAi: ácido ribonucleico de interferencia

dsRNA: double strand RNA (RNA de doble cadena)

MIB: Midgut infection barrier (Barrera de infección de intestino medio)

MEB: Midgut escape barrier (Barrera de escape de intestino medio)

INS: Instituto Nacional de Salud

ABSTRACT

Key words: *Aedes aegypti*, immune response, dengue virus, vector competence.

In recent years there has been considerable progress in our knowledge of dengue, particularly in vaccine development, the characterization of the immune responses and molecular properties of the virus. However, there are still many aspects that must be investigated in terms of its transmission by the principal vector, *Aedes aegypti*. We have conducted research to elucidate Dengue virus-vector relationships, specifically the innate immune response of *Ae. aegypti* to dengue virus infection. For this, we identified and selected two strains of *Ae. aegypti*, from Cali, Colombia with different susceptibility to dengue infection: Susceptible (Cali-S, 96%) and refractory with midgut infection barrier (Cali-MIB, 50%).

We compared the global gene expression of the midguts of Cali-S and Cali-MIB after ingestion of sugar, a bloodmeal, or a bloodmeal containing Dengue-2 virus using microarrays. Results from the microarrays indicated the total expression of 3804 genes. A differential expression between the two strains exposed to DENV-2 included genes in different functional groups: immunity, metabolism, proteolysis, redox, replication, transport, and unknown function. We have selected 12 genes to evaluate their differential expression at different time points (0, 8, 24 and 36h) by qPCR. The qPCR analysis confirmed the predominance of down regulated genes in Cali-MIB in comparison with Cali-S strain, observed in the microarray at 30 hours post infection (h.p.i). However, early in the infection (at 0, 8 and 24 h.p.i), several of this genes were up regulated suggesting an early response to eliminate the virus in refractory strain. Finally, we used RNAi assays to evaluate the role of four genes from 12 selected before (*Gram Negative Binding protein–GNBP* (AAEL009176), *Niemann Pick Type C2* (AAEL015136), *Keratinocyte lectin* (AAEL009842) and *Cathepsin-b* (AAEL007585) in DENV infection. We observed that the silencing of down regulated genes, *GNBP*, *Cathepsin-b* and *Keratinocyte lectin*, change the phenotype of Cali-S strain from 96% to 8, 20 and 12% respectively. The up regulated gene, *Niemann*, change the phenotype of Cali-BIM strain from 50% to 18%. This study provide a global overview of gene expression in susceptible and refractory mosquitoes. This study will also validate the use of our field derived strains as an important biological model to study Dengue-vector relationships.

RESUMEN

Palabras clave: *Aedes aegypti*, respuesta inmune, virus dengue, competencia vectorial.

En recientes años ha habido un progreso considerable en nuestro conocimiento sobre dengue, particularmente en el desarrollo de la vacuna, la caracterización de la respuesta inmune y las propiedades moleculares del virus. Sin embargo, hay muchos aspectos que deben ser investigados en términos de transmisión por el principal vector, *Aedes aegypti*. En el CIDEIM hemos desarrollado investigaciones dirigidas al estudio de las relaciones virus dengue-vector, específicamente la respuesta inmune innata de *Ae. aegypti* a la infección con virus dengue (vDEN). Para ello, se seleccionaron dos cepas de *Ae. aegypti* de Cali con diferente susceptibilidad a la infección por vDEN, a partir de mosquitos colectados en campo: una cepa Susceptible (Cali-S, 96%) y otra refractaria con barrera a la infección en el intestino medio (Cali-RBIM, 50%).

Mediante microarreglos, se comparó la expresión génica en intestinos medios de las cepas Cali-BIM y Cali-S, después de la ingestión de azúcar, sangre o sangre+vDEN-2 a 30 horas post alimentación. Los resultados de los microarreglos indicaron la expresión de un total de 3804 genes. La expresión génica diferencial entre las dos cepas expuestas a vDEN-2 incluye genes en diferentes grupos funcionales: inmunidad, metabolismo, proteólisis, redox, replicación, transporte, y de función desconocida. Seleccionamos 12 genes para evaluar su expresión diferencial diferentes tiempos (0, 8, 24 y 36h) por qPCR. Los análisis por qPCR confirmaron la predominancia de genes bajo regulados en la cepa Cali-MIB en comparación con la cepa Cali-S, resultados observados en los microarreglos a las 30 horas post infección (h.p.i). No obstante, en los tiempos tempranos de la infección (0, 8 y 24 h.p.i), varios de estos genes estaban sobre regulados sugiriendo una respuesta temprana para eliminar el virus en la cepa refractaria. Finalmente, usamos ensayos con RNA de interferencia (RNAi) para evaluar la función de cuatro genes de los 12 seleccionados previamente (*Gram Negative Binding protein*—GNBP (AAEL009176), *Niemann Pick Type C2* (AAEL015136), *Keratinocyte lectin* (AAEL009842) y *Cathepsin-b* (AAEL007585) en la infección con vDEN. Observamos que el silenciamiento de los genes bajo regulados, GNBP, *Cathepsin-b* and *Keratinocyte lectin*, cambian el fenotipo de la cepa Cali-S de 96% a 8, 20 y 12% respectivamente. El gen sobre regulado, *Niemann*, cambia el fenotipo de la cepa Cali-BIM de 50% a 18%. Este estudio provee una revisión global de la expresión génica en cepas susceptibles y refractarias. Además valida el uso de nuestras cepas como un modelo biológico importante para estudios de relaciones dengue-vector.

CAPÍTULO 1. Introducción

INTRODUCCIÓN

El virus Dengue-vDEN (serotipos 1-4), transmitido principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*, continúa siendo el arbovirus más importante que causa enfermedad y muerte en los trópicos y subtrópicos. La infección por vDEN, impone una carga significativa a nivel de salud, económico y social en las poblaciones de áreas endémicas (1) como las Américas, 100 países de África, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental. Se estima que hay 390 millones casos de dengue por año, de los cuales 96 millones se manifiestan aparentemente en cualquier nivel de gravedad clínica o subclínica (2). Alrededor de 21.000 muertes ocurren cada año por esta enfermedad, principalmente en la población infantil, lo que ha convertido al dengue en una de las enfermedades tropicales emergentes del siglo XXI (3, 4).

En los últimos 30 años, la frecuencia y magnitud de las epidemias de dengue han aumentado extraordinariamente cuando el principal vector *Ae. aegypti*, y los virus que causan la enfermedad, ampliaron su distribución geográfica a nivel mundial. Esta epidemiología fluctuante fue causada por factores demográficos y sociales, junto con la ausencia de un programa eficaz de control vectorial. Asimismo, la aparición de cepas con mayor virulencia y la circulación simultánea de varios serotipos en una misma región, han influido en el agravamiento de las epidemias de dengue en diversas partes del mundo. Además, se ha demostrado que los cambios climáticos de los últimos años han contribuido a la transmisión viral, por lo que se presume que en el futuro aumentarán el número de casos (5-10). Colombia, es un ejemplo claro de estos aspectos, con una infestación por *Ae. aegypti* de más del 90% del territorio nacional situado por debajo de los 2.200 msnm, la introducción reciente de *Ae. albopictus* y la urbanización no planificada a causa de problemas socio-políticos (11).

Investigaciones recientes indican que la carga mundial del dengue podría estar en el mismo nivel de magnitud que tantas otras enfermedades infecciosas, tales como la malaria, la tuberculosis y las enfermedades de transmisión sexual (sin incluir el SIDA), cuya prevención y control reciben un apoyo político y financiero mayor que el dengue (12).

Nuestro país no está ajeno a este flagelo, las tendencias epidemiológicas han demostrado que los programas de prevención y control de la transmisión del dengue basados en la disminución de las poblaciones del vector como la aplicación de insecticidas y la eliminación de criaderos, han sido poco eficaces (10). Hasta el momento no existe un tratamiento médico efectivo contra el dengue y aunque se están desarrollando vacunas tetravalentes, tomará un tiempo antes de que estén listas para su uso en la salud pública.

Este tipo de medidas se ha visto afectado por los altos costos asociados, la aparición de resistencia en los vectores a los productos químicos y la dificultad de eliminar formas adultas del mosquito. Asimismo, las medidas de vigilancia y control de los mosquitos no han sido suficientes y el incremento de las epidemias de dengue continúa (4).

En la actualidad se ha avanzado notablemente en el conocimiento del dengue, en particular en el desarrollo de vacunas, la caracterización de la respuesta inmune y en las propiedades moleculares del virus. No obstante, todavía hay muchos aspectos que se deben investigar. Según la OMS, las investigaciones estratégicas y básicas que se deben llevar a cabo para mejorar las intervenciones de control, se deben enfocar hacia la profundización en el conocimiento de las propiedades biológicas, genéticas del vector, y su interacción con el virus (13). Está bien documentado que sólo existen ciertas combinaciones de vectores y virus que resultan en una transmisión eficiente de la enfermedad, y datos que indican que los arbovirus deben superar las defensas inmunes del insecto vector con el fin de ser transmitido con éxito. Sin embargo, poco se conoce acerca de las defensas anti-virales en los insectos.

Siguiendo este enfoque, en el grupo de la Dra. Clara Ocampo, del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) hemos desarrollado investigaciones dirigidas al estudio de las relaciones virus-vector, orientadas a la respuesta inmune de *Ae. aegypti* durante la infección con vDEN, con el objetivo de buscar moléculas que pueden ser utilizadas para el control o disminución de la transmisión de dichas enfermedades (14, 15).

Para evaluar las interacciones moleculares entre *Ae. aegypti* y el vDEN, seleccionamos mosquitos colectados en campo, con el fin de obtener líneas con diferente susceptibilidad a la infección con vDEN-2 (16). Estudios iniciales de expresión diferencial de genes por hibridación supresiva substractiva sugirieron a la apoptosis como uno de los principales mecanismos del mosquito involucrados en el proceso de infección (14). Posteriormente, la caracterización de la expresión temporal de los genes caspasa-16 y dronc los cuales están asociados con el proceso de apoptosis, evidenció una sobreexpresión de estos genes en la cepa refractaria. El estudio funcional de dichos genes, a través del mecanismo de RNA de interferencia (RNAi), demostraron un incremento de 40% hasta 80% en la susceptibilidad al vDEN de la cepa refractaria. Estos datos sugieren que los genes de apoptosis pueden estar inhibiendo la replicación del virus en el vector (15).

Los resultados validaron las cepas seleccionadas como modelo biológico para llevar a cabo estudios que permitan entender los mecanismos que participan en la eliminación del virus en la cepa refractaria; por lo tanto, el objetivo principal del presente estudio, fue determinar si la respuesta inmune afecta la susceptibilidad y refractariedad del intestino medio de *Ae. aegypti* a la infección por vDEN e identificar genes utilizados por los mosquitos para eliminar el virus. Para el desarrollo de este

trabajo se emplearon las técnicas modernas que se encontraron a nuestro alcance (RNAi, secuenciación, microarreglos y qPCR), para la identificación de genes utilizados por los mosquitos refractarios para eliminar el virus. Estos datos podrían permitir la identificación de blancos para nuevas drogas antivirales o vacunas. A su vez, crea la posibilidad de utilizar la manipulación genética para crear mosquitos transgénicos que sean refractarios a la infección por vDEN.

JUSTIFICACIÓN

El dengue es una enfermedad viral reemergente extendida a áreas tropicales y subtropicales de América, Asia y África. En las Américas, el dengue continúa siendo un problema de salud pública a pesar de los esfuerzos para contenerlo y mitigar el impacto de las epidemias (17). Aún no se ha aprobado ninguna vacuna contra el dengue, a pesar de algunos progresos, el desarrollo de estas vacunas (para las formas tanto leves como graves) sigue siendo un reto. Los programas de control se centran en el uso de estrategias que permitan la reducción de las poblaciones del principal vector, *Ae. aegypti*, y así revertir la tendencia de aumento de la actividad epidémica del dengue y la mayor incidencia de dengue grave. A pesar de los esfuerzos realizados para disminuir el impacto de esta enfermedad, las epidemias persisten y el número de casos de dengue grave, manifestación clínica más severa de la enfermedad, aumenta continuamente por factores como la infestación por *Ae. aegypti* del más del 90% del territorio nacional situado por debajo de los 2.200 m.s.n.m, la circulación de los 4 serotipos del virus, la introducción de *Ae. albopictus*, cambios demográficos y ambientales, la urbanización no planificada, problemas económicos, políticos, entre otros (18).

Colombia no es ajeno a este panorama. Al igual que en otras partes del mundo, en nuestro país las medidas preventivas se han enfocado al control de las poblaciones de mosquitos del género *Aedes*, vectores del virus causante de la enfermedad. La poca efectividad de estos programas de prevención y control ha llevado a la búsqueda de enfoques novedosos y sostenibles para el control vectorial.

Teniendo en cuenta que la interacción entre el virus, el vector y el hospedero en un ecosistema determinado es en última instancia lo que determina la dinámica de la transmisión, es necesario realizar investigaciones que permitan lograr un mayor conocimiento de cada uno de estos factores, con el objetivo de reducir la morbilidad y la mortalidad causadas por el dengue, así como para aliviar la carga de esta enfermedad. Los avances acelerados en los campos de la biología molecular, la genómica y la reciente disponibilidad de la secuenciación del genoma de *Ae. aegypti* en combinación con estrategias de alto rendimiento, han permitido pensar que la manipulación genética de la competencia vectorial (CV) podría ser una estrategia que ayude al control de las enfermedades transmitidas por vectores (19, 20).

Si bien se han logrado grandes avances en la comprensión de las interacciones vector-patógeno en los insectos, como son los mecanismos de defensa antibacterial y antiparasitaria, el estudio de las defensas antivirales no ha tenido mucho desarrollo. En el caso del vDEN, está documentado que el intestino medio constituye un obstáculo potencial a la infección por el virus. Por esto, los genes del intestino medio involucrados con el establecimiento de la barrera a la infección, podrían ser un blanco potencial para ser manipulados a través de transgénesis o

paratransgénesis utilizando simbios (21) o mediante vacunas de bloqueo (22, 23). En este contexto, de acuerdo a los resultados de los estudios de la interacción *Ae. aegypti*-vDEN realizados en CIDEIM, planteamos como objetivo principal evaluar masivamente mediante el uso de microarreglos, la expresión génica diferencial entre mosquitos refractarios y susceptibles infectados y mosquitos alimentados con sangre solamente, con el fin de identificar genes asociados a la respuesta inmune innata o interacciones bioquímicas utilizadas por los mosquitos refractarios para eliminar el virus.

El desarrollo de esta propuesta contribuyó al entendimiento de las interacciones virus-vector, mediante la identificación de posibles mecanismos o vías usados por el virus para inactivar la respuesta inmune del vector o las estrategias del mosquito para volverse refractario a la infección por el vDEN. Este conocimiento aportará al diseño de estrategias de control vectorial efectivas que permitan disminuir la transmisión del virus, alcanzar la reducción de la morbilidad y mortalidad del dengue y consecuentemente disminuir su impacto socioeconómico negativo. Además de cooperar con el país para la aplicación de herramientas eficaces de vigilancia y control en el marco del sistema general de seguridad social en salud contemplado en su Plan Nacional de Salud Pública, que garanticen la sostenibilidad y una adecuada capacidad de respuesta al problema del dengue en el país.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar cómo la respuesta inmune innata funciona en la defensa antiviral en mosquitos susceptibles y refractarios de *Aedes aegypti* a la infección con virus dengue-2.

Objetivos específicos

Realizar un perfil transcripcional global de los genes del intestino medio en las cepas Cali-MIB Vs. la cepa Cali-S de *Ae. aegypti*

Seleccionar algunos genes que presenten expresión diferencial para confirmar y cuantificar su expresión temporal

Silenciar los genes en los mosquitos Cali-S, Rockefeller y Cali-MIB de *Ae. aegypti*, para elucidar su efecto en el desarrollo del vDEN-2.

ESTADO DEL ARTE

El Dengue

El dengue es una enfermedad viral febril aguda, cuyo agente causal se transmite por la picadura del mosquito *Ae. Aegypti*. Esta enfermedad puede ser ocasionada por uno de varios serotipos del virus (DEN-1, DEN-2, DEN-3 Y DEN-4) (24).

Se reconoce un espectro de manifestaciones de la enfermedad que va desde procesos asintomáticos hasta cuadros severos; es así como se definen diversas formas clínicas: dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y el dengue grave donde se encuentran incluidos el síndrome de choque dengue (SCD) y otras complicaciones del dengue como: miocarditis, encefalitis, hepatitis las cuales se asocian con mayor mortalidad (17).

Virus Dengue

El virus del dengue es un arbovirus (virus transmitido por vectores), pequeño (11Kb), monocatenario que abarca cuatro serotipos distintos (DEN-1 a DEN-4). Estos serotipos del dengue están estrechamente relacionados y pertenecen al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae* (25). Cada serotipo crea inmunidad específica para toda la vida contra la reinfección del mismo serotipo (homólogo), así como una inmunidad cruzada de corto plazo contra los otros tres serotipos, la cual puede durar varios meses. Los cuatro serotipos son capaces de producir infección asintomática, enfermedad febril y/o cuadros severos que pueden conducir hasta la muerte, dada la variación genética en cada uno de ellos (26, 27).

La partícula madura del virus del dengue es esférica, con un diámetro de 50nm, y contiene múltiples copias de las tres proteínas estructurales, una membrana de doble capa derivada del huésped y una copia única de un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva. El genoma está hendido por proteasas virales y del huésped en tres proteínas estructurales (cápside, C, prM, el precursor de membrana, M, proteína y envoltura, E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) (28).

Se han identificado distintos genotipos o linajes dentro de cada serotipo, lo que destaca la extensa variabilidad genética de los serotipos del dengue. La selección parece ser un tema dominante en la evolución del virus del dengue pero de manera tal que solamente se mantienen los virus que son "adecuados" tanto para seres humanos como para los vectores. Entre ellos, los genotipos "asiáticos" de DEN-2 y DEN-3 se asocian con frecuencia a infecciones concomitantes graves (29).

Mosquitos vectores

Ashburn y Craig (30), demostraron que el agente causal del dengue era un virus transmitido por la picadura del mosquito *Ae. aegypti*, especie del subgénero *Stegomyia* originario de África; y el más distribuido en el mundo. Posteriormente, se evidenciaron nuevos vectores, *Ae. albopictus* (31, 32) y *Ae. polynesiensis* que pueden actuar como vectores en función de la ubicación geográfica (24).

El mosquito vector tiene dos etapas en su ciclo de vida: la fase acuática con tres formas evolutivas diferentes (huevo, larva y pupa) y la fase aérea de adulto o ímago; reproduciéndose y habitando en criaderos antropogénicos y otros naturales que contienen agua limpia, logrando cumplir su ciclo de vida en 10 días (Figura 1). La rapidez con que se desarrollan las larvas y pupas depende en gran medida de las características del microambiente (26).

Las hembras son las que pican, por ser hematófagas obligadas, es decir, necesitan sangre para alimentarse y para que maduren los huevos. La hembra, se alimenta repetidamente en humanos momento en el cual puede infectarse con el virus (33).

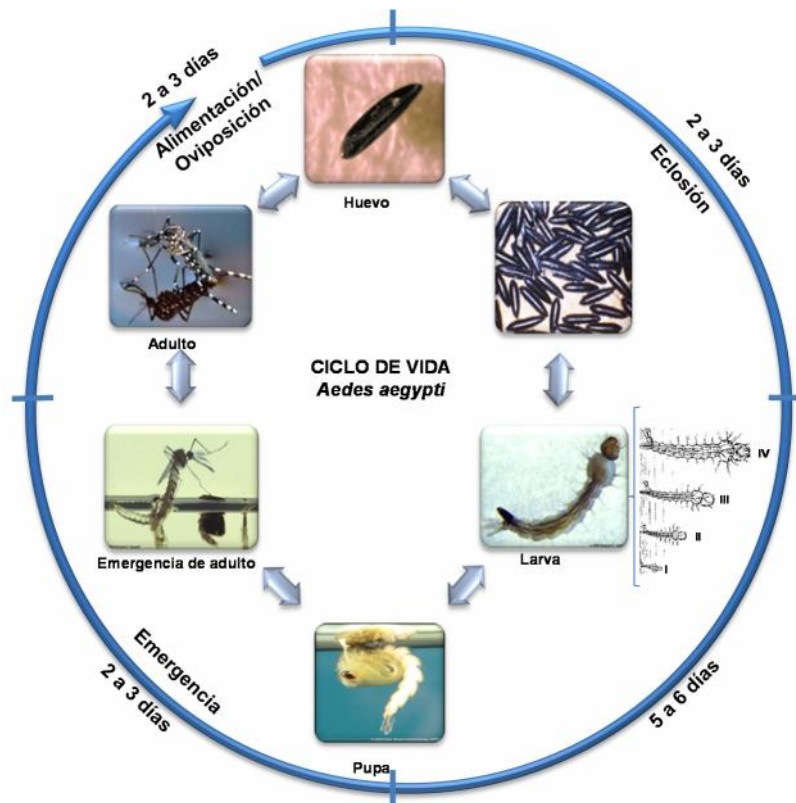


Figura 1. Ciclo biológico de *Aedes aegypti*.

Por lo regular, la hembra de *Ae. aegypti* deposita los huevos en las paredes húmedas de los recipientes que contienen agua. Hay preferencia a ciertos tipos de

recipientes, dependiendo de su oxigenación, temperatura, humedad, disponibilidad de materia orgánica, capacidad y estabilidad del agua, color y olor, entre otros; aunque esto no es limitante para encontrar ocasionalmente una gran diversidad de criaderos. Los huevos, son capaces de resistir desecación por varios meses hasta que las condiciones de temperatura y humedad les sean propicias, momento en el cual se hidratan y rápidamente eclosionan (33).

La supervivencia de los mosquitos depende de la capacidad para alimentarse, reproducirse, protegerse y dispersarse. Entre cada ciclo gonotrófico, a diferencia de otros géneros de mosquitos, *Ae. aegypti* se alimenta varias veces de uno o varios huéspedes hasta satisfacer sus necesidades alimenticias, lo que representa un factor de importancia en su capacidad como transmisor de microorganismos patógenos (33).

La replicación viral y el ciclo de transmisión

El virus dengue es transmitido a los humanos a través de la picadura de los mosquitos *Ae. aegypti* infectados (26, 34) y puede presentar varios ciclos de transmisión: un ciclo de transmisión enzoótico que involucra mosquitos del género *Aedes* y primates en los bosques de Asia y África; un ciclo de transmisión epidémico que ocurre en lugares rurales donde las poblaciones son pequeñas y un ciclo epidémico/endémico urbano donde el virus se transmite: *Ae. aegypti*-humano-*Ae. aegypti* (26).

El ciclo urbano inicia cuando la hembra adulta ingiere sangre de una persona infectada con el vDEN. El virus entra en la hembra y se multiplica en el epitelio intestinal, en los ganglios nerviosos, cuerpo graso, cerebro, esófago y glándulas salivales. El periodo de incubación extrínseco del virus en el mosquito usualmente es de 7 a 14 días. Después de este periodo el mosquito infectado transmite el virus a otros humanos durante la siguiente alimentación sanguínea (35, 36).

En el humano, el virus se replica en monocitos, células dendríticas, linfocitos y macrófagos. Posteriormente, infecta órganos como ganglios linfáticos y bazo; para luego liberarse a la sangre causando el periodo de viremia (tiempo de incubación intrínseco) en la persona infectada. Un segundo mosquito va a picar a esta persona infectada, en el periodo de viremia, y va a adquirir el virus. El dengue va a replicarse en el intestino medio del mosquito, después se replicará en las glándulas salivares, y así luego de 7 a 14 días de incubación, el mosquito infectará a otro hospedero susceptible por una nueva picadura (26, 34).

Varios factores pueden influir en la dinámica de la transmisión del virus, incluidos factores ambientales y climáticos, interacciones entre huéspedes y patógenos, y factores inmunológicos de la población. El clima influye directamente en la biología de los vectores y por esa razón, su abundancia y distribución; consiguientemente,

es un factor determinante importante en la epidemia de enfermedades transmitidas por vectores.

Epidemiología

En la actualidad, el dengue es la arbovirosis humana de mayor importancia de salud pública en las áreas tropicales del mundo. El mosquito vector de los vDEN, *Ae. aegypti*, se encuentra en casi 100 países tropicales y se calcula que unos 2,5 billones de personas habitan en áreas donde existe el riesgo de transmisión de la epidemia (17).

En los últimos 50 años, la incidencia de la fiebre de dengue ha aumentado 30 veces con la creciente expansión geográfica hacia nuevos países y, en la actual década, de áreas urbanas a rurales. Aunque no se ha determinado con exactitud la carga real de la enfermedad, se estiman 390 millones casos de dengue por año, de los cuales 96 millones se manifiestan aparentemente en cualquier nivel de gravedad clínica o subclínica (2). Durante las epidemias, las tasas de ataque pueden llegar entre el 80 y 90% de las personas susceptibles y la letalidad puede ser mayor de 5% (4, 5). La enfermedad es endémica en más de 100 países de África, las Américas, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental (Figura 2). Las dos últimas son las regiones más afectadas.

Antes de 1970 sólo nueve países habían sufrido epidemias de dengue grave, cifra que en 1995 se había multiplicado por más de cuatro. A medida que la enfermedad se propaga a nuevas zonas, no sólo aumenta el número de casos, sino que se están produciendo brotes explosivos (17).

En el caso de la Región de las Américas, la interrupción de la transmisión del dengue en la mayoría de la región, fue el resultado de la campaña de erradicación de *Ae. aegypti* en dicha zona, principalmente durante la década de 1960 y principios de la década de 1970. Sin embargo, no se mantuvieron las medidas de vigilancia y control del vector, y hubo re infestaciones subsiguientes del mosquito, seguidas de brotes en el Caribe, en América Central y América del Sur. Desde entonces, la fiebre del dengue se ha propagado con brotes cíclicos que ocurren cada 3 a 5 años (4). El mayor brote ocurrió en 2002 en el que se notificaron más de un millón de casos. De 2001 a 2007, más de 30 países de las Américas notificaron un total de 4'332.731 casos de dengue (1). El número de casos de dengue severo en el mismo período fue de 106.037 y el total de muertes fue de 1.299 personas. Los cuatro serotipos del virus del dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) circulan en la región, en Barbados, Colombia, República Dominicana, El Salvador, Guatemala, Guyana Francesa, México, Perú, Puerto Rico y Venezuela, se identificaron simultáneamente los cuatro serotipos en un año durante este período (10).

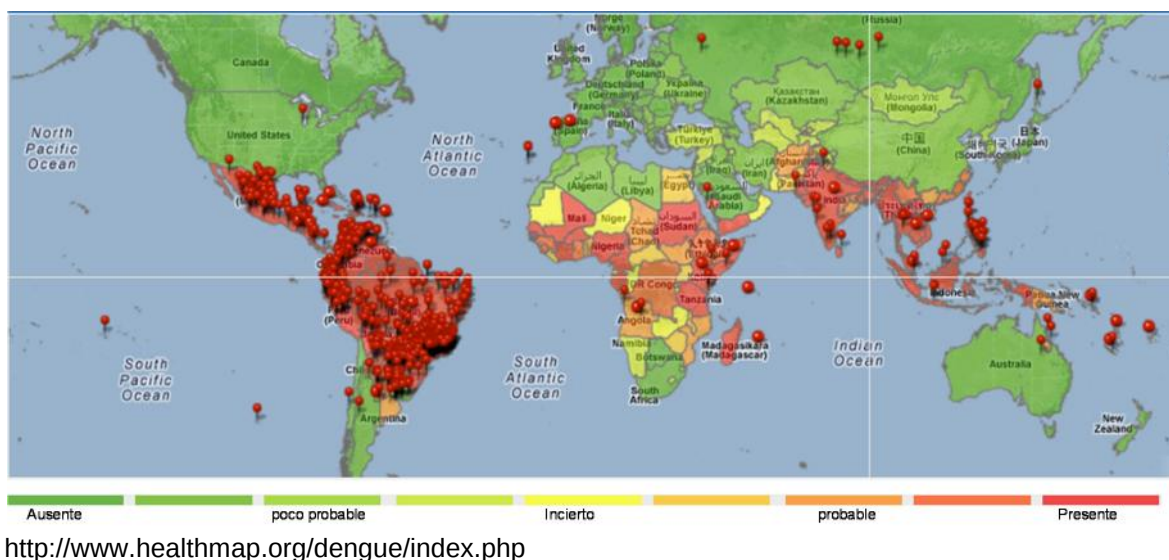


Figura 2. Mapa de la actividad global del dengue en el 2013.

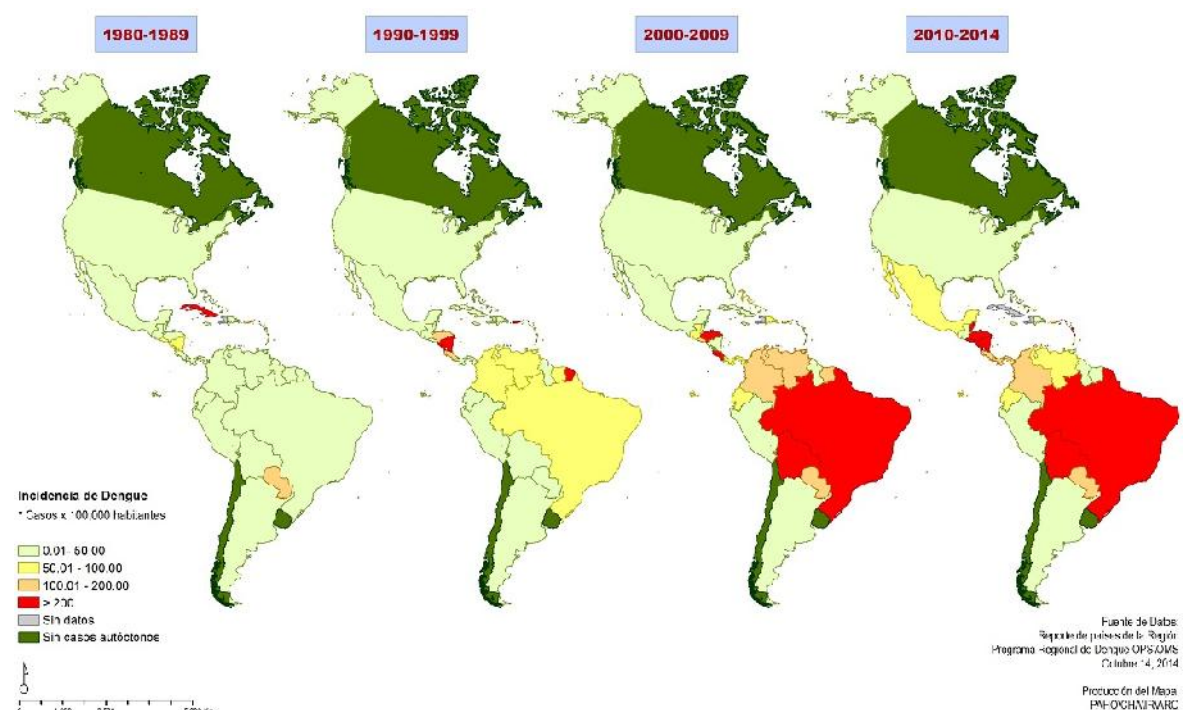
Durante la última década, en las Américas se ha registrado el incremento más drástico en la actividad del dengue (Figura 3), especialmente en Brasil, Colombia, Cuba, Ecuador, Perú, Venezuela y Paraguay (37). La situación epidemiológica del dengue sigue siendo de alta complejidad en la Región, lo que obliga a redoblar los esfuerzos para la implementación de una estrategia de gestión integrada y dar respuesta a tal situación.

Cabe resaltar la actividad inestable e intensa del dengue que sufrieron las Américas durante el 2010. Los patrones climatológicos han sido favorables a la proliferación de *Ae. aegypti*, incluso en épocas no esperadas durante el año. Hasta la semana epidemiológica 44 del 2010, la región notificó un total de 1.536.899 casos de dengue, con 35.455 casos severos y 807 muertes (13). Con el comienzo de la estación de lluvias en mayo, se observó un aumento en los criaderos de mosquitos, incrementando el número de casos de dengue y el riesgo de infección. A finales de mayo, la subregión centroamericana también fue afectada por la tormenta tropical Agatha, intensificando la situación. Además, condiciones sanitarias y ambientales pobres que se repiten, la acumulación de la basura, y el exceso de plantas inútiles que no se desechan correctamente, también contribuye a la proliferación de mosquitos en las áreas afectadas.

En el 2011 se notificaron 979.774 casos de dengue, de los cuales 15.860 presentaron formas graves que requirieron hospitalización y 692 que fallecieron (38). En el mismo año se registraron brotes de dengue, con un número total de casos y muertes que sobrepasaron los datos históricos registrados; en Paraguay, Panamá y en los países y territorios del Caribe inglés y francés como Aruba, Bahamas y Santa Lucía. También se observó la introducción del virus DEN-4 en

Panamá y en algunos estados del Brasil donde no había circulado anteriormente (38).

Durante el 2013, en la Región de las Américas se registraron 868.653 casos de dengue, 8.406 casos de dengue grave y 346 defunciones. La circulación de los 4 serotipos en la Región, aumentó el riesgo de aparición de formas graves de la enfermedad. Al cierre de 2014, se reportaron en las Américas 1.176.529 casos de dengue, 16.238 casos graves y 761 muertes. En general, el año 2014 reportó una reducción aproximada del 50% en el número de casos de dengue, casos graves y muertes comparado con el 2013 (39). Hasta la semana epidemiológica número 21 del año 2015, se contabilizaron 1.206.172 casos de dengue en todo el continente. Los datos registrados hasta dicha semana, superaron el total de casos reportados al cierre del 2014. Sin embargo, cabe resaltar, que a pesar del incremento en el número de casos, la cantidad de casos graves (2.824) y muertes (459) se mantuvieron muy por debajo de los valores observados durante el 2014. En la actualidad, Brasil, Colombia y México han reportado la co-circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus del dengue (39).



http://www.paho.org/hq/images/stories/AD/HSD/CD/Dengue/2014-Dengue_Incidencia8014_ESP.jpg

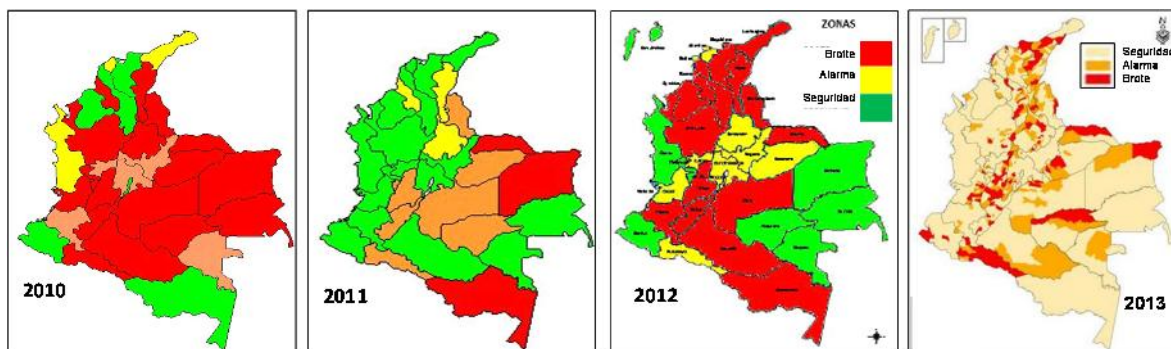
Figura 3. Evolución de la incidencia de dengue en las Américas 1980 – 2014.

Ahora bien, en Colombia, reaparece la problemática del dengue en los 70, momento en el cual después de declarar libre de *Ae. aegypti* el territorio nacional,

descontinuaron la campaña y vigilancia que había iniciado en 1950 contra la fiebre amarilla urbana, la cual tenía como objetivo erradicar *Ae. aegypti* y evitar el riesgo de esta enfermedad. Debido a la presencia del vector en Venezuela y la resistencia al DDT, insecticida utilizado en esa época, *Ae. aegypti* re infestó el país. Entonces, reaparecieron las primeras epidemias con DEN-2 en la Costa Atlántica en los años 1971 y 1972, seguidas de epidemias con DEN-3 entre 1975 y 1977 (40).

El primer caso de dengue hemorrágico se presentó en el año de 1989 en Puerto Berrio (Antioquia). En Santander, en límites con Venezuela, aparecen los primeros brotes a finales de 1989 y comienzos de 1990, el siguiente brote aparece en 1992 en Santander y el Valle del Cauca y en Cali en 1995, donde la gran primera epidemia ocurre con 566 casos con cuadros sospechosos de dengue hemorrágico y empiezan a aparecer desde entonces síndromes de choque de dengue con desenlace fatal (41).

La tasa de incidencia de dengue ha sido fluctuante desde 1978 con tendencia al incremento a través del tiempo. De igual forma, se ha observado en el país una tendencia al rápido incremento en el número de casos, al pasar de 5,2 casos por 100.000 habitantes en la década de 1990 a 18,1 casos por 100.00 habitantes en los últimos cinco años (18). Esta situación se observa de igual manera en el comportamiento de la mortalidad, la cual pasó de 0.07 defunciones por 100.000 habitantes en los 90, a 0,19 defunciones por 100.000 habitantes en la presente década (18).



INS, Boletín Epidemiológico 2010, 2011, 2012, 2013

Figura 4. Situación de alarma y brote de dengue en Colombia.

Tras el importante brote registrado en el segundo semestre de 2010, Colombia presentó en el año 2011 menos casos en comparación con la misma época del año anterior (18). No obstante, la transmisión se mantuvo activa y los sistemas de salud del país continuaron en alerta. Las inundaciones que afrontó Colombia durante una fuerte ola invernal requirió la intensificación de la vigilancia. Ya en el 2012, hasta la penúltima semana epidemiológica, notificaron 53.141 casos de dengue, de los cuales 1.417 correspondieron a dengue grave y 51.724 a dengue.

Desde entonces, cerca de 25 millones de personas que habitan en zonas urbanas con transmisión endémica de dengue, están en riesgo de adquirir esta enfermedad en nuestro país, esto producto de la situación de transmisión intensa y persistente de la enfermedad en el país durante los últimos años (hiperendemia) (Figura 4). Es una de las patologías infecciosas que impone mayor carga social y económica a la población que se encuentra en riesgo (38). Al cierre del año 2015, el canal endémico nacional en la semana epidemiológica 52, se notificaron 94.916 casos de dengue, el 98,6 % correspondió a dengue y el 1,4 % a dengue grave. En relación a la semana epidemiológica 52 del año 2014, se registró una reducción de 14.396 casos, lo que representa un 13. % de variación. (18).

Prevención y control

El dengue es una patología de alto poder epidémico que en los últimos años se ha presentado en sus formas clásica y severa en una gran parte del territorio nacional.

Esta enfermedad constituye un evento que es de especial interés en salud pública, debido a la interacción de múltiples factores como: el aumento en la tendencia e intensidad de la endemia producida por la enfermedad; la mayor frecuencia de brotes de dengue, por la aparición de ciclos epidémicos cada vez más cortos; la circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus; la infestación de más del 90% del territorio situado por debajo de los 2.200m.s.n.m. por el principal vector *Ae. aegypti* (11); la introducción y expansión de *Ae. albopictus*, la urbanización de la población del país por desplazamientos ocasionados por problemas de violencia y la falta de oportunidades de trabajo en el campo; además de las deficiencias en la cobertura y calidad de los servicios públicos y saneamiento básico; deficiencias en la prestación de los servicios de salud; debilidades en la capacidad operativa de los programas de prevención y control; y la pobre participación intersectorial y social, esto sumado a los efectos que produce el cambio climático en el vector y los virus (11, 42, 43).

Ante esta problemática, la Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda nuevos enfoques estratégicos para abordar el problema del dengue, los cuales se deben contextualizar en el marco de la promoción de la salud, la búsqueda de nuevas asociaciones, la colaboración con otros sectores de salud y con otras esferas gubernamentales y no gubernamentales, e incluir un sentido comunitario para lograr acciones de control sostenibles mediante el incremento de factores protectores. Cabe resaltar que para que las acciones individuales, familiares y comunitarias sean eficaces, están deberán diseñarse utilizando los conocimientos locales sobre el uso y distribución del agua, la eliminación de desechos y el saneamiento básico, así como también se necesita conocimiento de las organizaciones comunitarias y la función de los miembros dentro de la familia que permitan el diseño de acciones eficaces (13).

Actualmente, las estrategias de control del dengue mediante intervenciones integrales incluyen programas de educación comunitaria en la eliminación y control de criaderos de mosquitos, programas de prevención de la enfermedad, vigilancia epidemiológica, control vectorial y factores de riesgo ambiental, programas de atención al paciente y preparación a los laboratorios para detectar e identificar el virus (13).

En el caso de los programas de control vectorial, la participación de la comunidad es fundamental. Estos incluyen la implementación de medidas individuales y colectivas que promuevan la eliminación de los depósitos de agua que sirven de criadero para los mosquitos, y de esta manera disminuir la reproducción de los mismos. Estos programas fomentan el desarrollo de acciones como: cambiar frecuentemente el agua de los bebederos de animales y floreros; cubrir, vaciar y limpiar con jabón e hipoclorito cada semana los recipientes donde se almacena agua para uso doméstico, eliminar la basura acumulada en patios y áreas al aire libre, eliminar llantas o recipientes que acumulen agua los cuales se conviertan en potenciales criaderos para los mosquitos, perforar las llantas ubicadas en los parques infantiles que pueden contener aguas estancadas en temporadas de lluvia, rellenar con tierra tanques sépticos en desuso, desagües y letrinas abandonadas.

Además del control vectorial mediante métodos físicos (barreras físicas mosquitos/criaderos y eliminación de criaderos), las entidades de salud emplean métodos químicos como es el uso de insecticidas en calles para el control de mosquitos y larvicidas a las aguas de los criaderos como son los sumideros (cajas de agua lluvia) o almacenamientos de agua para uso doméstico. Como método alternativo y adjunto a la fumigación, se emplea el control biológico que incluye el uso de agentes como: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, copépodos, nematodos y peces larvívoros de agua dulce.

Otro aspecto que se debe tener en cuenta, es el control de picaduras de los mosquitos en adultos y niños, colocando anejo en puertas y ventanas, utilizar repelentes en las áreas del cuerpo que están descubiertas; usar toldillos en las camas, sobre todo cuando hay personas enfermas para evitar que infecten nuevos mosquitos y por lo tanto otras personas, además de rociar los alojamientos con algún insecticida que sea activo contra las formas adultas (17).

A pesar de que se han implementado diferentes acciones de control, hasta el momento éstas no han sido totalmente efectivas, por lo que la erradicación hemisférica del *Ae. aegypti* ya no es real; además, la sostenibilidad y continuidad de actividades de control están constantemente comprometidos por otras demandas de salud y política con las cuales compiten y por la poca capacidad de coordinación intersectorial (25). Aunado a esto, las características de la enfermedad, la ausencia de drogas antivirales contra la misma, el incremento de número de enfermos, la aparición de fenómenos como la resistencia a insecticidas, el aumento de países afectados y la dificultad para el control del vector, generan

una necesidad urgente de investigación destinada a proporcionar mejores herramientas para la prevención y el tratamiento de la enfermedad.

En la actualidad, una prioridad para la salud pública mundial es el desarrollo de una vacuna eficaz que induzca inmunidad simultáneamente contra los 4 serotipos del virus del dengue. Los esfuerzos hacia el desarrollo de vacunas han estado en curso durante más de 7 décadas. Hay muchos factores involucrados en la dificultad de desarrollar vacunas contra el dengue, incluyendo: la falta de tanto un modelo animal inmunocompetente para la enfermedad humana como de una correlación inmune definida de protección, la necesidad de inducir inmunidad simultáneamente a los 4 serotipos distintos, y la obligación de proceder con cautela debido a la preocupación de que la inmunidad "incompleta" puede ser un factor de riesgo para desarrollar subsecuente, dengue grave (44). A pesar de dichos inconvenientes, se encuentran actualmente en desarrollo clínico y preclínico 2 tipos de vacunas tetravalentes contra el dengue, con virus vivo atenuado y con virus no replicante (45).

Por otro lado, avances moleculares recientes en la comprensión de la genética de vectores y las relaciones vector-virus, han proporcionado nuevas herramientas para el estudio de factores involucrados en la transmisión de enfermedades. Los ejemplos incluyen: mosquitos refractarios a parásitos de la malaria (46-48) y el virus del dengue (49, 50), y mosquitos estériles (51, 52) o con limitación en la capacidad de reproducción (53-55). Otros métodos se han propuesto o demostrado, los cuales están a la espera del desarrollo de mosquitos transgénicos (15, 56-59). Los esfuerzos también se han enfocado en el desarrollo de efectos adicionales para reducir la duración de la vida o alterar los comportamientos de una manera beneficiosa como es el caso del uso de simbiosis naturales (60-62).

De esta manera, los estudios realizados en *Ae. aegypti* como: colonización, dispersión de genes, deriva genética, fuerzas de evolución selectivas y variabilidad genética asociada a características de importancia epidemiológica como los componentes de transmisión, CV y resistencia a insecticidas, resultan como nuevas alternativas para el desarrollo de mejores estrategias de control vectorial.

Componentes biológicos en la transmisión de patógenos por vectores.

Las poblaciones de *Ae. aegypti* son utilizadas como modelos de estudio para evaluar el comportamiento y la estructura genética de los mosquitos en respuesta a diferentes procesos de selección (63) como el uso de insecticidas (64), el control biológico, los cambios climáticos (65), el transporte y la diseminación de los mosquitos (66).

Dentro del estudio de las poblaciones de vectores ha existido un interés en entender las relaciones celulares y bioquímicas intrínsecas entre la relación virus-mosquito y el control genético de estos fenotipos; esto, a través del estudio de los factores biológicos que hacen parte del proceso de transmisión de patógenos como lo es la

capacidad vectorial, o la habilidad general de una especie de vector en un lugar determinado en un momento específico para transmitir un patógeno (67, 68).

Una vez los mosquitos son infectados con el virus, el proceso post infección se integra por una serie de factores que tiene gran influencia sobre la diseminación y transmisión del patógeno al hospedero vertebrado (67). Los factores *endógenos* propios del sistema virus–vector, condicionan la CV que refiere a la habilidad intrínseca de un vector para adquirir y transmitir biológicamente un patógeno (69-71). Los *factores exógenos* que son de tipo ambiental sumados con los endógenos, determinan la capacidad vectorial (71).

La capacidad vectorial se define cuantitativamente y es influenciada por variables tales como la densidad del vector, la frecuencia de picadura, la longevidad y la competencia del vector (68, 72). A su vez, la CV está dirigida por factores intrínsecos (genéticos) que influyen la habilidad del vector para transmitir un patógeno (73). Esta característica permite que sea un blanco interesante en el momento de realizar estudios genéticos, enfocados en la creación de nuevas herramientas para el control vectorial.

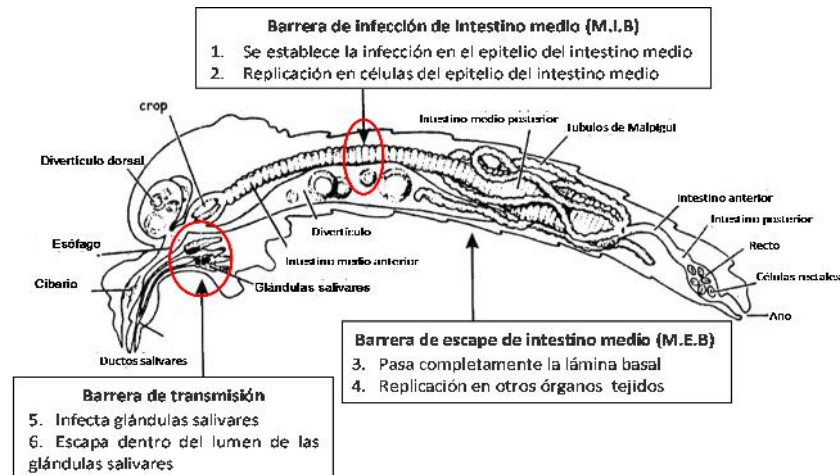
Competencia vectorial

En el caso de *Ae. aegypti*, este exhibe una variación global en cuanto a su CV por flavivirus (26, 74, 75). La transmisión del vDEN involucra un complejo de interacciones entre los virus y su vector, debido a que la CV está asociada con un número de barreras anatómicas para producir la infección en el mosquito (Figura 5).

Cuando un mosquito de la especie *Ae. aegypti*, ingiere sangre infectada con el vDEN de un hospedero vertebrado, el virus debe atravesar diferentes barreras presentes en el mosquito hospedero, para luego poder ser transmitido al hospedero vertebrado.

Una vez en el intestino medio, el virus rápidamente ataca y penetra las células del intestino medio del mosquito donde debe replicarse en altos títulos antes de que se forme la matriz peritrófica, la cual rodea la sangre ingerida por el mosquito y la separa físicamente del epitelio del intestino medio hasta ser totalmente digerida. Así, los factores que bloquean cualquiera de estos eventos, constituyen una *barrera de infección de intestino medio (BIM)* (Figura 5). Si se establece una infección a este nivel, el virus debe escapar de las células del intestino medio y esparcirse a tejidos secundarios del mosquito para establecer la diseminación de la infección. Si el virus no es capaz de esto, entonces el mosquito tiene una *barrera de escape de intestino medio (BEM)* (Figura 5) (76-78). La *BEM* está asociada con un ensamblaje ineficiente o maduración de los virus en las células del intestino medio y con la inhabilidad de que los virus escapen a través de estas células a la lámina basal e infecten órganos y tejidos secundarios (76, 77). Finalmente, una vez el virus alcanza

una mayor titulación, debe infectar el hemocelo y subsecuentemente las glándulas salivares donde puede ser transmitido al próximo hospedero vertebrado susceptible durante las continuas alimentaciones del mosquito (78, 79). Factores que supriman esta fase de replicación, actúan como una *barrera de transmisión* (Figura 5).



Black et al, 2002, modificado (68)

Figura 5. Barreras anatómicas en *Aedes aegypti* a la transmisión de vDEN.

Los estudios pioneros en evaluar la susceptibilidad tanto de *Ae. aegypti* como en *Ae. albopictus* hacia la infección del vDEN se realizaron en cepas originadas de diferentes localidades geográficas (80). Las investigaciones indican que el nivel de infección por vDEN en *Ae. aegypti* es una variable cuantitativa que parece ser distribuida continuamente entre los individuos y está sujeta a efectos ambientales. Recientes avances moleculares, genéticos y estadísticos permiten realizar mapeos de los loci que afectan la expresión de características cuantitativas o QTL (Quantitative Trait Loci) (81). Severson y colaboradores, mapearon en *Ae. aegypti* el QTL que condiciona la susceptibilidad a las filarias (81).

El primer mapa de ligamiento genético fue construido para *Ae. aegypti* usando marcadores moleculares de RFLP (81). La disponibilidad de estos conocimientos ha permitido a los investigadores empezar a estudiar el complejo genético de ciertos aspectos de la CV (81). Bosio y colaboradores mapearon y caracterizaron los QTL que controlan la infección en el intestino medio y las barreras de escape (BEM), las cuales condicionan la CV en *Ae. aegypti* para vDEN (72). Los QTL para la BEM en *Ae. aegypti* fueron detectadas en el cromosoma II y III. Bennett y colaboradores han identificado un QTL para la barrera de escape en el intestino medio sobre el cromosoma I (82).

En 1996, se registraron estudios donde se les proporcionó la refractariedad al vDEN a cepas susceptibles de *Ae. aegypti*, usando el virus Sindbis para expresar un ARN antisentido complementario a fragmentos del genoma del vDEN (83). El sistema de

virus Sindbis puede ser muy importante para evaluar *in vivo* los efectos de los genes candidatos para ser antipatógenos. Estas moléculas pueden ser sobre expresadas y su actividad puede ser evaluada por el examen de parámetros tales como prevalencia y medida de intensidad de infección. Sin embargo este sistema de expresión es temporal y no heredable (83).

En general, muy poco es conocido acerca de los eventos que ocurren en la infección por flavivirus en los diferentes vectores. Aunque varios genes han sido estudiados y relacionados a la CV, aún se desconocen los mecanismos específicos involucrados en las interacciones vector-patógeno (82, 84, 85). Los genes del intestino medio involucrados con el establecimiento de la barrera a la infección por virus y parásitos, podrían ser manipulados a través de transgénesis o paratransgénesis utilizando simbiosis (21, 86), o mediante vacunas de bloqueo (22, 23); por lo cual, la investigación y descubrimiento de nuevas moléculas blanco en *Ae. aegypti* hacia el vDEN es muy importante en el desarrollo de este proceso. Recientemente, en diferentes especies de insectos se han comenzado a identificar moléculas de la respuesta inmune expresadas en el intestino medio con la capacidad de inhibir el desarrollo de diferentes clases de parásitos (14, 15, 75, 87-90).

Respuesta inmune en insectos

Una amplia investigación ha sido llevada a cabo en la respuesta inmune de insectos a las infecciones bacterianas, fúngicas y parasitarias, sin embargo, recientemente la inmunidad antiviral en invertebrados ha recibido una atención análoga. Los estudios iniciales han utilizado *Drosophila melanogaster* como sistema modelo, ya que el poder de la genética y la amplia base de conocimientos en *Drosophila* han sido de gran valor en el establecimiento de las bases para la investigación de la inmunidad antiviral en insectos.

Sin embargo, la biología de los arbovirus está estrechamente vinculada a la fisiología de los artrópodos hematófagos, y como tal, la investigación en organismos modelo puede no ser totalmente relevante a la transmisión de virus y asociada a la defensa del vector. En este sentido, se requiere llevar a cabo un enfoque de investigación con el fin de estudiar con eficacia las respuestas vectoriales a arbovirus, utilizando como guía los hallazgos en *Drosophila*.

Los mosquitos inician respuestas inmunes robustas contra una variedad de patógenos: el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs- pathogen associated molecular patterns) conduce a la activación de vías de señalización inmune asociada con la producción de péptidos antimicrobianos potentes (AMPs- anti-microbial peptides) o cascadas que conducen a la lisis de patógenos, la fagocitosis, melanización o encapsulación celular por hemocitos, equivalentes a las células blancas de la sangre (91).

La respuesta inmune innata de los insectos es uno de los factores que pueden dictar su susceptibilidad a la infección viral. En el caso de *Ae. aegypti* hasta la fecha tres vías de señalización han sido implicadas en la inmunidad anti vDEN, la vía Toll, la Janus quinasa transductor de señal y activador de la transcripción (JAK-STAT) (88, 92, 93), y la vía del ARN de interferencia (RNAi); aunque aún no han sido claramente caracterizadas moléculas efectoras que actúen contra el virus. Estudios más recientes han abordado el desarrollo de patógenos intracelulares tales como vDEN y otros arbovirus en los mosquitos vectores, y las posibles funciones de moléculas y vías específicas que regulan o determinan estas interacciones (14, 90, 93-96). Hay una creciente evidencia de que estas vías no son distintas. Componentes de diferentes vías inmunes pueden actuar de forma sinérgica y pueden interactuar con los componentes de la apoptosis y otras vías metabólicas para determinar la CV (15, 59, 87, 88, 94, 96-98). La vía JAK/STAT (99), parece tener una función conservada en *Ae. aegypti*. Genes relacionados con la vía JAK/STAT están regulados diferencialmente en respuesta a la infección por vDEN (93), y *Ae. aegypti* se puede hacer más o menos susceptibles al virus a través de silenciamiento de DOME (receptor de la vía de JAK/STAT) y PIAS (regulador negativo de la vía JAK/STAT), respectivamente (88).

El mecanismo antiviral del RNA de interferencia (RNAi), es considerado por algunos autores, la defensa antiviral más importante en los mosquitos (100). El RNAi es un mecanismo de silenciamiento endógeno que se encuentra en una variedad de organismos eucariotas, el cual tiene dos funciones principales: 1) regular la expresión de genes endógenos (101), y 2) servir como un mecanismo de defensa contra el material nucleico invasivo (p.e: virus) (102). La inhibición de la vía de RNAi incrementa la infección por arbovirus en *Anopheles gambiae* infectado con el virus O'nyong-nyong (103) y *Ae. aegypti* infectado con el virus Sindbis (104) o el vDEN (105).

La presencia de viRNA (RNA que es específico de genomas virales) se ha demostrado en *Ae. aegypti* infectado con SINV y vDEN (106, 107), y se ha planteado que los virus recombinantes codifican supresores de RNAi para aumentar la mortalidad, aumentar títulos virales y reducir la acumulación de viRNAs en mosquitos infectados. Siguiendo esta premisa, un trabajo reciente usando una línea celular de mosquitos mostró que el vDEN es capaz de suprimir la expresión de algunas moléculas inmunes (97). En el caso de RNAi, han sido identificadas moléculas que actúan como supresores de la vía en los virus que infectan *Drosophila* (108, 109); sin embargo, dichas moléculas no han sido identificados en mosquitos que transmiten virus y la estrategia de defensa viral contra RNAi aún no se conoce (105).

En el caso de la vía Toll, los genes relacionados con esta vía están regulados diferencialmente en respuesta tanto a Sindbis virus y la infección con vDEN en *Ae. aegypti* (93, 110). Se ha demostrado la activación y la inhibición de la vía Toll para disminuir y aumentar la susceptibilidad a diferentes cepas del vDEN en varias cepas

de *Ae. aegypti*, mostrando la importancia de la vía Toll en la inmunidad antiviral en el mosquito (92, 93).

Otro mecanismo que ha sido involucrado en la respuesta antiviral en mosquitos es la apoptosis, una respuesta dirigida a eliminar agentes patógenos intracelulares, promoviendo la muerte y la eliminación tanto de la célula infectada como el patógeno (15, 98, 111-114). Este proceso se diferencia de otras estrategias de defensa debido a la utilización de la maquinaria ya existente en lugar de la síntesis de novo (115-117). El proceso comprende de dos fases, 1) el compromiso de la muerte celular inducida por caspasas iniciadoras, y 2) la ejecución mediada por las caspasas efectoras. La apoptosis puede ser incorporada en varias etapas para restringir la replicación viral (118, 119), y los virus responden a esta presión con la expresión de proteínas específicamente diseñadas para interrumpir las vías de apoptosis. La apoptosis es estrictamente controlada a través de reguladores de apoptosis y los inhibidores de la apoptosis (IAP), que regulan y promueven la muerte celular o la sobrevivencia, respectivamente.

Entender la contribución de moléculas apoptóticas específicas y otras vías durante la invasión de patógenos se vuelve algo complicado en algunas moléculas que funcionan dentro de múltiples vías inmunes. Los componentes de las vías IMD, Toll y las vías JAK-STAT funcionan dentro de las respuestas anti-bacteriales y anti-virales (88, 110, 120). La caspasa apoptótica, AeDredd (121), y el adaptador, AeFadd (122), funcionan directamente dentro de la vía IMD (121, 123) y afectan la señalización NF- κ B requerida tanto para la expresión de AMP (87, 124, 125) como de las señales que promueven la sobrevivencia en la apoptosis. Los componentes de la vía Toll también se activan por la invasión del vDEN pero esta activación no elimina completamente el virus (93). Las vías Toll, IMD, JAK-STAT y apoptóticas interactúan sinérgicamente (88, 126, 127), pero no se conoce cómo las moléculas multifuncionales son reguladas diferencialmente o cómo diferencialmente influyen sólo una vía.

CONEXIÓN 1. Diseño Metodológico

DISEÑO METODOLÓGICO

En el grupo de la Dra. Clara Ocampo en CIDEIM en colaboración con el grupo del Dr. Carl Lowenberger en Simon Fraser University (Canadá), se llevan a cabo investigaciones dirigidas al estudio de las relaciones virus-vector, orientadas a la respuesta inmune de *Ae. aegypti* durante la infección con vDEN, con el objetivo de buscar moléculas que pueden ser utilizadas para el control o disminución de la transmisión de la enfermedad.

Para evaluar las interacciones moleculares entre *Ae. aegypti* y el vDEN, seleccionaron mosquitos colectados en campo, con el fin de obtener cepas con diferente susceptibilidad y diferentes barreras a la infección con virus DEN-2; así obtuvieron una cepa 50% refractaria-Cali-MIB (Midgut Infection Barrier) a la infección por el virus y otra cepa 96% susceptible (Cali-S) (16). Al mismo tiempo, se realizaron estudios de expresión diferencial de genes por hibridación supresiva substractiva en mosquitos que se encontraban infectados o no con vDEN, que sugirieron a la apoptosis como uno de los principales mecanismos del mosquito involucrados en el proceso de infección (14). Además, mediante la caracterización de la expresión temporal de genes asociados con apoptosis y el mecanismo de RNA de interferencia (RNAi), se observó una sobreexpresión de genes relacionados con apoptosis (Caspasa-16 y Dronc) en la cepa Refractaria a las 24 y 36h. Los resultados del silenciamiento de estas caspasas en los mosquitos y su posterior infección con vDEN-2, evidenciaron un incremento de hasta un 80% en la susceptibilidad de la cepa refractaria. Estos datos sugieren que los genes de apoptosis pueden estar inhibiendo la replicación del virus en el vector (15).

Con estos antecedentes, y teniendo en cuenta que los resultados preliminares descritos anteriormente validan las cepas seleccionadas como modelo biológico para llevar a cabo estudios que permitan entender los mecanismos que participan en la eliminación del virus en la cepa refractaria, planteamos este estudio, con el objetivo de identificar genes específicos que permitan un mejor entendimiento de los componentes que contribuyen a la refractariedad de los mosquitos a la infección por el vDEN-2.

Durante el desarrollo de este proyecto analizamos y comparamos los genes del intestino medio de las hembras de *Aedes aegypti* de las cepas Cali-S y Cali-MIB, involucrados en la respuesta inmune ante la infección con vDEN-2. Empleamos una estrategia que involucra: una técnica de alto rendimiento como son los microarreglos, que permitió lograr un alto tamizaje génico y estudios funcionales (qPCR, RNAi) de genes asociados a la respuesta inmune del mosquito (figura 6). Nos enfocamos en el intestino medio, pues durante las infecciones vírales, en particular con arbovirus, se ha considerado que la principal barrera que existe en los mosquitos es la barrera de intestino medio (14, 15, 128).

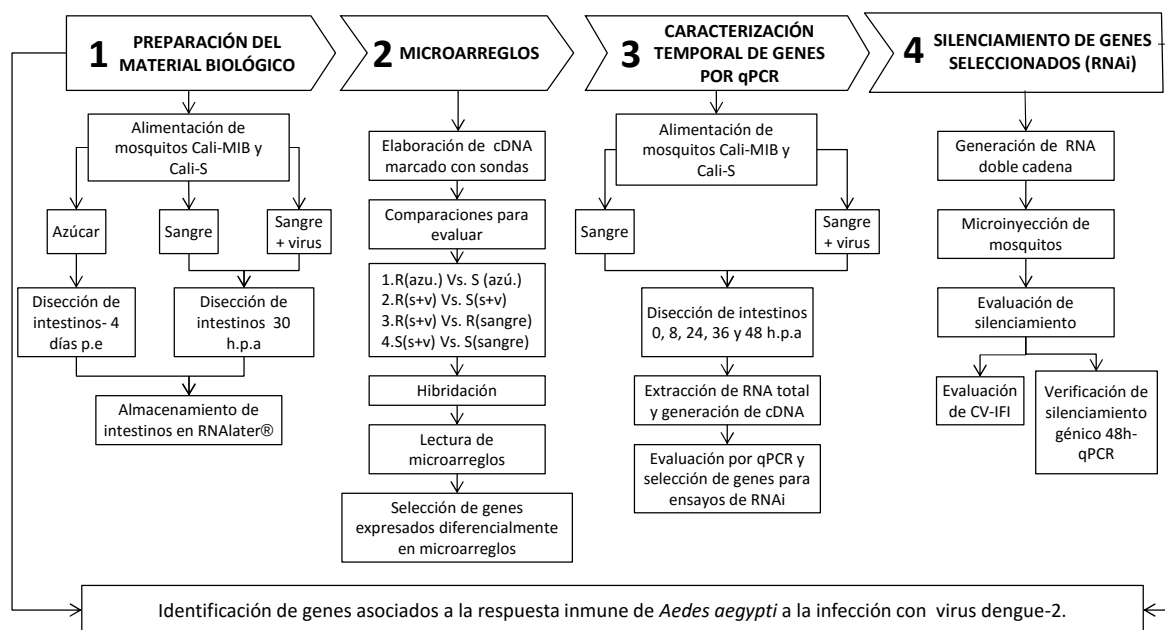


Figura 6. Diseño metodológico. p.e: post-emergencia; h.p.a: horas post-alimentación; s+v: sangre con vDEN; azú: azúcar; IFI: inmunofluorescencia; qPCR: PCR en tiempo real, Cali-MIB: cepa refractaria con barrera de escape en intestino medio, Cali-S: cepa susceptible.

En general, los mosquitos de ambas cepas se alimentaron con sangre infectada con vDEN-2 y como grupos controles se alimentaron mosquitos con sangre sola y solución azucarada de forma independiente (figura 6). Para la elaboración de los microarreglos, los intestinos de las hembras alimentadas por cada tratamiento se recolectaron a las 30 horas post alimentación; este tiempo se eligió como un punto intermedio, teniendo en cuenta trabajos anteriores realizados en CIDEIM, donde la expresión de genes relacionados con respuesta inmune presentaron una expresión diferencial entre las 24 y 36 horas post-infección (15). Posteriormente se realizó extracción de ARN total de los intestinos, se generó cDNA y se procedió a realizar los análisis con los microarreglos en el laboratorio del Dr. Dimopoulos en la Universidad Johns Hopkins.

Una vez se obtenidos los resultados, se escogieron los genes que presentaron una expresión diferencial relevante en el tratamiento con sangre infectada con virus comparado con los grupos control (azúcar y sangre). Caracterizamos la expresión temporal de estos genes, mediante PCR en tiempo real en muestras de intestinos recolectadas a los tiempos 0, 24, 36 y 48 horas post-alimentación con sangre y con sangre infectada con vDEN-2, comparando la cepa Cali-MIB Vs. la cepa Cali-S de *Ae. aegypti* y así observar si existían diferencias entre ellas. Finalmente, con ensayos de RNA de interferencia, realizamos silenciamiento de estos genes y evaluamos su función y efecto en el desarrollo de la infección por el virus en los mosquitos refractarios y susceptibles (figura 6). De este modo realizamos un aporte al entendimiento de los factores genéticos asociados a la CV de *Ae. aegypti*, lo cual permitirá en un futuro contribuir a la identificación de nuevas estrategias para

disminuir la transmisión basadas en la manipulación genética, blancos de tratamiento o desarrollo de vacunas. En los capítulos a continuación se describen los procesos detalladamente.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos con los microarreglos fueron analizados siguiendo las indicaciones reportadas por el grupo del Dr. Dimopoulos para esta técnica (93, 129). Todos los resultados obtenidos de las qPCR se analizaron empleando el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ propuesto por Livak y colaboradores (130), Para esto, se normalizaron los niveles de expresión usando un control interno (β -actina) para generar valores ΔCt . El método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ se empleó utilizando las muestras alimentadas con sangre (Tiempo 0) como el segundo calibrador para medir el número de veces que cambia la expresión de cada gen evaluado en el tratamiento con sangre infectada con virus. Se comparó la expresión de genes dentro de cada cepa expuesta a la sangre+vDEN-2 o solamente a sangre utilizando la fórmula $2^{(-\Delta Ct)_{vDEN-2}} / 2^{(-\Delta Ct)_{Sangre}}$ (Figura 9); y entre cepas (Cali-MIB vs Cali-S) después de la exposición a la sangre o sangre + vDEN-2, usando $2^{(-\Delta Ct)_{Cali-MIB}} / 2^{(-\Delta Ct)_{Cali-S}}$ (Figuras 10 y 11). Estos resultados se presentan como las medias y desviaciones estándar de dos DNAC generados de forma independiente y donde cada muestra se corrió por triplicado. Este método nos permitió realizar un análisis descriptivo de los cambios en la expresión génica, mediante el uso de las gráficas generadas.

Para corroborar las diferencias observadas en el análisis descriptivo, se realizaron comparaciones entre la expresión de los genes a los diferentes tiempos para el tratamiento sangre+virus, en las cepas Cali-S y Cali-MIB, a través de un modelo de regresión múltiple; siendo la variable respuesta ΔCt (Ct (muestra) - Ct (calibrador β -actina)) y los factores independientes el tiempo, tratamiento (sangre+virus) y la cepa (Cali-MIB o Cali-S). Los ensayos de silenciamiento génico por RNAi fueron analizados utilizando una prueba Chi cuadrado, para comparar el porcentaje de la CV entre las cepas Cali-S y Rockefeller. Los análisis estadísticos se realizaron empleando los paquetes estadísticos Stata SE 12 y R 3.1.1. (131). Se consideró un nivel de significancia de 0.05 para todas las pruebas estadísticas que se emplearon. Mensualmente se realizó una copia de las bases de datos en el servidor institucional y en dos discos duros externos.

CAPÍTULO 2. Identificación de genes de respuesta anti virus DEN-2 a través del análisis de un perfil transcripcional global en el intestino medio de los mosquitos de la cepa refractaria (Cali-MIB) Vs. la cepa susceptible (Cali-S) de *Ae. aegypti*.

Materiales y métodos

Mantenimiento de las cepas de Aedes aegypti.

Mosquitos de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio: $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% humedad relativa, y un ciclo luz:oscuridad de 12:12 horas. Los adultos se alimentaron con una solución azucarada al 10%. Se realizaron alimentaciones con sangre a través de un alimentador con membrana artificial, utilizando sangre de conejo desfibrada e intestino de cerdo como membrana (Figura 7), para la obtención de huevos y posterior mantenimiento de las cepas. Los huevos obtenidos, se recolectaron en toallas de papel y se almacenaron hasta una posterior eclosión.

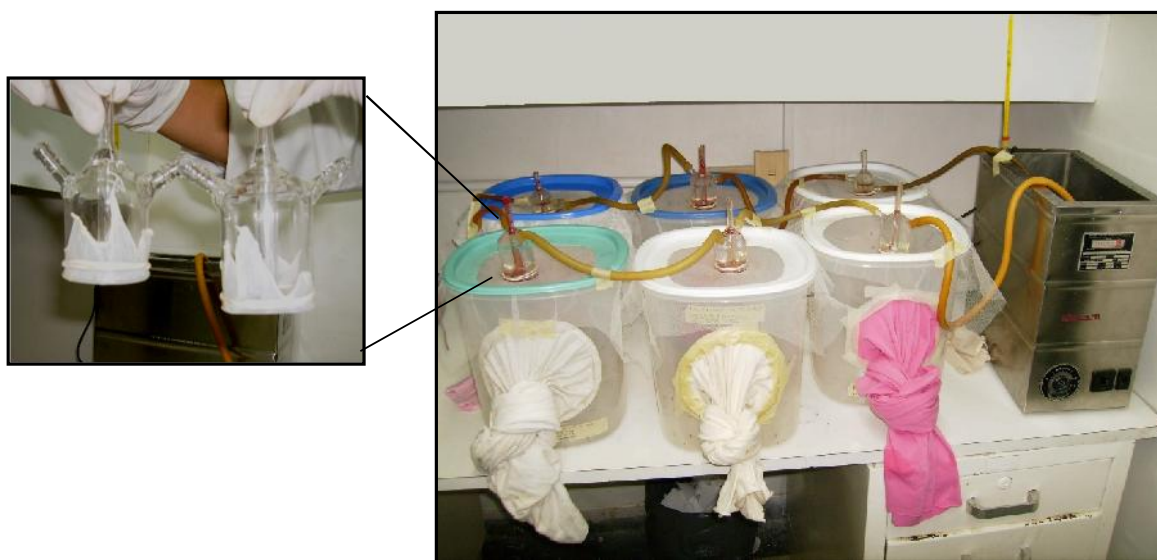


Figura 7. Equipo de alimentación artificial con alimentadores de vidrio.

Cultivo celular

Los cultivos celulares son utilizados para el estudio del crecimiento de diversos virus. La mejor línea celular empleada para el aislamiento del vDEN, es la línea de células de *Ae. albopictus* C6/ 36 HT (132).

El cultivo celular C6/36 HT, se mantuvo en flask de 50 mL con 5 mL de medio de crecimiento celular Lebovitz (L-15 medium, Sigma Aldrich®) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (10%), penicilina/estreptomicina (1%), y L-glutamina (1%) a $31 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Con el fin de mantener el cultivo de células *in vitro* en monocapas y preservar sus propiedades fisiológicas, se realizó un pase celular cada 7 días.

Replicación de vDEN-2 en células C6/36HT e infección de mosquitos mediante alimentadores de vidrio con membrana.

En primer lugar se obtuvo una monocapa de células C6/36 HT en 2 flask de 50mL. La infección de las células se realizó con el sobrenadante de virus DEN-2 cepa New Guinea C, el cual se encontraba alicuotado en tubos eppendorf y almacenado a -45°C. El sobrenadante del virus, se sacó de la nevera en una materia con hielo para descongelarlo lentamente. Una vez descongelado se llevó a la cabina con nivel de bioseguridad tipo III. Posteriormente, se adicionaron 800uL del virus a cada flask con monocapa celular y se incubaron por 1 hora a 37°C, agitando con suavidad durante el tiempo de la incubación con el fin de que el virus penetre en las células. Las células infectadas con el virus fueron incubadas por 14 días a 31±1°C con medio L-15 suplementado con SFB al 2%. Una vez transcurridos los 14 días de incubación, tiempo durante el cual el virus se multiplicó en las células, se desprendieron las células de los flask con la ayuda de un policía de vidrio y se recolectó el medio con las células de cada flask en un tubo plástico, este proceso se llevó a cabo en la cabina de bioseguridad tipo III.

El sobrenadante del vDEN-2 obtenido fue mezclado con sangre de conejo desfibrada en una proporción 1:1 para realizar las infecciones de los mosquitos *Ae. aegypti* (Cali-S y Cali-MIB). Las hembras de *Ae. aegypti* de 5 a 8 días de edad fueron expuestas por un tiempo suficiente para que un gran porcentaje de hembras se alimenten con sangre infectada (2 horas aproximadamente), mediante alimentadores de vidrio con membrana como se explicó anteriormente.

La presencia y la concentración del vDEN-2 en la sangre a la cual los mosquitos fueron expuestos se determinó en: a) sangre sin infectar, b) sobrenadante de virus y c) la mezcla de sangre y virus al inicio y al final del periodo de exposición como lo describe Bennett et al (84). Estas titulaciones permitieron controlar la variabilidad en las concentraciones de virus que fueron tomadas por los mosquitos en las infecciones. Todo el procedimiento de alimentación de mosquitos con sangre infectada con vDEN-2 se desarrolló en el insectario de CIDEIM catalogado como laboratorio de bioseguridad 2+ (BSL 2+), el cual posee tres espacios para colonización individual de especies de vectores (*Lutzomyia*, *Anopheles* y *Aedes*) que, a su vez, cuentan con espacios independientes para realizar infecciones experimentales. Todas las zonas están acondicionadas con barreras físicas de tal forma que se evite el escape de insectos entre las colonias y fuera de estas.

Obtención del material biológico para los ensayos con microarreglos.

En los ensayos con los microarreglos, se evaluaron tres retos diferentes en las cepas de *Ae. aegypti*, Cali-S y Cali-MIB: solución azucarada (10%), sangre desfibrada de conejo y sangre infectada con vDEN-2; los dos primeros grupos se emplearon como grupos control. En el caso del reto con solución azucarada, 60 mosquitos fueron diseccionados a los 4 días post-emergencia. Para los retos con

sangre desfibrada de conejo y sangre infectada, se llevaron a cabo alimentaciones artificiales, y 30 horas después de la alimentación, se diseccionaron 60 mosquitos para cada cepa.

Los intestinos medios de las hembras alimentadas fueron diseccionados en agua estéril DEPC sobre una superficie fría, se cortaron longitudinalmente, luego se enjuagaron con PBS para remover residuos de matriz peritrófica y contenidos del intestino, posteriormente fueron depositados en el agente estabilizador "RNA later" (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) por grupos de 20 y almacenados a -20°C mientras se obtuvo el material biológico suficiente para transportarlo a la Universidad Johns Hopkins, lugar donde se realizaron los microarreglos. De esta manera obtuvimos 3 repeticiones por cada tratamiento y cada experimento se realizó 3 veces.

Microarreglos

Los microarreglos se realizaron en el laboratorio del Dr. George Dimopoulos de John Hopkins University quien posee el microchip de *Ae. aegypti* y tiene amplia experiencia en este tipo de análisis.

Los ensayos de transcripción y análisis se llevaron a cabo siguiendo protocolos estándar, empleando la plataforma de microarreglos de Agilent con el genoma completo de *Ae. aegypti* (22, 93, 129). La abundancia relativa de mRNA se comparó entre mosquitos alimentados con solución azucarada (10%) (Cali-MIB_(azú) Vs. Cali-S_(azú)), mosquitos alimentados con sangre (Cali-MIB_(sangre) Vs. Cali-S_(sangre)) y mosquitos alimentados con sangre infectada con virus (Cali-MIB_(s+v) Vs. Cali-S_(s+v)). Aproximadamente 1ug de ARN total se usó para la síntesis de las sondas marcada con cy3 y cy5-dCTP. La extracción del ARN total de intestinos se realizó siguiendo las instrucciones del manual del RNeasy minikit (Qiagen®), y las concentraciones de ARN fueron medidas usando el NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE).

Las hibridizaciones fueron realizadas In Situ a través de la tecnología Agilent con un kit de hibridización a 60°C siguiendo las instrucciones del manual. Las intensidades de hibridización se determinaron con el escáner Axon GenePix 4200AL, y las imágenes analizadas con el programa "Gene Pix". El tamaño del punto, localización, y calidad fueron determinadas a través del programa "Gene Pix Pro 6.0 algorithms". Los datos de expresión se procesaron y analizaron como lo describió previamente el grupo del Dr. Dimopoulos (129). En resumen, los valores medios de fluorescencia se normalizaron de acuerdo al método LOWESS y la relación Cy5/Cy3 de las réplicas se analizaron con la prueba t-student con un nivel de significancia de $p < 0.05$ usando los programas de libre acceso TIGR MIDAS y MeV. Los datos de expresión de todas las réplicas fueron promediados con el programa "GEPAS microarray preprocessing" antes de la transformación logarítmica (base 2). El punto de corte para la significancia de la regulación génica

en este tipo de microarreglos fue el reportado por Yang y colaboradores (133), que corresponde a 0,78 en escala log2, equivalente a 1,71 veces de regulación. La base de datos de los genes que se utilizó para el análisis fue creada dentro del estudio de los genes ontólogos de *Ae. aegypti* desarrollado por el grupo "GeneMapp development" (134). Se realizaron 3 réplicas biológicas para todos los ensayos.

Este sistema permitió identificar la expresión diferencial de los genes de nuestras dos cepas (Cali-S y Cali-MIB), y los resultados se confirmaron usando la técnica de qPCR (capítulo 3).

Resultados

Concentración del virus en las infecciones artificiales

La concentración del vDEN-2 fue monitoreada mediante titulación, antes, durante y después de cada proceso de alimentación artificial y varió de 10^8 a $10^{8.5}$ TCID₅₀/mL al inicio de la infección y de $10^{7.2}$ a $10^{7.4}$ TCID₅₀/mL al final de la misma. Las muestras de sangre de conejo empleadas para mezclar con el virus, fueron negativas.

Identificación de genes asociados a la respuesta anti vDEN-2 en las cepas Cali-S y Cali-MIB de Ae. aegypti.

La expresión global de los genes del intestino medio de las cepas Cali-S y Cali-MIB fue identificada mediante microarreglos de la plataforma Agilent que contenían el genoma completo de *Ae. aegypti* (22, 93, 129). La abundancia relativa de mRNA se comparó en muestras recolectadas a las 30 horas post alimentación con solución azucarada (10%), sangre y sangre infectada con vDEN-2. La expresión génica se identificó en la cepa Cali-MIB comparado con la cepa Cali-S de la siguiente manera: Cali-MIB_(azú) Vs. Cali-S_(azú), Cali-MIB_(sangre) Vs. Cali-S_(sangre), Cali-MIB_(s+v) Vs. Cali-S_(s+v). El tiempo de evaluación (30h) se eligió como un punto intermedio, teniendo en cuenta trabajos anteriores realizados en CIDEIM, donde la expresión de genes relacionados con respuesta inmune hacia el vDEN-2, presentó una diferencia estadísticamente significativa entre las 24 y 36 horas post-infección (15).

Una vez realizado el análisis estadístico descrito previamente a los datos obtenidos con los microarreglos, estos fueron organizados en la base de datos realizada por el grupo "GeneMapp development", mediante el programa Access 2007 y luego exportados a una hoja de Excel 2007 para su manipulación y análisis.

En general, fueron identificados 3804 genes expresados en total en las tres comparaciones realizadas (figura 8). La expresión de los genes en la cepa Cali-MIB en comparación con la cepa Cali-S (30h.p.a) se observó en diferentes grupos funcionales: respuesta inmune, metabolismo, proteólisis, reacciones redox,

replicación, transporte, función diversa y desconocida. Los grupos de función diversa y desconocida, presentaron el mayor número de genes expresados, 1381 y 667, respectivamente. En el grupo de respuesta inmune, el cual está directamente implicado en el proceso de infección por el virus, solamente se identificaron 170 genes.

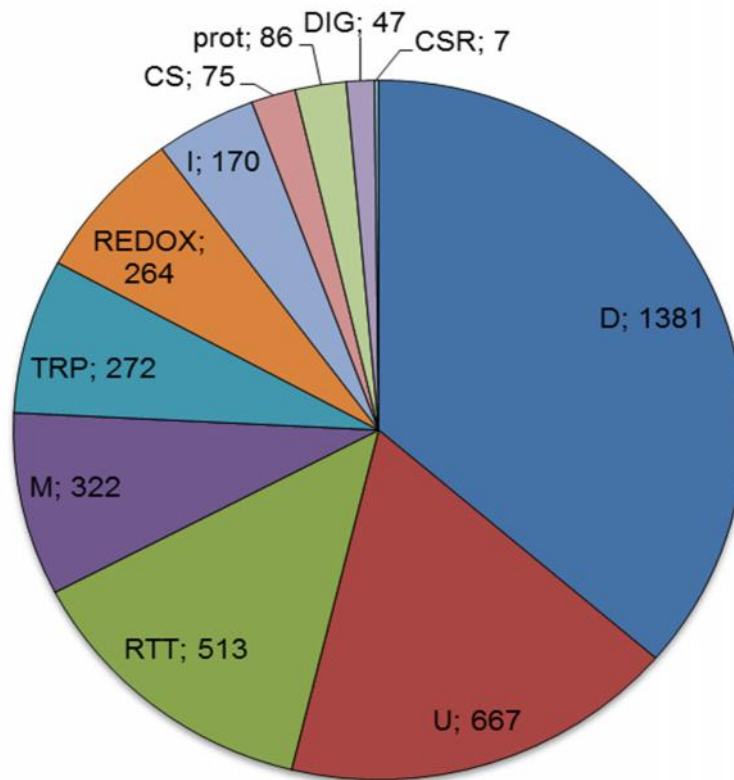


Figura 8. Número total de genes expresados en los microarreglos

Posterior al análisis macro de los datos, se procedió a seleccionar los genes que se encontraran bajo o sobre regulados en cada tratamiento evaluado, haciendo uso de la herramienta "formato condicional" del programa Excel. Este procedimiento se llevó a cabo teniendo en cuenta el punto de corte para la significancia de la regulación génica en este tipo de microarreglos reportado por Yang y colaboradores (133), que corresponde a 0,78 en escala log2, equivalente a 1,71 veces de regulación (tabla 1). Los genes bajo regulados fueron aquellos que se encontraban por debajo del valor 0,78, caso contrario a los genes sobre regulados (expresión > 0,78).

Tabla 1. Número de genes bajo o sobre regulados en la cepa Cali-MIB comparado con la cepa Cali-S, en los 3 grupos evaluados en los microarreglos.

Grupo funcional	Solución azucarada		Sangre		Sangre con vDEN-2	
	Genes sobre regulados	Genes bajo regulados	Genes sobre regulados	Genes bajo regulados	Genes sobre regulados	Genes bajo regulados
D	21	13	6	3	9	2
U	10	5	1	2	0	0
RTT	38	15	1	2	0	1
M	5	15	0	1	1	1
TRP	12	2	5	0	0	0
REDOX	11	9	5	0	1	0
I	14	7	25	2	10	10
CS	2	4	1	0	0	0
PROT	33	32	4	5	3	3
DIG	3	1	0	0	0	0
CSR	0	0	0	0	0	0
Total	149	103	48	15	24	17

I: inmunidad, M: metabolismo, PROT: proteólisis, RTT: replicación, transcripción, y traducción, TRP: transporte, U: función desconocida (Unknown functions), DIG: digestión, CS: citoesqueleto, D: diverso, TRP: transporte, REDOX: oxido-reducción.

El grupo de comparación en el que los mosquitos fueron alimentados con solución azucarada presentó el mayor número de genes sobre y bajo regulados en todos los grupos funcionales, seguido del grupo de comparación de mosquitos alimentados con sangre y finalmente el grupo de mosquitos alimentados con sangre infectada con vDEN-2 (Tabla 1). Considerando estos resultados, se realizó la selección de los genes bajo o sobre regulados asociados exclusivamente al tercer grupo de comparación (sangre+virus) y que no tuvieran expresión significativa en los dos grupos control (azúcar y sangre), con esto se asumía que los genes estaban expresados en respuesta a la infección por el virus y no por el proceso de alimentación. En el tercer grupo (sangre+virus) se observó un mayor número de genes sobre regulados (Tabla 1). En general, la expresión génica estuvo asociada en su mayoría a funciones de respuesta inmune y de función diversa y en menor proporción a proteólisis y metabolismo (Tabla 1). Teniendo en cuenta esto, se caracterizaron los genes involucrados en la respuesta inmune, esta vez incluyendo los tres grupos de comparación. De esta manera pudimos tener un mejor panorama en el momento de seleccionar los genes a evaluar funcionalmente en ensayos posteriores. Para esto se elaboró un diagrama Venn (Figura 9), que permitió determinar en general cuantos genes estaban expresados exclusivamente en cada grupo de comparación y cuantos estaban siendo compartidos entre los mismos; al mismo tiempo se identificaron cuales genes estaban sobre o bajo regulados.

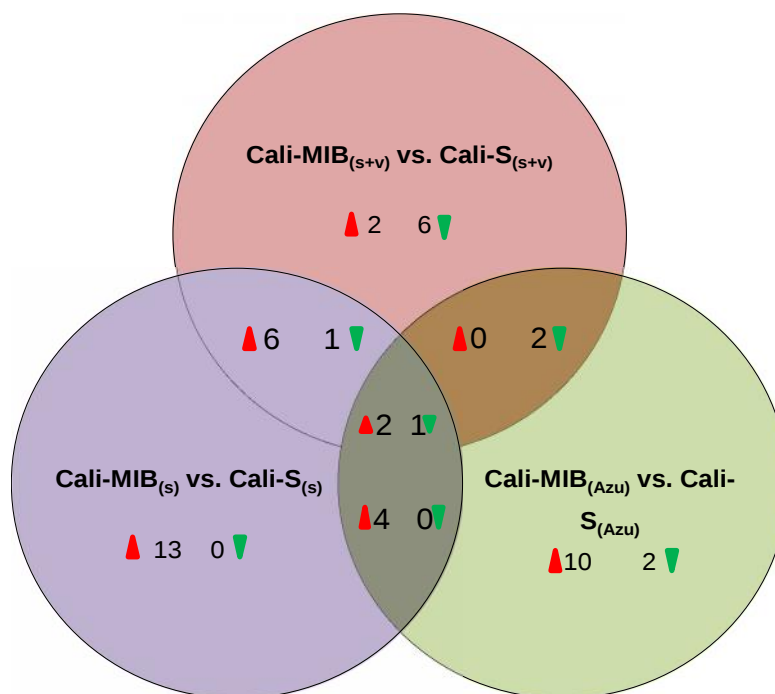


Figura 9. Genes asociados con la respuesta inmune en los tratamientos evaluados: Cali-MIB_(azu) Vs. Cali-S_(azu), Cali-MIB_(s) Vs. Cali-S_(s), y Cali-MIB_(s+v) Vs. Cali-S_(s+v). Flechas rojas: genes sobre regulados, flechas verdes: genes bajo regulados. Azu: tratamiento con azúcar, s: tratamiento con sangre, s+v: tratamiento con sangre con virus.

Posteriormente, se elaboró una lista detallada de los genes y su nivel de expresión según como se agrupan en el diagrama de Venn (Tabla 2). Esto, permitió seleccionar un pequeño grupo de genes (n=8) que estaban expresados solamente en el grupo sangre+virus, de los cuales, 2 genes estaban sobre regulados y 6 bajo regulados; de estos 8 genes seleccionamos 4 para evaluar funcionalmente: *Cathepsin-b* (AAEL007585), *Antibacterial peptide, putative* (AAEL000598), *Fibrinogen and fibronectin* (AAEL006702), *Keratinocyte lectin, putative* (AAEL009842).

Tabla 2. Genes bajo o sobre regulados en el grupo funcional respuesta inmune en los grupos de comparación: Cali-MIB_(azu) Vs. Cali-S_(azu), Cali-MIB_(s) Vs. Cali-S_(s), and Cali-MIB_(s+v) Vs. Cali-S_(s+v). Listado basado en el diagrama de Venn de la figura 9.

	Nombre de los genes	ID Ensamble	Nivel de expresión		
			Cali-MIB _(azu) Vs. Cali-S _(azu)	Cali-MIB _(s) Vs. Cali-S _(s)	Cali-MIB _(s+v) Vs. Cali-S _(s+v)
Genes expresados en la comparación: Cali-MIB (azú) vs. Cali-S (azú)	<i>Cathepsin-b</i>	AAEL009637	1,257143218**		
	<i>Toll</i>	AAEL002583	1,053746517**		
	<i>Serine collagenase 1 precursor</i>	AAEL008196	0,91894591**		
	<i>Trypsin</i>	AAEL012712	1,183051955**		
	<i>P37nb protein</i>	AAEL006248	1,050047053**		
	<i>Fibrinogen and fibronectin</i>	AAEL011009	0,993965883**		
	<i>Antifreeze protein</i>	AAEL000533	0,892611703**		
	<i>Serine protease</i>	AAEL008221	0,835209222**		
	<i>Aromatic amino acid decarboxylase</i>	AAEL003462	0,785564737**		
	<i>Serine protease</i>	AAEL010866	0,779872552**		
	<i>Hypothetical protein</i>	AAEL003821	-1,15039092*		
	<i>Chymotrypsin</i>	AAEL009680	-0,88538111*		
Genes expresados en la comparación Cali-MIB vs. Cali-S para los tratamientos azúcar y sangre	<i>Niemann Pick Type C2</i>	AAEL015136	2,020791545**	1,567856994**	
	<i>Serine-type endopeptidase</i>	AAEL017520	1,099877**	1,50569614**	
	<i>Trypsin</i>	AAEL013714	1,213745938**	1,423130326**	
	<i>Serine protease</i>	AAEL000028	0,840440454**	1,061757545**	
Genes expresados en la comparación: Cali-MIB (s) vs. Cali-S (s)	<i>Galectin</i>	AAEL005293		1,005398822**	
	<i>Galectin</i>	AAEL012001		1,016228206**	
	<i>Serine collagenase 1 precursor</i>	AAEL007432		0,918601219**	
	<i>Leucinech transmembrane protein</i>	AAEL011734		1,069599327**	
	<i>Cd36 antigen</i>	AAEL009432		1,518069977**	
	<i>Peptidoglycan recognition protein</i>	AAEL014640		0,950620892**	
	<i>Leucinech transmembrane protein</i>	AAEL003720		0,825548604**	
	<i>Epithelial membrane protein</i>	AAEL000227		1,053716921**	
	<i>Cd36 antigen</i>	AAEL009420		1,226440484**	
	<i>Conserved hypothetical protein</i>	AAEL005185		0,832600251**	
	<i>Serine protease inhibitor, serpin</i>	AAEL003686		0,802842101**	
	<i>Hemomucin</i>	AAEL004884		0,796671194**	
	<i>Serine protease</i>	AAEL002124		1,145571615**	
Genes expresados en la comparación Cali-MIB vs. Cali-S para los tratamientos sangre y s+v.	<i>Niemann Pick Type C2</i>	AAEL009556		2,431252035**	1,794626009**
	<i>Gram-negative bacteria binding protein</i>	AAEL009176		1,737849176**	1,90273163**
	<i>Serine-type endopeptidase activity</i>	AAEL017457		1,700841761**	2,44246843**
	<i>Galactose-specific C-type lectin</i>	AAEL005641		1,356865292**	1,395236521**
	<i>Peptidoglycan recognition protein</i>	AAEL017056		1,151168959**	1,016136252**
	<i>Peptidoglycan recognition protein sc2</i>	AAEL007039		0,938880515**	0,873958388**
	<i>Cathepsin-b</i>	AAEL007599		-1,10103252*	-2,15052296*
Genes expresados exclusivamente en la comparación: Cali-MIB (s+v) vs. Cali-S (s+v)	<i>Cathepsin-b</i>	AAEL007585			-1,55370209*
	<i>Glutamate decarboxylase</i>	AAEL001902			0,822099018**
	<i>Antibacterial peptide</i>	AAEL000598			1,807534955**
	<i>Cathepsin-b</i>	AAEL015312			-1,63923245*
	<i>Cathepsin-b</i>	AAEL012216			-1,58296822*
	<i>Keratinocyte lectin</i>	AAEL009842			-0,88880292*
	<i>Fibrinogen and fibronectin</i>	AAEL006702			-1,24340279*
Genes expresados en la comparación Cali-MIB vs. Cali-S para los tres tratamientos.	<i>Peroxiredoxin 6, prx-6</i>	AAEL002309			-0,85972611*
	<i>Fibrinogen and fibronectin</i>	AAEL006691	-0,80468408*	-0,91228917*	-1,43296784*
	<i>Serine protease</i>	AAEL008767	-0,98046711*	1,159195244**	2,158309599**
Genes expresados en la comparación Cali-MIB vs. Cali-S para los tres tratamientos. azúcar y s+v	<i>Serine protease</i>	AAEL015087	-1,51612583*	1,877885407**	2,5907257**
	<i>Holotricin, glycine rich repeat protein (grp), anti-microbial peptide.</i>	AAEL017536	-0,91780047*		-1,26548459*
	<i>Transferrin</i>	AAEL015458	-0,80821701*		-1,46736436*

**genes sobre regulados, *genes bajo regulados, azú: solución azucarada, s: sangre, s+v: sangre infectada con vDEN-2.

Considerando el bajo número de genes expresados a este nivel, se decidió seleccionar otros genes de los grupos proteólisis (*Metalloproteinase*-AAEL014516 y *Serine type endopeptidase*-AAEL001674) y de función diversa (*Trypsin*-AAEL013703) en los cuales se observó regulación génica en el grupo de comparación sangre+virus y los genes *Niemann Pick Type C2* (AAEL015136) y *Gram-negative bacteria binding protein* (GNBP-AAEL009176), que fueron expresados tanto en el tratamiento con sangre como el tratamiento con sangre+virus. Además, con el apoyo de búsqueda bibliográfica, decidimos escoger otros genes que aunque no cumplían el criterio de inclusión del punto de corte de regulación génica, estaban expresados en el microarreglo y que desempeñan una función que ha sido relacionada con proceso de infección con vDEN en otros estudios (*Caspase-1*-AAEL014348, *Apoptosis stimulating of P53*-AAEL013338, *Lethal (2) essential for life, l2efl*- AAEL011277) (Tabla 2). De esta manera, seleccionamos 12 genes (Tabla 3) a los cuales se verificó el patrón de expresión temporal (0, 8 24 y 36h.p.i) mediante qPCR, de esta manera se validaron los resultados obtenidos con los microarreglos, teniendo en cuenta que en los microarreglos solamente se evaluó la expresión génica a las 30 h.p.i.

Finalmente, se realizó la revisión bibliográfica de los 12 genes seleccionados lo cual permitió organizarlos en 4 grupos diferentes de acuerdo a la función que desempeñaban: apoptosis, receptores de reconocimiento de patrones (PRR-*Pattern recognition receptor*), serin proteasas y otros (Tabla 3).

Tabla 3. Genes seleccionados para su caracterización temporal y funcional mediante PCR en tiempo real y RNA de interferencia.

Gene	Identificación Ensembl	Grupo Funcional
Apoptosis		
1. <i>Caspase-1</i>	AAEL014348	I
2. <i>Apoptosis stimulating of P53</i>	AAEL013338	D
Receptor de reconocimiento de patrones		
3. <i>Niemann Pick Type C2</i>	AAEL015136	I
4. <i>Gram-negative bacteria binding protein</i>	AAEL009176	I
5. <i>Keratinocyte lectin, putative</i>	AAEL009842	I
6. <i>Fibrinogen and fibronectin</i>	AAEL006702	I
Serin Proteasas		
7. <i>Cathepsin- b</i>	AAEL007585	I
8. <i>Trypsin</i>	AAEL013703	D
9. <i>Metalloproteinase, putative</i>	AAEL014516	PROT
10. <i>Serine-type endopeptidase</i>	AAEL001674	PROT
Otros		
11. <i>Antibacterial peptide, putative</i>	AAEL000598	I
12. <i>Lethal (2)essential for life, l2efl</i>	AAEL011277	I

I: inmunidad, D: Diverso, PROT: proteólisis.

CAPÍTULO 3. Confirmación y cuantificación de la expresión temporal de los 12 genes asociados a la infección por vDEN-2 en mosquitos de las cepas Cali-MIB y Cali-S, mediante PCR en tiempo real (qPCR).

Materiales y métodos

Caracterización temporal de genes por PCR en tiempo real (qPCR)

Para confirmar la expresión diferencial de los 12 genes seleccionados previamente, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). En primer lugar, a través del software Primer3 (v.0.4.0) (137) se diseñaron primers a partir de las secuencias parciales de los genes que han sido identificados en los microarreglos, obtenidas por búsquedas bioinformáticas (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>); asimismo, se utilizó el SYBR Green como sistema de detección y cuantificación. El SYBR Green es un agente intercalante que se une al ADN doble cadena dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR. Los perfiles de expresión de los genes se normalizaron con el gen constitutivo (control interno) de β -actina, que tiene una expresión estable en todos los grupos de mosquitos y no son estimulados por los retos inmunes.

Los ensayos de qPCR se realizaron en muestras colectadas a diferentes tiempos post-alimentación con sangre o sangre con virus, 0, 8, 24 y 36 horas. Se emplearon mosquitos de las cepas: Cali-S y Cali-BIM, para obtener los intestinos y carcasas como se describió anteriormente (capítulo 2). Se almacenaron en grupos de 20 intestinos en 200 μ L de RNA later (Ambion, Austin, TX) y su correspondiente carcasa fue almacenada en 600 μ L de RNA later a -20°C.

La extracción del RNA total de los grupos de intestinos recolectados a diferentes tiempos se realizó siguiendo las instrucciones del manual del RNeasy minikit (Qiagen®), y las concentraciones de RNA fueron medidas usando el NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE). En la síntesis de cDNA, 100ng de ARN total fueron transcritos inversamente en 20 μ L de mezcla de reacción, que contenía buffer 5X (50 mM Tris-HCl (pH 8.3)), DTT 0.1 M, mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) 10mM, 50ng de primer Oligo(dT) (5'-CGGGCAGTGAGCGCAACGTTTTTTTTTTTTTTT-3') y 200 unidades de Transcriptasa reversa (Superscript II Reverse Transcriptase, Life Technologies, Grand Island, NY). La reacción se llevó a 65°C por 5 minutos, 42°C por 50 minutos y 70°C por 15 minutos en un termociclador.

Las condiciones que se usaron para la qPCR fueron: 95°C: 2 min, 40 ciclos de 95°C: 10s, Tm del primer: 15s, 72°C: 20s en 24 μ L de reacción final utilizando 1 μ L del cDNA sintetizado y Express SYBR GreenER qPCR Super-Mix Universal (Invitrogen) en el equipo Rotor Gene 6 (Corbett Life Science). Tres replicas biológicas fueron evaluadas por cada tiempo. Todos los resultados obtenidos de las qPCR se analizaron empleando el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ propuesto por Livak y colaboradores (130).

Teniendo en cuenta los patrones de expresión temporal, se seleccionaron los genes que presentaron mayor cambio ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$) entre los mosquitos susceptibles y

refractarios para evaluar la función en el proceso de infección por vDEN-2 mediante su silenciamiento, utilizando la técnica ARN de interferencia.

Resultados

Perfil de expresión temporal de doce genes asociados a la respuesta a la infección por vDEN-2

Los 12 genes seleccionados anteriormente fueron evaluados mediante qPCR y se determinó el patrón de expresión génica temporal en un lapso de 0, 8, 24 y 36 h.p.i. Se diseñaron los primers mediante el software Primer3 (137) para cada gen (Tabla 4) y fueron evaluados mediante PCR convencional para su posterior uso en los ensayos de qPCR.

Tabla 4. Primers empleados en los ensayos de PCR cuantitativa (qPCR)

Gene	Ensamble ID	Primers	
<i>Apoptosis stimulating of P53</i>	AAEL011277	Forward	GGATCGGATTCACAGCTCATTAC
		Reverse	GTTCGCTGCACTTGGATTG
<i>Keratinocyte lectin, putative</i>	AAEL009842	Forward	CGTTGCGGACTACGAATAC
		Reverse	GGTTACATGGAATGTGCTTAC
<i>Niemann Pick Type C2, putative</i>	AAEL015156	Forward	GCAGTTCGGATTGAAGG
		Reverse	GAGCAGTGATACCCAAAGC
<i>Antibacterial peptide, putative</i>	AAEL000598	Forward	GCTAGGTCAAACCGAAGC
		Reverse	GACGAAAGCTGCGAATC
<i>Lethal (2) essential for life, l2efl</i>	AAEL013338	Forward	CGTCTATCGAAAACCCCG
		Reverse	CGTAATGGCCGTTAGCAG
<i>Trypsin</i>	AAEL013703	Forward	CTTGACGGCAGCTCATTG
		Reverse	CCGTTTCGCAACATCCTC
<i>Serine-type endopeptidase</i>	AAEL001674	Forward	AGCGAAACATGGGTCGTAAC
		Reverse	GAGTCCTTCTCAGCGGAATG
<i>Fibrinogen and fibronectin</i>	AAEL006702	Forward	GATGAATCAGACGCACGAAC
		Reverse	CCACTTCCGGTAAGGATTG
<i>Caspase-1</i>	AAEL014348	Forward	GCTGAAGCGATTGCATTTTG
		Reverse	GTTTCGTTGCACAACTCTCGG
<i>Gram-negative bacteria binding protein</i>	AAEL009176	Forward	GCTGGTTCTGGATTCTGG
		Reverse	CGGGAGCCAATAATTCC
<i>Cathepsin-b</i>	AAEL007585	Forward	CAGGGATGTCACCCATATC
		Reverse	GAAAGCAGCCTGAACTGG
<i>Metalloproteinase</i>	AAEL014516	Forward	GGTCGGTGAAACAGTCGC
		Reverse	CCAACACTTCAGAAGACGCC

En primer lugar se realizó un análisis descriptivo de los datos empleando el método $(2^{(-\Delta\Delta Ct)})$ y las respectivas gráficas. El primer análisis que se desarrolló estuvo dirigido a la caracterización de cada cepa (Cali-S y Cali-MIB) por separado, mediante la descripción del comportamiento de los niveles de expresión de cada uno de los 12 genes entre los tratamientos evaluados: sangre y sangre+virus (Figura 10), con el

fin de observar si la expresión de los genes variaba en relación al tratamiento evaluado.

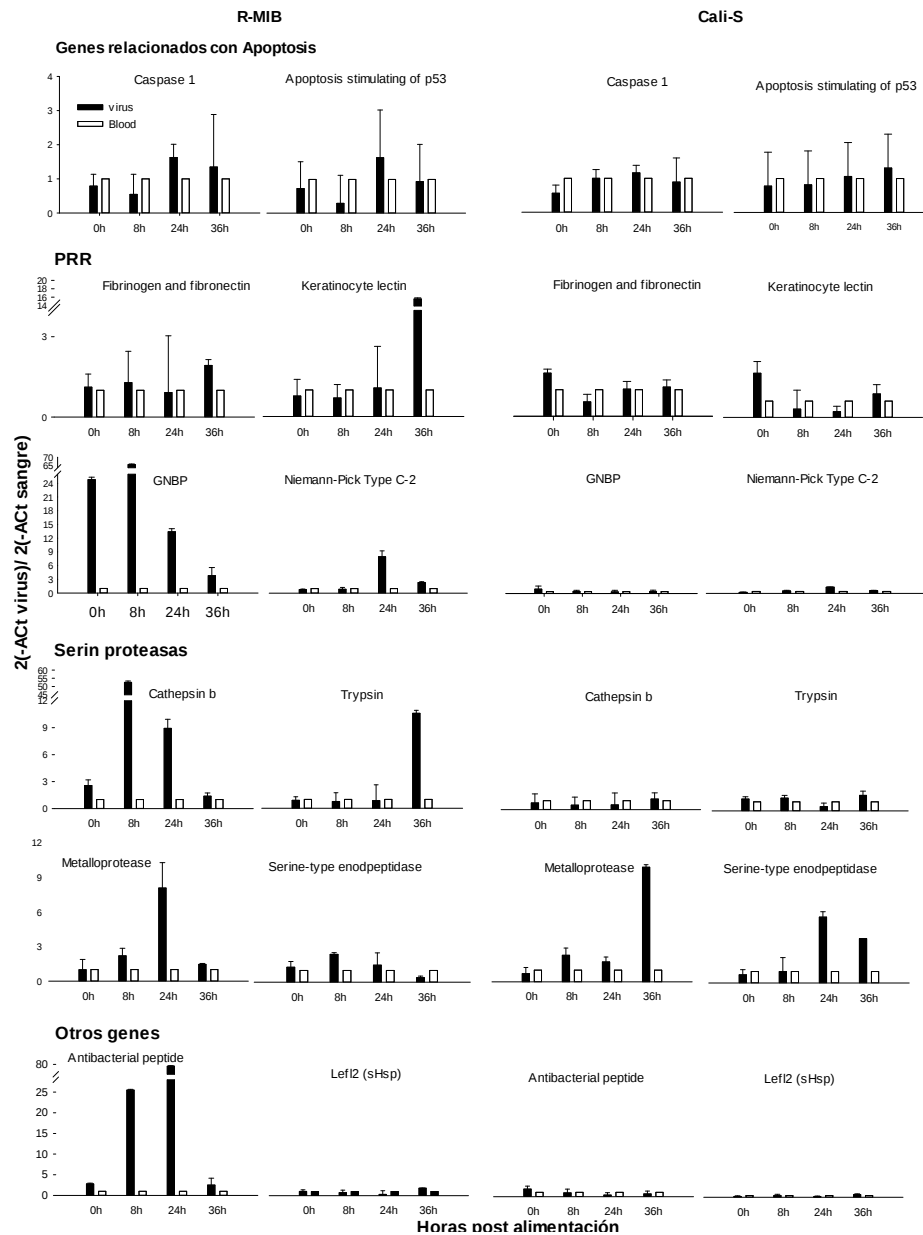


Figura 10. Expresión relativa de los receptores de patrones de reconocimiento (RPR), serin proteasas y otros genes en los intestinos de mosquitos *Ae. aegypti* de las cepas Cali-MIB y Cali-S a diferentes tiempos post-alimentación con sangre (barras blancas) o sangre con vDen-2 (barras negras). Todos los genes fueron normalizados usando el gen constitutivo *b-actina*. Los datos fueron analizados usando la ecuación $2^{(-\Delta\Delta Ct)} \pm SD$.

Los datos permiten observar mayor variabilidad en la expresión relativa de los genes *Keratinocyte lectin* (AAEL009842), *Cathepsin-b* (AAEL007585), *Trypsin* (AAEL013703), *Niemann Pick Type C2-* (AAEL015156), *GNBP* (AAEL009176) y

Antibacterial peptide (AAEL000598), entre los tiempos evaluados en la Cepa Cali-MIB comparado con la cepa Cali-S (Figura 10). En contraste, el gen *Serin type endopeptidase* presenta expresión diferencial entre los tiempos en la Cepa Cali-S con respecto a la cepa Cali-MIB. No se evidencian diferencias en la expresión de los genes: *Capase 1* (AAEL014348), *Apoptosis stimulating of p53-* (AAEL013338) y *Lethal (2) essential for life (l2efl)* (AAEL013338), Metalloproteinase (AAEL014516), *Fibrinogen and fibronectin* (AAEL006702). En resumen, la cepa Cali-MIB mostró un mayor número (n=6) de genes que se caracterizaron por tener diferencias estadísticamente significativas en el perfil temporal de expresión génica, en comparación a la cepa Cali-S (n=1).

El siguiente paso incluyó la confirmación de los resultados obtenidos con los microarreglos en los que se compara la expresión transcripcional en la cepa Cali-MIB con respecto a la de la cepa Cali-S después de los tratamientos con sangre o sangre con virus, a través del análisis homólogo con los resultados obtenidos en los ensayos de qPCR (Figuras 11 y 12). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante un modelo de regresión múltiple para comprobar si las diferencias observadas mediante el modelo $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, eran estadísticamente significativas (Tabla 5).

Tabla 5. Modelo de regresión múltiple para el análisis de la expresión de los genes *Keratinocyte lectin*, *Cathepsin-b*, *Niemann Pick Type C2*, *Trypsin*, *Antibacterial peptide*, *Fibrinogen and fibronectin*, *GNBP* y *Serin type endopeptidase* entre las cepas Cali-S y Cali-MIB.

		<i>Keratinocyte lectin</i>		<i>Cathepsin-b</i>		<i>Niemann Pick Type C2</i>		<i>Trypsin</i>		<i>Antibacterial peptide</i>		<i>Fibrinogen and fibronectin</i>		<i>GNBP</i>		<i>Serin type endopeptidase</i>	
		Razón de expresión		Razón de expresión		Razón de expresión		Razón de expresión		Razón de expresión		Razón de expresión		Razón de expresión		Razón de expresión	
		(IC 95%)	P valor	(IC 95%)	P valor	(IC 95%)	P valor	(IC 95%)	P valor	(IC 95%)	P valor	(IC 95%)	P valor	(IC 95%)	P valor	(IC 95%)	P valor
Horas post-alimentación con s+v	0 ^a	1		1		1		1		1		1		1		1	
	8	-1,1 -2,1-0,1	0,027	-4,6 -5,2-4,1	0,000	-0,21 -0,1-0,5	0,557	-1,9 -2,7-1,2	0,000	0,2 -0,8-1,2	0,703	-1,1 -2,1-0,2	0,025	-1,5 -2,8-0,1	0,042	-6,6 -7,7-5,5	0,000
	24	-0,6 -1,6-0,3	0,177	-5,5 -6,1-5,0	0,000	-3,3 -4,2-2,5	0,000	1,42 0,7-2,2	0,001	-1,3 -2,3-0,2	0,019	-3,0 -4,1-1,9	0,000	-2,4 -3,8-1,0	0,002	-7,1 -8,4-5,8	0,000
	36	-4,1 -5,0-3,1	0,000	-3,64 -4,2-3,1	0,000	-2,4 -3,3-1,6	0,000	2,01 1,2-2,8	0,000	-2,6 -3,6-1,5	0,000	-3,3 -4,4-2,2	0,000	-3,4 -4,8-2,0	0,000	-5,4 -6,7-4,1	0,000
	Entre cepas (Cali-MIB y Cali-S)	-1,02 -1,9-0,1	0,036	-7,74 -1,2-0,2	0,010	0,7 -0,8-1,4	0,077	-1,9 -2,7-1,0	0,000	0,49 -0,5-1,5	0,332	-0,4 -1,4-0,5	0,359	0,2 -1,2-1,6	0,804	0,76 -0,4-1,9	0,167
Entre cepas (Cali-MIB y Cali-S) y tiempo	0	1		1		1		1		1		1		1		1	
	8	0,10 -1,2-1,4	0,872	3,8 3,0-4,5	0,000	-0,54 -1,6-0,5	0,294	-1,14 -2,2-0,1	0,037	-1,69 -3,6-0,2	0,027	0,37 -0,9-1,7	0,567	-1,17 -3,1-0,8	0,227	0,5 -1,0-2,12	0,477
	24	-1,23 -2,5-0,1	0,069	3,9 3,1-4,7	0,000	1,2 0,06-2,5	0,041	0,08 -1,1-1,3	0,874	-0,03 -1,5-1,4	0,966	0,3 -1,2-1,8	0,639	-0,28 -2,2-1,7	0,770	-1,02 -2,8-0,7	0,236
	36	0,1 -1,2-1,4	0,884	0,43 -0,3-1,2	0,251	1,2 -0,03-2,4	0,056	2,4 1,2-3,6	0,001	2,5 1,0-3,9	0,002	0,03 -1,5-1,5	0,996	1,5 -4,2-3,5	0,114	-1,5 -3,3-0,2	0,078

En la comparación entre las cepas Cali-MIB Vs. Cali-S no se evidenciaron diferencias en la expresión temporal de los 12 genes evaluados después del tratamiento con sangre entre las cepas (Figura 11). Para el tratamiento de sangre

infectada con virus, el modelo de regresión múltiple, permitió evidenciar diferencias estadísticamente significativas entre las cepas en la expresión de tres genes: *Keratinocyte lectin-AAEL009842* (Razón=1,02, IC_(95%): -1,9-0,07, p=0,036), *Cathepsin-b* (Razón=-,74, IC_(95%):-1,2-0,2, p=0,010) y *Trypsin* (Razón=-1,9, IC_(95%):-2,7-1,0, p=0,000) (Tabla 5). Sin embargo, cuando los tiempos fueron analizados de manera independiente entre las cepas, se observaron diferencias significativas en otros genes (*Antimicrobial peptide*, *Niemann Pick Type C2*, *GNBP*, *Fibrinogen and fibronectin* y *Serin type endopeptidase*) incluidos los genes descritos anteriormente (Tabla 5).

Cuando se analizaron las posibles interacciones entre los tiempos evaluados con respecto al tiempo cero (tiempo base) entre las cepas, se observó que los genes *Cathepsin-b*, *Trypsin*, *Niemann Pick Type C2*, *Antibacterial peptide* y *Trypsin* presentaban diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión entre los tiempos evaluados con respecto al tiempo cero (Figura12, Tabla 5).

En la tabla 6, se representa la comparación de la expresión génica obtenida en los microarreglos (30 h.p.i) y los análisis por qPCR (24 y 36 h.p.i), donde se observa que los genes *Caspase-1*, *GNBP*, y *Trypsin*, que tenían una expresión bajo regulada a las 30h.p.i en los microarreglos, presentaron un cambio en la expresión a las 36h.p.i pasando a estar sobre regulados, probablemente como respuesta anti vDEN tardía. En contraste, el gen *Cathepsin-b*, que se encontraba bajo regulado a las 30h.p.i, presenta una activación temprana ante la infección por el virus (8 y 24h.p.i). Los genes *Niemann Type C-2*, *Metalloproteinase*, *Keratinocyte lectin*, *Fibrinogen and fibronectin* y *Serin type endopeptidase*, mantienen la expresión génica constante durante el lapso evaluado (0, 8, 24 y 36h.p.i) comparado con la expresión observada en los microarreglos.

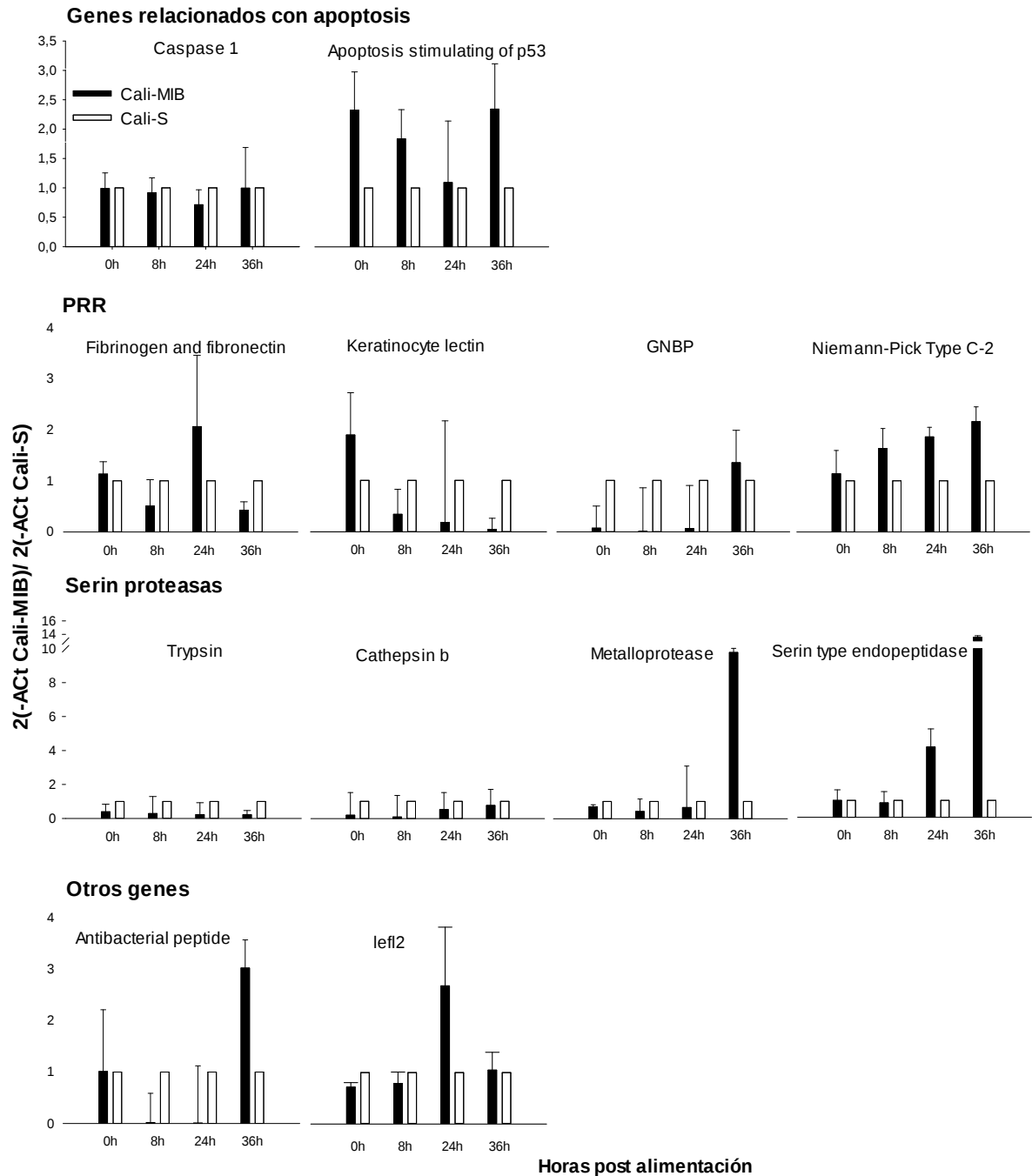


Figura 11. Expresión génica de Receptores de patrones de reconocimiento (RPR), serin proteasas y otros genes en los intestinos de mosquitos *Ae. aegypti* de la cepa Cali-BIM (barras negras) vs. la cepa Cali-S (barras blancas) a diferentes tiempos post-alimentación con **sangre**. La expresión relativa fue medida usando PCR en tiempo real (qPCR). Todos los genes fueron normalizados usando el gen constitutivo *β-actina*. Los datos fueron analizados usando la ecuación $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$.

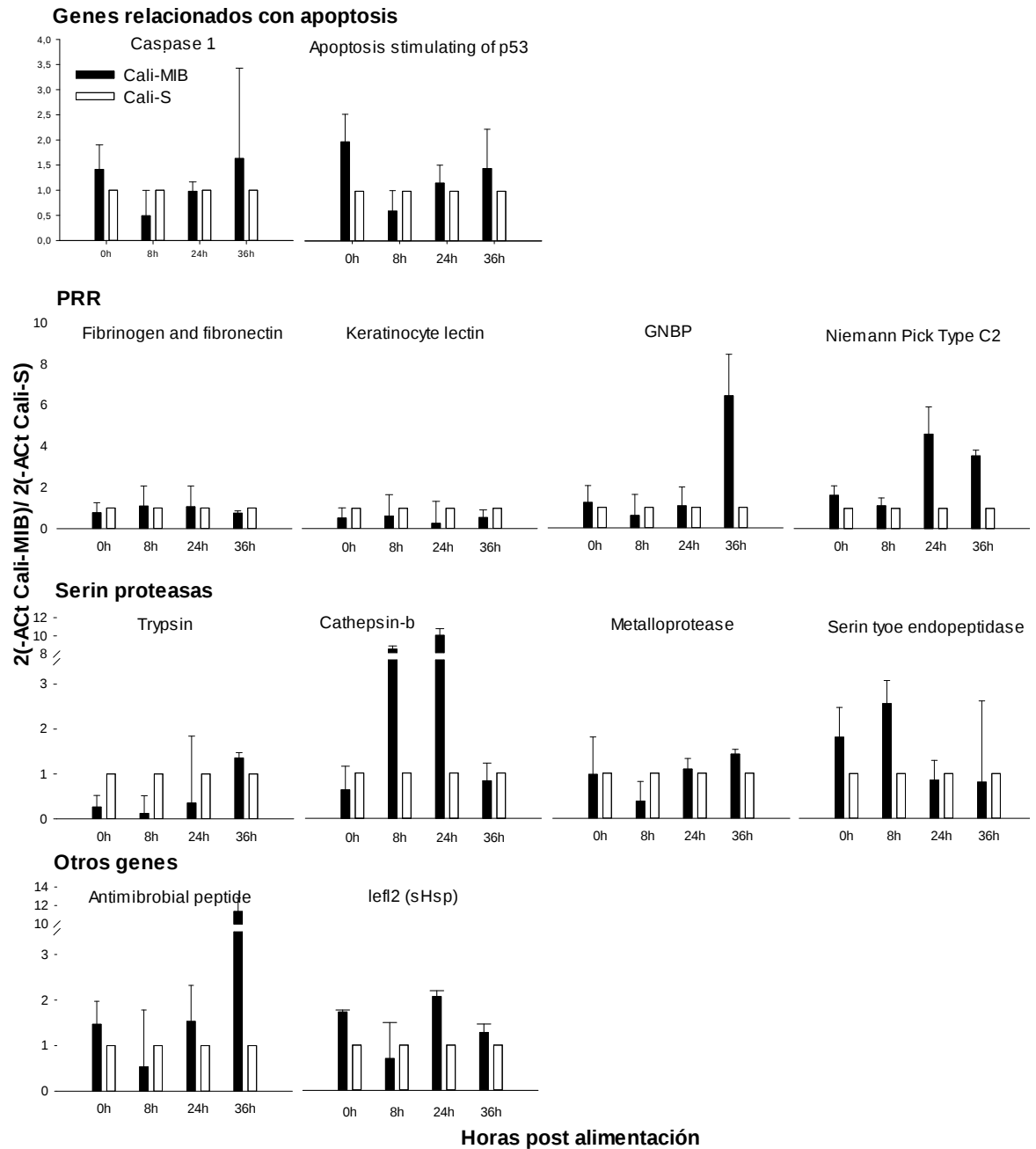


Figura 12. Expresión génica de Receptores de patrones de Reconocimiento (PRR), serin proteasas y otros genes en los intestinos de mosquitos *Ae. aegypti* de la cepa Cali-BIM (barras negras) vs la cepa Cali-S (barras blancas) a diferentes tiempos post-alimentación con **sangre infectada con vDen-2**. Todos los genes fueron normalizados usando el gen constitutivo β -actina. Los datos fueron analizados usando la ecuación $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SD$.

Tabla 6. Comparación entre los resultados obtenidos en los microarreglos y los ensayos por qPCR de los 12 genes asociados a la respuesta de *Ae. aegypti* a la infección por vDen-2.

Gene		Grupo Funcional	Estado de expresión del gen (sobre/bajo-regulado)		
			qPCR	Microarrays	qPCR
			24 h.p.i	30 h.p.i	36 h.p.i
Genes relacionados con apoptosis					
<i>Caspase-1</i>	AAEL014348	I	Bajo	Bajo	Sobre
<i>Apoptosis stimulating of P53</i>	AAEL013338	D	Sobre	Bajo	Sobre
PRR					
<i>Niemann Pick Type C2</i>	AAEL015136	I	Sobre	Sobre	Sobre
<i>Gram-negative bacteria binding protein</i>	AAEL009176	I	Bajo	Bajo	Sobre
<i>Galectin</i>	AAEL009842	I	Bajo	Bajo	Bajo
<i>Fibrinogen and fibronectin</i>	AAEL006702	I	Bajo	Bajo	Bajo
Serin Proteasas					
<i>Cathepsin b</i>	AAEL007585	I	Sobre	Bajo	Bajo
<i>Trypsin</i>	AAEL013703	DIG	Bajo	Bajo	Sobre
<i>Metalloproteinase, putative</i>	AAEL014516	PROT	Sobre	Sobre	Sobre
<i>Serine-type endopeptidase</i>	AAEL001674	PROT	Bajo	Bajo	Bajo
Otros genes					
<i>Cecropin (AMP)</i>	AAEL000598	I	Sobre	Bajo	Sobre
<i>Lethal (2)essential for life, l2efl</i>	AAEL011277	I	Sobre	Bajo	Sobre

I: inmunidad, D: Diverso, DIG: digestivo, PROT: proteólisis.

Finalmente, basados en los diferentes análisis de los datos de los microarreglos, la comprobación de los mismos mediante qPCR y reportes bibliográficos, seleccionamos 4 genes *Niemann Pick Type C2*, *Keratinocyte lectin*, *Cathepsin-b* y *GNBP*, los cuales presentaron un patrón de expresión diferencial en la cepa Cali-MIB comparado con la cepa Cali-S. Esto con el fin para probar si cumplen una función en el proceso de eliminación del vDEN-2, mediante ensayos de silenciamiento génico empleando la técnica de RNA de interferencia.

CAPÍTULO 4. Evaluación funcional de los genes *Cathepsin-b*, *Gram negative bacteria binding protein*, *Niemann Pick Type C2*, y *Keratinocyte lectin* ante la infección por virus DEN-2 en las cepas Cali-MIB, Cali-S y Rockefeller de *Ae. aegypti*.

Materiales y métodos

Silenciamiento de genes mediante RNA de interferencia (RNAi).

Una vez identificados los 4 genes de interés: *Cathepsin-b*, *Gram-negative bacteria binding protein*, *Niemann Pick Type C2*, y *Keratinocyte lectin*, se evaluó la función en el proceso de infección del vDEN-2 a través de su silenciamiento mediante la técnica de RNA de interferencia en las cepas Cali-S, Cali-BIM y Rockefeller (cepa de *Ae. aegypti* de referencia). El efecto del silenciamiento se determinó observando el cambio que cada uno de estos genes produce en la susceptibilidad o refractariedad al vDEN-2 en los mosquitos. En primer lugar, se elaboró el RNA doble cadena (dsRNA-*double strand RNA*), luego se realizó la microinyección en los mosquitos para obtener el silenciamiento de los genes, posteriormente se retaron a la infección con vDEN-2 y finalmente se determinó la variación en el fenotipo de los mosquitos de las tres cepas, mediante Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Generación de dsRNA y microinyección de mosquitos.

Para la obtención del dsRNA inicialmente se generaron secuencias de DNA molde de 400 a 500 pares de bases (pb) aproximadamente para cada gen de interés siguiendo las siguientes condiciones de PCR en volumen de reacción final de 24,1uL que contuvo: Taq DNA polimerasa (Invitrogen), mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) 5mM, MgCl₂ 50mM, PCR Buffer 10X sin Mg, los respectivos primers para cada gen de interés y DNA. Para verificar el producto de PCR se corrió un gel de agarosa al 2% y se purificó siguiendo el protocolo del QIAquick gel extraction de Qiagen®. Este producto de ADN de ~400 a 500pb, se verificó mediante secuenciación y se empleó para generar dsRNA mediante la unión de un sitio promotor T7 en cada hebra. Los primers para amplificar el DNA molde de 400 a 500pb se diseñaron tomando como referencia uno de los primers (forward o reverse) ya diseñados para los ensayos de qPCR y se diseñaron los pares correspondientes para obtener el fragmento de mayor tamaño (Tabla 7).

Tabla 7. Primers para generar dsRNA

Gene	Ensemble ID	Primer
<i>Gram Negative Binding Protein</i>	AAEL009176	F: CCGTCCTACATTGGTTGCTGAC R: GGTACAAATGGAAGCCGTTGTTG
<i>Cathepsin-b</i>	AAEL007585	F: CAAAGCACTCCCTTCCATC R: CACGAGCGTCGAATGTATC
<i>Keratinocyte lectin</i>	AAEL009842	F: CGTTGCGGACTACGAATAC R: GGTTACATGGAAATGTGCTTAC
<i>Niemann Pick Type C2, putative</i>	AAEL009556	F: GCACTCGTCCCAGCTGTAATG R: CACTGACCAGCGGATAGATGG

Para la producción del dsRNA se usó 1ug de DNA molde a través de un proceso *in vitro* a 37°C siguiendo el protocolo descrito para el kit MEGAscript RNAi, Ambion®.

Posteriormente, El DNA molde y el RNA de cadena sencilla sobrante de esta reacción fue tratado con DNase I (invitrogen®) y RNase (invitrogen®) para degradarlos. El dsRNA fue purificado por centrifugación a través de un sistema de absorción de fase sólida y posteriormente fue diluido en 100µl de 10mM Tris-HCl pH 7, 1mM EDTA. El dsRNA fue cuantificado por espectrofotometría y verificada su integridad y eficiencia de reacción en un gel de agarosa al 1%. Finalmente, se precipitó el dsRNA con etanol y acetato de amonio y se resuspendió en 10mM Tris-HCl pH 7y 1mM EDTA para llegar a una concentración final de 2µg/mL.

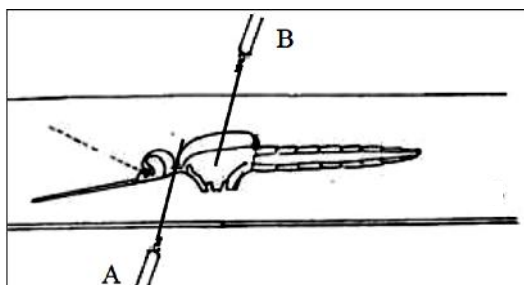
Para el silenciamiento génico se microinyectaron 100ng del dsRNA por insecto mediante un micromanipulador, en total se emplearon alrededor de 200 mosquitos/gen/ensayo. Como grupo control se tuvieron insectos retados con los virus sin silenciar, mosquitos microinyectados con agua y mosquitos microinyectados con el gen *Nautilus*, un regulador de miogénesis en *Drosophila melanogaster*. El porcentaje de reducción de la expresión génica fue realizado por qPCR a las 48h después de microinyectados los mosquitos en un grupo de 5 individuos. Después de 24 horas de la microinyección, los mosquitos fueron retados con el vDEN-2 vía oral. Una vez transcurrido el período de incubación del virus en el mosquito (10 a 14 días), se realizó la prueba de inmunofluorescencia (IFI) para medir la CV y determinar la variación en el fenotipo de las cepas Cali-MIB, Cali-S y Rockefeller.

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

La evaluación de la CV en mosquitos de las cepas de *Ae. aegypti* mediante IFI, permitió determinar la susceptibilidad o refractariedad de estos a la infección, replicación y transmisión del vDEN-2, mediante la determinación de las barreras anatómicas a la infección del virus y por lo tanto la determinación del fenotipo de los mosquitos. Pasados 14 días post-infección, las hembras de *Ae. aegypti* infectadas se sacrificaron por congelación, y se realizó la disección de la cabeza de cada una de ellas como se describe a continuación.

a) Disección de cabeza de hembras de Ae. aegypti infectadas:

Las disecciones de cabeza se llevaron a cabo sobre una superficie fría en una lámina portaobjetos (Figura 13) con la ayuda de un estereoscopio. Con una aguja entomológica, se sostuvo el cuerpo del mosquito desde el tórax (Figura 13, B) y con la otra se hizo un corte en la parte superior del tórax del mosquito (Figura 13, A) para extraer la cabeza, asegurándose de tomar las glándulas salivares; simultáneamente, en otra superficie fría se colocaron ordenadamente las cabezas diseccionadas sobre otra lámina portaobjetos, esto con el fin de mantener el virus, si lo había.



Mendoza, NM et al., 2000.

Figura 13. Disección de cabezas de hembras de *Aedes aegypti*.

Al mismo tiempo en el que se llevó a cabo la disección, se llevó un registro de cada placa en el formato establecido para la IFI (Anexo 1). Por cada placa se colocaron 6 muestras y 2 controles, uno positivo para vDEN-2 (mosquito de la cepa Rockefeller microinyectado con vDEN-2) y otro negativo (mosquito de la cepa Rockefeller sin infectar).

Los abdómenes de las hembras diseccionadas se guardaron en tubos eppendorf marcados con el número de la hembra, el nombre de la cepa y la fecha de infección. Los tubos se colocaron dentro de una materia con hielo mientras se terminó todo el proceso de disección para evitar la muerte del virus. Posteriormente, los tubos eppendorf se guardaron a -45°C para posteriores análisis.

Cuando la lámina se completó, se colocó una lámina cubreobjetos sobre las cabezas y se aplastaron para extender el tejido y permitir una buena lectura de la IFI. Se levantó el cubreobjetos y se removieron cuidadosamente los restos de tejido. La placa, se colocó en un recipiente para coloración con solución de acetona:PBS (3:1) por treinta minutos a 4°C para fijar los tejidos. Luego de la fijación, las láminas se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se delimitó el área de la muestra utilizando un marcador metálico que permite crear bordes alrededor de la muestra (pozo), esto con el fin de que no se derramara el anticuerpo cuando se realizara la IFI.

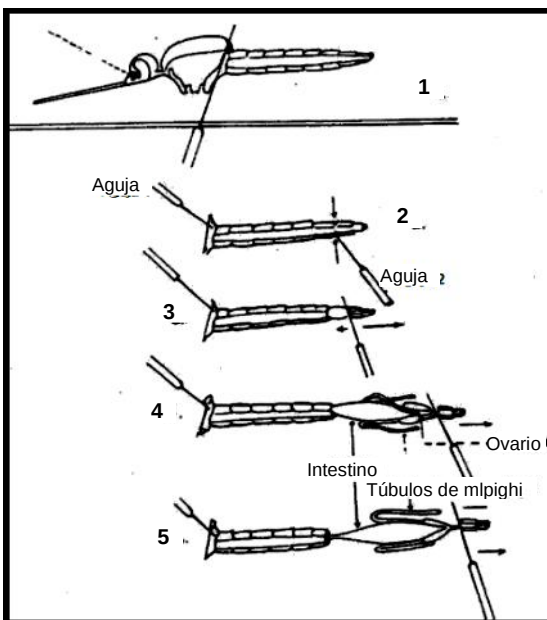
Se empleó un anticuerpo monoclonal contra el serotipo 2 del vDEN, suministrado por el CDC y el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína FITC ambos en una dilución con PBS estéril 1:200. Se adecuó una cámara húmeda para colocar las láminas y en cada pozo delimitado, se adicionó el anticuerpo hasta cubrirlos totalmente (aproximadamente 40uL/pozo). Las placas se incubaron a 37°C por 40 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se colocaron las placas en un recipiente para coloración y se realizaron 3 lavados. Los dos primeros lavados con PBS estéril y el último con agua destilada; cada uno por un minuto. Posteriormente se adicionó el fluorocromo en los pozos y se incubó nuevamente a 37°C por 40 minutos. Una vez terminó la incubación, se secaron las placas y se adicionó en cada pozo una gota de glicerina tamponada al 90%, finalmente se cubrió con una lámina cubreobjetos y se realizó la lectura en el microscopio para IFI.

A las hembras que presentaron IFI de cabeza negativo, se les diseccionó el intestino para realizar análisis mediante IFI y determinar las barreras anatómicas asociadas a la infección del virus, lo cual indicó la refractariedad o susceptibilidad de los mosquitos.

b. Disección de intestinos de hembras de *Aedes aegypti* con IFI negativo de cabeza.

La disección de los intestinos de los mosquitos se realizó como se muestra en la figura 14. Se tomaron los abdómenes de los mosquitos guardados a -45°C , y se colocaron en una materia con hielo para evitar la degradación de las proteínas virales, si lo hubiese. Individualmente, se colocó el cuerpo del mosquito sobre una lámina portaobjetos, ubicada sobre una superficie fría. Observando a través del estereoscopio, se procedió a realizar la extracción de los intestinos.

Con la aguja número 1 (Figura 14) se presionó suavemente entre el tórax y la parte superior del abdomen y con la aguja número 2 se desprendieron los últimos segmentos abdominales; se estiró suavemente el intestino y se empujó el contenido pasando la aguja número 2 por el abdomen desde arriba hacia abajo.



Mendoza, NM *et al.*, 2000.

Figura 14. Disección de intestinos de *Ae. aegypti*.

Una vez se tuvo el intestino; se retiraron los túbulos de Malpighi y el intestino se colocó en una gota de PBS sobre la placa donde se realizó posteriormente la IFI. Cuando se obtuvieron todos los intestinos a evaluar en la lámina, se realizó el mismo

procedimiento que se utilizó con las cabezas de los mosquitos para llevar a cabo su análisis mediante IFI.

c. **Determinación de fenotipos susceptibles y/o refractarios**

Con las placas procesadas anteriormente, se procedió a determinar el fenotipo de las hembras infectadas mediante los análisis de IFI. Si los resultados de *IFI de cabeza* eran positivos, esta lectura indicó la presencia de infección por el vDEN-2, por lo que la hembra se clasificó como *fenotipo susceptible* (Figura 15). Si el resultado de IFI de cabeza era negativo, se procedía a realizar la disección de intestino con el fin de evaluar la presencia de las barreras a la infección. Si la IFI de intestino era positiva indicaba la presencia de una Barrera de Escape de Intestino Medio (BEM), entonces las hembras se clasificaron como *fenotipo refractario con BEM*, pero si la IFI era negativa estos resultados indicaban la presencia de una barrera de Infección de Intestino Medio (BIM), por lo tanto estas hembras se clasificarán como *fenotipo refractario* (Figura 15).

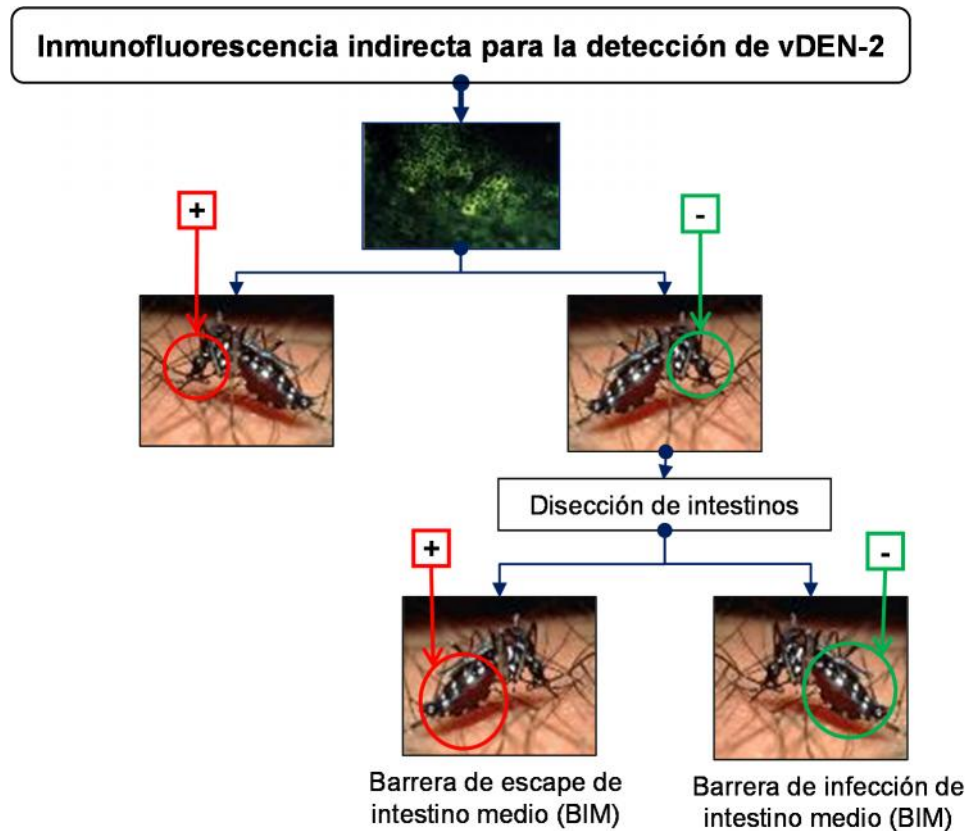


Figura 15. Evaluación de las barreras a la infección por vDEN-2 en *Aedes aegypti*.

Resultados

Evaluación del silenciamiento génico en las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller

La tecnología de silenciamiento génico mediante RNAi es útil para la exploración del papel funcional de los genes seleccionados sobre el proceso de infección viral en los mosquitos. Aunque el método de silenciamiento génico no suprime totalmente la expresión del producto blanco, si resulta en una sub-expresión significativa y útil para predecir su papel funcional asociado. Para el silenciamiento de los genes se obtuvo primero el dsRNA y posteriormente se realizó la microinyección de los mosquitos.

Es importante resaltar que inicialmente se realizaron cuatro ensayos de silenciamiento para los cuatro genes en las cepas Cali-S y Cali-MIB, sin embargo, se presentaron varios inconvenientes con los mosquitos en las colonias (presencia de hormigas, decaída en las poblaciones de mosquitos, falta de apetito por parte de los mosquitos) que impidieron en un principio obtener un número significativo de mosquitos silenciados y a su vez alimentados artificialmente con sangre infectada con vDEN-2. Sin embargo se lograron obtener resultados preliminares para los genes *Cathepsin-b* y *Niemann Pick Type C2* (datos no mostrados), que mostraban un cambio en el fenotipo de las cepas. Estos hechos conllevaron a que se tomara la decisión de realizar los análisis funcionales en una cepa de referencia como es la Rockefeller la cual es 97% susceptible a la infección por vDEN-2, y de paso probar que la función de los genes era extrapolable a otras poblaciones diferentes a las seleccionadas en nuestro laboratorio. Finalmente una vez terminados los ensayos en la cepa Rockefeller, se logró llevar a cabo a cabalidad el análisis funcional de los cuatro genes en las cepas Cali-S y Cali-MIB.

Aunque se seleccionaron 4 genes para los ensayos funcionales, la síntesis de dsRNA se realizó para todos los genes, excepto para el gen *Metalloproteínase* debido a que no fue posible obtener primers adecuados para la amplificación de un fragmento de 400 a 500pb. El dsRNA fue cuantificado por espectrofotometría y verificada su integridad y eficiencia de reacción en un gel de agarosa al 1%. La evaluación de la eficiencia del silenciamiento génico de los cuatro genes seleccionados, se llevó a cabo en mosquitos de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller. Para este procedimiento se inyectaron 100ng/0,1µL del dsRNA en el cuello de los insectos utilizando un micromanipulador. Para los genes que se encontraron bajo regulados (*Keratinocyte lectin*, *GNBP* y *Cathepsin*) en el microarreglo, el ensayo por RNAi, se realizó en mosquitos de la cepa Cali-S, mientras que para los genes que estaban sobre regulados (*Niemann Pick Type C2*) se realizaron en la cepa Cali-MIB; en la cepa Rockefeller (cepa de referencia) se evaluaron los 4 genes. El porcentaje de reducción de la expresión de los genes (silenciamiento) en el intestino medio fue analizado por qPCR a las 48h después de microinyectado (Figura 16).

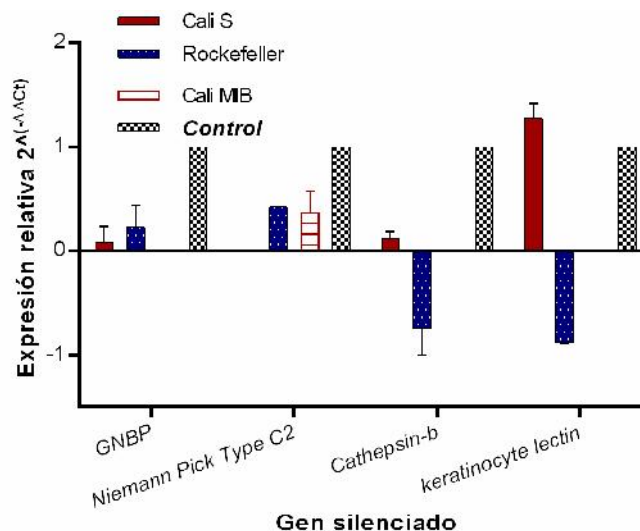


Figura 16. Evaluación del silenciamiento de los genes *GNBP*, *Niemann Type C2*, *Cathepsin-b* y *Keratinocyte lectin*, durante los ensayos de silenciamiento génico (RNAi) en las cepas Cali S, Cali MIB y Rockefeller, 48h.p.i. La expresión para cada gen se comparó con un grupo control de mosquitos microinyectados con el gen *Nautilus*, los niveles de expresión para este grupo de mosquitos se establecieron arbitrariamente a 1 (línea continua). La expresión relativa fue medida usando qPCR. Todos los genes fueron normalizados usando el gen constitutivo β -actina. Los datos fueron analizados usando la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_T} \pm SD$.

El análisis mediante el modelo $2^{-\Delta\Delta C_T}$, permitió corroborar el silenciamiento de los cuatro genes de interés (Figura 16), aunque el gen *Keratinocyte lectin* presenta un cambio en la expresión superior a 1 (1,27), este cambio no es significativo con respecto a la expresión del gen sin silenciar (Figura 10).

Evaluación funcional de los genes Cathepsin-b, Gram-negative bacteria binding protein, Niemann Pick Type C2, y Keratinocyte lectin en el proceso de infección del vDEN-2 en los mosquitos de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller.

Una vez que se probó que el silenciamiento genético funcionara en los mosquitos, se procedió a realizar la evaluación del silenciamiento génico de los 4 genes de interés y determinar su papel en el proceso de infección por el vDEN-2. Nuevamente se inyectaron 100ng/0,1μL del dsRNA de cada gen en los mosquitos (n=~200) y después de 24 horas de la microinyección los mosquitos fueron retados con el vDEN-2 vía oral a través de la alimentación artificial utilizando alimentadores de vidrio (proceso descrito anteriormente). Como grupo control se emplearon mosquitos de las tres cepas microinyectados con el gen *Nautilus* retados con el virus. Una vez transcurrido el periodo de incubación del virus en el mosquito (10-14 días), se evaluó el porcentaje de CV y se determinó el efecto del silenciamiento en el fenotipo de los mosquitos de las tres cepas evaluadas. Con este procedimiento evaluamos el rol de los 4 genes en la infección por vDEN.

En resumen, observamos que el silenciamiento de genes que se encontraban bajo regulados en la cepa Cali-MIB en el microarreglo: *GNBP*, *Cathepsin-b* y *Keratinocyte lectin*, disminuyó significativamente el porcentaje de la CV a la infección por vDEN-2 de los mosquitos que fueron silenciados en la cepa Cali-S, de 100% (*Nautilus*-control) a 8 ($\chi^2=44,5$, $p<0,001$), 20 ($\chi^2=44,9$, $p<0,001$) y 12% ($\chi^2=50,8$, $p<0,001$), respectivamente (Tabla 8), es decir cambió el fenotipo susceptible a refractario de los mosquitos, El silenciamiento del gen sobre regulado, *Niemann Pick Type C2* en la cepa Cali-MIB en el microarreglo, incrementó el porcentaje de la CV a la infección por vDEN-2, de la cepa Cali-MIB de 35,3% (*Nautilus*-control) a 66% ($\chi^2= 7,6$, $p<0,05$), y por ende el cambio del fenotipo refractario a susceptible (Tabla 8, figura 17).

Aunque inicialmente se había planteado realizar el silenciamiento de los genes sobre regulados en la cepa Cali-MIB y los bajo regulados en la cepa Cali-S, se decidió realizar el silenciamiento del gen *Niemann Pick Type C2* (sobre regulado) en las cepas Rockefeller y Cali-S, esto con el fin de observar si el comportamiento observado en la cepa Cali-MIB variaba. Los resultados obtenidos muestran una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de la CV de los mosquitos a la infección por el virus. En la cepa Rockefeller disminuyó de 88,46 (*Nautilus*) a 31,42% ($\chi^2=16,6$, $p<0,001$) y en la cepa Cali-S de 100% a 44,4% ($\chi^2= 20,7$, $p<0,001$)

Tabla 8. Evaluación de silenciamiento génico en mosquitos en las cepas Cali-S y Cali-MIB.

Gen evaluado	Estado del gen en microarreglo	Cepa	mosquitos infectados (n)	IFI cabeza (n)	IFI intestino (n)	% S	%MIB	%MEB
<i>Nautilus</i>	Control	Cali-MIB	34	+ (12) - (22)	+ (3) - (19)	35,3	8,8	56
<i>Niemann Pick Type C2</i>	Sobre regulado	Cali-MIB	50	+ (33) - (17)	+ (9) - (8)	66,0	18,0	16,0
<i>Nautilus</i>	Control	Cali-S	27	+ (27) - (0)	+ (27) - (0)	100	0,0	0,0
<i>Cathepsin-b</i>	Bajo regulado	Cali-S	50	+ (10) - (40)	+ (10) - (30)	20,0	20,0	60,0
<i>GNBP</i>	Bajo regulado	Cali-S	25	+ (2) - (23)	+ (12) - (11)	8,0	48,0	44,0
<i>Keratinocyte lectin</i>	Bajo regulado	Cali-S	55	+ (7) - (41)	+ (12) - (29)	12,7	34,5	52,7
<i>Niemann Pick Type C2</i>	Sobre regulado	Cali-S	27	+ (12) - 15	+ (6) - 9	44,4	22,2	33,3
<i>Nautilus</i>	Control	Rockefeller	26	+ (23) - (3)	+ (2) - (1)	88,46	3,8	7,74
<i>Niemann Pick Type C2</i>	Sobre regulado	Rockefeller	35	+ (11) - (24)	+ (7) - (17)	31,42	48,6	19,98
<i>Cathepsin-b</i>	Bajo regulado	Rockefeller	83	+ (10) - (73)	+ (15) - (58)	12,04	70	17,96
<i>GNBP</i>	Bajo regulado	Rockefeller	31	+ (4) - (27)	+ (11) - (26)	13	51,6	35,4
<i>Keratinocyte lectin</i>	Bajo regulado	Rockefeller	45	+ (6) - (39)	+ (16) - (23)	13,3	51,1	35,6

IFI: inmunofluorescencia, % S: porcentaje de mosquitos susceptibles a la infección con vDEN-2, % MIB (*Midgut Infection Barrier*): porcentaje de mosquitos con Barrera de Infección en intestino, % MEB (*Midgut Escape Barrier*): porcentaje de mosquitos con Barrera de Escape en intestino.

La cepa Rockefeller presentó un comportamiento similar al de la cepa Cali-S (Figura 17), donde se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de la CV en los mosquitos silenciados con *Cathepsin-b*-12% ($\chi^2=54,7$, $p<0,001$), *GNBP*-13% ($\chi^2=32,3$, $p<0,001$) y *Keratinocyte lectin*-13,3% ($\chi^2=38,4$, $p<0,001$), comparado con el porcentaje de la CV en los mosquitos silenciados con el gen Nautilus 88,46% (control).

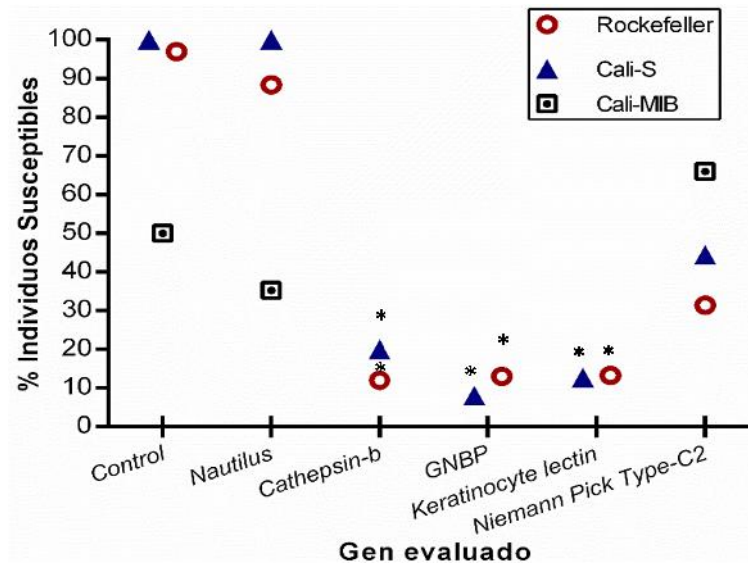


Figura 17. Efecto del silenciamiento de los genes *Keratinocyte lectin*, *GNBP*, *Cathepsin-b*, *Niemann Pick Type C2* y *Nautilus* en la susceptibilidad de los mosquitos de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller a la infección por el vDEN-2. La susceptibilidad a la infección por el vDEN se mide mediante IFI para obtener porcentajes de individuos positivos o negativos a la infección.

Los resultados en general demuestran la intervención de estos genes de manera individual en el proceso de eliminación del vDEN en los mosquitos, representado en el cambio del fenotipo de los mosquitos de susceptible a refractario (*GNBP*, *Cathepsin-b* y *Keratinocyte lectin*) o en la disminución o incremento de la capacidad de los mosquitos de eliminar el virus (refractariedad) como es el caso del gen *Niemann*.

CAPÍTULO 5. Discusión y Conclusiones Generales.

DISCUSIÓN

La comprensión de los eventos celulares y moleculares involucrados en la relación vDEN-Ae. *aegypti*, requiere el desarrollo de estudios que permitan elucidar las moléculas y/o mecanismos implicados en el proceso de infección por parte del virus en el vector. En este estudio, realizamos un análisis comparativo global de la expresión génica en dos cepas de Ae. *aegypti* que presentan diferente susceptibilidad a la infección por el vDEN-2 (Cali-S y Cali-MIB), estas cepas han sido seleccionadas en laboratorio a partir de mosquitos colectados en campo (16).

El uso de microarreglos permitió observar la expresión de 3804 genes en ambas cepas en los 3 tratamientos evaluados (azúcar, sangre y sangre+virus), los cuales estaban distribuidos entre diferentes grupos funcionales, que incluían: metabolismo, inmunidad, proteólisis, de función diversa y desconocida, entre otros (Tabla 1). Sin embargo, cuando seleccionamos los genes en el grupo de sangre+virus teniendo en cuenta el valor de corte para determinar la significancia de la regulación génica en este tipo de microarreglos que es de 0,78 en escala log2 (1,71-fold change) (133), encontramos solamente un número reducido de genes (n=41) expresados de manera diferencial asociados a respuesta inmune (n=20), proteólisis (n=6), metabolismo (n=2), RTT (n=1) y de función diversa (n=11) en respuesta a la infección con virus dengue (tabla 1). Esto sugiere que las vías de respuesta inmune implicadas en el proceso de infección de mosquitos con vDEN, presentan una respuesta transcripcional baja en las cepas Cali-S y Cali- MIB, lo cual puede estar asociado a factores intrínsecos o al acervo genético de las cepas (94).

De los 41 genes que presentaron una expresión estadísticamente significativa en respuesta a la infección por vDEN, obtuvimos varios transcritos que correspondían al mismo gen y por lo tanto disminuía el número de genes disponibles para seleccionar algunos de ellos. Esto con el fin de realizar análisis de expresión temporal de los genes y los ensayos funcionales mediante RNAi.

Teniendo en cuenta que el grupo de respuesta inmune fue el que presentó el mayor número de genes expresados de los 41 asociados a la infección, decidimos realizar un diagrama de Venn (figura 8) para observar cuales eran los genes expresados exclusivamente en el grupo de comparación de sangre+virus y descartar los genes que presentaban expresión en los tres grupos de comparación de azúcar, sangre y sangre+virus. Finalmente, seleccionamos ocho genes que se encontraron bajo o sobre regulados en el grupo de los 41 genes asociados principalmente a la respuesta inmune del mosquito, entre ellos: *Cathepsin-b*, *Gram-Negative binding protein*, *Niemann Pick Type C2*, *Keratinocyte lectin*, *Antibacterial peptide* y *Fibrinogen and fibronectin*, del grupo funcional digestión seleccionamos *Trypsin*) y *Serin type endopeptidase* del grupo proteólisis. Teniendo en cuenta el bajo número de genes asociados a la respuesta ante la infección por el vDEN, decidimos, con el

apoyo de búsqueda bibliográfica, escoger otros genes (*Caspase-1*, *Apoptosis stimulating of p53*, *Metalloprotease*, *lef2*) que aunque no cumplían el criterio de inclusión del punto de corte de regulación génica, estaban expresados en el microarreglo y desempeñan una función (p.e. apoptosis) que ha sido relacionada con el proceso de eliminación del vDEN por parte del mosquito en otros estudios (111, 138, 139). En resumen, seleccionamos 12 genes a los cuales se les verificó el patrón de expresión temporal mediante qPCR (0, 8, 24 y 36h.p.i) (Figuras 10, 11 y 12) y se validaron los resultados obtenidos con los microarreglos, esto teniendo en cuenta que en los microarreglos solamente se evaluó la expresión génica a las 30 h.p.i.

Los resultados obtenidos mediante qPCR permitieron corroborar la eficacia de los microarreglos como técnica para el análisis comparativo de expresión génica. Esto debido a que los genes presentan un comportamiento similar al observado en los microarreglos cuando fueron analizados mediante qPCR. Además se confirmó que los genes *Caspase-1*, *p53*, *Metalloprotease* y *lef2*, efectivamente no presentan expresión diferencial estadísticamente significativa en los análisis mediante qPCR (figuras 10, 11 y 12) de la misma manera como se observó a las 30h en los microarreglos.

Los patrones de expresión génica (qPCR), brindaron información valiosa sobre la dinámica y el comportamiento de cada gen en el proceso de infección por el virus antes (0, 8, 24h) y después (36h) del punto post infección que había sido evaluado en el microarreglo (30h.p.i) (figuras 10, 11 y 12). Por ejemplo, se evidenció que algunos genes que se encontraron bajo regulados a las 30 h.p.i en los microarreglos como es el caso de *GNBP*, *Trypsin*, *Antibacterial peptide* y *Keratinocyte lectin*, presentaron una expresión significativa a partir de las 36 h.p.i. En contraste, a los genes expresados a las 36h.p.i, los genes *Cathepsin-b* y *Serin Type endopeptidase* tienen una activación temprana en respuesta a la infección por el virus (8 y 24h.p.i). Además, se evidenció que el gen *Niemann Pick Type-C2* que estaba sobre regulado en los microarreglos, se activa a partir de las 24 horas y se mantiene hasta las 36 h.p.i.

Entre los genes que presentaron una expresión significativa a partir de las 36h.p.i, el gen *Gram-negative bacteria binding protein*, GNBP3 (AAEL009176), ha sido descrito como un receptor de reconocimiento de patrones (PRR) que puede unirse a lipopolisacáridos y a β -1,3-glucanos de las paredes celulares de los hongos (140-142). Este gen ha sido asociado a la activación de la vía Toll en respuesta a la infección por hongos en *D. melanogaster* (143-148) y parece estar regulada por retos inmunes en los mosquitos (93, 149, 150). En el caso del gen *Trypsine* (AAEL013703), su importancia está bien documentada en el proceso de digestión en *Ae. aegypti* (151, 152), sin embargo se conoce poco acerca de su efecto en la CV a vDEN (153, 154). Molina-Cruz A. y colaboradores sugieren que los cambios metabólicos en el intestino medio provocados por la digestión de la sangre son necesarios para una óptima replicación, infección y diseminación del vDEN-2 en el

intestino del mosquito. La actividad de la tripsina en el intestino medio facilita la replicación del virus en *Ae. aegypti* a través de un efecto nutricional y probablemente también por el procesamiento proteolítico directo de la superficie viral (155), esto porque la proteína E del vDEN debe haber sido producida en el intestino medio para que el virus pueda replicarse. Del mismo modo, otros estudios han encontrado evidencia que sugiere que arbovirus como La Crosse y el virus de la lengua azul, utilizan las proteasas del intestino medio del vector para el procesamiento proteolítico y así aumentar la replicación viral (156, 157).

El gen *Antibacterial peptide* (AAEL000598), es una cecropina que hace parte de una amplia familia de péptidos antibacteriales, los cuales realizan funciones de defensa del huésped y con frecuencia actúan en sinergia, proporcionando una rápida defensa no específica contra la invasión de microorganismos (158, 159). Además de las actividades antibacteriales, han sido reportadas en acción ante hongos (160), protozoos (161) y virus (162). Al igual que en nuestros resultados de evaluación del patrón de expresión génica por qPCR, otros estudios han documentado la sobre expresión del gen *Antibacterial peptide* (AAEL000598) en glándulas salivares en *Ae. aegypti* infectados con vDEN (59, 163), lo cual sugiere que la vía IMD está involucrada en la defensa del mosquito ante vDEN, mediante la síntesis de péptidos antimicrobianos-AMP como es el caso de la cecropina.

El gen *keratinocyte lectin* (AAEL009842), una galectina miembro del grupo de las lectinas, juega un papel esencial como molécula de reconocimiento, ya sea actuando como PRRs transmembrana (receptores de lectina tipo C) o después de la secreción por las células inmunes innatas. En insectos, las galectinas son ampliamente expresadas en células huésped y juegan un papel importante durante las diferentes etapas de la infección, como el reconocimiento de patógenos, la invasión y la resolución (164, 165). Además, las galectinas son conocidas por funcionar a varios niveles de la defensa antiviral, desde el reconocimiento inicial, el bloqueo de la envoltura y la fusión de glicoproteínas hasta la activación y amplificación de la respuesta inmune innata y adaptativa (164, 166).

En el caso de los genes expresados en los tiempos tempranos (8 y 24h.p.i) del proceso de infección evaluados con el perfil de expresión temporal (*Cathepsin-b* y *Serin Type endopeptidase*) tenemos que la función fisiológica primaria de *Cathepsin-b*, es regular el recambio proteico lisosomal a través de su capacidad proteolítica. Además, está implicada en muchos procesos celulares asociados con estados patológicos, en particular la apoptosis (167-171). La investigación en mamíferos ha demostrado que *Cathepsin-b* contribuye a la muerte celular ya sea por activación de factores apoptóticos corriente arriba de las caspasas ejecutoras (170, 172) o mediante la unión a estas, activándolas directamente (173-175). Además, la *Cathepsin-b* parece estar implicada en la muerte celular independiente de caspasas. Recientemente se involucró la actividad de este gen en la vía de señalización y clivaje de TLR3 (receptor tipo Toll) en mamíferos. Se sabe también que la activación de esta vía induce apoptosis en las células tumorales a través de

la activación de las caspasas 8 y 9 (176). En otros estudios esta proteasa activa ha sido involucrada en la respuesta inmune del huésped durante una infección bacteriana y viral (177-180), han demostrado que el silenciamiento génico de *Cathepsin-b* en *Ae. aegypti*, conlleva a la disminución de los títulos virales en glándulas salivares, lo que sugiere su papel antagónico en el proceso de infección por vDen (177).

En referencia a *Serin-type endopeptidase* (AAEL001674), un miembro de la familia de las serin proteasas, podemos decir que son genes que regulan varias respuestas de defensa en invertebrados, incluyendo la coagulación en hemolinfa, la síntesis de péptidos antimicrobianos y la melanización de superficies de patógenos (181). Estos procesos requieren la presencia de serin proteasas en la hemolinfa donde pueden activar rápidamente las vías de respuesta inmune para la detección de patógenos (181). El transcrito, *Serin-type endopeptidase* codifica para una proteína con un dominio Trypsin-like cysteine/serine peptidase (IPR009003) y este dominio se relaciona con la proteína NS3 de los Flavivirus (p.e vDEN). Su importancia radica en que NS3, en conjunto con el cofactor NS2B (182) escinden el precursor de la poliproteína viral dentro de la célula huésped, un proceso que se requiere para la replicación viral (183-185). La sobre expresión a las 0 y 8 h.p.i de este tipo de genes en la cepa Cali-MIB en nuestro estudio sugiere su actuación en el proceso inicial de replicación del virus en el mosquito, sin embargo una vez el virus necesite invadir las células intestinales antes de que se forme la matriz peritrófica y escapar a hemolinfa (aproximadamente entre las 24 y 36 h.p.i), los mosquitos de la cepa Cali-MIB regulan la expresión de este gen probablemente como mecanismo de defensa.

Por su parte, *Niemann Pick Type C2* (NPC2), es miembro de la familia ML (Myeloid differentiation 2-related lipid recognition protein) de proteínas y en vertebrados juega un papel importante en el metabolismo de lípidos y en las vías de señalización inmune (186). NPC2 es una pequeña proteína soluble que se encuentra en el lumen de los lisosomas y *Niemann-Pick C1* (NPC1) es una gran glicoproteína de membrana integral que reside en endosomas tardíos (187, 188). Tanto NPC1 como NPC2, son responsables de la salida de colesterol intracelular y glucoesfingolípidos desde los compartimentos lisosomal/endosomal tardío (187). Ha sido demostrado que el fenotipo de ciertas células deficientes en cualquiera de las dos proteínas conlleva a la acumulación de colesterol derivado no esterificado en los compartimentos descritos anteriormente (189). Además este tipo de deficiencias permiten en gran medida la infectividad de algunos virus (190).

Curiosamente, en *D. melanogaster* la sobre expresión de NPC2a y NPC2e activan el promotor de la dipterina en células S2 estimuladas por peptidoglicanos, lo que sugiere que NPC2e y NPC2a pueden desempeñar un papel en la vía IMD, y tal vez otras proteínas de insectos de la familia ML pueden funcionar como co-receptores o PRR para diferentes ligandos y así modular vías de señalización de la respuesta inmune innata (191). Ha sido demostrado que el silenciamiento del gen NPC1 en cepas de *Ae. aegypti* de campo y laboratorio resultó en una elevada resistencia de

los mosquitos al vDEN, estos estudios sugieren que el vDEN influye en la expresión de este gen para facilitar su infección en el mosquito y por ende proponen su posible papel en la defensa de *Ae. aegypti* en contra de la infección por el vDEN (192).

Para realizar nuestros estudios funcionales mediante silenciamiento génico o knockdown a través de la técnica del RNAi en mosquitos de las cepas Cali-S, Cali-MIB y Rockefeller, seleccionamos los genes *Niemman Pick Type-C2*, *GNBP*, *Keratinocyte lectin* y *Cathepsin-b*. Estos genes se seleccionaron basados en la función asociada a una respuesta inmunitaria descrita en otros organismos y además en que presentaron un patrón de expresión diferencial en los ensayos de qPCR diferente en la cepa Cali-MIB comparado con la cepa Cali-S (figuras 10, 11 y 12). Con el fin de optimizar los ensayos de RNAi, tuvimos en cuenta el estado de expresión de los genes, bajo o sobre regulado, según los resultados de los microarreglos. Los genes que ya se encontraron bajo regulados en la cepa Cali-MIB en los microarreglos, *GNBP*, *Keratinocyte lectin* y *Cathepsin-b*, fueron silenciados en las cepas Cali-S y Rockefeller, esto con el fin de determinar si el silenciamiento de los genes causaba un cambio en el fenotipo de las cepas y por ende podría estar implicado en el control de la replicación de vDEN-2.

El gen *Niemman Pick Type-C2* que estaba sobre regulado en la cepa Cali-MIB en los microarreglos fue silenciado en la misma cepa y en las cepas Cali-S y Rockefeller con el fin de corroborar su función. En general, el silenciamiento de los 3 genes bajo regulados (*GNBP*, *Keratinocyte lectin* y *Cathepsin-b*) en las cepas Cali-S y Rockefeller, disminuyó significativamente el porcentaje de la susceptibilidad a la infección por el vDEN-2 (figura 14) y por ende generó el cambio de susceptible a refractario en su fenotipo. El silenciamiento del gen sobre regulado (*Niemman Pick Type-C2*), generó la disminución de la susceptibilidad a la infección por el virus en las cepas susceptibles, y causó el efecto contrario en la cepa Cali-MIB, en la cual incrementó la susceptibilidad a la infección. Estos resultados señalan la posible implicación de estos genes en el proceso de inhibición de la replicación del virus en el mosquito, en estados tempranos o tardíos de la infección.

El silenciamiento de *Cathepsin-b* reduce significativamente la susceptibilidad de la cepa Cali-S y Rockefeller a la infección por el vDEN de 100% a un 20% ($X^2= 44.9$, $p<0.001$) y de 97% a 10% ($Chi^2=54.7$, $p<0.001$) respectivamente. Esta disminución en la susceptibilidad, podría estar asociada a la activación de una respuesta apoptótica temprana mediante una vía intrínseca (0 y 8h.p.i), donde *Cathepsin-b* intervendría mediante su acción proteolítica en la cascada de activación de dicho mecanismo. Este tipo de respuesta podría estar asociada con el control de la entrada inicial del virus a las células epiteliales del intestino. La disminución de la expresión de *Cathepsin-b* después de las 24h.p.i sugiere la participación de otras moléculas que activen un mecanismo de apoptosis mediante una vía extrínseca en respuesta a la entrada del virus a las células epiteliales, como es el caso de Caspasa-16 y AeDronc, reportadas previamente en *Ae. aegypti* (15). No obstante la

implicación de este gen dentro de la vía apoptótica requiere de la evaluación simultánea de otros genes asociados a esta vía.

De la misma manera el silenciamiento del gen GGBP, causa un cambio estadísticamente significativo en el fenotipo de la cepa Cali-S, y aunque el papel de este gen ha sido asociado principalmente en respuesta a bacterias, podrían plantearse 2 hipótesis: 1, este PRR podría asociarse con el reconocimiento de dominios proteicos específicos de la envoltura del virus que conlleve a la activación de una respuesta inmune, o 2, la infección del virus en el intestino desencadena la proliferación de poblaciones bacterianas que activen una respuesta tipo Toll y a su vez de manera indirecta esta vía participe en la eliminación del virus en el intestino como ha sido reportado para *Ae. aegypti* en otros estudios (92). Con respecto a la segunda hipótesis, en CIDEIM se está adelantando un estudio, donde resultados preliminares demuestran la presencia diferencial de bacterias en el intestino medio de mosquitos de la cepa Cali-MIB con respecto a la cepa Cali-S. En la cepa Cali-MIB se observa mayor un número de bacterias en comparación a la cepa Cali-S y la eliminación mediante antibióticos de estas bacterias en ambas cepas influye en la competencia vectorial hacia el vDEN-2 (datos no publicados).

En el caso de NPC2, aunque el cambio del fenotipo en las cepas no es tan fuerte como se observó en los otros genes (Figura 17), nuestros resultados indican una variación significativa en la susceptibilidad a la infección por vDEN tanto de las cepas Cali-S y Rockefeller como la cepa Cali-MIB. Teniendo en cuenta lo anterior, podríamos decir que posiblemente la función de este gen está relacionada con la acción de NPC1 u otros genes que actúen sinérgicamente como ha sido descrito en otros estudios(192), sin embargo se requiere de otros estudios para corroborar esta hipótesis. Además el gen NPC2 el cual ha sido encontrado en los lisosomas, podría estar implicado en el proceso de fusión de la cápside del vDEN con la membrana lisosomal, lo cual permite la liberación del ARN dentro de la célula y da paso al inicio de la infección (193).

Finalmente el gen *Keratinocyte lectin* (lectina), puede estar involucrado como un receptor de reconocimiento para el vDEN que permite la activación de ciertas vías de respuesta inmune y por ende la disminución del virus en la cepa Cali-S y Rockefeller, esto teniendo en cuenta que la ausencia de este gen, cambia significativamente el fenotipo susceptible de ambas cepas a refractario (Figura 17). En humanos, las lectinas han sido involucradas como receptores de vDEN en células dendríticas, las cuales están presentes en la piel y que son de las primeras que se infectan con vDEN, la unión ocurre entre la lectina de unión a ICAM3, DC-SIGN o CD209, y los residuos de manosa de la asparagina 67 de la proteína E, de esta manera se lleva a cabo el primer paso en la infección del vDEN donde se requiere de la interacción entre la partícula viral y el complejo receptor presente en la superficie de la célula huésped para posteriormente desencadenar una serie de respuestas inmunes que permitan esclarecer la infección (194). En este sentido es posible pensar en que en los mosquitos se lleva a cabo un proceso similar.

En general, nuestro estudio brinda información básica sobre el papel antagónico de cuatro genes en respuesta a la infección por vDEN tanto en cepas seleccionadas como en una cepa de referencia como es la Rockefeller, lo cual da evidencias de que los mecanismos asociados a la eliminación del virus pueden ser extrapolados a otras cepas de mosquitos. Aunque son necesarios otro tipo de estudios para corroborar la o las vías de respuesta inmune en las que están involucrados los 4 genes evaluados, el efecto observado con el silenciamiento génico en las cepas seleccionadas, permite pensar en la posibilidad de emplear estos genes como blancos potenciales para desarrollar a futuro estudios que contemplen la manipulación genética de mosquitos incapaces de replicar el virus o su uso para el desarrollo de herramientas útiles que permitan disminuir la transmisión del virus por el vector. Este tipo de estudios podrían ser extrapolados a modelos celulares (humanos)- virus que permitan entender la dinámica de infección en los humanos y relacionarla con el vector.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar otros análisis funcionales con los 4 genes evaluados en este proyecto, que comprendan el uso de otras cepas de *Ae. aegypti* y cepas de virus que sean aisladas de pacientes o con los serotipos restantes del virus dengue (vDEN-1, vDEN-3 y vDEN4). Esto con el fin de asegurar que los resultados obtenidos son extrapolables a cualquier cepa de mosquitos o virus.
- Con el fin de aprovechar los resultados obtenidos en este trabajo, se sugiere la evaluación funcional de otros genes que presentaron expresión diferencial en los ensayos por qPCR, como es el caso de *Trypsin*, *Serin Type endopeptidase* y *Antibacterial protein*. Este tipo de ensayos brindan información básica asociada al proceso de infección en el modelo *Ae. aegypti-vDEN*.
- Es necesario realizar ensayos para co-silenciar otros genes que estén relacionados a la función de los genes *Cathepsin-b*, *GNBP*, *Keratinocyte lectin* y *Niemann Type C2*, para obtener información fundamental que permita determinar qué vía o vías específicamente están involucradas en la respuesta a la infección por vDEN.
- Gracias al avance diario que presenta la tecnología y a la actualización constante de las bases de datos, se sugiere realizar otra exploración de los datos obtenidos con los microarreglos, con el fin de identificar algunos genes que en el momento de realizar este estudio no habían sido descritos y estaban identificados como proteínas hipotéticas o de función desconocida. Este tipo de información podría soportar y complementar la información obtenida en este trabajo.

PERSPECTIVAS

- En un futuro cercano, se espera continuar con el desarrollo de trabajos en laboratorio que permitan transformar una cepa de *Aedes aegypti* susceptible al vDEN (Cali-S o Rockefeller) en refractaria. Esto a través de la inactivación génica (knock out) de los genes previamente identificados, *Cathepsin-b*, *GNBP*, *Keratinocyte lectin* y *Niemann Type C2*, los cuales inducen refractariedad en el modelo *Ae. aegypti*-vDEN en CIDEIM. Se espera que los mosquitos genéticamente modificados puedan ser utilizados en el diseño de alternativas de control como las liberaciones en campo para contribuir en la disminución de la transmisión de vDEN.
- Durante el desarrollo de esta tesis se planteó en colaboración con el Dr. Carl Lowenberger, la escritura de un proyecto relacionado a algunos de los resultados obtenidos con los análisis de los microarreglos. En el proyecto emergente, se planteó determinar el efecto de la presencia de endosimbiontes bacterianos del intestino medio en la CV de *Ae. aegypti* a la infección por el vDEN, esto con el fin de esclarecer algunos mecanismos o vías con las cuales los mosquitos podrían eliminar el virus. En la actualidad, una parte del proyecto lo está llevando a cabo un Joven Investigador en CIDEIM y otra parte asociada al análisis masivo de endosimbiontes mediante secuenciación profunda, se está desarrollando en el laboratorio del Dr. Lowenberger. Esperamos que la totalidad del proyecto se culmine durante este año. Los resultados de este trabajo, permitirán la identificación potencial de blancos de interés que contribuyan al desarrollo de estrategias biotecnológicas para el control de la transmisión del virus dengue.
- Simultáneamente al desarrollo de este proyecto, realizamos el análisis por secuenciación profunda, de muestras de intestinos medios de mosquitos de las cepas Cali-S y Cali-MIB alimentados con sangre o con sangre+virus. Los datos obtenidos con esta técnica son analizados actualmente por una estudiante de Maestría en la Universidad Simon Fraser, Canadá. Este año, esperamos obtener el análisis de estos resultados para fortalecer la información obtenida con los microarreglos.

REFERENCIAS

1. Organization WH, Research SPf, Diseases TiT, Diseases WHODoCoNT, Epidemic WHO, Alert P. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: World Health Organization; 2009.
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013.
3. Parks W, Lloyd L, Nathan M, Hosein E, Odugleh A, Clark G, et al. International experiences in social mobilization and communication for dengue prevention and control. *Dengue Bull*. 2004;28(Suppl):1-7.
4. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of medical research*. 2002;33(4):330-42.
5. Guzmán MG, Kouri G. Dengue: an update. *The Lancet infectious diseases*. 2002;2(1):33-42.
6. Guzman A, Istúriz RE. Update on the global spread of dengue. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;36:S40-S2.
7. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8:S7-S16.
8. Holmes EC, Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends in microbiology*. 2000;8(2):74-7.
9. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature medicine*. 2004;10:S98-S109.
10. WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: World Health Organization; 2009.
11. Malagon JN, Padilla JC, Rojas-Alvarez DP. Guía de atención clínica integral del paciente con dengue. *Infectio*. 2011;15(4):293-301.
12. Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vance Vorndam A. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet*. 1998;352(9132):971-7.
13. WHO. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020: World Health Organization; 2012.
14. Barón OL, Ursic-Bedoya RJ, Lowenberger CA, Ocampo CB. Differential gene expression from midguts of refractory and susceptible lines of the mosquito, *Aedes aegypti*, infected with Dengue-2 virus. *Journal of Insect Science*. 2010;10(41):1-23.
15. Ocampo CB, Caicedo PA, Jaramillo G, Bedoya RU, Baron O, Serrato IM, et al. Differential expression of apoptosis related genes in selected strains of *Aedes aegypti* with different susceptibilities to dengue virus. *PloS one*. 2013;8(4):e61187.
16. Caicedo PA, Baron OL, Pérez M, Alexander N, Lowenberger C, Ocampo CB. Selection of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains that are susceptible or refractory to Dengue-2 virus. *The Canadian Entomologist*. 2013;145(03):273-82.
17. WHO. Dengue and Severe Dengue WHO: World Health Organization Media centre 2014 [updated march 2014; cited 2014 2014]. 117:[Fact Sheet N° 117]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en>.
18. INS. Dengue <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/paginas/dengue.aspx>: Instituto Nacional de Salud; 2015 [cited 2016 Enero 15 de 2016].

19. Alphey L. Malaria Control with Genetically Manipulated Insect. *Nature*. 2002;415:702.
20. Craig Jr G, Hickey WA. Genetics of *Aedes aegypti*. *Genetics of insect vectors of disease*. 1967;1.
21. Hillyer JF, Schmidt SL, Christensen BM. The antibacterial innate immune response by the mosquito *Aedes aegypti* is mediated by hemocytes and independent of Gram type and pathogenicity. *Microbes and infection*. 2004;6(5):448-59.
22. Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*. 2007;316(5832):1718-23.
23. Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC, et al. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *science*. 2007;316(5832):1738-43.
24. Monath T, Heinz F, Flaviviruses FB, Knipe D, Howley P. *Fields Virology*, 1996, 961-1034. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
25. CDC CfDC. Dengue Fever: División of vector-borne infectious diseases; 2005 [cited 2005]. Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/index.htm>.
26. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(3):480-96.
27. Lin C-F, Lei H-Y, Shiau A-L, Liu H-S, Yeh T-M, Chen S-H, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *The Journal of Immunology*. 2002;169(2):657-64.
28. Rothman AL. *Viral pathogenesis of dengue infections. Dengue and dengue hemorrhagic fever* London: CAB International. 1997:245-72.
29. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*. 1988;239(4839):476-81.
30. Ashburn PM, Caraig CF. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. *The Journal of Infectious Diseases*. 1907:440-75.
31. Foster W, Walker E. Mosquitoes (Culicidae). *Medical and veterinary entomology*. 2002:203-62.
32. Chen WJ, Wei HI Fau - Hsu EL, Hsu El Fau - Chen ER, Chen ER. Vector competence of *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) to dengue 1 virus on Taiwan: development of the virus in orally and parenterally infected mosquitoes. (0022-2585 (Print)).
33. Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *BMJ: British Medical Journal*. 2002;324(7353):1563.
34. Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. *Fields virology*. 1996;3:931-59.
35. Mendoza MY, Salas-Benito JS, Lanz-Mendoza H, Hernández-Martínez S, del Angel RM. A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45-kDa glycoprotein. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002;67(1):76-84.

36. Blair CD, Adelman ZN, Olson KE. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(4):651-61.
37. Hoyos Pérez R. Actualización en aspectos epidemiológicos y clínicos del dengue. *Rev Cubana Salud Pública* [Internet] Mar. 2010;36(1).
38. PAHO. Alerta Epidemiológica: Dengue en las Américas http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=15288&Itemid=270&lang=en; Pan American Health Organization; 2011 [cited 2013].
39. WHO P. Descripción de la situación epidemiológica actual del dengue en las Américas http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494&Itemid=2481&lang=es; World Health Organization; 2015 [cited 2016 15/01/2016].
40. Boshell J, Groot H, Gacharna M, Márquez G, González M, Gaitán MO, et al. Dengue en Colombia. *Biomédica*. 1986;6(3-4):101-6.
41. INS. Guía de Atención Clínica Integral del Paciente con Dengue http://www.paho.org/col/index.php?option=com_content&view=article&id=597:guia-de-atencion-clinica-integral-del-paciente-con-dengue-introduccion2010.
42. Reiter P. Yellow fever and dengue: a threat to Europe. *Euro Surveill*. 2010;15(10):19509.
43. Wilder-Smith A, Renhorn K-E, Tissera H, Bakar SA, Alphey L, Kittayapong P, et al. DengueTools: innovative tools and strategies for the surveillance and control of dengue. *Global health action*. 2012;5.
44. Webster DP, Farrar J, Rowland-Jones S. Progress towards a dengue vaccine. *The Lancet infectious diseases*. 2009;9(11):678-87.
45. Durbin AP, Whitehead SS. Dengue vaccine candidates in development. *Dengue Virus*: Springer; 2010. p. 129-43.
46. Corby-Harris V, Drexler A, Watkins de Jong L, Antonova Y, Pakpour N, Ziegler R, et al. Activation of Akt signaling reduces the prevalence and intensity of malaria parasite infection and lifespan in *Anopheles stephensi* mosquitoes. *PLoS Pathog*. 2010;6(7):e1001003.
47. Isaacs AT, Li F, Jasinskiene N, Chen X, Nirmala X, Marinotti O, et al. Engineered resistance to *Plasmodium falciparum* development in transgenic *Anopheles stephensi*. *PLoS Pathog*. 2011;7(4):e1002017.
48. Ito J, Ghosh A, Moreira LA, Wimmer EA, Jacobs-Lorena M. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*. 2002;417(6887):452-5.
49. Travanty EA, Adelman ZN, Franz AW, Keene KM, Beaty BJ, Blair CD, et al. Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2004;34(7):607-13.
50. Franz AW, Sanchez-Vargas I, Adelman ZN, Blair CD, Beaty BJ, James AA, et al. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(11):4198-203.

51. Nolan T, Papathanos P, Windbichler N, Magnusson K, Benton J, Catteruccia F, et al. Developing transgenic *Anopheles* mosquitoes for the sterile insect technique. *Genetica*. 2011;139(1):33-9.
52. Windbichler N, Papathanos PA, Crisanti A. Targeting the X chromosome during spermatogenesis induces Y chromosome transmission ratio distortion and early dominant embryo lethality in *Anopheles gambiae*. *PLoS Genet*. 2008;4(12):e1000291.
53. Fu G, Lees RS, Nimmo D, Aw D, Jin L, Gray P, et al. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(10):4550-4.
54. Phuc HK, Andreassen MH, Burton RS, Vass C, Epton MJ, Pape G, et al. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC biology*. 2007;5(1):11.
55. Thomas DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey LS. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*. 2000;287(5462):2474-6.
56. Marshall JM. The Cartagena Protocol and genetically modified mosquitoes. *Nature biotechnology*. 2010;28(9):896-7.
57. Papathanos PA, Bossin HC, Benedict MQ, Catteruccia F, Malcolm CA, Alphey L, et al. Sex separation strategies: past experience and new approaches. *Malar J*. 2009;8(Suppl 2):S5.
58. Schliekelman P, Gould F. Pest control by the release of insects carrying a female-killing allele on multiple loci. *Journal of economic entomology*. 2000;93(6):1566-79.
59. Sim S, Jupatanakul N, Ramirez JL, Kang S, Romero-Vivas CM, Mohammed H, et al. Transcriptomic profiling of diverse *Aedes aegypti* strains reveals increased basal-level immune activation in dengue virus-refractory populations and identifies novel virus-vector molecular interactions. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(7):e2295.
60. Frentiu FD, Robinson J, Young PR, McGraw EA, O'Neill SL. *Wolbachia*-mediated resistance to dengue virus infection and death at the cellular level. *PloS one*. 2010;5(10):e13398.
61. Hoffmann A, Montgomery B, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson P, Muzzi F, et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*. 2011;476(7361):454-7.
62. Walker T, Johnson P, Moreira L, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu F, McMeniman C, et al. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*. 2011;476(7361):450-3.
63. Yan G, Chadee DD, Severson DW. Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics*. 1998;148(2):793-800.
64. Ocampo CB, Wesson DM. Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2004;71(4):506-13.

65. Fouque F, Vazeille M, Mousson L, Gaborit P, Carinci R, Issaly J, et al. *Aedes aegypti* in French Guiana: susceptibility to a dengue virus. *Tropical Medicine & International Health*. 2001;6(1):76-82.
66. Paupy C, Girod R, Salvan M, Rodhain F, Failloux AB. Population structure of *Aedes albopictus* from La Reunion Island (Indian Ocean) with respect to susceptibility to a dengue virus. *Heredity*. 2001;87(3):273-83.
67. Bosio CF, Beaty BJ, Black W. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1998;59(6):965-70.
68. Black WCt, Bennett KE, Gorrochotegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernandez-Salas I, de Lourdes Munoz M, et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of medical research*. 2002;33(4):379-88.
69. Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual review of entomology*. 1983;28(1):229-62.
70. Woodring J, Higgs S, Beaty B, Marquardt W. Natural cycles of vector-borne pathogens. *The biology of disease vectors*. 1996:51-72.
71. Marquardt WH. *Biology of disease vectors*: Academic Press; 2004.
72. Bosio CF, Fulton RE, Salasek ML, Beaty BJ, Black WC. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*. 2000;156(2):687-98.
73. Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000;64(1):115-37.
74. Cox J, Brown HE, Rico-Hesse R. Variation in vector competence for dengue viruses does not depend on mosquito midgut binding affinity. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(5):e1172.
75. Charan SS, Pawar KD, Severson DW, Patole MS, Shouche YS. Comparative analysis of midgut bacterial communities of *Aedes aegypti* mosquito strains varying in vector competence to dengue virus. *Parasitology research*. 2013;112(7):2627-37.
76. Shahabuddin M, Cociancich S, Zieler H. The search for novel malaria transmission-blocking targets in the mosquito midgut. *Parasitology Today*. 1998;14(12):493-7.
77. Gass R. Influences of blood digestion on the development of *Plasmodium gallinaceum* (Brumpt) in the midgut of *Aedes aegypti* (L.). *Acta tropica*. 1977;34(2):127-40.
78. Goddard J. *Infectious diseases and arthropods*: Springer Science & Business Media; 2009.
79. Christensen BM, Tracy JW. Arthropod-transmitted parasites: mechanisms of immune interaction. *American Zoologist*. 1989;29(2):387-98.
80. Gubler D, Nalim S, Tan R, Saipan H, Sulianti SJ. Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1979;28(6):1045-52.
81. Severson D, Mori A, Zhang Y, Christensen B. Chromosomal mapping of two loci affecting filarial worm susceptibility in *Aedes aegypti*. *Insect molecular biology*. 1994;3(2):67-72.

82. Bennett KE, Flick D, Fleming KH, Jochim R, Beaty BJ, Black WC. Quantitative trait loci that control dengue-2 virus dissemination in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*. 2005;170(1):185-94.
83. Olson K, Higgs S, Gaines P, Powers A, Davis B, Kamrud K, et al. Genetically engineered resistance to dengue-2 virus transmission in mosquitoes. *Science*. 1996;272(5263):884-6.
84. Bennett KE, Beaty BJ, Black IV WC. Selection of D2S3, an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strain with high oral susceptibility to Dengue 2 virus and D2MEB, a strain with a midgut barrier to Dengue 2 escape. *Journal of medical entomology*. 2005;42(2):110-9.
85. Osta MA, Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *Journal of experimental biology*. 2004;207(15):2551-63.
86. Hillyer JF, Schmidt SL, Christensen BM. Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and *Plasmodium* sporozoites by hemocytes of the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Parasitology*. 2003;89(1):62-9.
87. Cooper DM, Granville DJ, Lowenberger C. The insect caspases. *Apoptosis*. 2009;14(3):247-56.
88. Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(42):17841-6.
89. Wang H, Gort T, Boyle DL, Clem RJ. Effects of manipulating apoptosis on Sindbis virus infection of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of virology*. 2012;86(12):6546-54.
90. Bryant B, Blair CD, Olson KE, Clem RJ. Annotation and expression profiling of apoptosis-related genes in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2008;38(3):331.
91. Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunological reviews*. 2004;198(1):127-48.
92. Ramirez JL, Dimopoulos G. The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes. *Developmental and Comparative Immunology*. 2010;34(6):625-9.
93. Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS pathogens*. 2008;4(7):e1000098.
94. Behura SK, Gomez-Machorro C, Harker BW, Lovin DD, Hemme RR, Mori A, et al. Global cross-talk of genes of the mosquito *Aedes aegypti* in response to dengue virus infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(11):e1385.
95. Severson DW, Behura SK. Mosquito genomics: progress and challenges. *Annual review of entomology*. 2012;57:143-66.
96. Chauhan C, Behura SK, Lovin DD, Harker BW, Gomez-Machorro C, Mori A, et al. Comparative expression profiles of midgut genes in dengue virus refractory and susceptible *Aedes aegypti* across critical period for virus infection. *PloS one*. 2012;7(10):e47350.

97. Sim S, Dimopoulos G. Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. *PloS one*. 2010;5(5):e10678.
98. Liu B, Behura SK, Clem RJ, Schneemann A, Becnel J, Severson DW, et al. P53-mediated rapid induction of apoptosis conveys resistance to viral infection in *Drosophila melanogaster*. *PLoS pathogens*. 2013;9(2):e1003137.
99. Agaisse H, Perrimon N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological reviews*. 2004;198(1):72-82.
100. Blair CD. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future microbiology*. 2011;6(3):265-77.
101. Ketting RF. The many faces of RNAi. *Developmental cell*. 2011;20(2):148-61.
102. Bivalkar-Mehla S, Vakharia J, Mehla R, Abreha M, Kanwar JR, Tikoo A, et al. Viral RNA silencing suppressors (RSS): novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system. *Virus research*. 2011;155(1):1-9.
103. Keene KM, Foy BD, Sanchez-Vargas I, Beaty BJ, Blair CD, Olson KE. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(49):17240-5.
104. Khoo CC, Piper J, Sanchez-Vargas I, Olson KE, Franz AW. The RNA interference pathway affects midgut infection-and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. *BMC microbiology*. 2010;10(1):130.
105. Sánchez-Vargas I, Scott JC, Poole-Smith BK, Franz AW, Barbosa-Solomieu V, Wilusz J, et al. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS pathogens*. 2009;5(2):e1000299.
106. Myles KM, Wiley MR, Morazzani EM, Adelman ZN. Alphavirus-derived small RNAs modulate pathogenesis in disease vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(50):19938-43.
107. Cirimotich CM, Scott JC, Phillips AT, Geiss BJ, Olson KE. Suppression of RNA interference increases alphavirus replication and virus-associated mortality in *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC microbiology*. 2009;9(1):49.
108. Li H, Li WX, Ding SW. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science*. 2002;296(5571):1319-21.
109. van Cleef KW, van Mierlo JT, van den Beek M, van Rij RP. Identification of viral suppressors of RNAi by a reporter assay in *Drosophila* S2 cell culture. *Antiviral RNAi: Springer*; 2011. p. 201-13.
110. Sanders H, Foy B, Evans A, Ross L, Beaty B, Olson K, et al. Sindbis virus induces transport processes and alters expression of innate immunity pathway genes in the midgut of the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2005;35(11):1293.
111. Clarke TE, Clem RJ. Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis. *International reviews of immunology*. 2003;22(5-6):401-24.
112. Clem R. Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell death and differentiation*. 2001;8(2):137-43.
113. Everett H, McFadden G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends in microbiology*. 1999;7(4):160-5.

114. Clem R. The role of apoptosis in defense against baculovirus infection in insects. *Role of Apoptosis in Infection*: Springer; 2005. p. 113-29.
115. Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature*. 1998;396(6707):119-.
116. Thornberry NA. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chemistry & biology*. 1998;5(5):R97-R103.
117. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281(5381):1312-6.
118. James ER, Green DR. Manipulation of apoptosis in the host–parasite interaction. *Trends in parasitology*. 2004;20(6):280-7.
119. Aravind L, Dixit VM, Koonin EV. Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science*. 2001;291(5507):1279-84.
120. Medeiros RB, Resende RdO, de Ávila AC. The plant virus Tomato Spotted Wilt Tospovirus activates the immune system of its main insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of virology*. 2004;78(10):4976-82.
121. Cooper DM, Pio F, Thi EP, Theilmann D, Lowenberger C. Characterization of *Aedes Dredd*: A novel initiator caspase from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2007;37(6):559-69.
122. Cooper DM, Chamberlain CM, Lowenberger C. *Aedes FADD*: A novel death domain-containing protein required for antibacterial immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2009;39(1):47-54.
123. Cooper D, Thi E, Chamberlain C, Pio F, Lowenberger C. *Aedes Dronc*: a novel ecdysone-inducible caspase in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect molecular biology*. 2007;16(5):563-72.
124. Leulier F, Parquet C, Pili-Floury S, Ryu J-H, Caroff M, Lee W-J, et al. The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nature immunology*. 2003;4(5):478-84.
125. Stöven S, Silverman N, Junell A, Hedengren-Olcott M, Erturk D, Engström Y, et al. Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF-κB factor Relish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(10):5991-6.
126. Tanji T, Hu X, Weber AN, Ip YT. Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(12):4578-88.
127. Sessions OM, Barrows NJ, Souza-Neto JA, Robinson TJ, Hershey CL, Rodgers MA, et al. Discovery of insect and human dengue virus host factors. *Nature*. 2009;458(7241):1047-50.
128. Higgs S, Olson KE, Kamrud KI, Powers AM, Beaty BJ. Viral expression systems and viral infections in insects. *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors*: Springer; 1997. p. 459-83.
129. Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E, Dimopoulos G. *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS pathogens*. 2006;2(6):e52.

130. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *methods*. 2001;25(4):402-8.
131. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012. ISBN 3-900051-07-0; 2014.
132. Kuno G, Gubler D, Kuno G. Factors influencing the transmission of dengue viruses. *Dengue and dengue haemorrhagic fever* New York: CAB International. 1997:61-88.
133. Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, et al. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol*. 2002;3(11):1-0062.12.
134. Dahlquist KD, Salomonis N, Vranizan K, Lawlor SC, Conklin BR. GenMAPP, a new tool for viewing and analyzing microarray data on biological pathways. *Nature genetics*. 2002;31(1):19-20.
135. Bryant B, Blair CD, Olson KE, Clem RJ. Annotation and expression profiling of apoptosis-related genes in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2008;38(3):331-45.
136. Cooper DM. Apoptosis and immunity: characterizing the cell death machinery in the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti*.: Simon Fraser University; 2008.
137. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*. 2012;40(15):e115-e.
138. Tchankouo-Nguetchou S, Khun H, Pincet L, Roux P, Bahut M, Huerre M, et al. Differential protein modulation in midguts of *Aedes aegypti* infected with chikungunya and dengue 2 viruses. *PloS one*. 2010;5(10):e13149.
139. Means JC, Passarelli AL. Viral fibroblast growth factor, matrix metalloproteases, and caspases are associated with enhancing systemic infection by baculoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(21):9825-30.
140. Ochiai M, Ashida M. Purification of a beta-1, 3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(24):12056-62.
141. Ochiai M, Niki T, Ashida M. Immunocytochemical localization of β -1, 3-glucan recognition protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Cell and tissue research*. 1992;268(3):431-7.
142. Ochiai M, Ashida M. A pattern-recognition protein for β -1, 3-glucan the binding domain and the cDNA cloning of β -1, 3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(7):4995-5002.
143. Filipe SR, Tomasz A, Ligoxygakis P. Requirements of peptidoglycan structure that allow detection by the *Drosophila* Toll pathway. *EMBO reports*. 2005;6(4):327-33.
144. Wang L, Weber AN, Atilano ML, Filipe SR, Gay NJ, Ligoxygakis P. Sensing of Gram-positive bacteria in *Drosophila*: GNBP1 is needed to process and present peptidoglycan to PGRP-SA. *The EMBO journal*. 2006;25(20):5005-14.

145. Gobert V, Gottar M, Matskevich AA, Rutschmann S, Royet J, Belvin M, et al. Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science*. 2003;302(5653):2126-30.
146. Pili-Floury S, Leulier F, Takahashi K, Saigo K, Samain E, Ueda R, et al. In vivo RNA interference analysis reveals an unexpected role for GGBP1 in the defense against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(13):12848-53.
147. Gottar M, Gobert V, Matskevich AA, Reichhart J-M, Wang C, Butt TM, et al. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell*. 2006;127(7):1425-37.
148. Matskevich AA, Quintin J, Ferrandon D. The *Drosophila* PRR GGBP3 assembles effector complexes involved in antifungal defenses independently of its Toll-pathway activation function. *European journal of immunology*. 2010;40(5):1244-54.
149. Warr E, Das S, Dong Y, Dimopoulos G. The Gram-Negative Bacteria-Binding Protein gene family: Its role in the innate immune system of *Anopheles gambiae* and in anti-*Plasmodium* defence. *Insect molecular biology*. 2008;17(1):39-51.
150. Pan X, Zhou G, Wu J, Bian G, Lu P, Raikhel AS, et al. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(1):E23-E31.
151. Noriega FG, Wells MA. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *Journal of insect physiology*. 1999;45(7):613-20.
152. Brackney DE, Isoe J, Black W, Zamora J, Foy BD, Miesfeld RL, et al. Expression profiling and comparative analyses of seven midgut serine proteases from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of insect physiology*. 2010;56(7):736-44.
153. Brackney DE, Foy BD, Olson KE. The effects of midgut serine proteases on dengue virus type 2 infectivity of *Aedes aegypti*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2008;79(2):267-74.
154. Pennington JE, Wells MA. The adult midgut: structure and function. *Biology of Disease Vectors*, WC Marquardt, ed(Burlington, MA: Elsevier Academic). 2004:289-95.
155. Molina-Cruz A, Gupta L, Richardson J, Bennett K, BLACK W, Barillas-Mury C. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2005;72(5):631-7.
156. Ludwig GV, Christensen BM, Yuill TM, Schultz KT. Enzyme processing of La Crosse virus glycoprotein G1: a bunyavirus-vector infection model. *Virology*. 1989;171(1):108-13.
157. Mertens P, Burroughs J, Walton A, Wellby M, Fu H, O'HARA R, et al. Enhanced Infectivity of Modified Bluetongue Virus Particles for Two Insect Cell Lines and for Two Culicoides Vector Species. *Virology*. 1996;217(2):582-93.
158. Tamang DG, Saier Jr MH. The cecropin superfamily of toxic peptides. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 2006;11(1-2):94-103.

159. Bulet P, Stocklin R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and peptide letters*. 2005;12(1):3-11.
160. Ahmad I, Perkins WR, Lupan DM, Selsted ME, Janoff AS. Liposomal entrapment of the neutrophil-derived peptide indolicidin endows it with in vivo antifungal activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1995;1237(2):109-14.
161. Bevins CL, Zasloff M. Peptides from frog skin. *Annual review of biochemistry*. 1990;59(1):395-414.
162. Wachinger M, Kleinschmidt A, Winder D, von Pechmann N, Ludvigsen A, Neumann M, et al. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *Journal of General Virology*. 1998;79(4):731-40.
163. Luplertlop N, Surasombatpattana P, Patramool S, Dumas E, Wasinpiyamongkol L, Saune L, et al. Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following infection with dengue virus. 2011.
164. Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, et al. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*. 2004;119(3):329-41.
165. Dimopoulos G, Seeley D, Wolf A, Kafatos FC. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. *The EMBO journal*. 1998;17(21):6115-23.
166. Vasta GR. Roles of galectins in infection. *Nature Reviews Microbiology*. 2009;7(6):424-38.
167. Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, et al. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *The Journal of cell biology*. 2001;153(5):999-1010.
168. Turk V, Kos J, Turk B. Cysteine cathepsins (proteases)—On the main stage of cancer? *Cancer cell*. 2004;5(5):409-10.
169. Gocheva V, Zeng W, Ke D, Klimstra D, Reinheckel T, Peters C, et al. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes & development*. 2006;20(5):543-56.
170. Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis. *Biological chemistry*. 2007;388(6):555-60.
171. Deussing J, Roth W, Saftig P, Peters C, Ploegh HL, Villadangos JA. Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(8):4516-21.
172. Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim T-H, Cirman T, Snipas SJ, et al. Lysosomal protease pathways to apoptosis cleavage of Bid, not pro-caspases, is the most likely route. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(5):3149-57.
173. Schotte P, Van Crielinge W, Van de Craen M, Van Loo G, Desmedt M, Grooten J, et al. Cathepsin B-mediated activation of the proinflammatory caspase-11. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;251(1):379-87.

174. Vancompernelle K, Van Herreweghe F, Pynaert G, Van de Craen M, De Vos K, Totty N, et al. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS letters*. 1998;438(3):150-8.
175. Canu N, Tufi R, Serafino AL, Amadoro G, Ciotti MT, Calissano P. Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *Journal of neurochemistry*. 2005;92(5):1228-42.
176. Sun R, Zhang Y, Lv Q, Liu B, Jin M, Zhang W, et al. Toll-like receptor 3 (TLR3) induces apoptosis via death receptors and mitochondria by up-regulating the transactivating p63 isoform α (TAP63 α). *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(18):15918-28.
177. Sim S, Ramirez JL, Dimopoulos G. Dengue virus infection of the *Aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002631.
178. Zhang F-T, Zhang Y-B, Chen Y-D, Zhu R, Dong C-W, Li Y-Y, et al. Expressional induction of *Paralichthys olivaceus* cathepsin B gene in response to virus, poly I: C and lipopolysaccharide. *Fish & shellfish immunology*. 2008;25(5):542-9.
179. Chen L, Sun L. Cathepsin B of *Cynoglossus semilaevis*: identification, expression, and activity analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2012;161(1):54-9.
180. Qiu R, Liu X, Hu Y-h, Sun B-g. Expression characterization and activity analysis of a cathepsin B from Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Fish & shellfish immunology*. 2013;34(5):1376-82.
181. Gorman MJ, Paskewitz SM. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2001;31(3):257-62.
182. Murthy HK, Clum S, Padmanabhan R. Dengue virus NS3 serine protease crystal structure and insights into interaction of the active site with substrates by molecular modeling and structural analysis of mutational effects. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(9):5573-80.
183. Wichapong K, Pianwanit S, Sippl W, Kokpol S. Homology modeling and molecular dynamics simulations of Dengue virus NS2B/NS3 protease: insight into molecular interaction. *Journal of Molecular Recognition*. 2010;23(3):283-300.
184. Aleshin AE, Shiryayev SA, Strongin AY, Liddington RC. Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the Flaviviridae fold. *Protein science*. 2007;16(5):795-806.
185. Chandramouli S, Joseph JS, Daudenarde S, Gatchalian J, Cornillez-Ty C, Kuhn P. Serotype-specific structural differences in the protease-cofactor complexes of the dengue virus family. *Journal of virology*. 2010;84(6):3059-67.
186. Inohara N, Nuñez G. ML—a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. *Trends in biochemical sciences*. 2002;27(5):219-21.
187. Higgins ME, Davies JP, Chen FW, Ioannou YA. Niemann–Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Molecular genetics and metabolism*. 1999;68(1):1-13.

188. Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, Fensom A, Vanier MT, Wattiaux R, et al. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science*. 2000;290(5500):2298-301.
189. Steinberg S, Mondal D, Fensom A. Co-cultivation of Niemann-Pick disease type C fibroblasts belonging to complementation groups α and β stimulates LDL-derived cholesterol esterification. *Journal of inherited metabolic disease*. 1996;19(6):769-74.
190. Coleman EM, Walker TN, Hildreth J. Loss of Niemann Pick type C proteins 1 and 2 greatly enhances HIV infectivity and is associated with accumulation of HIV Gag and cholesterol in late endosomes/lysosomes. *Virology*. 2012;9:31.
191. Shi X-Z, Zhong X, Yu X-Q. *Drosophila melanogaster* NPC2 proteins bind bacterial cell wall components and may function in immune signal pathways. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2012;42(8):545-56.
192. Jupatanakul N, Sim S, Dimopoulos G. *Aedes aegypti* ML and Niemann-Pick type C family members are agonists of dengue virus infection. *Developmental and Comparative Immunology*. 2014;43:1-9.
193. Goodsell DS. Dengue virus <http://pdb101.rcsb.org/motm/103>: Protein Data Bank; 2008 [cited 2015].
194. del Ángel RM. Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral. *Cinvestad*. 2006;25(31):38-43.

Anexo 1. Formato de registro IFI para cabezas e intestinos de mosquitos – CV.

Código: **FOR 090**

Creado por:

Fecha de creación:

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

Versión: 01

Modificado por:

Última modificación:

Fecha: _____

Localidad: _____

Responsable: _____

☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐

☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐

☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐

☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐

☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐

☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐

☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐

☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐

OBSERVACIONES: _____

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL- CIDEIM