



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN CÉLULAS C6/36
PERSISTENTEMENTE INFECTADAS CON EL VIRUS DEL DENGUE TIPO
2.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN
CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

PRESENTA:

REYES REYES ANA LAURA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN SANTIAGO SALAS BENITO

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE DEL 2011





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 29 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMyH para examinar la tesis titulada:

"Expresión diferencial de genes en células C6/36 persistentemente infectadas con el virus del Dengue tipo 2"

Presentada por el alumno:

<u>Reyes</u>	<u>Reyes</u>	<u>Ana Laura</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
	Con registro:	<table border="1"> <tr> <td>B</td> <td>0</td> <td>9</td> <td>1</td> <td>4</td> <td>5</td> <td>5</td> </tr> </table>	B	0	9	1	4	5	5
B	0	9	1	4	5	5			

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular

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

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dr. Juan Santiago Salas Benito

Dra. Mónica Ascención De Nova Ocampo

Dra. Doris Ateña Cerecedo Mercado

Dra. Paula María del Carmen Figueroa Arredondo

Dra. María Esther Ramírez Moreno

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. César Augusto Gandino Reyes López

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 29 del mes Noviembre del año 2011, el (la) que suscribe Ana Laura Reyes Reyes alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular con número de registro B091455, adscrito a ENMyH, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Juan Santiago Salas Bonito y cede los derechos del trabajo intitulado “Expresión diferencial de genes en células C6/36 persistentemente infectadas con el virus del Dengue tipo 2”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección alafca@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Ana Laura Reyes Reyes

Nombre y firma

La parte experimental de esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Biomedicina Molecular III de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional bajo la Dirección del Dr. Juan Santiago Salas Benito. El financiamiento fue a través de la Secretaria de Investigación y Posgrado, proyecto SIP 20110915 del Instituto Politécnico Nacional. Se contó con beca de Maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional, Beca Tesis del Instituto Politécnico Nacional y Beca por parte del Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) del Estado de México.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Juan Salas Benito**, por su eterna paciencia, disposición de oír, permitir desenvolverse en su laboratorio brindándome confianza y respaldo, así como mantener siempre su puerta abierta para prestarme ayuda. Sinceramente Gracias.

A la **Dra. Mónica De Nova Ocampo**, por sus valiosas propuestas y sugerencias para el desarrollo del trabajo.

A la **Dra. Doris Cerecedo**, por sus comentarios y apoyo en todos los aspectos pero sobre todo siempre certeros en los momentos difíciles.

A la **Dra. Paula Figueroa** quien desde el primer momento que supe de la Maestría me apoyó de manera desinteresada, alentándome a perseverar siempre.

A la **Dra. Esther Ramírez** por todas las sugerencias puntuales y tiempo prestado durante el desarrollo de este trabajo.

A **Maty y Mariana** por su apoyo y arduo trabajo en equipo en la generación de material técnico, capacitación en las técnicas empleadas en este trabajo, pero sobre todo por su amistad.

Al **Dr. Fernando Chanona**, por su amistad, apoyo y sinceros comentarios que me impulsaron a continuar y no declinar en este viaje. Te admiro y siempre te reconoceré.

A **Rita, Raúl y Migue**, amigos que siempre llevaré en mi corazón, gracias por estar presente en todos los momentos que he vivido durante estos 2 años y darle color, alegría y emoción a mi estancia por aquí.

A mis compañeras de Laboratorio, **Dora, Rocío, Wendy, Bere, Tania, Angeles, Lesli, Caro y Giuliana** por su compañía, apoyo y todos los momentos agradables en el lab.

A **Oli**, por su compañía y comentarios.

A **Viki** por su apoyo en el diseño de un par de oligonucleótidos utilizados en este trabajo y comentarios puntuales e importantes respecto a la técnica de AFLP.

DEDICATORIA

A mi hijita y querido Esposo

Ana Cristina, quien es la persona más importante en mi vida y se convirtió en el motor que impulsa cada deseo y ganas de luchar con todas mis fuerzas para alcanzar un objetivo. Te amo mi chiquita. **Julio**, que siempre has estado conmigo, brindándome tu inmenso amor y apoyo, sobre todo cuando de pronto sentí que ya no podía. me impulsaste para que pudiera continuar y lograr mis metas. Te amo.

A mis padres

Lic. Rosalío Reyes, que a su manera me ha enseñado a luchar en este camino de la vida y sin ello, todo sería más difícil. **Sra. Anadelia Reyes**, mi querida mamá, que siempre ha estado conmigo, con tenacidad me ha enseñado a perseverar y con sus lindas y a veces fuertes palabras me ha animado a seguir luchando. De verdad Señora, te quiero mucho y admiro tu gran fortaleza. Gracias papás por respaldarme siempre. Aquí, dedico a Ustedes un logro más.

A mis hermanos

Alex, que me ha acompañado durante estos dos años, gracias por tus palabras tan directas y sinceras. **Vero**, siempre tan luchona, tan virtuosa, me has apoyado en todo momento. **Marquitos**, porque aunque seas niño siempre has sabido animarme. Ustedes me han enseñado y recordado que las cosas se logran cuando te las propones. Los quiero.

A mis suegros

Mtro. Juan Luis García, gracias por aceptarme y hacerme sentir como parte de su familia, me ha respaldado y apoyado sin dudarlo en todo momento. **Sra. Adelma Villarreal**, gracias por animarme y apoyarme cuando más lo necesité. Esta meta cumplida, también es para Ustedes.

A mi querida Abuelita.

Trinidad, si existe el donde quiera que estés, entonces, espero que hasta allá llegue la alegría que siento por haber cumplido lo que te prometí. Te extraño.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	3
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
1.0 INTRODUCCIÓN	8
1.1 Epidemiología.....	8
1.2 Epidemiología en México.....	9
1.3 Agente etiológico.....	11
1.4 Transmisión.....	12
1.5 Características clínicas.....	12
1.5.1 Fiebre Indiferenciada.....	13
1.5.2 Fiebre por Dengue.....	13
1.5.3 Fiebre Hemorrágica por Dengue.....	13
1.5.4 Síndrome de Choque por Dengue.....	14
1.6 Prevención y control.....	14
2.0 ANTECEDENTES	16
3.0 JUSTIFICACIÓN	24
4.0 OBJETIVO	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5.0 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
6.0 MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1 Línea celular C6/36 de <i>Aedes albopictus</i>	27
6.2 Extracción de RNA total de las células C6/36.....	27
6.3 Tratamiento del RNA total con DNasa.....	28
6.4 Evaluación de la integridad del RNA total.....	28

6.5 Purificación del RNAm mediante cromatografía de afinidad en columnas de oligo-dT.....	29
6.6 Cuantificación del RNAm por espectrofotometría.....	30
6.7 Síntesis de cDNA de doble cadena a partir del RNAm.....	30
6.7.1 Síntesis de la primera cadena del cDNA.....	30
6.7.2 Síntesis de la segunda cadena del cDNA.....	30
6.8 Polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (“Amplified fragment length polymorphism”, AFLP).....	31
6.8.1 Digestión del cDNA de doble cadena con las enzimas de restricción <i>Eco RI</i> y <i>Mse I</i>	32
6.8.2 Preparación de doble cadena de los adaptadores.....	32
6.8.3 Preparación de la reacción de ligación de los adaptadores.....	33
6.8.4 Amplificación de los fragmentos de cDNA por PCR pre-selectiva.....	33
6.8.5 Amplificación de los fragmentos de cDNA por PCR selectiva.....	34
6.9 Purificación de las bandas diferenciales.....	36
6.10 Reacción de ligación al vector pJET 1.2.....	37
6.11 Preparación de células competentes.....	37
6.12 Transformación de las células competentes.....	38
6.13 Minipreps.....	38
6.14 Restricción con <i>Bgl II</i>	39
6.15 Purificación de plásmidos por columna.....	39
6.16 Análisis bioinformático.....	40
6.17 Amplificación de importina beta-3 por RT-PCR.....	40
7.0 RESULTADOS	42
8.0 DISCUSIÓN	61
9.0 CONCLUSIONES	71
10.0 PERSPECTIVAS	72
11.0 ANEXOS	73
12.0 BIBLIOGRAFÍA	74

ABREVIATURAS

AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
ATP	Adenosina trifosfato
Bgl II	Endonucleasa de restricción
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C6/36	Células de <i>Aedes albopictus</i>
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
cDNA	Cadena complementaria de DNA
dcDNA	Doble cadena de DNA
DENV-1	Dengue virus serotipo 1
DENV-2	Dengue virus serotipo 2
DENV-3	Dengue virus serotipo 3
DENV-4	Dengue virus sertipo 4
DEPC	Diethylpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<i>Eco RI</i>	Endonucleasa de restricción
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FD	Fiebre por Dengue
FHD	Fiebre Hemorrágica por Dengue
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LB	Luria-Bertoni
M	Molar
MEM	Medio Mínimo Esencial
Mg	Miligramos

MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
NS1	Proteína no estructural 1
NS2A	Proteína no estructural 2A
NS2B	Proteína no estructural 2B
NS3	Proteína no estructural 3
NS4A	Proteína no estructural 4A
NS4B	Proteína no estructural 4B
NS5	Proteína no estructural 5
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
Rcf	Fuerza centrífuga relativa
Rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción de la Cadena Polimerasa en Transcripción Reversa
SCD	Síndrome de Choque por Dengue
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Tfl	<i>Thermas flavus</i>
UV	Luz ultra violeta

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Distribución mundial de las áreas predominantes del mosquito vector del virus del Dengue (<i>Ae. aegypti</i>).....	9
Figura 2. Reintroducción del Dengue en la República Mexicana 1978-1981.....	10
Figura 3. Panorama epidemiológico de FD y FHD en México por Entidad Federativa en la semana 44 acumulado hasta el 8 de noviembre del 2011.....	10
Figura 4. Casos de FD y FHD en el 2010-2011.....	11
Figura 5. Mapa del vector pJET 1.2/blunt.....	37
Figura 6. Análisis de los productos de amplificación de un fragmento del gen de <i>actina</i> de <i>Ae. aegypti</i> a partir del RNA total tratado con DNasas.....	42
Figura 7. Amplificación de un fragmento del gen de <i>actina</i> a partir del RNAm purificado.....	43
Figura 8. Amplificación de un fragmento de NS1 y NS2A.....	45
Figura 9. Amplificación de un fragmento del gen de <i>actina</i> a partir del cDNA de doble cadena.....	46
Figura 10. Restricción del plásmido pBluescript como control para verificar la eficiencia de las enzimas <i>Eco RI</i> y <i>Mse I</i>	47
Figura 11. Análisis electroforético de la hibridación de los adaptadores de doble cadena para el sitio <i>Eco RI</i> y <i>Mse I</i>	47
Figura 12. Patrones diferenciales generados durante la amplificación preselectiva y selectiva.....	48
Figura 13. Patrones representativos de las bandas diferenciales generadas con la técnica de AFLP durante la amplificación selectiva.....	51
Figura 14. Alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de las bandas de 400 pb y 150 pb generadas de la combinación ES4-MS4.....	53
Figura 15. Secuencia obtenidas a partir de las bandas de 300 pb y 250 pb generadas de la combinación ES1-MS10.....	54

Figura 16. Alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de las bandas de 200 pb generadas de la combinación ES1-MS11.....	54
Figura 17. Alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de las bandas diferenciales de 300 pb generadas de la combinación ES4-MS6....	55
Figura 18. Alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de las bandas diferenciales de 150 pb generadas de la combinación ES3-MS9....	56
Figura 19. Análisis de los productos de amplificación de la RT-PCR semicuantitativa.....	59
Figura 20. Gráfica que representa la expresión diferencial de la importina beta-3.....	60
Tabla 1. Secuencia de los Adaptadores para <i>EcoR I</i> y <i>Mse I</i>	33
Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos para la PCR pre-selectiva.....	34
Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos que fueron utilizados para realizar la PCR selectiva.....	35
Tabla 4. Combinaciones de oligonucleótidos selectivos que generaron bandas diferenciales.....	49
Tabla 5. Resultado del análisis de cDNA-AFLPs.....	50
Tabla 6. Insertos purificados del patrón polimórfico de ambas condiciones generado mediante la técnica de AFLP.....	52
Tabla 7. Análisis de las secuencias con el genoma de <i>Ae. aegypti</i>	58

RESUMEN

El dengue es la principal enfermedad viral humana transmitida por artrópodos y México se encuentra dentro de la lista de los países con mayor riesgo. Su espectro es muy amplio ya que va desde cuadros clínicos inaparentes hasta una enfermedad potencialmente fatal. El diagnóstico y manejo adecuado dependen fundamentalmente del conocimiento de la misma, así como de una observación estricta del paciente para evitar complicaciones. Desafortunadamente, por el momento no hay una vacuna disponible para prevenir esta enfermedad.

El virus del Dengue es transmitido al hombre por mosquitos pertenecientes al género *Aedes*, vectores en los cuales el virus establece una infección de por vida o persistente. En la actualidad hay pocos estudios que aporten información acerca de este tipo de infecciones en células de mosquito y todavía menos que documenten cuáles son de los genes implicados en el control de la infección viral, por lo que este trabajo se enfocó al estudio de la expresión diferencial de genes en células C6/36 de mosquito persistentemente infectadas con el virus DENV-2 mediante el uso de la técnica AFLP, que inicialmente fue empleada para el análisis de diversidad genética en plantas, bacterias y luego utilizada satisfactoriamente en insectos. Recientemente se ha reportado el uso de esta técnica para el análisis de la expresión diferencial de genes en diferentes organismos, razón por la cual se decidió emplearla en este trabajo. Se presentan, además de las características generales de la técnica de AFLP, la identificación de 24 genes expresados de manera diferencial durante una infección persistente: proteínas hipotéticas, proteínas ribosomales, el cofactor molibdopterina, la etanolamina-fosfato citidililtransferasa, la peritrofina, la ferritina, la adenilato cilclasa, un péptido de secreción salival, la inosina monofosfato 5-deshidrogenasa y la importina beta-3, siendo este último el más directamente relacionado con la infección por el virus del Dengue, cuya disminución en infecciones agudas es proporcional a los títulos virales de DENV, patrón observado en las células persistentemente infectadas, de manera que podemos referir que su disminución contribuye en la regulación de la infección. Estos hallazgos proporcionan datos interesantes que en un futuro nos podrían ayudar a entender cual es el comportamiento celular ante una infección

persistente para finalmente controlar, prevenir y promover su uso como posibles blancos para la acción antiviral.

ABSTRACT

Dengue is a major human viral disease transmitted by arthropods, being Mexico one of the most affected countries. Its spectrum is very wide, ranging from slight clinical manifestations to a potentially fatal disease. Early diagnosis and proper management depends critically on the knowledge of the illness, as well as the strict patient monitoring to avoid complications. Unfortunately, at present there is not any available vaccine to prevent this sickness.

Dengue virus is transmitted to humans by mosquitoes belonging to the genus *Aedes*, which are vectors where the virus establishes a lifelong or persistent infection. At present there are not enough studies to provide information about this type of infection in mosquito cells, and even less to document what kind of genes are involved in controlling viral infection in this type of cells, so this work was focused on the study of differential gene expression in C6/36 mosquito cells persistently infected with DENV-2 virus using the AFLP technique. It has been extensively used for the analysis of genetic diversity in plants and bacteria and afterwards successfully in insects. Recently, it has been reported the use of this technique in the analysis of differential gene expression in different organisms, so that we decided to use it in this investigation. The general characteristics of the AFLP technique is described and besides we also show the identification of 24 genes differentially expressed during persistent mosquito cell infection. These genes codify for: hypothetical and ribosomal proteins, molybdopterin cofactor, ethanolamine-phosphate cytidyltransferase, peritrophin, ferritin, adenylate cyclase, a salivary secreted peptide, the inosine-5-monophosphate dehydrogenase and the importin beta-3. The last one was the most directly related to infection by Dengue virus, which decline proportionally in acute infections to the viral titers; this pattern was observed in persistently infected cells, so we can infer that its decrease contributes to the regulation of infection. These findings provide interesting data that could contribute to understand the mechanisms of the persistent infections and identify potential targets for antiviral action.

1.0 INTRODUCCIÓN

En la actualidad el dengue es la enfermedad viral humana transmitida por vector más importante en el mundo causante de grandes epidemias, principalmente en países pobres donde encuentra condiciones para su desarrollo y causa grandes daños económicos y sociales.^{19,22}

La infección por Dengue es causada por cuatro serotipos diferentes del virus (Dengue serotipo 1, 2, 3 y 4) pero estrechamente relacionados. Después de recuperarse de la infección causada por uno de los serotipos, el paciente adquiere inmunidad contra éste pero sólo una protección parcial y transitoria contra posteriores infecciones por los otros tres.^{22, 23}

Anualmente se reportan aproximadamente 100 millones de casos de fiebre por dengue (FD) y medio millón de casos de fiebre hemorrágica por dengue (FHD) alrededor del mundo. No hay vacuna disponible para prevenir esta enfermedad y el reconocimiento temprano y el inicio oportuno de un tratamiento apropiado son vitales para su adecuada resolución.⁴⁸

1.1 Epidemiología

Durante los últimos 50 años, la incidencia del dengue ha aumentado 30 veces con brotes significativos en 5 de las 6 regiones geográficas determinadas por la Organización Mundial de la Salud.^{66,86} En los últimos años, el dengue junto con la malaria, constituyen una de las enfermedades más frecuentes importadas a través de los viajeros.¹⁹ La OMS calcula que cada año puede haber 50-100 millones de casos de dengue en todo el mundo con 500,000 hospitalizaciones debidas a FHD, y un total del 21,000 muertes.^{14,86} En el periodo del 2001 al 2006 se notificaron 3, 419,919 casos de dengue, incluidos 79 664 casos de FHD y 982 defunciones solamente en las Américas, con una tasa de letalidad de 1,2 % y la circulación de los 4 serotipos, lo que aumenta el riesgo de aparición de las formas más graves de la enfermedad.^{24,70} Unos 2,5 mil millones de personas (dos quintos de la población mundial) corren el riesgo de contraer la enfermedad.^{14,86}

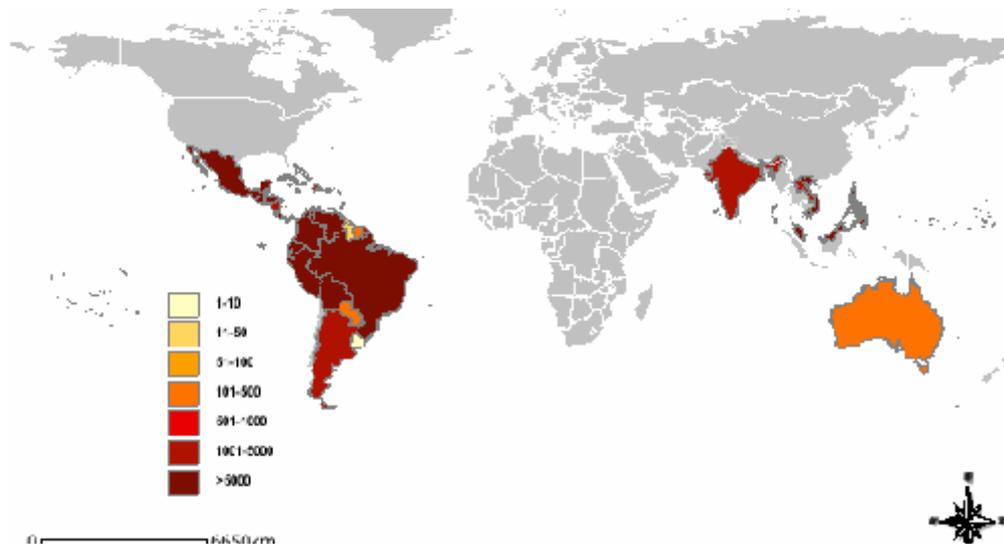


Figura 1. Distribución mundial de las áreas predominantes del mosquito vector del virus del Dengue (*Ae. aegypti*).⁸⁶

El aumento rápido de las poblaciones urbanas de mosquitos se relaciona directamente con el incremento del número de personas en contacto con este vector, especialmente en zonas favorables a la reproducción de los mosquitos, como aquellas en las que es frecuente el almacenamiento doméstico de agua y no disponen de servicios adecuados de eliminación de residuos sólidos (**figura 1**).^{48,29}

1.2 Epidemiología en México

La incidencia del dengue ha aumentado extraordinariamente en todo el mundo en los últimos años. Los primeros casos de dengue en México se presentaron en 1941, donde el número de enfermos y su impacto en la salud fueron controlados gracias a las medidas sanitarias exitosamente implementadas, de forma tal que se eliminó de las listas de padecimientos sujetos a notificación por muchos años. Sin embargo, esta condición sólo pudo ser mantenida durante dos décadas, periodo después del cual nuevamente se inició la infestación paulatina del territorio nacional a través de la frontera con Guatemala en 1978. Más tarde los movimientos internos de población contribuyeron sustancialmente a su expansión. De 1978 a 1999 se registraron 418,281 casos de dengue (**figura 2**).^{54,57}

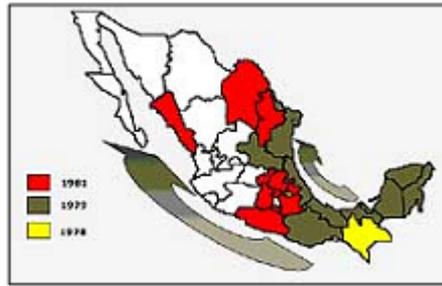


Figura 2. Reintroducción del dengue en la República Mexicana 1978-1981.⁵⁷

Un estudio realizado en el Instituto Mexicano del Seguro Social reportó un total de 2,743 casos de FHD de enero de 1995 a junio del 2003.⁵⁸ Recientemente la Secretaría de Salud reportó que en el 2008 hubo 28,015 casos de Fiebre por dengue (FD) y 7,588 personas con FHD. En 2009 se reportaron 11,396 personas infectadas con dengue, mientras que en 2010 se presentaron 13,319 y 3,529 con FHD. Actualmente, hasta la semana 44 de este año se han reportado 11,192 casos, de los cuales 8,031 han sido FD y 3,161 casos de FHD (figura 3 y 4).⁹

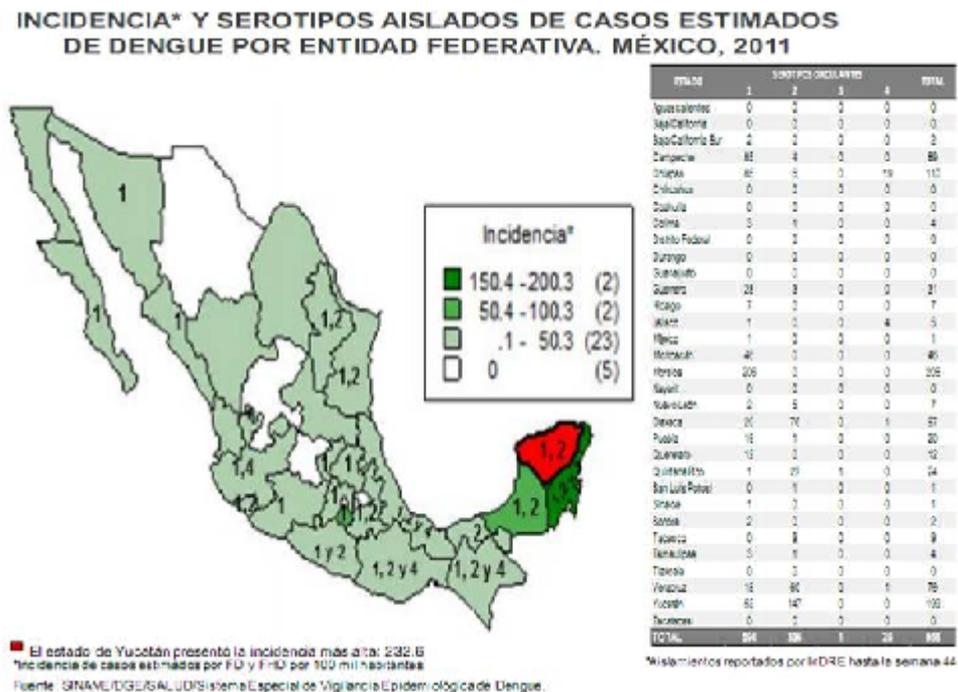


Figura 3. Panorama epidemiológico de FD y FHD en México por Entidad Federativa en la semana 44 acumulado hasta el 8 de noviembre del 2011.⁹

Casos de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue 2010 - 2011*

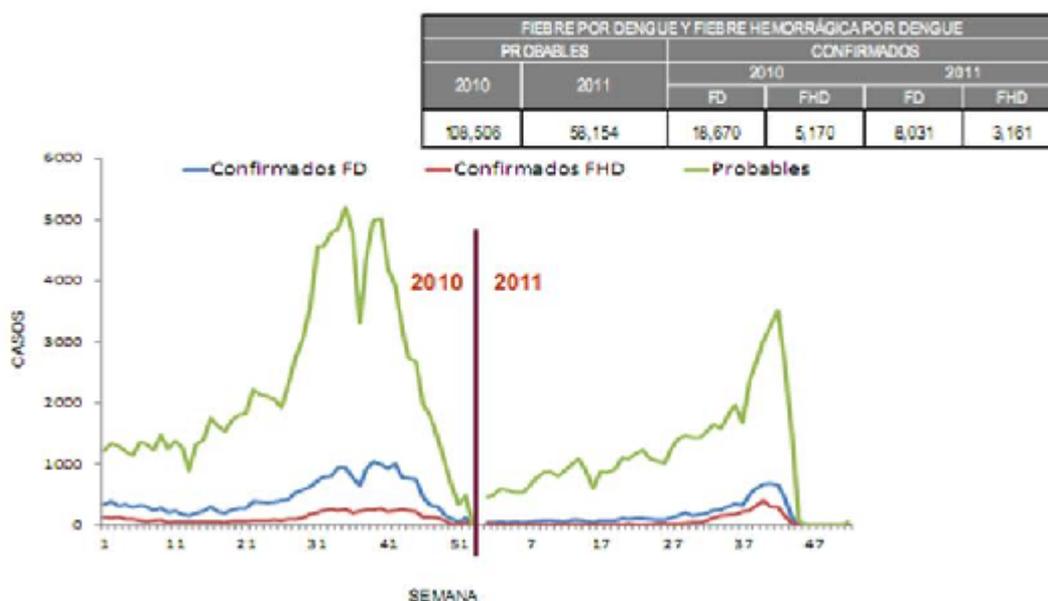


Figura 4. Casos de FD y FHD en el 2010-2011.⁹

Como se puede observar, en los últimos años esta patología se ha incrementado y dispersado a todos los Estados que cuentan con condiciones ecológicas para su transmisión, incluso en sitios que anteriormente no eran considerados como propicios para la reproducción del vector.⁵⁶ El riesgo se hace manifiesto con la circulación de los serotipos 1 y 2, los más prevalentes en varias entidades del país.⁵⁶

1.3 Agente etiológico

El virus del dengue es un arbovirus y pertenece al género *Flavivirus* familia *Flaviviridae* que agrupa virus RNA de cadena sencilla de polaridad positiva que se multiplican en células de vertebrados y de insectos vectores.^{8,14,43,71}

El genoma está compuesto por una sola molécula de ácido ribonucleico (RNA) de cadena sencilla lineal, polaridad positiva, de 10,703 nucleótidos (aproximadamente 11 kb) que codifica para 3 proteínas estructurales (C, preM/M, E) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5).^{24,48} El virión infeccioso está compuesto por 6 % de RNA, 66 % de proteínas, 9 % de carbohidratos y 17 % de lípidos.^{48,52}

La partícula viral infecciosa mide entre 30-40nm de diámetro, es esférica y tiene una envoltura lipídica proveniente de la membrana del retículo endoplásmico de la célula hospedera. El material genético se encuentra protegido por una nucleocápside icosaédrica de 25-30 nm.^{14,48,52}

1.4 Transmisión

Los virus del Dengue se transmiten al ser humano por la picadura de los mosquitos del género *Aedes* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Aedes polynesiensis*). El vector principal y el más importante es *Ae. aegypti*, pero *Ae. albopictus* y *Ae. polynesiensis* pueden actuar como vectores dependiendo de la ubicación geográfica. Por ejemplo *Ae. albopictus* ha sido encontrado como causante de la transmisión de dengue en Tailandia, India, Singapur y México.⁴⁸

De todos los vectores mencionados anteriormente, las hembras *Ae. aegypti* son los mejores vectores y adquieren el virus cuando se alimentan de la sangre de una persona en etapa de viremia permaneciendo infectadas el resto de su vida.^{14,48} Los seres humanos infectados son los principales portadores y multiplicadores del virus, sirviendo como fuente para los mosquitos no infectados.^{14,24,48}

Tras la incubación del virus durante 8 a 10 días, un mosquito infectado es capaz de transmitir el virus por el resto de su vida durante la picadura y la alimentación y también pueden transmitir el virus a su descendencia por vía transovárica (a través de los huevos).^{34,48} Se ha observado que las condiciones climáticas, tales como la temperatura y la humedad, especialmente de la temporada de lluvias, pueden ayudar en la proliferación del mosquito.^{49,70,80,82,94}

1.5 Características clínicas

El dengue es una enfermedad grave similar a la gripe que afecta a los lactantes, los niños pequeños y los adultos. Las infecciones por dengue pueden ser asintomáticas o causar una fiebre indiferenciada, fiebre por dengue (FD), fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y síndrome de choque por dengue (SCD).²⁶

Las características clínicas varían según la edad del paciente. Los lactantes y

niños pequeños pueden tener fiebre y erupciones cutáneas, los niños mayores y los adultos pueden tener fiebre leve o la enfermedad invalidante clásica, de aparición brusca, con fiebre elevada, cefalea grave con dolor retroocular, muscular, articular, y algunas erupciones cutáneas.⁴⁸

1.5.1 Fiebre Indiferenciada:

Esto por lo general ocurre después de una infección primaria, pero también puede ocurrir durante la infección secundaria. Clínicamente es indistinguible de otras infecciones virales.⁴⁸

1.5.2. Fiebre por Dengue:

La FD es conocida también como “tracazo” o “fiebre quebrantahuesos”. Puede producirse durante la infección primaria o secundaria. El inicio es repentino con fiebre alta, dolor de cabeza (especialmente en la zona retro-ocular, que se incrementa con el movimiento de los ojos), artralgias, mialgias, anorexia, malestar abdominal, conjuntivitis congestión faríngea y a veces una erupción papulo macular. La fiebre puede ser bifásica y tiende a durar 2-7 días.^{3,55} La recuperación de los pacientes que padecen este cuadro ocurre por lo general sin incidentes, pero puede ser prolongada, especialmente en los adultos.⁸⁶

1.5.3 Fiebre Hemorrágica por Dengue:

Los 4 serotipos del dengue han sido asociados con FHD. Las variaciones en las cepas del virus entre los cuatro serotipos pueden influir en la gravedad de la enfermedad. Las infecciones secundarias (en particular con el serotipo 2) tienden más a provocar una enfermedad más severa y fiebre hemorrágica por dengue.^{11,57} La fiebre hemorrágica por dengue, es una complicación potencialmente mortal que se caracteriza por fiebre elevada, a menudo con hepatomegalia, y en casos graves con insuficiencia circulatoria. Con frecuencia empieza con un aumento brusco de la temperatura acompañado de rubor facial y otros síntomas gripales. La fiebre suele durar 2 a 7 días y puede llegar a 41 °C, acompañándose a veces de convulsiones y otras complicaciones.^{45,93}

1.5.4 Síndrome de choque por Dengue:

El SCD está asociado con una alta tasa de mortalidad.⁴³ Suele presentarse en el curso de un cuadro de FHD, por lo general entre el tercero y quinto día de evolución; sin embargo, de acuerdo a literatura, puede manifestarse inmediatamente dos o tres días después de la infección y excepcionalmente en pacientes asintomáticos o con cuadro febril inespecífico de dengue.^{24,35} Como en todo cuadro de choque, hay manifestaciones de insuficiencia circulatoria: piel fría y congestionada, cianosis perioral o de las extremidades, vómito, llenado capilar lento, taquicardia, tensión arterial disminuida o imperceptible, pulso rápido y débil o imperceptible, oliguria; puede haber además inquietud, agitación y alteraciones en el estado de conciencia, como letargo o confusión.⁴⁸

1.6 Prevención y control

Actualmente, el único método de controlar o prevenir la transmisión del virus del Dengue consiste en la lucha contra los vectores.

El control de los vectores se basa en la implementación de estrategias para el control del mosquito y el uso de métodos químicos. Esto incluye, por un lado, la eliminación adecuada de los residuos sólidos y la mejora de las prácticas de almacenamiento de agua; y por otro la aplicación de insecticidas larvicidas.^{22,82,86} El uso de los insecticidas apropiados a los hábitats larvarios, en particular aquellos presentes en los hogares, como las vasijas de almacenamiento de agua, evita la cría de mosquitos durante varias semanas, pero debe repetirse periódicamente. La fumigación se usa más ampliamente para el esparcimiento del insecticida larvicida. Los insecticidas utilizados para el tratamiento de los envases que acumulan agua incluye Temefos, 1% gránulos de arena y reguladores del crecimiento de los insectos.⁸² Bajos volúmenes de bifentrina tienen efectos tanto larvicidas como contra insectos adultos, lo que ha resultado ser el más efectivo para el control del vector.⁴⁶ Las medidas de control deben acompañarse de una monitorización y vigilancia activas de la población natural de mosquitos para determinar la eficacia del programa.^{41,47}

Como control biológico se han utilizado con éxito pequeños peces (*Gambusia affinis* y *Poecilio reticulate*) y copépodos (crustáceos diminutos) que se alimentan de los mosquitos.^{48,86}

2.0 ANTECEDENTES

El mosquito *Ae. aegypti* es una amenaza para la salud pública por ser el vector transmisor del virus del Dengue. Al suspenderse las campañas de erradicación durante las décadas de 1970 y 1980, el mosquito reinvasió a casi todos los países americanos.⁸¹ En los años 80s y 90s, el virus y el mosquito vector continuó su expansión geográfica causando procesos de colonización y aumentando la emergencia de FHD.²⁵ Aunado al descuido de los programas de control y vigilancia del mosquito, al transporte moderno y a la globalización, el rápido crecimiento de la población ha condicionado un proceso de urbanización descontrolada con deficiencia en los servicios básicos, como el suministro de agua potable, ha favorecido la expansión del virus y el mosquito vector, haciendo que éste se adapte a nuevos ambientes.²⁵ En resumen, el factor humano, ambiental y evolutivo han originado poblaciones polimórficas de *Ae. aegypti* a nivel genético que podrían influenciar su capacidad vectorial para los virus que trasmite.⁸¹

Se ha reportado que los virus tienen la capacidad de convivir por periodos prolongados de tiempo en ciertas células hospederas, originando un tipo de infección que se denomina infección persistente. Este tipo de infecciones son fácilmente establecidas cuando una célula de mosquito es infectada con virus de las familias *Togaviridae*, *Alfavirusidae* o *Flaviviridae*.³⁰ La capacidad de establecer una infección persistente *in vivo* e *in vitro* se ha reportado anteriormente para *Flavivirus*, incluyendo la fiebre amarilla (YFV), encefalitis de San Luis (SLE), la encefalitis japonesa (JEV), encefalitis transmitida por garrapatas (TBE), encefalitis del Nilo Occidental (WNV), y el virus de la encefalitis del Valle Murray (MVE).^{12,29,53,66,75}

En varios casos, la exposición de una célula previamente infectada (infección aguda) o persistentemente infectada con un determinado virus interfiere con el proceso de una segunda reinfección, fenómeno conocido como interferencia viral.³⁸ Por ejemplo, las células, ya sean de vertebrados o invertebrados, infectadas por *Alfavirus* no pueden ser reinfectadas con el mismo virus u otros que tengan una estrecha relación con él. Las células de mosquitos de *Ae. albopictus* infectadas con el virus Sindbis no son capaces de replicar el RNA de un nuevo virus Sindbis, pero tampoco permiten la replicación del genoma del virus de la encefalitis equina (un

virus relacionado ya que ambos pertenecen a la familia *Togaviridae*) fenómeno conocido como exclusión por superinfección o interferencia viral homóloga.⁷⁶ Por otra parte, las células infectadas por *Alfavirus* que no pueden ser reinfectadas por un virus que no tenga ninguna relación con él, presentan el fenómeno conocido como interferencia viral heteróloga.¹⁷

Aunque todavía no se entienden bien los mecanismos por los cuales ocurren estos fenómenos de interferencia, se han sugerido una serie de factores que podrían ser los responsables, como la competencia por los receptores de la célula huésped o por factores intracelulares del huésped, la producción de proteínas anti-virales (tipo interferón en vertebrados) por la célula infectada, la producción de genomas virales defectuosos y la producción de proteasas por el primer virus infectante.^{47,66}

Estudios realizados en vertebrados, en células de riñón de hamster recién nacidos (BHK-21) infectadas por un virus Sindbis (SINV) termosensible y luego reinfectadas con el mismo pero termoestable, se observó que la expresión de los genes no estructurales del primer virus era importante para el establecimiento de la exclusión homóloga y ésta era debida principalmente a que el segundo virus, es decir, el “interferido”, era capaz de traducirse pero no de replicarse.¹ Se conoce muy poco sobre la exclusión homóloga en células de mosquito *Ae. albopictus* infectadas con el virus Sindbis, pero Stollar y Shenk han demostrado que el RNA del virus superinfectante, al igual que en las células de mamífero, no se puede replicar y que este bloqueo ocurre a nivel intracelular y no de penetración ya que, aunque el RNA viral sea transfectado, no es capaz de replicarse en las células de mosquitos infectados.^{31,76}

Uno de los mecanismos que se ha sugerido para explicar este fenómeno de interferencia viral en células infectadas de manera persistente por *Flavivirus* es la producción de partículas virales defectuosas interferentes (DI) que son generadas a partir de un virus parental y capaces de inhibir la replicación de los virus silvestres que le dieron origen.^{63,66} En relación a esto, el análisis de las células de mosquitos persistentemente infectadas con el virus del Dengue han demostrado características tales como la resistencia a superinfecciones con virus homólogos y la generación de placas líticas cuyo desarrollo es sensible a cambios de temperatura, lo que sugiere

la aparición de poblaciones de virus con mutaciones, probablemente partículas DI, aunque recientemente se ha informado que la infección persistente generada por el JEV puede atribuirse a la presencia de una proteína viral NS1 trunca en ausencia de cualquier virus detectable de tipo DI.^{30,40} McLinden *et al.* (2008) demostraron que la expresión de la proteína NS5 del Dengue serotipo 2 disminuían de manera importante los niveles de replicación del virus del VIH *in vitro*. Aparentemente la inhibición de VIH es mediada por la proteína NS5 de DENV-2 debido a una interacción por una proteína no identificada que modifica de la susceptibilidad a infecciones por VIH. Efectos similares fueron observados cuando la proteína NS5 de virus relacionados con *Flavivirus* (GBV-C) fue expresada en células Jurkat.⁵¹

Otros estudios revelan que cuando células de mosquito C6/36 persistentemente infectadas con densovirus son inoculadas con el virus del Dengue serotipo 2 (DENV-2), manifiestan una resistencia a ser reinfectadas, esto evidenciado por el desarrollo de un bajo efecto citopático comparado con las células que no estaban persistentemente infectadas, lo que habla de la existencia de interferencia de tipo heterólogo.⁵¹

Por otro lado, en el trabajo desarrollado por Gaines *et al.* 1996, se demostró que cuando se emplea un vector viral basado en el virus Sindbis (dsSIN) el cual expresaba, ya sea el RNA sentido o antisentido de la proteína prM del DENV-2 en las células C6/36 de *Ae. albopictus* se generaba resistencia a otras reinfecciones mientras que el control permitía la replicación de los nuevos virus.¹⁸ Otros investigadores han reportado que probablemente la expresión de una porción blanco del genoma del patógeno en la célula hospedera podría inducir una resistencia derivada de patógeno ("Pathogen-Derived Resistance", PDR) pero se observó que sólo generaba resistencia específica para el serotipo de Dengue del cual se había tomado la porción efectora ya que para otros serotipos no se generaba resistencia.^{18,60} En relación a lo anterior Adelman *et al.* (2001) fueron capaces de inducir resistencia a la infección por el DENV-2 en las mismas células C6/36 tras una infección con virus dsSIN capaces de transcribir en sentido o antisentido, RNA derivado del gen que codifica para la proteína prM del mismo virus, indicando que aunque la interferencia era específica de serotipo, la orientación del gen efector

no era tan relevante. Otros estudios realizados con este tipo de vectores dsSIN conteniendo secuencias de virus heterólogos mostraron que son capaces de inducir una respuesta de tipo silenciamiento post-transcripcional de genes (por sus siglas en inglés, PTGS) o tipo RNAi, desencadenado en los mosquitos un mecanismo de defensa ante una infección viral.^{2,18} Teniendo conocimiento de este mecanismo de defensa en las células de mosquito, se ha desarrollado por ingeniería genética, resistencia de los mosquitos hacia las infecciones virales utilizando elementos transponibles que expresan RNAs efectores en promotores de genes activos en los mosquitos.⁶⁰ A pesar de que mediante diversos estudios, se ha generado información para tratar de explicar cuáles podrían ser los mecanismos moleculares que inducen a la interferencia viral como respuesta de defensa celular, este proceso todavía no queda muy claro.

En relación a lo anterior, se ha observado que las células de *Ae. albopictus* persistentemente infectadas con el virus Sindbis liberan en el medio de cultivo un agente de bajo peso molecular capaz de inhibir la replicación viral durante la fase aguda de la infección. Este agente es rápidamente inactivado cuando es tratado con proteinasa K o con calor pero no cuando se utilizan anticuerpos.⁵⁹ Esta proteína con efecto antiviral, obtenida a partir de tres líneas celulares independientes de *Ae. albopictus*, aparentemente inhibe la síntesis del RNA viral y este efecto es más importante cuando las células son tratadas antes de la infección.^{10,69} Se realizó también un estudio de los efectos de un péptido puro sobre el crecimiento de las células de mosquito, encontrando que el tratamiento en células de *Ae. albopictus* no infectadas con el virus Sindbis provoca un arresto temporal de la división celular acompañada por la adquisición de una resistencia a la infección viral y la producción constitutiva de una proteína antiviral no caracterizada.⁴⁷

Estos estudios previos involucraban la participación de mecanismos celulares para explicar la interferencia viral homóloga: ya sea la producción de algún péptido antiviral o una vía relacionada con RNAi pero no ha sido sino hasta fechas recientes que los mecanismos de defensa antiviral en artrópodos se han empezado a estudiar, indicando que la inmunidad innata juega un papel importante en la limitación de la

infección por patógenos, tanto a través de la producción de moléculas efectoras como de péptidos antimicrobianos así como mediante la fagocitosis y encapsulación, secreción de las barreras físicas y melanización.^{5,36,39,44,64} Los estudios que se han realizado principalmente en el insecto *Drosophila melanogaster* han demostrado que la respuesta inmune a infecciones virales se debe a la intervención de los RNAi, la vía Jak-Stat, mecanismos de apoptosis, la vía Toll y la vía de inmunodeficiencia (Imd).^{38,42} La activación de la vía Toll por los microorganismos ocurre a través de receptores de reconocimiento de patrones (“Patterns Recognition Receptors”, PRR’s) que conducen a una cascada de eventos para la degradación de la proteína denominada CACTUS, la cual es una proteína represora específica de DORSAL, un factor de transcripción que, al igual que Dif, se translocan al núcleo para activar genes específicos y con ello provocar un rápido aumento de compuestos antimicrobianos y otros efectores. La vía de transducción del sistema Toll en *Drosophila* muestra una similitud remarcable con la vía de la interleucina (IL) 1 en mamíferos, que se asocia con la activación del factor de transcripción NF-κB responsable de múltiples eventos inmunes e inflamatorios. La vía de Imd participa en la defensa contra las bacterias Gram-negativas y tras su activación se sigue una cascada de acontecimientos similares a los de la vía de Toll, con degradación de su supuesto regulador negativo “CASPAR”, la translocación del factor de transcripción Relish al núcleo y la producción de los efectores y compuestos antimicrobianos. Análisis genómicos comparativos han demostrado un notable grado de conservación de estas vías de señalización inmunitaria en *D. melanogaster*, *Anopheles gambiae* y *Ae. aegypti*.⁸⁷ Respecto a esto, Xi *et al.* (2008), encontraron que la infección por el virus del Dengue activa la vía de Toll y varios genes asociados. También demostró que la flora natural del mosquito desempeña un papel en la modulación de la infección por el virus del Dengue, posiblemente a través de la estimulación basal del sistema inmunológico del mosquito.⁸⁷ En relación a esto, en otro estudio, se analizó tanto la respuesta fisiológica como la expresión de los genes en *Ae. aegypti* en el intestino medio cuando fueron infectados con DENV-2, encontrando varios que participan en la vía de la respuesta inmune. Estos genes correspondieron PRR’s y a apoptosis y la prominente activación de la vía Toll por PPRs sugirió que está involucrada en la

respuesta de defensa anti-dengue. Posteriormente estos investigadores silenciaron los genes CACTUS y CASPAR involucrados en la vía Toll e Imd respectivamente, observando que la baja expresión de CACTUS reducía notoriamente la infección por dengue, mientras que CASPAR no afectó este proceso, corroborando que más que la vía Imd, era la Toll la responsable de la respuesta del vector contra el virus. Para obtener una mayor evidencia de la participación antiviral, silenciaron a MYD88, proteína intracelular que contiene dominio de reconocimiento a TIR (Toll-IL1) y observaron que los títulos virales aumentaron, comprobando una vez más la importancia de esta vía para controlar la infección del virus del Dengue en el mosquito.^{42,87}

Con la finalidad de entender más a fondo todo el proceso de infección por el virus del Dengue en su vector, en el 2010, Barón *et. al.* realizaron un estudio en donde analizan la expresión diferencial de genes del intestino medio de insectos de *Ae. aegypti* que son susceptibles y resistentes de manera natural a infecciones virales con DENV-2. Cuando analizaron los intestinos de los mosquitos susceptibles encontraron activos genes relacionados con el citoesqueleto, factores de transcripción, genes de señalización y nuevamente de la respuesta inmune. La mayoría de los genes identificados principalmente estuvieron asociados ya sea tanto con la inhibición o la inducción de la apoptosis, los cuales han sido identificados y caracterizados en insectos pero su participación durante infecciones en arbovirus todavía no ha sido bien descrita. También se identificó al complejo de la ubiquitina ligasa, que participa en la degradación de proteínas en el proteasoma durante varios procesos celulares y se ha visto que en *D. melanogaster*, la sobreexpresión de ubiquitina conduce a la degradación de CACTUS permitiendo a la proteína dorsal translocarse al núcleo para activar factores de transcripción, proceso que ocurre en la vía Toll; citocromo (C y p450), proteínas involucradas en funciones celulares como estrés oxidativo, respiración y apoptosis, sin embargo en los insectos todavía no ha sido completamente caracterizado.⁷⁶ La sobreexpresión de estos genes sugiere que podrían estar relacionados con el proceso de infección, dado que la presencia de moléculas anti y pro-apoptóticas podría indicar que los virus manipulan la maquinaria celular para replicarse y diseminarse ya que estos genes no fueron observados tras

analizar el intestino de los mosquitos resistentes al virus del Dengue. Contrario a este resultado, los genes encontrados durante el análisis de los intestinos de mosquitos resistentes, fue la presencia de un gen inhibidor de tripsina, proteína la cual se ha reportado podría afectar la infección por el virus del Dengue, puesto que cuando es inhibida o disminuida su expresión, se ha visto que esta molécula disminuye o incrementa la infección de dengue en el mosquito. Se cree que los genes encontrados en los mosquitos susceptibles pero ausentes en los resistentes pueden deberse a que el virus no logró entrar a las células del intestino medio, no pudo establecer infección o que existen eventos tempranos apoptóticos que eliminan al virus.⁵

Hasta el momento ya se está empezando a identificar aquellos genes que participan en la respuesta celular de los mosquitos ante las infecciones agudas ocasionadas por el virus de Dengue pero aún se carece de información para entender que ocurre cuando las células de mosquito están infectadas de manera persistente, conocimiento que nos ayudaría a comprender los mecanismos involucrados en la infección por el virus del Dengue así como los mecanismos de interferencia viral asociados con ella, tal como ocurre naturalmente en los mosquitos.

Debido a la existencia de variantes genéticas en el vector, ha sido necesario su estudio para poder combatir al Dengue. A principios de los años 70s, las isoenzimas se emplearon extensamente como marcador para analizar la estructura genética de poblaciones naturales de *Ae. aegypti* y se encontró una baja diferencia genética entre poblaciones del mosquito de todo el mundo.⁷⁹ En 1995 Vos y Col., desarrollaron la técnica *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP, por sus siglas en inglés), para generar marcadores que permitieran identificar secuencias desconocidas, basado en las técnicas de RFLP y PCR, mediante el uso del genoma completo del organismo. Los AFLP's son marcadores que proporcionan una información genérica a través del uso de enzimas de restricción para obtener fragmentos de DNA con extremos cohesivos, los cuales se ligan a adaptadores de doble cadena y finalmente este producto ligado servirá como molde para una amplificación por PCR.⁸⁴ Los AFLP's presentan ciertas ventajas ante otras técnicas,

ya que detectan un elevado número de polimorfismos y no se requiere del conocimiento de una secuencia específica, lo que lo convierte en una herramienta potencialmente útil para el estudio genético de una población.^{84,88,89,90} Esta técnica inicialmente fue empleada para el análisis de diversidad genética en plantas y bacterias y luego utilizada satisfactoriamente en insectos. Por su robustez, alta reproducibilidad y elevado poder discriminativo se convirtió en una técnica ideal para el estudio de variabilidad genética de organismos como *Ae. aegypti*.^{32,72,73}

En el transcurso de los años, los análisis de AFLP's han dado información acerca de la variabilidad y estructura poblacional de *Ae. aegypti*. En 1999 Yan y Col., utilizaron y compararon los marcadores de AFLP y RFLP para hacer estimaciones de la variabilidad genética en poblaciones de *Ae. aegypti* en Trinidad y Tobago e Indias Occidentales.⁸⁸ De manera similar, en Phnom Penh, Cambodia, se compararon tres marcadores moleculares; AFLP, isoenzimas y microsatélites, para determinar la variabilidad genética del mosquito vector.⁶³ A nivel local, en el Noroeste de México, se determinó la diversidad genética de *Ae. aegypti* mediante AFLP y microsatélites y se evidenció un proceso de reinvasión, resaltando el gran poder de discriminación y reproducibilidad de ésta técnica.⁶⁷ Por otro lado, también ha sido utilizada para determinar la expresión diferencial de genes en el proceso de tuberización de la papa, permitiendo aislar tres transcritos que codifican para proteínas que participan en dicho evento.⁴ De manera similar, en bovinos, se pudo identificar dos marcadores genéticos de RNAm que se expresaban diferencialmente en bovinos machos y hembras.⁹¹ En lo referente a plantas, el análisis de la expresión diferencial génica ha sido sugerida como una forma de estudiar la tolerancia a estrés abiótico en cultivos, así como para entender la base molecular genética a la tolerancia a la sequía en pastos mediante la identificación de genes de respuesta a estrés hídrico en plantas xerofíticas adaptadas (*Festuca mairei*).⁹²

3.0 JUSTIFICACIÓN

La incidencia de enfermedades transmitidas por mosquitos está aumentando entre las poblaciones humanas en todo el mundo.^{12,13}

El control del dengue se ha intentado mediante campañas contra el vector o el desarrollo de vacunas contra el virus. Los intentos por controlar a *Ae. aegypti* no han sido tan alentadores. El resurgimiento de FD y de la FHD ha sido debida a varios factores donde se incluyen el crecimiento de la población, la expansión de las ciudades con la consiguiente urbanización no planeada, abasto inadecuado del agua, aumento del desplazamiento de la población dentro y entre países con infraestructura sanitaria deficiente, la desaparición de los programas de control de mosquitos y aparición de resistencia a los insecticidas.²⁶ La prevención por medio de vacunas se ha planteado como la posibilidad más viable, aunque hasta el momento no existe ninguna eficaz en el mercado.

Las infecciones persistentes ofrecen un modelo interesante para el estudio de las interacciones entre el virus y su célula huésped. Antecedentes previos sugieren que los mosquitos poseen mecanismos de defensa contra las infecciones virales pero se desconoce todavía mucho de lo que ocurre con ellos durante las infecciones persistentes. La identificación de genes que se expresan durante este tipo de infección facilitaría la identificación de posibles blancos farmacológicos.

4.0 OBJETIVO

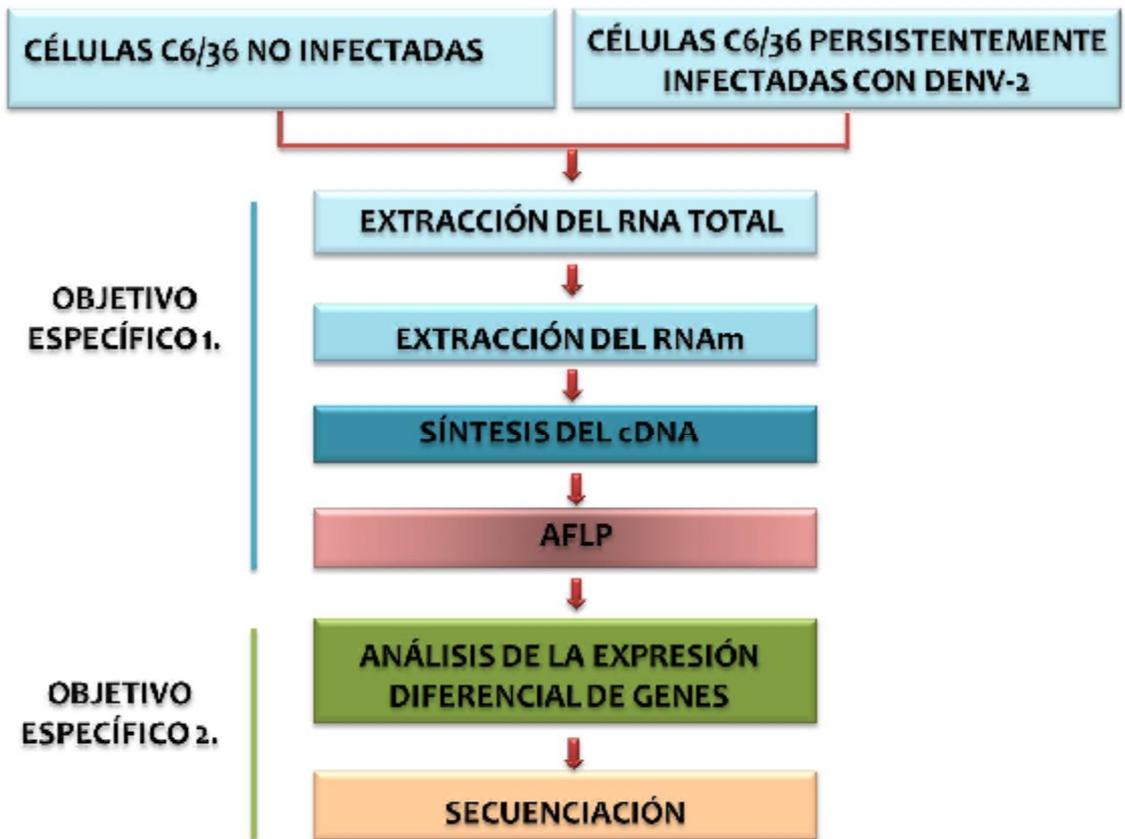
4.1 Objetivo general:

Determinar la expresión diferencial de genes entre células C6/36 de mosquitos *Aedes albopictus* no infectadas y las persistentemente infectadas con el virus del Dengue serotipo 2.

4.2 Objetivos específicos:

- Estandarizar la técnica de AFLP en células C6/36.
- Analizar la expresión diferencial de genes en la línea celular C6/36 en ambas condiciones.

5.0 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Línea celular C6/36 de *Aedes albopictus*

En el laboratorio III de Virología del IPN, se cuenta con la línea celular C6/36 de *Ae. albopictus*. Estas células han sido cultivadas en medio MEM (Gibco) suplementado con NaHCO₃ al 0.034%, suero fetal bovino al 10%, vitaminas (Gibco), aminoácidos no esenciales (Gibco) y penicilina (100U/mL)-estreptomicina (100ug/mL) (Sigma). Se creció en incubadora húmeda a 34°C sin CO₂ (Lab Line). Para el estudio de la expresión génica, se analizaron las células C6/36 no infectadas y las células C6/36 infectadas persistentemente con DENV-2 obtenidas en el laboratorio de virología de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. Ambas líneas se procesaron con las mismas técnicas que a continuación se describen.

6.2 Extracción de RNA total de las células C6/36.

La extracción del RNA total se realizó utilizando la técnica de extracción por Trizol, para la cual se utilizaron aproximadamente 2 botellas de cultivo de 75 cm² que contenían tanto las células C6/36 no infectadas como persistentemente infectadas. Todos los materiales empleados fueron previamente horneados a 200°C, para eliminar las RNasas y todas las soluciones se prepararon con agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC, ver anexo) (Sigma). La extracción del RNA total se realizó tal como sigue: se decantó el medio de cultivo, se agregaron 7.5 mL de Trizol (Invitrogen Life Technologies) por cada botella y se agitó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se homogenizó pipeteando suavemente el contenido de la botella y se transfirieron 1.250 mL del lisado celular a tubos Eppendorf de 1.5 mL (nuevos y esterilizados) que fueron incubados 5 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Después se agregaron 0.250 mL de cloroformo (Merk) a cada tubo y se agitaron vigorosamente por 15 segundos. Enseguida se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos sin agitación para que ocurriera el proceso de separación de fases. Inmediatamente se centrifugó a 12,000 rcf por 15 min a 4°C en la microcentrífuga (Eppendorf centrifuge 5417R) y la fase acuosa se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5mL (nuevos y esterilizados). Para precipitar el RNA se agregaron 0.625 mL de isopropanol (J.T Baker), se mezcló por inversión y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Se centrifugó a 12,000 rcf a 4°C por 10

minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol (J.T. Baker) al 75% preparado con agua DEPC, mezclando brevemente en vórtex (Sport). Se reempastilló el RNA total centrifugando a 7,500 rcf por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 50 µl de agua libre de RNasa.

6.3 Tratamiento del RNA total con DNasa.

Se realizó este tratamiento con la finalidad de eliminar la posible contaminación con DNA genómico. Para ello se utilizó el RQ1 RNase-Free DNase (Promega) y se siguió el protocolo descrito en el manual de Promega. Se agregó en un tubo Eppendorf de 50 µl: 40 µl RNA total en agua libre de nucleasa, 5 µl de amortiguador de reacción 10X (RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer), 1 µl RQ1 DNasa libre RNasa (1U/µg RNA) y para ajustar a un volumen final de 50 µl, se agregó agua libre de nucleasas. Posteriormente se incubó esta reacción a 37°C (incubadora Imperial III) por 30 minutos y finalmente se inactivó la enzima a 65°C por 10 minutos en el Thermo block (Lab Line).

6.4 Evaluación de la integridad del RNA total

Para evaluar la integridad del RNA total extraído se realizó una RT-PCR en un solo paso utilizando el kit RT-PCR Access® de Promega. Para ello se preparó una mezcla de reacción con 10 µl de *AMV/Tfl* Reaction buffer 5X, 1 µl de dNTP's mix 10mM (10mM de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP), 1 µl de oligonucleótido sentido ACAE 617 para actina (ACGTGAAATCGTTCGTGACATTAAG) (50 pmol/µl), 1µl oligonucleótido antisentido para actina ACAE 1136 (TTAACTTAGAAGCACTTGCGGTGAA) (50 pmol/µl), 2 µl de MgSO₄ 25mM, 1µl de *AMV*-RT, 1µl de *Tfl* y 1µl de RNA total para un volumen final de 50 µl. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

RT	{	48°C - 45 minutos	}	
		94°C - 4 minutos (inactivación de la enzima <i>AMV</i>)		
PCR	{	94°C - 30 segundos	}	35 ciclos
		55°C - 1 minuto		
		68°C - 1 minuto		
		68°C - 10 minutos		

La reacción se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycle y al término las muestras se almacenaron a -20°C . El producto amplificado se analizó en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X (ver anexo) teñido con bromuro de etidio y corrido a 100V. Finalmente se visualizó en un fotodocumentador de luz UV (EPI-Chemi Darkroom UVP Laboratory products).

6.5 Purificación del RNAm mediante cromatografía de afinidad en columnas de oligo-dT

A partir del RNA total se extrajo RNAm utilizando el kit MicrPoly(A) Purist Procedure (Invitrogen). El producto sirvió para la síntesis del cDNA.

Siguiendo el protocolo de Invitrogen, primero se resuspendió el RNA total en 250 μl de agua libre de nucleasa (incluida en el kit) y se agitó vigorosamente con vórtex (Sport) para completar la resuspensión de la pastilla. Se agregaron 250 μl de solución de unión 2X y se mezcló bien. Enseguida se transfirieron los 500 μl de la mezcla anterior a un tubo que contiene la resina y el oligo dT. Se incubó a 75°C por 5 minutos y posteriormente se agitó suavemente durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó (centrifuga modelo 5425R) a 4,000 rcf durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 500 μl de solución de lavado I y se agitó brevemente para mezclar. Enseguida se pasó la columna a un tubo colector y se centrifugó a 4,000 rcf por 3 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se repitió nuevamente el paso anterior. Se agregaron 500 μl de solución de lavado II y se centrifugó a 4,000 rcf por 3 minutos a temperatura ambiente. Se colocó la columna dentro de un tubo colector nuevo, se agregaron 200 μl de solución de almacenaje (precalentado) e inmediatamente se centrifugó a 5,000 rcf por 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se precipitó con 20 μl de acetato de amonio 5M (J.T.Baker), 1 μl de glicógeno y 550 μl de etanol al 100% (J.T. Baker). Después se centrifugó a 11,900 rcf por 30 minutos a 4°C . Se retiró el sobrenadante, se agregó 1mL de etanol al 75% (J.T. Baker) y se agitó con vórtex (Sport) brevemente. Se re-empastilló centrifugando a 11,900 rcf por 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Finalmente la pastilla se resuspendió en 200 μl de agua libre de nucleasas.

6.6 Cuantificación del RNAm por espectrofotometría.

Para cuantificar el RNAm extraído, se agregó 1 μ l del RNAm obtenido en el paso anterior y se completó con agua DEPC un volumen final de 199 μ l (dilución 1:200). La medición se realizó en un espectrofotómetro (Beckman DU 650) con luz UV y se utilizó una absorbancia a una longitud de onda de 260/280 nm. Para el cálculo de la concentración del RNAm se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{RNA } \mu\text{g/mL} = (A_{260})(40)(\text{Factor de dilución})$$

Como parámetro de pureza se comparó la relación entre las absorbancias ($A_{260/280}$).

6.7 Síntesis de cDNA de doble cadena a partir del RNAm.

La síntesis de la doble cadena de cDNA se realizó en dos pasos a partir del RNAm de ambas condiciones, para ello se utilizó el kit SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis (Invitrogen). El protocolo realizado se describe a continuación.

6.7.1 Síntesis de la primera cadena del cDNA

Para la síntesis de la primera cadena se preparó una mezcla de reacción que contenía 1 μ l del oligonucleótido dT (100pmol/ μ l), 3 μ g de RNAm en agua DEPC y para ajustar a un volumen final de 10 μ l se agregó agua libre de nucleasas. Enseguida se calentó a 70°C (Termo block Lab Line) durante 10 minutos e inmediatamente se colocó e hielo. Posteriormente se agregó 4 μ l de amortiguador First Strand 5X (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl), 2 μ l de 0.1M DTT, 1 μ l de dNTP mix 10mM (10mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Se agitó con vórtex (Sport) brevemente y se colocó el tubo a 45°C por 2 minutos. Después se agregaron 5 μ l de la enzima Super Script II RT (200U/ μ l), se mezcló bien y se incubó a 45°C (Termo block Lab Line) por 1 hora. Al término de la síntesis de la primera cadena el tubo se colocó en hielo.

6.7.2 Síntesis de la segunda cadena del cDNA.

El producto de la síntesis de la primera cadena se utilizó para generar la cadena complementaria del cDNA. A la reacción de síntesis de primera cadena, se agregó 91 μl de agua DEPC, 30 μl de amortiguador Second Strand Reaction 5X (100mM Tris-HCl (pH 6.9), 450 mM KCl, 23mM MgCl_2 , 0.75 mM $\beta\text{-NAD}^+$, 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 μl de dNTP mix 10mM (10mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 μl *E. coli* ligasa (10U/ μl), 4 μl de *E. coli* DNA polimerasa I (10U/ μl) y 1 μl de *E. coli* RNasa H (2U/ μl) para un volumen final de reacción de 150 μl . Se agitó con vórtex (Sport) brevemente y se incubó 2 horas a 16°C. Posteriormente se agregaron 2 μl de T4 DNA polimerasa y se incubó por 5 minutos más a 16°C. Al finalizar la síntesis de cDNA de doble cadena se colocó el tubo en hielo y se agregaron 10 μl de 0.5M de EDTA (BioRad) y 160 μl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Invitrogen;Merk;Merk); se mezcló bien y se centrifugó a temperatura ambiente por 5 minutos a 14,000 rcf para separar las fases. Se removieron cuidadosamente 140 μl de la fase acuosa y se transfirieron a un tubo Eppendorf nuevo y estéril de 1.5 mL. Se agregaron 70 μl de acetato de sodio (Sigma) 3M, seguido de 500 μl de etanol absoluto (J.T. Baker) frío. Se agitó vigorosamente la mezcla e inmediatamente se centrifugó a 14,000 rcf por 20 minutos a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante cuidadosamente y a la pastilla se le agregaron 500 μl de etanol (J.T. Baker) frío al 70%. Se centrifugó a 14,000 rcf por 2 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y finalmente se dejó secar el dcDNA a 37°C para evaporar el etanol. Finalmente se resuspendió en 20 μl de agua libre de nucleasas.

6.8 Polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (“Amplified fragment length polymorphism”, AFLP)

La técnica de AFLP ha sido utilizada para sistemas tanto eucarióticos como procarióticos^{80,90} y consiste en la digestión del DNA genómico utilizando dos enzimas de restricción, una de baja y otra con alta frecuencia de corte, respectivamente. Posteriormente estos fragmentos generados son ligados a adaptadores sintéticos que servirán como sitios de unión a oligonucleótidos que llevan en sus extremos 3', 0 y 3 nucleótidos selectivos que amplificarán en una PCR pre-selectiva y otra selectiva, respectivamente.^{75,90}

6.8.1 Digestión del cDNA de doble cadena con las enzimas de restricción *EcoR I* y *Mse I*.

Para producir fragmentos de restricción se realizó la digestión del cDNA de doble cadena utilizando dos enzimas de restricción: *EcoR I* y *Mse I* (Biolabs). Para realizar la doble digestión se siguió el protocolo (con algunas modificaciones) propuesto por Vos *et. al* (1995).

En un tubo de Eppendorf nuevo de 600µl se realizó una primera digestión usando la enzima *EcoRI*, para lo cual se colocaron 0.6µg de dcDNA, 2 µl de *EcoR I* (10U/µl), 2 µl de amortiguador 1X (50mM NaCl, 100mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 0.025% Tritón X-100, pH 7.5) y se ajustó a un volumen final de 20 µl con agua libre de nucleasas. Posteriormente se incubó a 37°C durante 1 hora. Para inactivar esta enzima la reacción se sometió a 65°C durante 20 minutos. Enseguida, para eliminar el exceso de sales, se precipitó con 2 µl de acetato de amonio (J.T. Baker) 5M y 50 µl de etanol (J.T. Baker) al 100%. Se dejó 2 días precipitando a 4°C y posteriormente se centrifugó (Centrífuga Eppendorf 5417R) a 12,000 rcf durante 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol (J.T. Baker) al 70% y se agitó con vórtex (Sport) por 30 segundos. Se centrifugó a 12,000 rcf por 10 minutos a 4°C, se descartó todo el sobrenadante y el DNA se resuspendió en 3 µl de agua libre de nucleasas.

Posteriormente se procedió a realizar la digestión con la enzima de alta frecuencia *Mse I*, para lo cual se agregó: 1 µl de *Mse I* (10U/ µl), 3 µl de DNA resuspendido en agua libre de nucleasa, 2 µl amortiguador 1X (50mM acetato de potasio, 20mM tris acetato, 10mM acetato de magnesio, 1mM dithiothreitol, pH 7.9) y se ajustó con agua libre de nucleasas a un volumen final de 20 µl. Se incubó 1 hora a 37°C y después la enzima se inactivó a 65°C por 20 minutos.

6.8.2 Preparación de los adaptadores de doble cadena

Las secuencias de los adaptadores utilizados para *EcoR I* y *Mse I* se muestran en la tabla 1. Los adaptadores se prepararon haciendo una mezcla equimolar de cada oligonucleótido complementario, 10µM para *EcoR I* y 100µM para

Mse I. Se obtuvieron mezclas de los adaptadores de *EcoR I* y *Mse I* a una concentración final de 5µM y 50µM respectivamente. Para que se llevara a cabo la hibridación se calentó en un termociclador (Eppendorf Mastercycle) a una temperatura de 85°C durante 5 minutos para cada par de oligonucleótidos y finalmente se dejó enfriando a temperatura ambiente. Para verificar el resultado, las hibridaciones y los oligonucleótidos no hibridados se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12% corrido a 100V por 20 minutos

NOMBRES	SECUENCIAS
ADAPTADOR DE EcoR I	
Cadena líder	5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3'
Cadena complementaria	5' AAT TGG TAC GCA GTC TAC 3'
ADAPTADOR DE Mse I	
Cadena líder	5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3'
Cadena complementaria	5' TAC TCA GGA CTC AT 3'

Tabla 1. Secuencia de los adaptadores para *EcoR I* y *Mse I*.⁸⁹

6.8.3 Preparación de la reacción de ligación de los adaptadores

Los adaptadores hibridados se ligaron a los fragmentos obtenidos del proceso de restricción del cDNA. Para ello, en un tubo Eppendorf de 600 µl se agregaron 20 µl de dcDNA previamente digeridos con las enzimas *EcoR I* y *Mse I*, 1.5 µl del adaptador *EcoR I* (5pmol), 3.5 µl del adaptador de *Mse I* (50 pmol), 1.2 µl de T4 DNA ligasa 5U y 8µl del amortiguador 5X (1mM de ATP disuelto en un amortiguador de reacción que contiene 10mM de Tris-HAc pH 7.5, 50mM de acetato de potasio, 5mM de DTT y 50ng/µl de BSA). Todo el volumen de la reacción de ligación fue ajustado a 40 µl con agua libre de nucleasas. La mezcla se dejó incubando por 48 horas a 37°C. Después se hizo una dilución 1:10 de la reacción anterior para utilizarlo como templado para la PCR-preselectiva. El resto, que no fue diluido, se guardó a -20°C.

6.8.4 Amplificación de los fragmentos de cDNA por PCR pre-selectiva

Para las reacciones de amplificación se utilizaron como templado el dcDNA

ligado a los adaptadores *EcoR I-Mse I* de ambas condiciones (C6/36 no infectadas y persistentemente infectadas con DENV-2). Se realizó primero una amplificación pre-selectiva utilizando oligonucleótidos que contienen secuencias complementarias a la cadena codificante para ambos adaptadores (**tabla 2**). Para la reacción de amplificación de dcDNA por PCR pre-selectiva, se agregó a un tubo Eppendorf: 2.5 µl del amortiguador 10X, 1.5 µl de MgCl₂, 2.5 µl de dNTP's mix 10mM (10mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 2.5 µl de oligonucleótido para *EcoR I* 10µM, 2.5 µl de oligonucleótido para *Mse I* 10µM, 5 µl de dcDNA, 0.5 µl de Taq Recombinante (5U/µl) y se agregó agua libre de nucleasas para ajustar un volumen final de 50 µl. En el termociclador (Eppendorf Martercycle) se programaron las siguientes temperaturas:

PCR-preselectiva {

94°C - 5 minutos
94°C - 1 minuto
56°C - 1 minuto
72°C - 1 minuto
72°C - 10 minutos

} 30 ciclos

NOMBRE	SECUENCIA
OLIGONUCLEÓTIDO PRE-SELECTIVO <i>EcoR I</i>	
E1	5' GAC TGC GTA CCA ATT C 3'
OLIGONUCLEÓTIDO PRE-SELECTIVO <i>Mse I</i>	
M1	5' GAT GAG TCC TGA GTA A 3'

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos para la PCR pre-selectiva.⁸⁹

6.8.5 Amplificación de los fragmentos de cDNA por PCR selectiva

El producto de amplificación pre-selectiva fue diluido en 1:10 y se utilizó como DNA blanco para esta fase. Los oligonucleótidos utilizados en esta reacción contienen 3 nucleótidos selectivos en el extremo 3' (**tabla 3**).

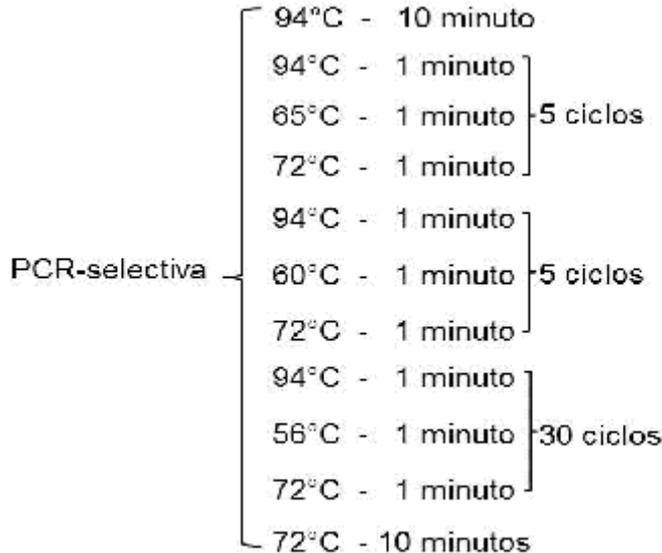
NOMBRE	SECUENCIA
OLIGONUCLEÓTIDO SELECTIVO PARA EcaRI	
ES1	5' GACTGC GTA CCA ATT CAC 3'
ES2	5' GACTGC GTA CCA ATT CAAC 3'
ES3	5' GACTGC GTA CCA ATT CAAG 3'
ES4	5' GACTGC GTA CCA ATT CACC 3'
ES5	5' GACTGC GTA CCA ATT CACG 3'
ES6	5' GACTGC GTA CCA ATT CACT 3'
ES7	5' GACTGC GTA CCA ATT CAGG 3'
NOMBRE	SECUENCIA
OLIGONUCLEÓTIDO SELECTIVO PARA MseI	
MS1	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACAC 3'
MS2	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACAT 3'
MS3	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACAA 3'
MS4	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACAG 3'
MS5	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACTC 3'
MS6	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACTA 3'
MS7	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACGA 3'
MS8	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACGT 3'
MS9	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACCG 3'
MS10	5' GAT GAG TCC TGA GTA ATAA 3'
MS11	5' GAT GAG TCC TGA GTA ATAG 3'
MS12	5' GAT GAG TCC TGA GTA ATTA 3'
MS13	5' GAT GAG TCC TGA GTA ATCA 3'

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos que fueron utilizados para realizar la PCR selectiva. Las letras en negritas corresponden a los oligonucleótidos selectivos adicionados en el extremo 3'.⁸⁹

Se realizaron 48 combinaciones tal como se indica a continuación:

- ❖ ES1/MS1, ES1/MS3, ES1/MS4, ES1/MS5, ES1/MS6, ES1/MS8, ES1/MS10, ES1/MS11.
- ❖ ES2/MS1, ES2/MS3, ES2/MS4, ES2/MS5, ES2/MS7, ES2/MS10, ES2/MS11, ES2/MS13.
- ❖ ES3/MS1, ES3/MS2, ES3/MS3, ES3/MS4, ES3/MS6, ES3/MS7, ES3/MS8, ES3/MS9, ES3/MS10, ES3/MS11, ES3/MS12, ES3/MS13.
- ❖ ES4/MS1, ES4/MS2, ES4/MS4, ES4/MS5, ES4/MS6, ES4/MS7, ES4/MS10, ES4/MS11, ES4/MS12, ES4/MS13.
- ❖ ES5/MS10.
- ❖ ES6/MS1, ES6/MS2, ES6/MS6, ES6/MS11.
- ❖ ES7/MS3, ES7/MS4, ES7/MS6, ES7/MS10, ES7/MS11.

Para la reacción de amplificación de cDNA por PCR selectiva, se agregó a un tubo Eppendorf: 5 µl de amortiguador 10X, 5 µl de MgCl₂, 2.0 µl de dNTP's 10mM, 2.0 µl de oligonucleótido para *EcoR* / 10µM, 2.0 µl de oligonucleótido para *Mse* / 10µM, 3 µl de producto de PCR-preselectiva dilución 1:10, 0.5 µl de Taq recombinante 5U/µl y se agregó agua libre de nucleasas para ajustar a un volumen final de 50 µl. Se programó en el termociclador las siguientes temperaturas:



El producto de la PCR selectiva fue analizado en un gel de poliacrilamida al 12 % en amortiguador TBE 1X, corrido a 100 V.

6.9 Purificación de las bandas diferenciales

Para la purificación de las bandas analizadas en el gel de poliacrilamida se utilizó el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Las bandas de interés fueron cortadas y resuspendidas en un amortiguador de difusión (0.5 M de acetato de amonio, 10 mM de acetato de magnesio (J.T. Baker), 1mM de EDTA (BioRad) pH 8.0 y 0.1% de SDS (Sigma), 100mg del gel por cada 100-200 µl de amortiguador de difusión y se incubó a 50°C por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 13, 000 rpm por 1 minuto (Centrífuga eppendorf 5417R) y se colectó el sobrenadante en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, al cual se le añadieron 3 volúmenes de amortiguador QG. Se mezcló hasta observar una coloración amarilla. Enseguida se colocó la mezcla en la columna QIAquick y se centrifugó a 13, 000 rpm por 1 minuto. Para lavar se agregaron 750 µl de amortiguador PE y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto. Este paso se realizó 2 veces y luego se colocó la columna en un tubo nuevo para

agregar 30µl de agua de ampolla sobre la columna. Por último se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto y el DNA colectado se guardó a -20°C hasta su uso.

6.10 Reacción de ligación al vector pJET 1.2.

La reacción de ligación del producto amplificado por PCR al vector plasmídico pJET 1.2 (**figura 5**) se llevó a cabo a un volumen final de 20 µl, agregando: 10 µl de amortiguador de ligación 2X, 4 µl de producto PCR, 3 µl de agua libre de nucleasa y 1 µl de DNA Blunting Enzyme. Posteriormente se incubó la mezcla a 70°C durante 5 minutos y rápidamente se colocó en hielo. Enseguida se agregó 1 µl de pJET 1.2 Blunt Cloning Vector (50ng/µl) y 1 µl de T4 DNA ligasa, se mezcló la reacción y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente se incubó a 4°C durante 48 hrs.

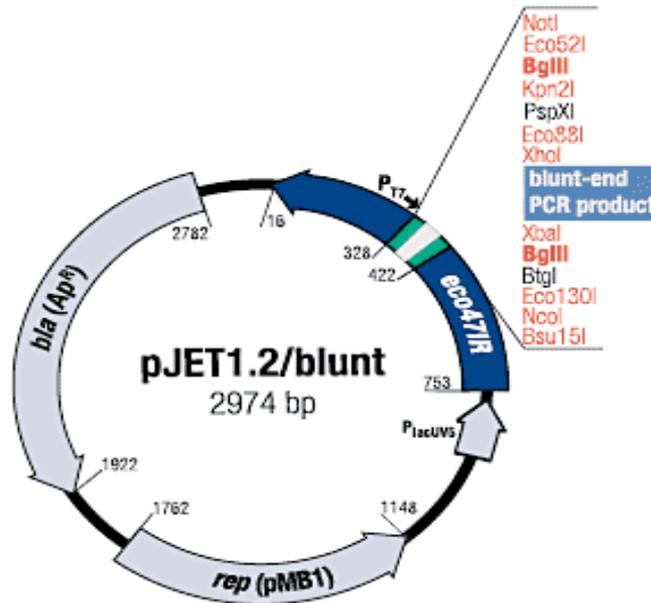


Figura 5. Mapa del vector pJET 1.2/blunt.

6.11 Preparación de células competentes.

Las células competentes que se utilizaron para la transformación del vector fueron preparadas el mismo día que se realizó la reacción. Para su preparación se siguió el siguiente protocolo:

A 10 mL de medio LB (Luria-Bertani) previamente esterilizado por autoclave

se le agregó, una colonia de la cepa bacteriana de *E. coli*. DH5 α . Todo el proceso de realizó bajo condiciones de esterilidad. Se dejó crecer en agitación a 200 rpm y a 37°C hasta que alcanzara una D.O. de 0.5-0.6. Entonces, se colocó un volumen de 1.0 mL en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos a 4°C (Centrifuga eppendorf 5417R) y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 150 μ l de CaCl₂ (150mM) (Sigma) estéril y frío, se resuspendió con mucho cuidado evitando la formación de burbujas. Se volvió a centrifugar a 10,000 rpm durante 2 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante, se agregaron 100 μ l de CaCl₂ y se resuspendió.

6.12 Transformación de las células competentes.

Se tomaron 50 μ l de las células competentes previamente preparadas y se mezclaron con 5 μ l de la reacción de ligación al vector. Se incubó por 30 minutos a 4°C y luego se le dio un choque térmico a 42°C por 90 segundos. Enseguida se incubó a 3 minutos en hielo, se adicionaron 500 μ l de medio LB y se incubó a 37°C a 200 rpm por 1 hora. Las células transformadas se sembraron en placas LB-ampicilina (50 μ g/ml) y se incubaron a 37°C. Después de 16 horas se seleccionaron algunas colonias para cultivarlas en un caldo LB con ampicilina para la extracción del DNA plasmídico usando el método de lisis alcalina.

6.13 Minipreps.

El protocolo que se siguió para realizar la minipreps se describe a continuación:

Del cultivo que contiene las células seleccionadas para analizar, se tomó un volumen de 1 mL y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se centrifugó a 14,000 rpm por 2 minutos a 4°C, se separó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 μ l de Solución I (50mM glucosa, 25 mM Tris-Cl pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0) (BioRad)). Posteriormente se colocó en hielo, se agregaron 200 μ l de solución II (0.2N NaOH a partir de un concentrado 10 N y 1% SDS (Sigma), se agitó suavemente y se incubó 5 minutos en hielo. Enseguida se agregaron 150 μ l de solución III (60 mL de acetato de potasio 5M, 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5

mL de agua esterilizada), se agitó suavemente y se colocó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C (Centrífuga eppendorf 5417R) y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL. A ese volumen se le agregó 1mL de etanol absoluto frío, se agitó y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se decantó el etanol y se lavó la pastilla con 1mL de etanol al 70% frío (este paso se repitió 2 veces). La pastilla se dejó secar durante 30 minutos para finalmente resuspenderla en 30 µl en agua de ampolla.

6.14 Restricción con *Bgl II*.

Para verificar la presencia de los insertos en las clonas seleccionadas se realizó una restricción de 5 µl de DNA plasmídico con la enzima *Bgl II* (New England Biolabs). Se utilizaron 0.5 µl de la enzima (10,000 U/mL), 1 µl de amortiguador 10X (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9) y para ajustar a un volumen final de 10 µl se agregó agua libre de nucleasas. Se incubó por 2 horas a 37°C y posteriormente se analizó el resultado en un gel de agarosa al 1%.

6.15 Purificación de plásmidos por columna.

Seleccionadas las clonas positivas, los plásmidos que contenían el inserto de interés, se purificaron utilizando GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). Para ello, a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se le agregó 1mL de células que contenían el plásmido y el inserto de interés, se centrifugó a 12,000 rcf durante 2 minutos (Centrífuga eppendorf 5417R) a temperatura ambiente y se decantó para eliminar el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en 250 µl de la solución de resuspensión incluida en el kit y se agitó con una micropipeta. Posteriormente se agregaron 250 µl de solución de lisis y se mezcló por inversión 4 veces. Rápidamente se agregaron 350 µl de solución de neutralización y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 12,000 rcf durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a una columna GeneJET para luego centrifugar a 12,000 rcf por 1 minuto. El sobrenadante fue descartado y enseguida se agregaron 500 µl de solución de lavado para posteriormente centrifugar a 12,000 rfc por 1 minuto. Este paso se repitió una vez más, eliminándose el sobrenadante por decantación y centrifugando nuevamente a 12,000 rfc por 1 minuto para descartar cualquier residuo de solución de lavado. Finalmente

se agregaron 30 µl de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 12,000 rcf por 2 minutos.

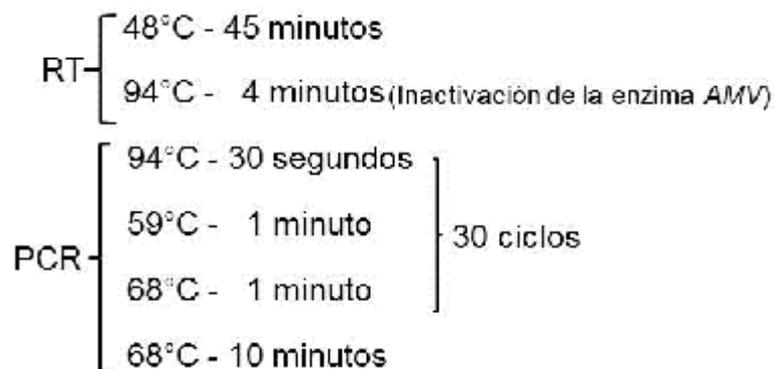
Los plásmidos purificados se mandaron a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México en la Unidad de Biología Molecular. La secuenciación se realizó mediante el analizador genético ABI Prism 310 y ABI Prism 3100 de AppliedBiosystems.

6.15 Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas usando el software Bioedit 7.0 y comparada con la base de datos del NCBI del genoma de *Aedes aegypti* (Centro Nacional de Biotecnología para la Información, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante el programa BLAST para nucleótidos.

6.16 Amplificación de importina beta-3 por RT-PCR

Se realizó la RT-PCR con la intención de corroborar el resultado arrojado por la técnica de AFLP, combinación ES4/MS4. El fragmento obtenido con esta combinación tuvo un alineamiento del 96% con el gen importina β-3. Para amplificar este gen, se mandaron sintetizar los oligonucleótidos que amplifican un fragmento de aproximadamente 300pb. Para que la reacción se llevara a cabo se agregó a un tubo Eppendorf: 10 µl de amortiguador 5X, 2 µl de dNTP's 10mM, 2.5 µl de oligonucleótido sentido (ACGGCTGGTTTGAAGACAA) y antisentido (AGTGCAGAAGTTCGGCTTGAA) para importina beta-3, 2 µl de MgSO₄ 25mM, 1 µl de la enzima AMV, 1 µl de la enzima TFI y para ajustar a un volumen de 50 µl se agregó agua DEPC. El programa de amplificación fue el siguiente:



El producto amplificado se analizó en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X (ver anexo) teñido con bromuro de etidio y corrido a 100V. Finalmente se visualizó en un fotodocumentador de luz UV (EPI-Chemi Darkroom UVP Laboratory products). Para el análisis densitométrico, se utilizó el software LABWORKS, programa incluido en la paquetería del fotodocumentador de luz UV utilizado para el análisis de los geles de agarosa.

7.0 RESULTADOS

En este trabajo se analizó la expresión diferencial de genes entre células C6/36 de mosquito *Aedes albopictus* no infectadas (SI) y las persistentemente infectadas con DENV-2 (PI) que se encontraban en los pase 52 al 58.³¹

Para comenzar el análisis de la expresión diferencial de genes, fue necesario purificar RNAm, el primer ensayo que se realizó fue la extracción del RNA total de las células en ambas condiciones por la técnica de trizol. El RNA total fue tratado con DNasa (Promega) para eliminar cualquier molécula de DNA genómico contaminante. La integridad del RNA total así como la ausencia de DNA genómico se evaluó mediante una RT-PCR (kit RT-PCR Access® Promega), utilizando oligonucleótidos que amplifican una región del gen de actina de *Ae. aegypti*, los productos de la reacción se corrieron en un gel de agarosa al 1%. La eficiencia del tratamiento con DNasa se verificó al observar la ausencia de una banda de aproximadamente 500 pb en los carriles 3 y 5 en cuya reacción de RT-PCR no se agregó AMV, mientras que la presencia de un fragmento con el tamaño esperado en los carriles 2 y 4 donde se adicionaron las dos enzimas (RT y DNAPol), nos indica además que la integridad del RNA total fue adecuada. No se observó amplificación cuando en la reacción no se agregó el templado (carril 6).

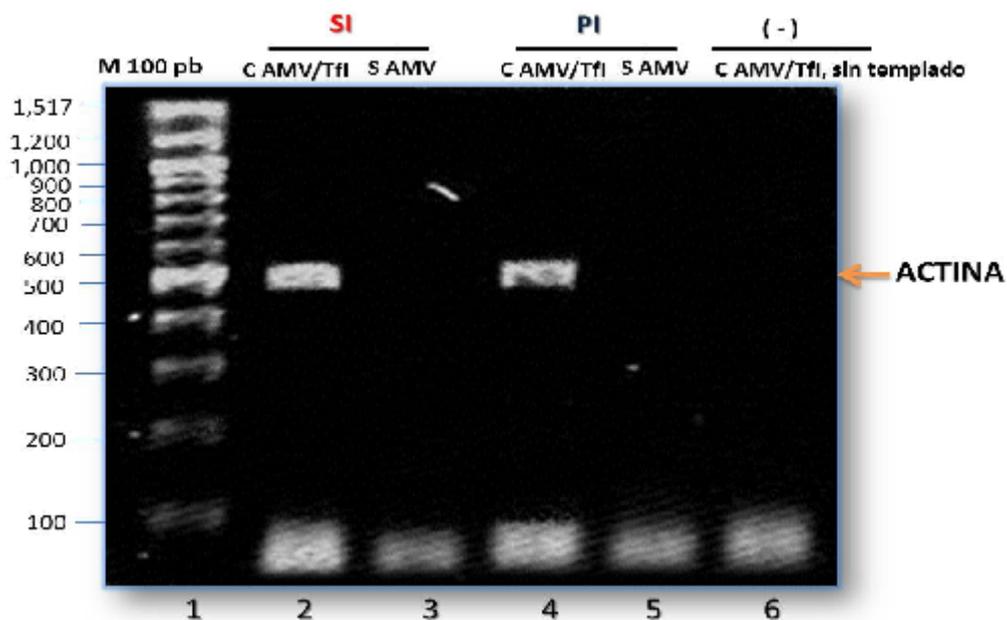


Figura 6. Análisis de los productos de amplificación de un fragmento del gen de actina de *Ae.*

***aegypti* a partir del RNA total tratado con DNAsas.** El RNA total fue tratado con DNasa y usado como templado para amplificar un fragmento del gen de actina. Los productos de la RT-PCR en un solo paso se observaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de 100 pb (New England Bio Labs); carriles 2 y 4, control positivo de la RT-PCR con templado de RNA total de las células C6/36 SI y PI respectivamente; carriles 3 y 5, control de PCR con templado de RNA total de las células C6/36 SI y PI; carril 6, control negativo de la reacción donde no se adicionó el templado.

Una vez tratado con DNAsas el RNA total purificado de las células no infectadas y persistentemente infectadas, así como verificada su integridad, se procedió a purificar el RNAm en base a la presencia de la cola de poli-A. Se usó un kit de purificación de RNAm mediante columnas de oligo dT (Invitrogen). Para verificar la presencia del RNAm y su integridad, se realizó una RT-PCR para amplificar un fragmento del gen de actina de manera semejante a lo referido anteriormente. En la figura 7 se observa que la extracción del RNAm fue adecuada debido a la presencia de una banda del tamaño esperado en los carriles 2 y 4 cuando se adicionaron las dos enzimas (RT y DNAPol) que no se aprecia cuando sólo se empleó la DNAPol (carriles 3 y 5).

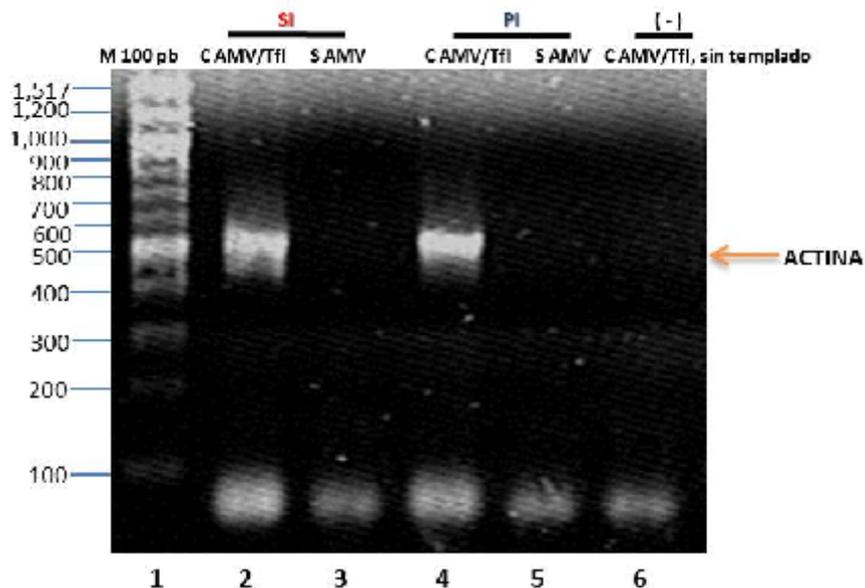


Figura 7. Amplificación de un fragmento del gen de actina a partir del RNAm purificado. El RNAm purificado con el kit MicrPoly(A) Purist Procedure (Invitrogen) fue usado como templado para

amplificar un fragmento del gen de actina. Los productos de la RT-PCR se observaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de 100 pb (New England Bio Labs); carriles 2 y 4, amplificación de un fragmento de actina usando como templado RNAm de las células C6/36 SI y PI respectivamente; carriles 3 y 5, reacción de RT-PCR sin AMV y con templado de RNAm de las células C6/36 SI y PI respectivamente; carril 6, control negativo de la reacción donde no se adicionó el templado.

Una vez demostrada la integridad y pureza del RNAm, se determinó su concentración por espectrofotometría a una longitud de onda de 260nm y usando una dilución 1:200. La concentración que se obtuvo fue de 177.051 ng/ μ l para el RNAm de las células SI y de 301.169 ng/ μ l para las PI.

El RNA viral carece de una cola de poli-A, por lo que al momento de realizar la purificación del RNAm las moléculas obtenidas únicamente eran celulares y no virales. Sin embargo, para demostrarlo, se realizó una amplificación de un fragmento de 1000 pb que corresponde a una parte de los genes que codifican para las proteínas virales NS1 y NS2A del DENV-2. En la figura 8 se observa la amplificación únicamente cuando se empleó como templado el RNA total de las células C6/36 PI (carril 3). Como control positivo se incluyó una reacción donde se utilizó como templado RNA total de células PI en el pase 60 donde se observa un producto del mismo tamaño (carril 6) y no se observa amplificación en ninguno de los casos donde se empleó como templado el RNA total y RNAm de las células C6/36 SI (carriles 2 y 4). Cuando el RNAm de las células PI fue purificado, las secuencias virales fueron eliminadas con lo que el producto de amplificación correspondiente ya no se observa (carril 5).

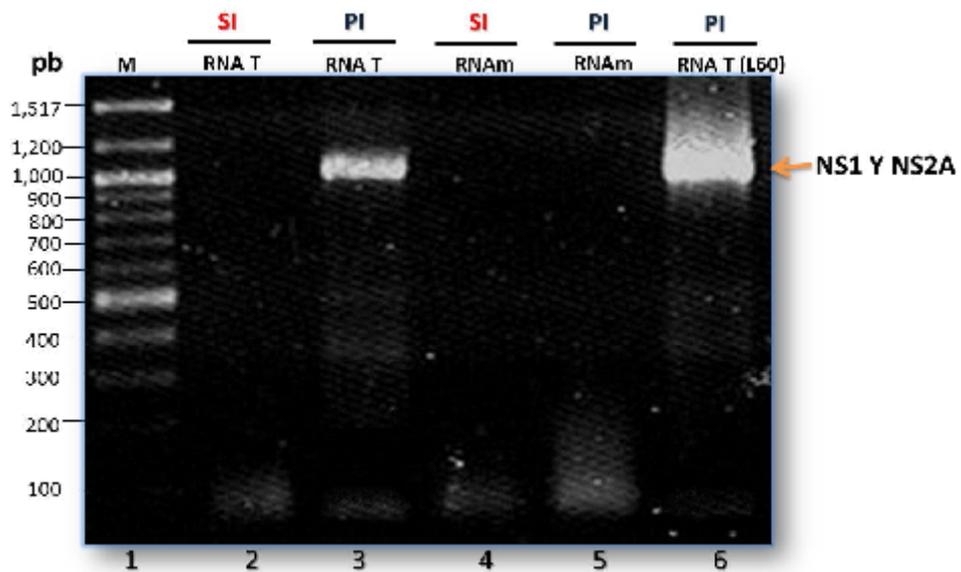


Figura 8. Amplificación de un fragmento de NS1 y NS2A. Los productos de la RT-PCR se observan en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de 100 pb (New England Bio Labs); carril 2, RNA total extraído de C6/36 SI; carril 3, RNA total extraído de C6/36 PI; carril 4, RNAm purificado de RNA total de C6/36 SI; carril 5, RNAm extraído del RNA total de C6/36 PI y carril 6, RNA total de C6/36 L60. Con una flecha se indica el fragmento de 1000 pb (NS1-NS2A).

Con este ensayo se demostró que la extracción del RNAm fue el adecuado.

A partir del RNAm, se procedió a realizar la síntesis del cDNA de doble cadena utilizando el kit Super Script Double-Stranded cDNA (Ambion) (descrita en materiales y métodos). La eficiencia de la síntesis se verificó al observar los productos de amplificación de un fragmento de 500 pb del gen de actina de *Ae. aegypti* para ambas condiciones (**figura 9**).

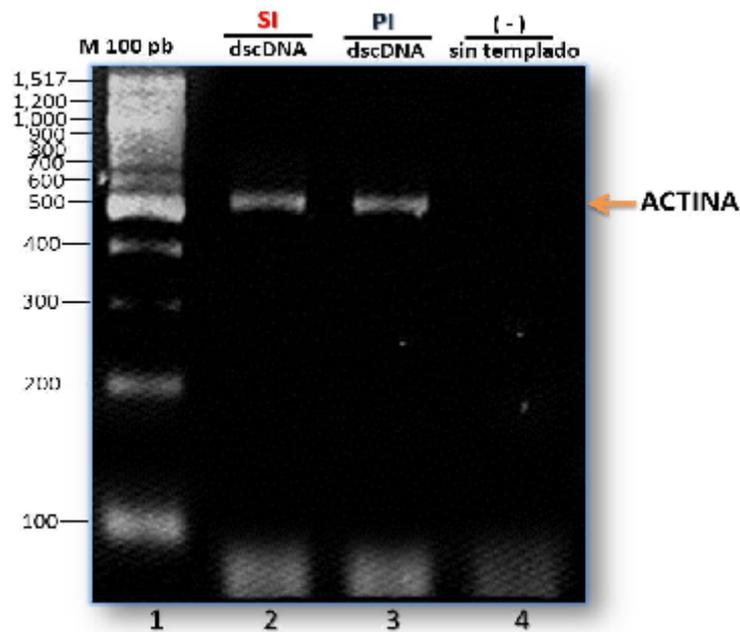


Figura 9. Amplificación de un fragmento del gen de actina a partir del cDNA de doble cadena. El cDNA de doble cadena sintetizado a partir del RNAm tanto de células no infectadas como persistentemente infectadas se utilizó como templado para amplificar el fragmento del gen de actina de *Ae. aegypti*. Los productos de la PCR se presentan en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de 100 pb (New England Bio Labs); carril 2, amplificado para el gen de actina en el que se utilizó como templado cDNA de doble cadena de la condición no infectada; carril 3, amplificado para el gen de actina en el que se utilizó como templado cDNA de doble cadena de la condición persistentemente infectada; carril 4, control negativo de la reacción sin DNA templado.

Una vez verificada la síntesis del cDNA de doble cadena, se procedió a realizar la digestión del cDNA con las enzimas *Eco RI* y *Mse I* de manera secuencial. Cabe mencionar que la eficiencia de las enzimas de restricción fue comprobada al cortar el plásmido pBluescript (Stratagene) antes de realizar la digestión del cDNA de doble cadena (**figura 10**).

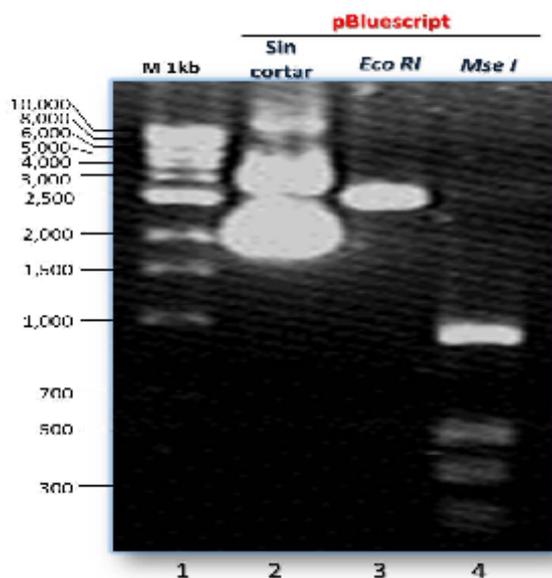


Figura 10. Restricción del plásmido pBluescript como control para verificar la eficiencia de las enzimas *Eco RI* y *Mse I*. Los productos de la restricción se presentan en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de 100 pb (New England Bio Labs); carril 2; plásmido íntegro; carril 3, plásmido digerido con la enzima *Eco RI*; carril 4, plásmido digerido con la enzima *Mse I*.

Los fragmentos de restricción obtenidos a partir del cDNA de las células en ambas condiciones fueron ligados a los adaptadores (ver **tabla 1** de materiales y métodos), los cuales fueron previamente hibridados. La hibridación se verificó en un gel de poliacrilamida al 12%, en donde se observó una diferencia de migración de los oligonucleótidos de cadena sencilla respecto a los de doble cadena (**figura 11**).

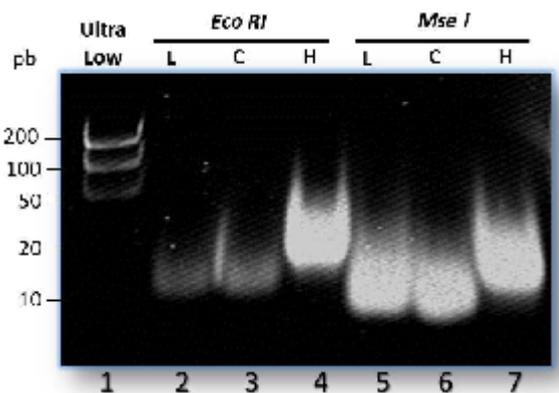


Figura 11. Análisis electroforético de la hibridación de los adaptadores de doble cadena para el sitio *Eco RI* y *Mse I*. Los oligonucleótidos complementarios de *Eco RI* y *Mse I* de cadena sencilla fueron hibridados en concentraciones equimolares y analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% teñidos con bromuro de etidio. Carril 1, marcador Ultra Low (Fermentas); carriles 2 y 5, oligonucleótidos de cadena sencilla sentido de *Eco RI* y *Mse I*; carril 3 y 6, oligonucleótidos de

cadena sencilla antisentido de *Eco RI* y *Mse I*; carriles 4 y 7, oligonucleótidos apareados para *Eco RI* y *Mse I* respectivamente.

El éxito de la reacción de ligación se comprobó los ensayos de PCR preselectiva y selectiva. En la PCR preselectiva, donde se utilizaron oligonucleótidos con secuencias complementarias a los adaptadores *Eco RI* y *Mse I* (ver **tabla 2** de materiales y métodos), y el producto de amplificación se corrió en un gel de poliacrilamida al 12% se observó, como era de esperarse, un barrido (**figura 12 panel A carriles 2 y 3**), a diferencia de la PCR selectiva, en donde se utilizaron oligonucleótidos con 3 nucleótidos adicionales en el extremo 3' y como templado el producto de la PCR preselectiva (dilución 1:10), se observó un patrón de bandas bien definidas (**figura 12 panel B carriles 2 y 3**). En ninguno de los casos donde no se empleó templado se observó amplificación (carriles 4 de ambos paneles de la **figura 12**) indicando que las bandas observadas en los carriles 2 y 3 de los paneles A y B no eran productos de un artefacto ocasionado por los oligonucleótidos.

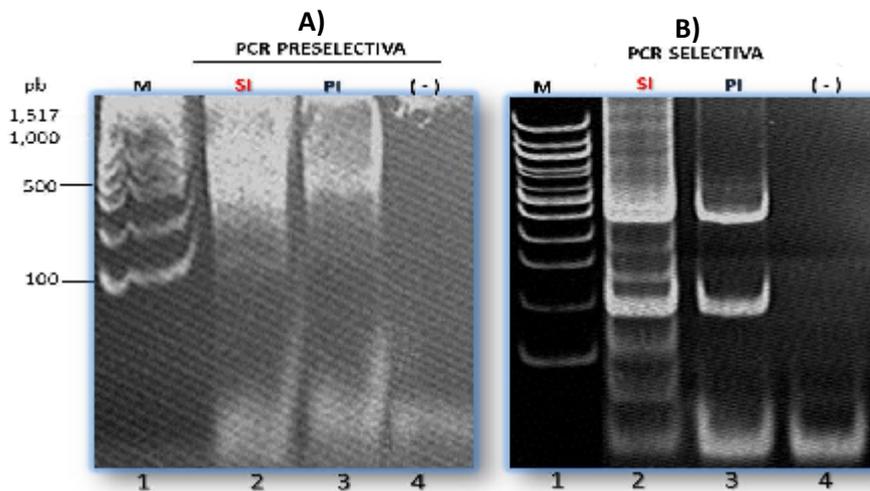


Figura 12. Patrones de amplificación generados durante la amplificación preselectiva y selectiva. Amplificaciones preselectiva y selectivas para el DNA de las células C6/36 de ambas condiciones analizados en geles de poliacrilamida al 12 % teñidos con bromuro de etidio. Los oligonucleótidos empleados para la PCR preselectiva (A) y selectiva (B) fueron *EcoRI*-*MseI* y ES3-MS1 respectivamente. **A)** Carril 1, marcador de 100 pb (New England Bio Labs); carril 2, PCR preselectiva para DNA SI; carril 3, PCR preselectiva para DNA PI y carril 4, control negativo de la PCR preselectiva sin templado de DNA. **B)** Carril 1, marcador de 100pb (New England Bio Labs); carril 2, amplificación selectiva de la condición SI; carril 3, amplificación selectiva de la condición PI y carril 4, control negativo de la PCR selectiva sin templado de DNA.

La reproducibilidad de la técnica se comprobó al realizar de manera independiente las reacciones de amplificación por triplicado, observándose fragmentos idénticos en tamaño molecular en todos los casos.

Una vez estandarizada la técnica de AFLP, se realizaron las 48 combinaciones restantes propuestas para la PCR selectiva, en donde se utilizó un iniciador selectivo para el sitio Eco RI y uno para Mse I. El número de oligonucleótidos selectivos utilizados fue de 7 para el adaptador Eco R I y 13 para Mse I. De las 48 combinaciones diferentes realizadas, 30 generaron bandas diferenciales (ver **tabla 4**).

Tabla 4. Combinaciones de oligonucleótidos selectivos que generaron bandas diferenciales.

		Oligonucleótidos selectivos para el sitio de Eco RI						
		5' GACTGCGTACCAATTC NNN 3'						
Oligonucleótidos selectivos para el sitio de Mse I 5' GATGAGTCTGAGTAA NNN 3'	NNN 3'	ES1	ES2	ES3	ES4	ES5	ES6	ES7
		ACA	AAC	AAG	ACC	ACG	ACT	AGG
	MS1	●	●	●	●		●	
	CAC							
	MS2			●	●		●	
	CAT							
	MS3		●					
	CAA							
	MS4	●			●			
	CAG							
	MS5				●			
	CTC							
	MS6	●		●	●			
	CTA							
MS7		●	●	●				
CGA								
MS8			●					
CGT								
MS10	●	●	●		●		●	
TAA								
MS11	●	●		●		●		
TAG								
MS13			●	●				
TCA								

Se obtuvieron 209 fragmentos dentro de un rango de 40 a 900 pb y para su análisis se seleccionaron sólo aquellos fragmentos mayores a 100 pb para asegurar la obtención de datos fidedignos, resultando así 134 bandas seleccionadas. De manera diferencial se expresaron 69 fragmentos, 42 en la condición sin infectar y 27

en la condición persistentemente infectada. Por otro lado, se observaron 13 bandas aparentemente sobreexpresadas en la condición persistentemente infectada, aunque esto deberá ser corroborado con otra metodología. Las combinaciones ES1-MS3, ES1-MS5, ES1-MS8, ES2-MS4, ES2-MS5, ES2-MS13, ES3-MS3, ES3-MS4, ES3-MS9, ES3MS11, ES3MS12, ES4-MS10, ES4-MS12, ES6-MS6, ES7-MS3, ES7-MS4, ES7-MS6 y ES7-MS11 generaron 140 bandas del mismo tamaño molecular e intensidad, es decir, no hubo ninguna diferencia entre ambas condiciones (**tabla 5**).

Tabla 5. Resultado del análisis de cDNA-AFLPs.

Fragmentos obtenidos por la técnica de cDNA-AFLPs	No. de Fragmentos
Fragmentos obtenidos (40-900 pb)	209
Fragmentos mayores a 100 pb	134
Fragmentos expresados en ambas condiciones	140
Fragmentos diferencialmente expresados	69
Fragmentos expresados en SI	42
Fragmentos expresados en PI	27
Fragmentos aparentemente sobreexpresados en PI	13

La figura 13 muestra algunos patrones representativos de los fragmentos obtenidos con la metodología de AFLP utilizando diferentes combinaciones de oligonucleótidos para el ensayo de PCR selectiva. Las flechas muestran las bandas diferenciales generadas con las combinaciones ES1-MS10 y ES4-MS4 respectivamente.

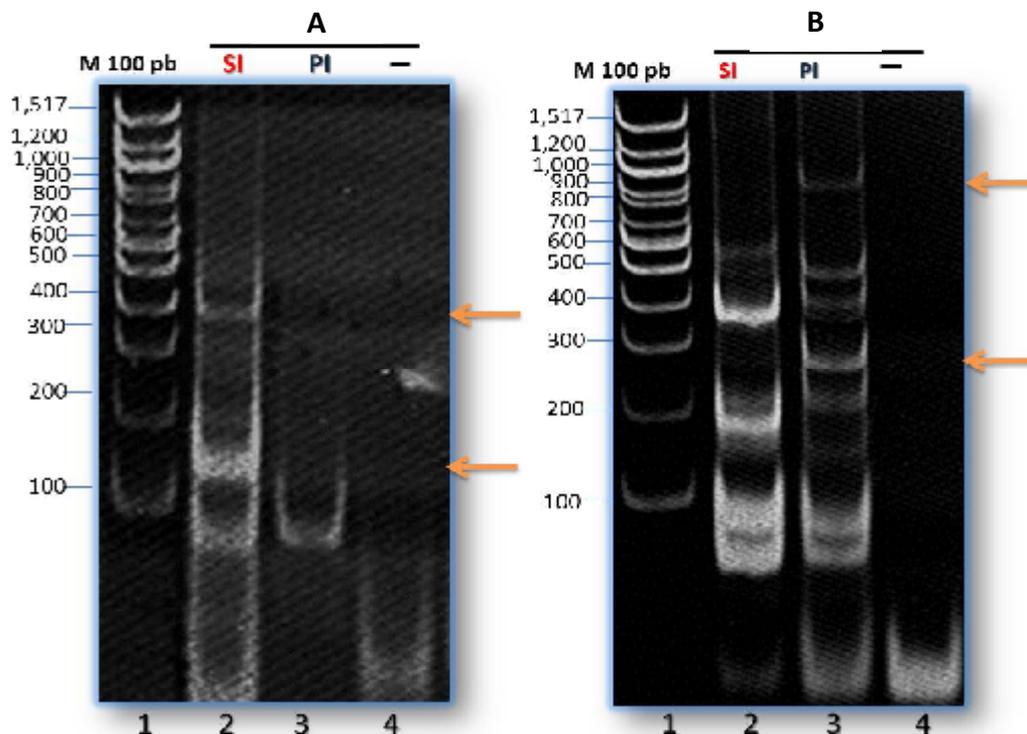


Figura 13. Patrones representativos de las bandas diferenciales generadas con la técnica de AFLP durante la amplificación selectiva. En esta figura se presenta de manera representativa combinaciones de oligonucleótidos que permitieron observar patrones diferenciales. **A)** Amplificación generada a partir de la combinación ES4-MS4. En el carril 1, marcador de 100 pb (New England Bio Labs); carril 2, producto de la PCR selectiva usando como templado cDNA de la condición no infectada; carril 3, producto de la PCR selectiva usando como templado cDNA de la condición persistentemente infectada y carril 4, control negativo de la reacción de PCR donde no se adicionó templado. **B)** Amplificación generada a partir de la combinación ES4-MS6. En el carril 1, marcador de 100 pb (New England Bio Labs); carril 2, bandas diferenciales generadas en la condición no infectada; carril 3, producto de la PCR selectiva usando como templado cDNA de la condición persistentemente infectada y carril 4, control negativo de la reacción de PCR sin templado de cDNA. Las flechas indican las bandas diferenciales observadas en una condición pero ausente en la otra.

De los 134 fragmentos mayores a 100 pb que se expresaron de manera diferencial, se pudieron purificar en las condiciones óptimas para su clonación solo 8 fragmentos, los cuales se clonaron y se mandaron a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México en la Unidad de Biología Molecular. La homología fue determinada por comparación con la base de datos del NCBI del genoma de *Ae. aegypti* (Centro Nacional de Biotecnología para la Información, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), usando inicialmente el algoritmo BLAST para nucleótidos.

De los 7 fragmentos clonados en el vector pJET 1.2 (ver materiales y métodos) se obtuvieron 27 clonas positivas, 11 y 16 clonas para la condición no infectada y persistentemente infectada respectivamente (**tabla 6**). Los tamaños de los insertos fueron desde 150 pb a 400 pb, prevaleciendo las clonas positivas con los fragmentos pequeños (150-300 pb).

Tabla 6. Insertos purificados del patrón diferencial de ambas condiciones generado mediante la técnica de AFLP.

COMBINACIÓN	TAMAÑO DEL INSERTO	CONDICIÓN	CLONAS (+) SECUENCIADAS
ES4-MS4	400 pb	SI	2
	150 pb	SI	2
ES1-M10	300 pb	SI	1
	250 pb	SI	1
ES1-MS11	200 pb	SI	5
ES4-MS6	300 pb	PI	10
ES3-MS9	150 pb	PI	6

Del resultado de la secuenciación, se realizaron alineamientos entre las clonas obtenidas a partir de un solo fragmento. En el alineamiento realizado entre las 2 secuencias obtenidas del fragmento clonado de 400pb, se observa que tienen una homología del 100%, contrario al alineamiento de las secuencias correspondientes al fragmento de 150pb, que se diferencian por la ausencia de varios nucleótidos (**figura 14**). Esta característica se observó en las secuencias generadas a partir de la combinación ES1-MS11 de la condición no infectada (SI) (**figura 16**). Debido a que las secuencias obtenidas de la combinación ES1-MS10 provienen de clonas distintas se pudo hacer el alineamiento por lo que directamente se realizó el BLAST (**figura 15**).

Para el caso del alineamiento de los fragmentos purificados a partir de las combinaciones ES4-MS6 y ES3-MS9 de la condición persistentemente infectada (**figuras 17 y 18**) las clonas provenían del mismo inserto para cada combinación, sin embargo, los alineamientos no son del 100%, puesto que se presenta por lo menos una diferencia de 1 solo nucleótido. En la figura 18, se evidencia una mayor diferencia entre las clonas, lo que significa que cada una provenían de diferentes insertos con un tamaño molecular similar.

```

A)
1      GATGAGTCCTGAGTAACAGCAGCCGGTAAAACGTCTGTCTGCGGTGTATTACGTCAACG  50
2      GATGAGTCCTGAGTAACAGCAGCCGGTAAAACGTCTGTCTGCGGTGTATTACGTCAACG  50
      *****

1      TATTTGCAATTGTAACCAATTCGTAGTGCTAAGAAAATTTGTCATAGCTTATGTTTACACT  120
2      TATTTGCAATTGTAACCAATTCGTAGTGCTAAGAAAATTTGTCATAGCTTATGTTTACACT  120
      *****

1      ACTGGTGAATTGGTACGCAGT  141
2      ACTGGTGAATTGGTACGCAGT  141
      *****

B)
1      GATGAGTCCTGAGTAACAGC-----CTACCA---TGGGAGGG--CAAGGTGACA  44
2      GNTGAGTCCTGAGTAACAGCAGCCGGTAAAACGTCTGTCTGCGGTGTATTACGTCAACG  60
      * ***** ** * **** * * *

1      CACTTGC--TGGGCGGGTC-----CAGAACC-----CGCAA-----TGA  78
2      TATTTGCAATTGATGAGTCCTGAGTAACAGGATCGGTTCATGTCATTACGGGACACGTTGT  120
      * **** * * * * * * * * * * * * * * * * *

1      CCGAG---GAGCCCGGATGATGGCAGCCGTCCCTGCTGA----GGCGATT-----  121
2      TCGAGTTCAGCGAACAAATTTGGTAATCGTACTATTGACTCCAGCGATTCCCAACART  180
      **** * * ** * * * * * * * * * * * * * * *

1      ---GTC-----TCCGGTGAATTGGTACGCAG  145
2      GGAGTTCCTTTCGGTCGTAGGGATTCACACAATTTGGTGAATTGGTACGCAG  232
      **** * *****

```

Figura 14. Alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de las bandas de 400 pb y 150 pb generadas de la combinación ES4-MS4. A) Las clonas 1 y 2 fueron obtenidas del fragmento de 400 pb, se aprecia que el alineamiento de ambas secuencias son del 100%. **B)** las clonas 3 y 4 fueron obtenidas del fragmento de 150 pb. Se observa que las secuencias comparten sólo algunos nucleótidos.

A)

```
GATGAGTCCTGAGTAAATAACAAGCAACCGTTTGTGACTTCGGTTGCCATTGGTAACCGGATGGATCCAAGCA
TGCGCCAAACATATGTGAATTGCATGCAAGATTCATAGTAGTATGCTGGTTGATTTCCCGCCTAAATAGATTTT
TTGTTGCTTCATGTGAGAGAGATCAGGTTGAATATGTAGGTATCATAAAATCTAAAAAATAAGCATTTTCCAT
AAAATGAGAACACTGGGTCGGCAITTTATGGGGGGCCAITATCTTATTACTCAGGAATCATC
```

B)

```
GATGAGTCCTGAGTAAATAACAATTTATACCTTTTCAAAGGGCGAAATTCCTTTGTAGCACGGGCGTTTGAAGTGGG
AAAATCACATGAATGTGAATTGGTACGGCGTC
```

Figura 15. Secuencias obtenidas a partir de las bandas de 300 pb y 250 pb generadas de la combinación ES1-MS10. A) La clona 1 fue obtenida del fragmento de 300 pb. B) La clona 2 fue obtenida del fragmento de 250 pb.

```
2 -----GATGAGTCCTGAGTAAATAGTACACGCAAGACGAAACCGGGCAAGACGATAACCG 53
4 -----GATGAGTCCTGAGTAAATAAT-----CANCG 25
1 -----GATGAGTCCTGAGTAAATAGTACACGCAAGACGAAACCGGGCAAGACGATAACCG 53
3 GATGAGTCCTGAGTAAATAATATCAAGAGGAG-----GAGTA 37
5 -----GAGTAAATAATATCAAGAGGAG-----GAGTA 27
          **** * * * * *
          *

2 GTTGACTAAATTTTCGAAGGGGGTGAAGCATATAGGATCGAAATATAGAATAGCAGGATCAC 113
4 G----- 26
1 GTTGACTAAATTTTCGA-GGGGGTGAAGCATATAGGATCGAAATATAGAATAGCAGGATCAC 112
3 GT----- 39
5 GT----- 29
*

2 ATAGAARTCAATTTTATATAAATAGCAC-TAGAGGAGCAGGAAGTGAGTGTGCATTGCCTA 172
4 -----AAAAT-----TGTTGAANT----- 39
1 ATAGAARTCAATTTTATATAAATAGCACCTAGAGGAGCAGGAAGTGAGTGTGCATTGCCTA 172
3 -----AFCAT-----GTATGCCG---- 52
5 -----AFCAT-----GTATGCCG---- 42
          ** **
          **

2 ACTAGTTGCTTGIGAATTGGTACGCGAGTC 201
4 -----TTTGIGAATTGNTACNCNNTC 60
1 ACTAGTTGCTTGIGAATTGGTACGCGAGTC 201
3 -----TGIGAATTGGTACGCGAGTC 71
5 -----TGIGAATTGGTACGCGAGTC 61
          **** * * * * *
          **
```

Figura 16. Alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de las bandas de 200 pb generadas de la combinación ES1-MS11. En el alineamiento se observa que las clonas 1 y 2 tienen una alta similitud, ya que se diferencian por la ausencia de una base en cada secuencia. Las secuencias 3, 4 y 5, aunque comparten algunas bases, no tienen una alta homología, por lo que probablemente provienen de distintos fragmentos

```

8      GATGAGTCCTGAGTAACTAAATAACCTAAATTATTTATTCCTTCTTCATCGCTTCCCTGTG 60
10     GATGAGTCCTGAGTAACTAAATAACCTAAATTATTTATTCCTTCTTCATCGCTTCCCTGTG 60
1      GATGAGTCCTGAGTAACTAAATAACCTAAATTATTTATTCCTTCTTCATCGCTTCCCTGTG 60
9      GATGAGTCCTGAGTAACTAAATAACCTAAATTATTTATTCCTTCTTCATCGCTTCCCTGTG 60
6      GATGAGTCCTGAGTAACTAAATAACCTAAATTATTTATTCCTTCTTCATCGCTTCCCTGTG 60
5      GATGAGTCCTGAGTAACTAAATAACCTAAATTATTTATTCCTTCTTCATCGCTTCCCTGTG 60
4      GATGAGTCCTGAGTAACTAAATAACCTAAATTATTTATTCCTTCTTCATCGCTTCCCTGTG 60
3      GATGAGTCCTGAGTAACTAAATAACCTAAATTATTTATTCCTTCTTCATCGCTTCCCTGTG 60
2      GATGAGTCCTGAGTAACTAAATAACCTAAATTATTTATTCCTTCTTCATCGCTTCCCTGTG 60
7      ---NGNTCCNGANNNNCNCNNNNCCNNCGTTNNTNNTNNTCNNNCNTCNCNTTNNNGTG 57
      *** ** * ** * ** * ** * ** *
8      CCTTATCCTGCAGGGTCTGTCCGATTTCCGCTGGCCCTTCGCCTTGATGGTGTCTCCCAGTT 120
10     CTTTATCCTGCAGGGTCTGTCCGATTTCCGCTGGCCCTTCGCCTTGATGGTGTCTCCCAGTT 120
1      CCTTATCCTGCAGGGTCTGTCCGATTTCCGCTGGCCCTTCGCCTTGATAGTGTCTCCCAGTT 120
9      CCTTATCCTGCAGGGTCTGTCCGATTTCCGCTGGCCCTTCGCCTTGATGGTGTCTCCCAGTT 120
6      CCTTATCCTGCAGGGTCTGTCCGATTTCCGCTGGCCCTTCGCCTTGATGGTGTCTCCCAGTT 120
5      CCTTATCCTGCAGGGTCTGTCCGATTTCCGCTGGCCCTTCGCCTTGATGGTGTCTCCCAGTT 120
4      CCTTATCCTGCAGGGTCTGTCCGATTTCCGCTGGCCCTTCGCCTTGATGGTGTCTCCCAGTT 120
3      CCTTATCCTGCAGGGTCTGTCCGATTTCCGCTGGCCCTTCGCCTTGATGGTGTCTCCCAGTT 120
2      CCTTATCCTGCAGGGTCTGTCCGATTTCCGCTGGCCCTTCGCCTTGATGGTGTCTCCCAGTT 120
7      CCNTATCCTGNAGGNNGTNNNATNNNCTGGNCTTCNNNNTGNNNGNGTCTCNNNNNTN 117
      * **** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
8      CCGTCAGCTTGCCGAGGAAGTTATCAACATTTTCCTTGGTGAAAGTATTAGAGATTCCCT 180
10     CCGTCAGCTTGCCGAGGAAGTTATCAACATTTTCCTTGGTGAAAGTATTAGAGATTCCCT 180
1      CCGTCAGCTTGCCGAGGAAGTTATCAACATTTTCCTTGGTGAAAGTATTAGAGATTCCCT 180
9      CCGTCAGCTTGCCGAGGAAGTTATCAACATTTTCCTTGGTGAAAGTATTAGAGATTCCCT 180
6      CCGTCAGCTTGCCGAGGAAGTTATCAACATTTTCCTTGGTGAAAGTATTAGAGATTCCCT 180
5      CCGTCAGCTTGCCGAGGAAGTTATCAACATTTTCCTTGGTGAAAGTATTAGAGATTCCCT 180
4      CCGTCAGCTTGCCGAGGAAGTTATCAACATTTTCCTTGGTGAAAGTATTAGAGATTCCCT 180
3      CCGTCAGCTTGCCGAGGAAGTTATCAACATTTTCCTTGGTGAAAGTATTAGAGATTCCCT 180
2      CCGTCAGCTTGCCGAGGAAGTTATCAACATTTTCCTTGGTGAAAGTATTAGAGATTCCCT 180
7      NNNCTNNCTNNCANNANNANNANNCNNCATTNNNNNTGNNNNAANTNTCANAN----- 170
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
8      TCTTGACGGTATCTACTGCCCTCATCGAAAGCATCACGACGGAGACGGGCGGGCGAGGGTGA 240
10     TCTTGACGGTATCTACTGCCCTCATCGAAAGCATCACGACGGAGACGGGCGGGCGAGGGTGA 240
1      TCTTGACGGTATCTACTGCCCTCATCGAAAGCATCACGACGGAGACGGGCGGGCGAGGGTGA 240
9      TCTTGACGGTATCTACTGCCCTCATCGAAAGCATCACGACGGAGACGGGCGGGCGAGGGTGA 240
6      TCTTGACGGTATCTACTGCCCTCATCGAAAGCATCACGACGGAGACGGGCGGGCGAGGGTGA 240
5      TCTTGACGGTATCTACTGCCCTCATCGAAAGCATCACGACGGAGACGGGCGGGCGAGGGTGA 240
4      TCTTGACGGTATCTACTGCCCTCATCGAAAGCATCACGACGGAGACGGGCGGGCGAGGGTGA 240
3      TCTTGACGGTATCTACTGCCCTCATCGAAAGCATCACGACGGAGACGGGCGGGCGAGGGTGA 240
2      TCTTGACGGTATCTACTGCCCTCATCGAAAGCATCACGACGGAGACGGGCGGGCGAGGGTGA 240
7      -----
8      ATTGGTACGCAGTC 254
10     ATTGGTACGCAGTC 254
1      ATTGGTACGCAGTC 254
9      ATTGGTACGCAGTC 254
6      ATTGGTACGCAGTC 254
5      ATTGGTACGCAGTC 254
4      ATTGGTACGCAGTC 254
3      ATTGGTACGCAGTC 254
2      ATTGGTACGCAGTC 254
7      -----

```

Figura 17. Alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de las bandas diferenciales de 300 pb generadas de la combinación ES4-MS6. De las clonas 1 al 10 fueron obtenidas del fragmento de 300 pb de la condición persistentemente infectada.

```

4      -ATGAGTCCTGAGTAACCGACAGAAGACCGCCAAGTTG-GACCCCGCTCTGGAGGAACAG 58
5      GATGAGTCCTGAGTAACCGACAGAAGACCGCCAAGTTG-GACCCCGCTCTGGAGGAACAG 59
2      GATGAGTCCTGAGTAACCGAC-----CAAGT-----AT-G 29
3      ---GA---CTGCGTA-CCAAT-----TCAAG----AATCTTAC-----CAG 30
1      ----A---CTGCGTA-CCAAT-----TCAAGTAATAATCTAATT-----AGTAG 36
6      ---GA---CTGCGTA-CCAAT-----TCAAGTAATAATCTAATT-----AGTAG 37
          *   *** ** * *   *           *
4      TTCAACGCTGG----ACGTCCTGCTGGCCGCTATCGCTTCCC GCCCAGGACAGAGCGGTTCG 114
5      TTCAACGCTGG----ACGTCCTGCTGGCCGCTATCGCTTCCC GCCCAGGACAGAGCGGTTCG 115
2      TACAACGTAA----ATGTTT-----TAT----TTTTGCCT-----TTG 60
3      --CAAGAGGAA----GGTATTGCTGCCATTAGCG--GAGCGGCAGCGAGGGATCCGATG 82
1      TTTGTAAGTAGTTTCACGTTTT---AGAAATATAA--TTTCAATACTTTGAAAATGGTTG 91
6      TTTGTAAGTAGTTTCACGTTTT---AGAAATATAA--TTTCAATACTTTGAAAATGGTTG 92
          * * *           *
4      TGCCGATGGATACATCCTCGAGGGTAAGGAACCTTGAATT-----GTTACGCAG---T 163
5      TGCCGATGGATACATCCTCGAGGGTAAGGAACCTTGAATT-----GTTACGCAG---T 164
2      TATTT-----TGCATT-----TGAAATACTTGAATT-----GTTACGCAG---T 96
3      AACTA-CAGGCATGTT-----CAGAATGCTGTAACG-----GTTACTCAGGACT 125
1      GGC----AGAGATTTTC-----AATCAAGTGT----- 114
6      GGC----AGAGATTTTC-----AATCAAGTGTCTAAATTTTACGTCGGTTACTCAGGACT 143
4      C----- 164
5      CATGAGTCCTGAGTAACCGACGTAAAATTTAGACACTTGATTGAAAATCTCTGCCCAACC 224
2      CA----- 98
3      CATC----- 129
1      -----
6      CATC----- 147
4      -----
5      ATTTTCAAAGTATTGAAATTATATTTCTAAAACGTGAAACTACTTACAACTACTAATTA 284
2      -----
3      -----
1      -----
6      -----
4      -----
5      GATTATTACTTGAATTGGTACGCAGTC 311
2      -----
3      -----
1      -----
6      -----

```

Figura 18. Alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de las bandas diferenciales de 150 pb generadas de la combinación ES3-MS9. Las clonas 1 a 6 fueron obtenidas del fragmento de 150 pb de la condición persistentemente infectada.

Con las secuencias obtenidas, se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI para determinar la homología con algún gen reportado para *Ae. aegypti*. La

tabla 7 resume los resultados del análisis a nivel de nucleótidos de estas secuencias. La clona 3 obtenida de la combinación ES4-MS4 mostró una identidad del 96% para el gen que codifica para la importina beta-3 de *Ae. Aegypti*. Las demás clonas tuvieron una identidad de entre el 78% al 100% con genes que hasta el momento no se han podido relacionar directamente con la infección por Dengue a diferencia de la importina beta-3, molécula que interactúa con otra subunidad (importina α) para formar un complejo funcional que permite el importe de proteínas hacia el núcleo, como sucede con la proteína viral NS5.^{6,27}

Tabla 7. Análisis de las secuencias con el genoma de *Ae. aegypti*.

COMBINACIÓN	INSERTO	CLONA	CONDICIÓN	NÚMERO DE ACCESO (NCBI)	IDENTIDAD	HOMOLOGÍA
ES4-MS4	150 pb	3	SI	XM_001654246.1	<i>Aedes aegypti</i> importin beta-3 partial mRNA	96%
ES1-MS10	250 pb	1	SI	XM_001657604.1	<i>Aedes aegypti</i> molybdopterin cofactor synthesis protein a partial mRNA	75%
				XM_001651158.1	<i>Aedes aegypti</i> ethanplamina-phosphate cytidyltransferase partial mRNA	100%
ES1-MS11	200 pb	1	SI	AY431727.1	<i>Aedes aegypti</i> ASAP ID: 43290 conserved unknown mRNA sequence	100%
				XM_001655315.1	<i>Aedes aegypti</i> hypothetical protein partial mRNA	100%
				AY050566.1	<i>Aedes aegypti</i> peritrophin mRNA, complete cds	100%
				EF173374.1	<i>Aedes aegypti</i> clone BAC ND41C6, complete sequence	100%
				XM_001654469.1	<i>Aedes aegypti</i> ferritin subunit partial mRNA	94%
				XM_001650452.1	<i>Aedes aegypti</i> adenylate cyclase partial mRNA	100%
ES1-MS11	600 pb	3 y 5	SI	EF173374.1	<i>Aedes aegypti</i> clone BAC ND41C6, complete sequence	100%
				XM_001660266.1	<i>Aedes aegypti</i> hypothetical protein partial mRNA	87%
	600 pb	4		EF173378.1	<i>Aedes aegypti</i> clone BAC ND67B23, complete sequence	90%
ES4-MS6	300 pb	2	PI	XM_001659475.1	<i>Aedes aegypti</i> hypothetical protein partial mRNA	88%
				DQ440046.1	<i>Aedes aegypti</i> clone AE-269 putative salivary secreted peptide mRNA, complete cds	88%
				AY433328.1	<i>Aedes aegypti</i> ASAP ID: 42879 conserved unknown mRNA sequence	88%
ES3-MS9	150 pb	1, 5 y 5	PI	XM_001653725.1	<i>Aedes aegypti</i> inosine- 5-monophosphate dehydrogenase partial mRNA	87%
				AY826137.1	<i>Aedes albopictus</i> clone AL_133 ribosomal protein S8 mRNA, complete cds	98%
				XM_001653071.1	<i>Aedes aegypti</i> 40S ribosomal protein S8 partial mRNA	93%
				DQ440035.1	<i>Aedes aegypti</i> clone AE-266 40S ribosomal protein S8 mRNA, complete cds	93%
				AY432409.1	<i>Aedes aegypti</i> ASAP ID: 36093 cytosolic small ribosomal subunit S8 mRNA sequence	95%
		4 y 5		CR938578.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Aedes aegypti</i> total adult females. 3-prime end of clone KWDA441YG07A4M1 from strain Liverpool of <i>Aedes aegypti</i> (yellow fever mosquito)	93%
				CR938577.1	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from <i>Aedes aegypti</i> total adult females. 3-prime end of clone KWDA441YG07B3M1 from strain Liverpool of <i>Aedes aegypti</i> (yellow fever mosquito)	95%
		5		XM_001653072.1	<i>Aedes aegypti</i> 40S ribosomal protein S8 partial mRNA	97%
				EF173373.1	<i>Aedes aegypti</i> clone BAC ND41B18, complete sequence	97%

Una vez realizado el análisis *in silico* y encontrada la homología de las secuencias obtenidas con la técnica AFLP con los genes reportados en la base de datos del NCBI para *Ae. aegypti*, consideramos conveniente el análisis de la expresión del gen importina beta-3 por su posible relación con el proceso de infección por DENV. Para confirmar el patrón de expresión observado con la metodología AFLP's, se extrajo el RNAm de las células C6/36 en ambas condiciones y se realizó la RT-PCR semicuantitativa. Para la RT-PCR se diseñaron oligonucleótidos que amplifican un fragmento de aproximadamente 300 pb del gen de importina beta-3 de *Ae aegypti* y como control se utilizaron los oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 500 pb de actina.

Tal como era de esperarse, hubo una disminución en la expresión del gen importina beta-3 en la condición persistentemente infectada (**figura 19**).

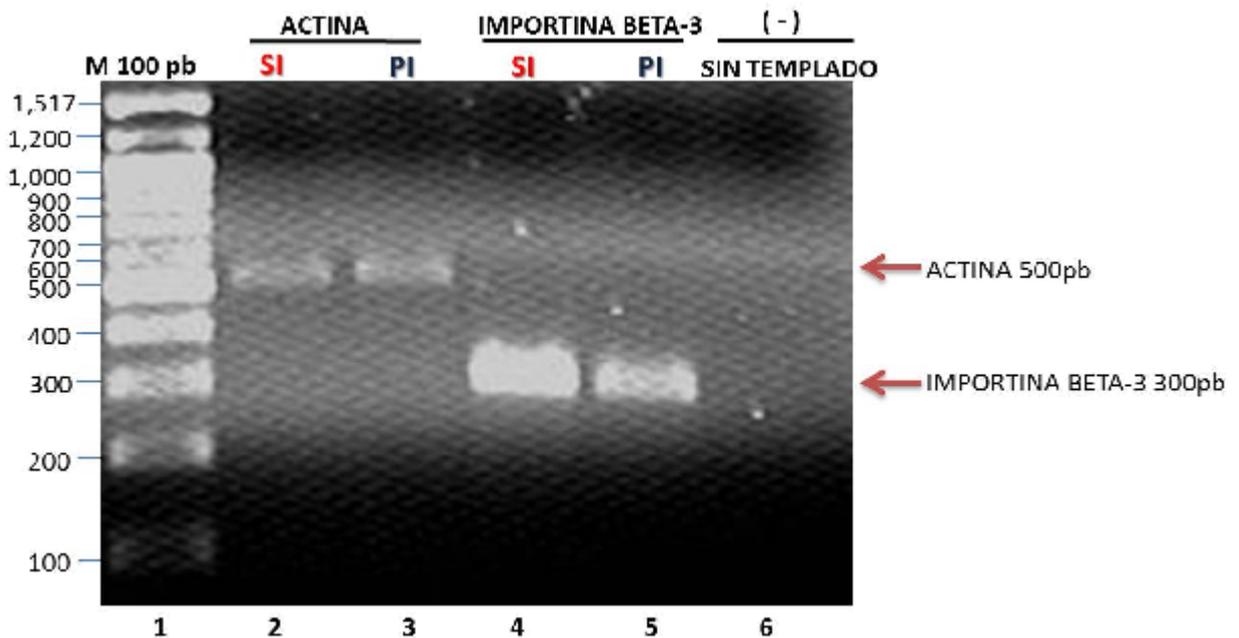


Figura 19. Análisis de los productos de amplificación de la RT-PCR semicuantitativa. Amplificaciones del gen de actina y de importina β -3 utilizando RNAm extraído de las células C6/36 de ambas condiciones analizadas en un gel de azarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de 100 pb (New England Bio Labs); carril 2, producto de la RT-PCR para gen de actina en SI; carril 3, producto de la RT-PCR para gen de actina en PI, carril 4, producto de la amplificación de un fragmento del gen importina β -3 en SI, carril 5, producto de la RT-PCR usando como templado RNAm de la condición PI y control negativo de la RT-PCR semicuantitativa sin templado de RNAm.

Mediante el programa LABWORKS algoritmo Area Density Tool, se hicieron las mediciones densitométricas de las bandas observadas en el ensayo de RT-PCR semicuantitativa correspondientes a las amplificaciones de actina y de importina beta-3 (**figura 20**). Este experimento sólo se realizó una vez por lo que este resultado es preliminar, sin embargo nos permite sugerir que existe una disminución de la expresión de importina β -3 cuando las células están persistentemente infectadas con DENV-2 lo cual correlacionó con los resultados obtenidos con la técnica de AFLP y que nos permite confirmar que esta técnica es útil para los estudios de expresión diferencial.

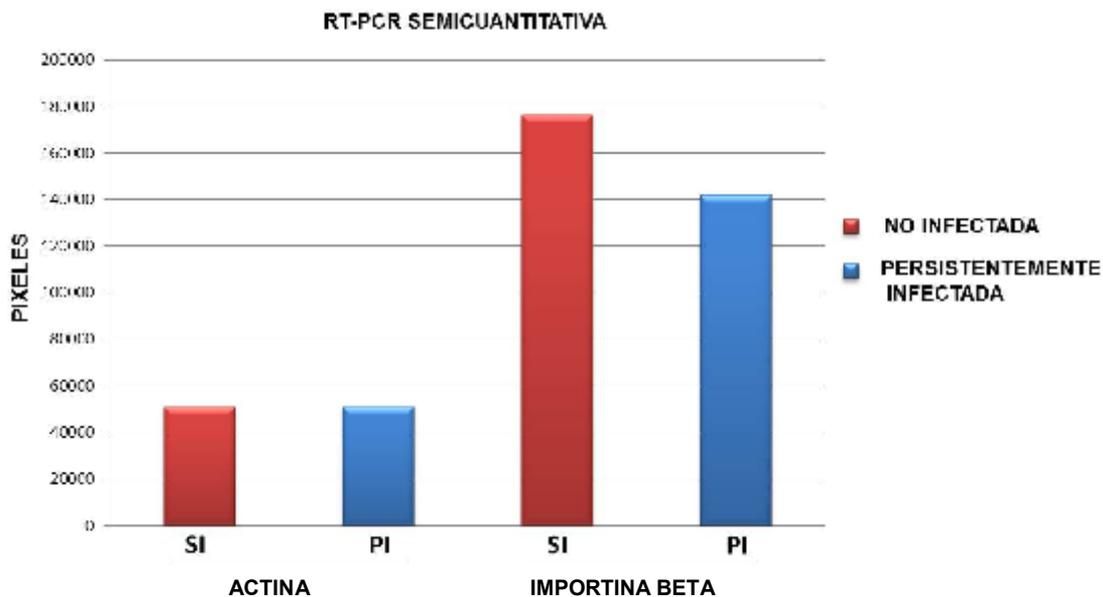


Figura 20. Gráfica que representa la expresión diferencial de importina beta-3. La barra en color rojo representa los píxeles del producto analizado correspondiente a la condición no infectada (SI) mientras que en color azul corresponde al análisis de los píxeles de la expresión en la condición persistentemente infectada.

8.0 DISCUSIÓN

Los artrópodos son los organismos más abundantes del reino animal y se les encuentra en casi todos los hábitats del mundo pero revisten especial importancia aquellos que ocasionan daños directos al hombre, tal como los mosquitos del género *Aedes*, responsables de transmitir el mayor número de enfermedades virales como el dengue, que en años recientes se le ha considerado la enfermedad humana transmitida por vector más importante del mundo. Este padecimiento tiende a tornarse en cuadros clínicos más severos con episodios hemorrágicos o presentarse letalidad si no es tratado a tiempo.¹²

En México la prevención y control del dengue ha tomado relevancia considerándosele uno de los programas prioritarios en salud pública. Las estrategias básicas de prevención están enfocadas al control del vector, ya sea con el uso de métodos químicos, físicos o biológicos. Desafortunadamente en la actualidad no se dispone de vacunas preventivas ni drogas antivirales específicas para el tratamiento del dengue aunque hay diversos proyectos en desarrollo que intentan construir vacunas recombinantes pero aún hay un largo camino a recorrer hasta la obtención de un inmunógeno efectivo y seguro.¹³

Desde el punto de vista médico y económico, entre los artrópodos que más daño causan están los mosquitos *Ae. aegypti* y dado que los métodos de control, como es el uso indiscriminado de insecticidas, han inducido resistencia en estos vectores, se requiere imperiosamente información sobre los mecanismos de respuesta inmune tras la interacción artrópodo-virus con el objetivo de controlar o prevenir infecciones a través de la manipulación de la misma.⁸⁵ Recientemente la investigación se ha enfocado en la comprensión de la respuesta del vector ante las infecciones virales, entre ellas el dengue, pero todavía no se conoce con exactitud la respuesta celular durante una infección aguda y menos aún en infecciones persistentes, sin embargo se ha sugerido la participación de algunos mecanismos celulares para la defensa antiviral, donde la inmunidad innata tiene una función importante ante patógenos mediante la producción de algunos péptidos con

actividad antimicrobiana, mecanismos de fagocitosis, encapsulación, melanización y secreción de barreras físicas.^{5,36} En el caso particular de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, organismo que ha sido utilizado para estudiar la respuesta inmune innata en insectos, se ha evidenciado que está regulada por dos vías: la de inmunodeficiencia (Imd) y la Toll. En relación a esta última se le ha atribuido su participación en la respuesta antiviral.^{11,87} Otros elementos que se ha reportado contribuyen a la defensa antiviral son los RNA de interferencia (RNAi).⁴²

Recientemente se ha evidenciado que factores involucrados en la biología de los mosquitos, como son los de tipo genético, son condicionantes de su capacidad vectorial, su eficacia como transmisor, susceptibilidad o resistencia a insecticidas e infecciones por virus.^{26,81} Sin embargo, los casos documentados respecto al estudio del comportamiento celular ante infecciones virales referente a la expresión de genes en *Ae. aegypti* son mínimos. El único trabajo que describe el análisis de la expresión de genes así como la respuesta fisiológica del intestino medio de los mosquitos *Ae. aegypti* durante una infección aguda con DENV-2, reporta la presencia de receptores de reconocimiento de patrones (“Patterns Recognition Receptors”, PPR’s) mismos que activan a la vía de Toll, sugiriendo que ésta participa en la respuesta antiviral, tal como fue observado en *D. melanogaster*. Estudiando los efectores CACTUS y CASPAR que participan en esta vía, tras silenciar su expresión, se observó que el decremento de la expresión de CACTUS disminuía de manera importante la infección por DENV, concluyendo que esta vía está participando en respuesta a la infección por virus.⁸⁷

Dado que se conoce que los mosquitos pueden ser susceptibles o resistentes a infecciones virales, se realizó un estudio donde se analizó la expresión diferencial de genes del intestino medio de los insectos *Ae. aegypti* que son susceptibles y resistentes a infecciones por DENV-2, encontrándose que en el intestino de mosquitos susceptibles se activan genes de señalización, del citoesqueleto, de factores de transcripción y efectores que participan en la respuesta inmune. Sin embargo, estos genes estuvieron ausentes en el intestino de mosquitos resistentes, activándose únicamente el gen de inhibidor de tripsina, proteína reportada que tiene

capacidad de afectar la infección por DENV, evidencia que vuelve a poner de manifiesto la participación de la respuesta inmune de los insectos ante las infecciones virales pero que también sugiere que existen otros factores participantes.⁵

Todos los estudios mencionados anteriormente y que permitieron conocer la expresión de genes durante la infección viral se realizaron en mosquitos infectados de manera aguda con DENV, pero no se ha realizado ningún trabajo donde utilicen células infectadas de manera persistente, aún cuando los mosquitos adquieren este tipo de infección una vez que entran en contacto con el virus.

En nuestro laboratorio se han realizado experimentos con el fin de conocer de manera preliminar la expresión de genes, utilizando células C6/36 persistentemente infectadas con DEV-2 y como control células C6/36 no infectadas. Para llevar a cabo este análisis, se empleó la técnica de AFLP ya que representa una metodología altamente reproducible y específica que permite detectar genes que se expresan diferencialmente. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada tanto en genomas complejos como sencillos y fue aplicada por primera vez por Bachem y colaboradores para explorar la expresión diferencial en el proceso de tuberización de la papa, en donde aislaron 3 transcritos que codificaron para proteínas que participan en este evento.⁴ En levaduras se analizaron los cambios de expresión en presencia y ausencia de glucosa, comparando tres metodologías: cDNA-AFLP, microarreglos y GeneChip, demostrando que las tres técnicas presentan una correlación en la expresión diferencial de genes.⁶⁸ En el caso de los mosquitos *Ae. aegypti*, se ha utilizado la técnica de AFLP's para hacer estimaciones de variabilidades genéticas en distintas poblaciones.⁶⁴ En México, se empleó para determinar la diversidad genética de *Ae. aegypti* y se comprobó su reproducibilidad. A pesar de que esta técnica ha sido empleada para el estudio del comportamiento de variabilidad genética en el mosquito *Ae. aegypti* y no en estudios de expresión diferencial de genes, si ha reflejado exitosamente resultados congruentes en otros organismos donde se ha empleado para este fin. Nuestro trabajo es el primero en emplear esta técnica en células de *Ae. albopictus* para identificar genes diferencialmente expresados.

Mediante la técnica de AFLP, obtuvimos fragmentos que correlacionaron bien con reportes en otros genomas donde obtienen tamaños de aproximadamente 1000 pb para genomas complejos como animales y plantas.⁴ Fragmentos de tamaños menores a 200 pb se ha reportado para genomas menos complejos como levaduras.⁶⁸

Nos enfocamos en purificar fragmentos que se “sobreexpresaban” o que “disminuían” su expresión tanto en células C6/36 no infectadas como persistentemente infectadas, ya que estos fragmentos representaban las bandas diferenciales entre las dos condiciones de las células C6/36. Incluimos células C6/36 persistentemente infectadas de los pases 52 a 58, cuyo RNA obtenido fue mezclado para obtener un resultado homogéneo y realizar los posteriores experimentos necesarios para la técnica de AFLP. Consideramos como desventaja de esta metodología el hecho de haber obtenido pocos fragmentos diferenciales en tamaños mayores a 100 pb y un número mayor de fragmentos de aproximadamente entre 100 y 400 pb, impidiendo su purificación con éxito de los geles de poliacrilamida. Es probable que el uso de otras enzimas de restricción así como el diseño de nuevos oligonucleótidos para ser empleados durante la PCR preselectiva y selectiva, permitan la generación de un mayor número de fragmentos de tamaños mayores a 100 pb, con lo cual su purificación sea más eficiente. Otra técnica que se pudiera emplear para la identificación de genes son los microarreglos, sin embargo, se requiere de equipo y software especializados.

A pesar de que obtuvimos pocos fragmentos, esta metodología nos fue útil para identificar algunos genes que se encuentran expresados diferencialmente durante una infección persistente en las células C6/36.

Con el análisis *in silico*, utilizando la base de datos del banco de genes de *Ae. aegypti* del Centro Nacional para la investigación en Biotecnología (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), se pudo encontrar homología de las secuencias de los fragmentos diferencialmente expresados con las ya reportadas. Se obtuvo homología con 24 genes, de los cuáles 6 fueron secuencias de RNAm conservadas

desconocidas, es decir, todavía no se le ha identificado una función dentro de la célula; 3 fueron RNAm de proteínas hipotéticas, secuencias por medio de las cuales puede inferirse su función en la célula por su relación con proteínas funcionales y 5 RNAm de proteínas ribosomales. Este tipo de proteínas también fueron encontradas durante la búsqueda de genes en células resistentes y susceptibles a infecciones agudas por DENV, sin embargo el número de accesos al NCBI fue distinto. El resto de las secuencias obtenidas en este trabajo tuvieron homología con los genes del cofactor molibdopterina, la etanolamina-fosfato citidililtransferasa, la peritrofina, la ferritina, el adenilato ciclasa, el péptido de secreción de saliva, la inosina monofosfato 5-deshidrogenasa y la importina beta-3.

COFACTOR DE MOLIBDOPTERINA.

El cofactor de molibdopterina (Moco), es una molécula que se une al sitio activo de la molibdoenzima (molibdopterina Mo), catalizando reacciones muy importantes en los ciclos de carbono, nitrógeno y azufre, asimilación de nitratos, catabolismo de purinas y síntesis de hormonas como el indol acético y ácido abscísico en plantas superiores. Por otro lado se ha reportado que la deficiencia de Mo o mutaciones que afectan la capacidad de usar o transportar Mo al interior de las células implican la pérdida de rutas metabólicas importantes que provocan la muerte del organismo. En insectos todavía no se ha reportado la función de esta molécula, sin embargo puede inferirse que tal vez la importancia en éstos radica en su participación en la síntesis de purinas, proceso que también está implicado en la replicación viral.⁷⁴ De manera interesante este gen fue encontrado en la condición no infectada pero no en la persistente sugiriendo que probablemente exista una modificación en la vía de la síntesis de purinas en las células persistentemente infectadas que pudiera tener repercusiones, probablemente negativas, en la síntesis del RNA viral (ver **tabla 7**).

ETANOLAMINA-FOSFATO CITIDILILTRANSFERASA.

La etanolamina-fosfato citidililtransferasa es una enzima perteneciente a la familia de las transferasas de fósforo que participa en el metabolismo de los aminofosfonatos (fosfonatos) y glicerfosfolípidos. Se ha reportado que los

aminofosfonatos son una buena fuente de nitrógeno del suelo para las plantas y son bastante comunes en diferentes organismos como insectos y moluscos, entre otros. En *Ae. albopictus*, la etanolamina-fosfato citidililtransferasa se ha encontrado en las células C6/36 no infectadas, pero está ausente en las que han sido infectadas con DENV 1 y 3, sin embargo la relevancia de este hallazgo no ha sido esclarecida.⁶² Curiosamente en este trabajo encontramos un hallazgo similar ya que el gen se encontró expresado en las células no infectadas pero no en las persistentemente infectadas (ver **tabla 7**).

PERITROFINA.

En relación a la peritrofina, es una proteína que fue aislada por primera vez en el intestino de los insectos y forma parte de la matriz peritrófica. La presencia de la matriz peritrófica en el intestino del insecto todavía no ha sido bien definida pero se cree que participa en la digestión de los alimentos y además forma una barrera protectora contra la invasión de bacterias, virus y parásitos. La peritrofina no sólo ha sido reportada en insectos sino que recientemente se ha encontrado en crustáceos como componente de la capa del huevo. Se ha sugerido que en los crustáceos la peritrofina puede desempeñar un papel en la defensa inmune así como en otras respuestas fisiológicas.¹⁵ Debido a que esta proteína fue encontrada en la condición no infectada (ver **tabla 7**) puede inferirse que la célula tiene activada su protección contra agentes infecciosos, sin embargo su ausencia en la condición persistente tal vez se deba a que la presencia del DENV ha provocado cambios en la célula, afectando la función de la peritrofina, sin embargo esta función tendrá que demostrarse en células del intestino donde su función ha sido más estudiada, a diferencia en las células C6/36 cuyo origen se desconoce.

ADENILATO CICLASA.

Es una enzima que utiliza ATP como sustrato para generar AMP cíclico en el cual las posiciones de 5' y 3' del azúcar cíclico se unen mediante un grupo fosfato. Además es una importante molécula en la transducción de señales en eucariotas, sin embargo, todavía no se ha asociado su importancia con la infección por DENV.²¹

FERRITINA.

En los insectos hematófagos, la sangre es importante para regular la maduración del óvulo, sin embargo una alta concentración de hierro es tóxica para la mayoría de los organismos, incluyendo a los insectos. Un medio por el cual éstos soportan la carga de hierro es quizás por la expresión de proteínas de unión, tal como la ferritina, proteína de almacenamiento de hierro que en la mayoría de los animales es un componente citosólico, pero en los insectos es una proteína que se encuentra en el sistema vacuolar de las células y en la hemolinfa. En vertebrados, la ferritina es un oligómero formado por dos tipos de subunidades llamadas cadenas pesadas y ligeras, que forman parte de la respuesta antioxidante constitutiva. Se ha reportado que en el intestino medio de *Ae. aegypti* existe un sitio primario para la expresión de ferritina, y cada vez que el mosquito termina de alimentarse, se induce la expresión de homólogos a la cadena pesada y ligera de la ferritina, funcionando como protector al efecto citotóxico generado por la cantidad de hierro en la sangre.^{16,20} Probablemente, la ausencia de ferritina en los mosquitos infectados con DENV disminuye su tiempo de vida media, ya que al no tener regulación sobre las concentraciones de hierro, después de la ingesta de sangre, éste se vuelve tóxico. La presencia del virus en el mosquito pudiera afectar la expresión de esta proteína, razón por la cual disminuye su expresión en las células persistentemente infectadas, sin embargo hasta el momento no hay evidencias que puedan confirmarlo.

PÉPTIDO DE SECRECIÓN SALIVAL

Los mosquitos machos obtienen su energía de líquidos azucarados que obtienen de las plantas, pero como se ha indicado, las hembras requieren para la reproducción de una alimentación con sangre de vertebrados. La transmisión de organismos productores de enfermedades ocurre durante la alimentación sanguínea, ya que los mosquitos pueden adquirir patógenos al obtener la sangre de un huésped infectado y transmitirlos al inyectar saliva infectada durante la toma de sangre. La saliva de los mosquitos es un fluido indispensable para obtener sangre, ya que en ella existen numerosos factores peptídicos con funciones farmacológicas determinadas: anticoagulantes, capaz de inhibir la cascada de la coagulación;

antiplaquetarios que evitan el taponamiento y vasodilatadores para aumentar el flujo de sangre a la zona de picadura. La composición de la saliva de los mosquitos es muy compleja y aunque se tienen datos de que pueden existir lectinas y lisozimas, se desconoce la identidad de la mayoría de los péptidos presentes en las secreciones salivales. Probablemente el hecho de que se haya encontrado una homología de nuestra secuencia con un péptido de secreciones salivales en las células persistentemente infectadas nos hable de una posible influencia del virus como mecanismo de distribución y traslado a otros mosquitos pero que deberá ser estudiada a mayor detalle.³²

INOSINA MONOFOSFATO-5 DESHIDROGENASA

La inosina monofosfato 5 deshidrogenasa es otro de los genes expresados en las células infectadas de manera persistente. Esta proteína es una enzima limitante de la síntesis de *ново* de los nucleótidos de guanina, además se ha reportado que participa en la oxidación de la inosina 5 monofosfato en xantina 5 monofosfato con la reducción del NAD. Se ha indicado que esta proteína regula la cantidad de nucleótidos de guanina, que a su vez controlan varios procesos fisiológicos, como la replicación, transcripción, señalización y glicosilación, todos estos procesos importantes en la célula, pero también para la replicación viral pues durante la síntesis del genoma se requiere de la participación de nucleótidos que no son sintetizados por la maquinaria viral sino por la celular. Es posible que el virus se beneficie si manipula algún mecanismo para “sobreexpresar” a la inosina monofosfato 5 deshidrogenasa, pero todavía faltan muchos estudios para poder relacionar su papel durante una infección persistente.⁵⁰

IMPORTINA BETA-3

En los últimos años, nuestra comprensión de los procesos de transporte macromolecular a través de la envoltura nuclear ha ido creciendo, identificándose a receptores solubles de transporte que participan en el importe nuclear, tal cual lo hace la importina beta, quien reconoce a sus sustratos en el citoplasma y los transporta a través de los poros nucleares al interior del núcleo. Las importinas son un grupo de proteínas que tienen una masa molecular de entre 90 y 130 kDa, pero

todas se caracterizan por tener un punto isoeléctrico ácido. Las características comunes de todas las importina beta son su capacidad de transporte entre el núcleo y el citoplasma, su interacción con RanGTP, así como su capacidad para reconocer sustratos específicos.⁷⁷ Un esfuerzo importante en materia de transporte nucleocitoplásmico se ha dirigido hacia el análisis de los miembros de la familia importina beta, ya que antes se consideraba que esta proteína era exclusivamente un receptor central en el transporte de proteínas, sin embargo, recientemente se ha publicado que participa como regulador negativo en el ensamble del huso mitótico, formación de membrana nuclear y el ensamble del poro nuclear.⁷⁸ Sorprendentemente, las funciones de muchos de estos receptores se conservan desde la levadura hasta los seres humanos. Hay 14 miembros de la familia importina beta en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, nueve de los cuales han demostrado que funcionan como importinas y cuatro como exportinas. Los eucariotas superiores contienen un número aún mayor de importina beta y se ha propuesto que hay más de 22 miembros en mamíferos.⁷⁷ Por otro lado, se ha observado que la importina beta no sólo transporta proteínas celulares sino también proteínas virales, como es el caso de la NS5 de DENV, la cual es la RNA polimerasa viral, misma que requiere ser fosforilada en el núcleo para poder participar en el proceso de replicación viral, de lo contrario este proceso parece ser afectado. En nuestro trabajo, encontramos expresada la importina beta-3 en la condición no infectada pero disminuida en la condición persistente. Interesantemente, existe un estudio donde, mediante el uso de RNAi, la disminución de la expresión de la importina beta en células de mosquito infectadas de manera aguda provoca una reducción en los títulos virales, sugiriendo su importante participación en el ciclo replicativo viral.²⁶

Debido a que la técnica de AFLP permite analizar los resultados de manera cualitativa, decidimos realizar RT-PCR para evaluar los patrones de expresión de la importina beta-3 en las células C6/36 en ambas condiciones. Para ello se diseñaron oligonucleótidos que flanquean una región del gen de la importina beta-3. Tras efectuarse la RT-PCR y utilizar como control oligonucleótidos que amplifican una región del gen de la actina, corroboramos que la importina beta-3 está mayormente

expresada en las células C6/36 no infectadas respecto a las células infectadas de manera persistente. Las células C6/36 persistentemente infectadas empleadas en este trabajo aparentemente no producen cantidades detectables de partículas virales (datos no publicados) y aunque todavía está en proceso de evaluación la eficiencia de la replicación viral en estas células, la disminución de la expresión de la importina beta-3 y el antecedente del efecto de esta proteína en *Ae aegypti* por DENV, puede sugerirse que este transportador pudiera participar como un represor indirecto del proceso de replicación del DENV, sin embargo se requerirá de estudios más dirigidos para corroborarlo.

No se pudo encontrar la expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta inmune, tal como ha sido observado en infecciones agudas, sin embargo, tal vez la presencia o ausencia de algunos genes encontrados en la infección persistente sea un mecanismo de defensa en el que la célula utilice menos energía para regular la actividad replicativa del virus y a la vez garantice su supervivencia, sin embargo se deben hacer más estudios para corroborarlo.

En resumen, en este trabajo se identificaron diversos genes celulares que se encuentran diferencialmente expresados en células de mosquito *Ae. albopictus* persistentemente infectadas con DENV-2 que abrirán una amplia gama de estudios encaminados a entender la relación virus-célula, la generación y mantenimiento de infecciones persistentes y la interferencia viral.

9.0 CONCLUSIONES

- ❖ Se encontró que la infección de manera persistente por DENV-2 en las células C6/36 de *Ae. albopictus* provocó el incremento o disminución de ciertos genes.
- ❖ Mediante la técnica de AFLP se pudo observar la expresión diferencial de 24 genes que tienen una homología de 78-100% con el genoma de *Ae. aegypti*, de los cuáles 12 se encuentran disminuidas y 12 “sobreexpresadas” en la condición persistentemente infectada, resultado que al menos para uno de los genes, coincidió con los obtenidos mediante RT-PCR semicuantitativa.
- ❖ Hasta el momento solo hemos podido relacionar con el proceso de infección por DENV en las células C6/36 al gen de importina beta-3, ya que estudios previos indican que durante una infección aguda su disminución es proporcional a los títulos virales.
- ❖ Durante el análisis de la expresión diferencial de genes no se pudo encontrar genes relacionados con la respuesta inmune tal como ha sido observado en infecciones agudas.

10.0 PERSPECTIVAS

Con este trabajo se observó que la técnica de AFLP puede utilizarse para el estudio de la detección de expresión diferencial de genes en las células C6/36 de mosquito cuando están infectadas de manera persistente con el DENV-2. A partir de los resultados obtenidos podemos sugerir lo siguiente:

- 1.- Seguir analizando las combinaciones que no pudieron ser estudiadas durante el desarrollo de este trabajo.
- 2.-Analizar, de manera cuantitativa mediante RT-PCR en tiempo real o final, la expresión de los genes restantes encontrados.
- 3.-Estudiar, con la técnica de inmunofluorescencia, el comportamiento de la importina β -3 en las células C6/36 en ambas condiciones.
- 4.-Disminuir, mediante RNAi, la expresión de importina beta-3 en las célula C6/36 no infectadas y posteriormente infectar con el DENV-2 para observar el comportamiento del virus en la célula.
- 5.-Aumentar la expresión de importina β -3 en las células persistentemente infectadas y medir los títulos virales.

11.0 ANEXOS

PREPARACIÓN DE TBE 10X, 1L.

Se pesan los siguientes reactivos:

Trizma base	108g
Ácido bórico	55g
EDTA	9.3g

Aforar a 1 litro de agua y esterilizar en autoclave. El pH final= 8.3.

PREPARACIÓN DE AGUA DEPC.

Se agregan 100 μ l de Dietilpirocarbonato (DEPC) por cada 100mL de agua destilada. Se agita vigorosamente hasta homogenizar. Finalmente se deja reposar toda la noche y esterilizar al siguiente día.

12.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Adams RH. and DT. Brown. 1985. BHK cells expressing Sindbis virus-induced homologous interference allow the translation of nonstructural genes of superinfecting virus. *Journal Virology*. 54:351-357.
2. Adelman ZN., Blair CD., Carlson JO., Beaty BJ. and Olson KE. 2001. Sindbis virus-induced silencing of dengue viruses in mosquitoes. *Insect Molecular Biology* 10(3):265-273.
3. Ahmed Fu., Mahmood CB. and Sharma JD. 2001. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever in children the 2000 out break in Chittatong, Bangladesh. *Dengue Bulletin*. 25:33-9.
4. Bachem C., Hoeven R., Bruijin S., Vreugdenhi d., Zabeau M. and Visser G. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal*. 9(5):745-753.
5. Barón OL., Ursic-Bedoya RJ., Lowenberger CA. and Ocampo CB. 2010. Differential gene expression from midguts of refractory and susceptible lines of the mosquito, *Aedes aegypti*, infected with Dengue-2 virus. *Journal of Insect Science*. 10:23-41.
6. Brooks A., Johansson M., John A. and Vasudevan S. 2002. The Interdomain Region of Dengue NS5 Protein That Binds to the Viral Helicase NS3 Contains Independently Functional Importin β -1 and Importin α/β Recognized Nuclear Localization Signals. *The Journal of Biological Chemistry*. 39:277.
7. Burivong P., Pattanakitsakul SN., Thongrunkiat S., Malasit P. and Flejel TW. 2004. Markedly reduced severity of Dengue virus infection in mosquito cell cultures persistently infected with *Aedes albopictus densovirus* (AalDNV). *Virology*. 329:2.
8. Calisher CH., Karabatsos N., Dalrymple JM., Shope RE., Porterfield JS. and Westaway EG. 1989. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by crossneutralization tests with polyclonal antisera. *Journal General Virology*. 70:37- 43.

9. CENA VECE Epidemiologia, Secretaria de salud, 2011.
<http://www.cenavece.salud.gob.mx/>
10. Condreay LD. and Brown DT. 1988. Suppression of RNA synthesis by a specific antiviral activity in sindbis virus-infected *Aedes albopictus* cells. *Journal Virology*. 62(1):346-348.
11. De Gregorio, E., Spellman, PT., Tzou, P., Rubin, GM. and Lemaitre, B. 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO Journal*. 21(11):2569-79.
12. Debnath NC., Tierney R., Sil BK., Wills MR. and Barrett AD. 1991. *In vitro* homotypic interference by defective interfering particles of West Nile virus. *Journal General Virology*. 72:2705–2711.
13. Dietz VJ., Nielburg P., Gubler DJ. and Gómez I. 1992. Diagnosis of measles by clinical case definition in dengue-epidemic-areas: implications for measles surveillance and control. *Bull World Health Organ*. 70(6): 745-750.
14. Domingo C. and Gascón J. 2005. Dengue y otras fiebres hemorrágicas virales. *Enfermedades Infecciosa Microbiología Clínica*. 23(10):615-26.
15. Du X., Wang J., Liu N., Zhao X., Li F. and Xiang J. 2005. Identification and molecular characterization of a peritrophin-like protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). *Molecular immunology*. 43:1633-44.
16. Dunkov B., Georgieva T., Yoshiga T., Hall M. and Law J. 2001. *Aedes aegypti* ferritin heavy chain homologue: feeding of iron or blood influences message levels, lengths and subunit abundance. *Journal of Insect Science*. 2:7.
17. Eaton BT. 1979. Heterologous interference in *Aedes albopictus* cells infected with alphaviruses. *Journal Virology*. 30:45–55.
18. Gaines P., Olson E., Higgs S., Powers A., Beaty J. and Blair D. 1996. Pathogen-derived resistance to dengue type 2 virus in mosquito cells by expression of the premembrane coding region of the viral genome. *Journal Virology*. 2132–2137.
19. Gascón J., Giner V., Vidal J., Jou JM., Mas E. and Corachan M. 1998. Dengue: a re-emerging disease. A clinical and epidemiological study in 57 Spanish travelers. *Medicina Clínica (Barcelona)*. 111:583-6.

20. Geiser D., Chavez C., Munguia R., Winzerling J. and Pham D. 2003. *Aedes aegypti* ferritin a cytotoxic protector against iron and oxidative challenge?. Journal Biochemistry. 270:3667-74.
21. Genes IX. 2008. Benjamin Lewin. McGrawHill. 845.
22. Gibbons RV. and Vaughn DW. 2002. Dengue: an escalating problem. Department of Virus Diseases. British Medical Journal. 234:1563-6.
23. Gubler DJ. 1989. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: trop down or bottom up? Charles Franklin Craig Lecture. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 40:571-8.
24. Gubler DJ. 1998. Dengue and Dengue hemorrhagic fever. Clinical Microbiology Reviews. 17:11:480-96.
25. Gubler DJ. and Trent DW. 1993. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. Infect Agents Dis 2(6):383-93.
26. Guha D. and Schimmer B. 2005. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. Emerging Themes in Epidemiology. 2:186.
27. Guo X., Xu Y., Pike A. and Xi Z. 2010. Response of the mosquito protein interaction network to dengue infection. BioMed Genomics. 11:380.
28. Gutiérrez A., Arroyo R., Martínez JM., Pintado B. y De la Fuente J. 2000. Identificación mediante RT-AFLP de expresión génica diferencial ligada al sexo en embriones bovinos en estadio de preimplantación. Investigación Agraria. Producción y Sanidad Animales. 15:3.
29. Guzman MG. and Kouri G. 2004. Dengue diagnosis, advances and challenges. International Journal Infectious Diseases. 8:69-80.
30. Guzman MG., Alvarez M. and Rodríguez R. 1999. Fatal Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. International Journal Infectious Diseases. 3:130-5.
31. Harel A. and Forbes D. 2004. Importin Beta: Conducting a Much Larger Cellular Symphony. Molecular Cell. 16:319-30.
32. Igarashi A. 1979. Characteristics of *Aedes albopictus* cells persistently infected with dengue viruses. Nature. 280:690-691.

33. Igarashi A., Koo R. and Stollar V. 1977. Evolution and properties of *Aedes albopictus* cell cultures persistently infected with Sindbis virus. *Virology*. 82:69–83.
34. Isawa H., Yuda M., Orito Y. and Chinzei Y. 2002. A Mosquito Salivary Protein Inhibits Activation of the Plasma Contact System by Binding to Factor XII and High Molecular Weight Kininogen. *Journal Biology Chemistry*. 277: 27651-8.
35. Janssen P., Coopman R., Huys G., Swings J., Bleeker M., Vos P., Zabeau M. and Kersters K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*. 142:1881–1893.
36. Joshi V., Mourya DT. and Shorma RC. 2002. Persistence of Dengue 3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 67:158-61.
37. Kabra SK., Jain Y. and Pandey RM. 1999. Dengue hemorrhagic fever in children in the 1996. *American Tropical Medicine Hygiene*. 93:294-8.
38. Karlsson C. and Korayem I. 2004. Proteomic analysis of the *Drosophila* larval hemolymph clot. *Journal of Biological Chemistry*. 279(50): 52033-41.
39. Karpf A., Lenches E., Strauss E., Strauss J. and Brown D. 1997. Superinfection exclusion of alphaviruses in three mosquito cell lines persistently infected with sindbis virus. *Journal Virology*. 71:7119-23.
40. Keene KM. and Foy BD. 2004. 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*. 101(49): 17240-5.
41. Kocks C. and Cho JH. 2005. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 123(2): 335-46.
42. Lacaster MG., Hodgetts S. and Mackenzie J. 1998. Characterization of Defective Viral RNA Produced during Persistent Infection of Vero Cells with Murray Valley Encephalitis Virus. *Journal Of Virology*. 72(3):2474–2482.
43. Lee HL., Khadari MS. and Chiang YF. 1997. Preliminary field evolution of the combined adulticidal, larvicidal, and wall residual activity of ULV-applied bifenthrin against mosquitoes. *Journal Vector Ecology*. 22:146-9.
44. Lemaître B. and Hoffmann J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Reviews Immunology*. 25: 697-743.

45. Lewis JA., Chang GJ., Lanciotti RS., Kinney RM., Mayer L. and Trent D. 1993. Relationships of dengue-2 viruses. *Virology*. 197(1):216-24.
46. Lowenberger C., Kamal S., Chiles S., Bulet P., Hoffmann and Christensen B. 1996. Mosquito-*Plasmodium* Interactions in Response to Immune Activation of the Vector. *Experimental Parasitology*. 91:69.
47. Lucus GN., Kuranatilaka DH. and Wijesuriya AP. 2003. Guidelines for management of dengue haemorrhagic fever (DHF). Sri Lankan College of Pediatricians.
48. Lum LC., Lam SK., Choy YS., George R. and Harum E. 1996. Dengue encephalitis: a true entity? *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 54:256-9.
49. Luo T., Brown DT. 1993. Purification and characterization of a Sindbis virus-induced peptide which stimulates its own production and blocks virus RNA synthesis. *Virology*. 194: 44-49.
50. Malavige GN., Fernando S., Fernando DJ. and Seneviratne SL. 2006. Dengue viral infections. *Postgrad Medicine Journal* 2004; 80:588-601.
51. McBride WJ. and Bielefeldt-Ohmann H. 2000. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes and Infection*. 2:1041-50.
52. McClean J., Hamaguchi N., Belenky P., Mortimer S. and Hedstrom L. 2004. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase binds nucleic acids *in vitro* and *in vitro*. *Journall Biochemistry*. 379:243-251.
53. McLinden JH., Stapleton JT., Chang Q. and Xiang Jinhua. 2008. Expression of the Dengue Virus type 2 NS5 Protein in a CD4+ T Cell line inhibits HIV replication. *Journal infectious Diseases*. 198(6):860-3.
54. Monath TP. and Tsai T. 1997. Flavivirus In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. New York: Churchill Livinstone Inc; *Clinical Virology*. 1133-85.
55. Monath TPC. 1971. Neutralizing antibody responses in the major immunoglobulin classes to yellow fever 17D vaccination of humans. *American Journal Epidemiology*. 93:123-129.
56. Murillo J., Valenzulea H., Flores P. y Peraza F. 2006. Caracterización clínica y epidemiológica del dengue. *Revista Médica instituto Mexicano del Seguro Social*. 45(5): 485-491.

57. Narayanam M., Aravind MA. and Thilathammal N. 2002. Dengue fever epidemic in Chennai-a study of clinical profile and outcome. *Indian Pediatrician*. 39:1027-33.
58. Navarrete J., Cuervo N. y Vázquez J. 2008. Dengue hemorrágico sin hemorragias: ¿otra categoría?. *Gaceta Médica México*. 144:2.
59. Navarrete J., Vázquez JL., Vázquez JA. y Gómez H. 2002. Epidemiología del dengue y dengue hemorrágico en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). *Revista Peruana de Epidemiología*. 10:1.
60. Navarrete-Espinosa J., Gómez-Dantes H., Celis-Quintal JG. y Vázquez-Martínez JL. 2005. "Clinical profile of dengue hemorrhagic fever cases in México". *Salud Pública México*. 47:193-200.
61. Newton SE. and Dalgarno L. 1983. Antiviral activity released from *Aedes albopictus* cells persistently infected with Semliki forest virus. *Journal Virology*. 47(3): 652-655.
62. Olson KE. 2002. Developing arbovirus resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Molecular Biology*. 32(10):1333-43.
63. Pan American Health Organization. 2007. Dengue en las Américas, programa regional de dengue. Washington. PAHO.
64. Patramol S., Surasombatpattana P., Luplertlop N., Seveno M., Choumet P., and Misse D. 2011. Proteomic analysis of an *Aedes albopictus* cell line infected with Dengue serotypes 1 and 3 viruses. *Parasites&Vectors*. 4:138.
65. Paupy C., Orsoni A., Mousson L. and Huber. K. 2004. Comparisons of Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Microsatellite, and Isoenzyme Markers: Population Genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Phnom Penh (Cambodia). *Journal of Medical Entomology*. 41(4):664-71.
66. Pearson A. and Lux A. 1995. Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophagespecific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 92(9): 405660.
67. Pinheiro FP. and Corber SJ. 1997. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q* 50:161-8.

68. Poidinger M., Coelen R.J. and Mackenzie J.S. 1991. Persistent infection of Vero cells by the flavivirus Murray Valley encephalitis virus. *Journal General Virology*. 72:573–578.
69. Ravel S., Monteny N., Velasco-Olmos D., Escalante-Verdugo J. and Cuny G. 2001. A preliminary study of the population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico using microsatellite and AFLP markers. *Acta Tropica*. 78:241-50.
70. Reijans M., Lascaris R., Groeneger A.O., Wittenberg A., Werrelink E., Van Oeveren J., de Wit E., Boorsma A., Voetdijk B., van der Spek H., Grivell L.A. and Simons G. 2003. Quantitative comparison of cDNA-AFLP, microarrays, and Genechip expression data *Sacharomyces cerevisiae*. *Genomics*. 82:606-618.
71. Riedel B. and Brown D.T. 1979. Novel antiviral activity found in the media of Sindbis virus-persistently infected mosquito (*Aedes albopictus*) cell cultures. *Journal Virology*. 29(1):51-60.
72. Rigan-Perez J.C., Clark G.G., Gubler D.J., Reiter P., Sanders E.J. and Vorndam A.V. 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 352:971-7.
73. Romero C., Delfino M., Giachetto G. and Pérez M. 2011. Dengue: frente a una eventual epidemia en Uruguay. Puesta al día. *Clínicas Pediátricas del Sur*. 28-39.
74. Savelkoul P., Aarts H., Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J., Schouls L., and Lenstra, J. 1999. Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *Journal Of Clinical Microbiology*. 3083–3091.
75. Savelkoul M., Aarts M., Haas L., Dijkshoorn L. and Duim B. 1999. Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis: The State of an Art. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:3083-309.
76. Shokry A. 2001. Análisis molecular de la proteína portadora del cofactor de molibdeno de *Chlamydomonas reinhardtii*. Universidad de Córdoba. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. 1-10

77. Slavin HB. 1943. Persistence of the virus of St. Louis encephalitis in the central nervous system of mice for over five months. *Journal Bacteriology*. 46:113–116.
78. Spencer E. and Jiang J. 1999. Signal-induced ubiquitination of B α by the F-box protein Slimb/-TrCP. *Genes & Development*. 13(3): 284-94.
79. Stollar V. and Shenk TE. 1973. Homologous viral interference in *Aedes albopictus* cultures chronically infected with Sindbis virus. *Journal Virology*. 11:592– 595.
80. Ström AC. And Wies K. 2001. Importin- β -like nuclear transport receptors. *Genome Biology*. 2(6):3008.1-9.
81. Tabachnick WJ and Powell JR. 1979. A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Genet Resource Crop Evolution*. 34:215-29.
82. Thu HM., Aye KM. and Thein S. 1998. The effect of temperature and humidity on dengue virus propagation in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*. 29:280-4.
83. Troyes L., Villegas Z. and Troyes M. 2006. Expansión De L *Aedes Aegypti* A Localidad S Rurales De Cajamarca. *Revista Peru Salud Pública* 23(3).
84. Van BH., Khantikul N. and Panart K. 2002. Knowledge and use of prevention measure related to dengue in northern Thailand. *Tropical Medicine International Health*. 7:993-1000.
85. Vaughn DW., Green S., Kalayanarooj S., Innis BI. and Suntayakorn S. 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *Journal Infect Disease*. 181:2-9.
86. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van De Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. and Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23:4407-14.
87. Walts DM., Burke DS. and Harrison BA. 1987. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for Dengue type 2 virus. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 6:143-52.
88. Wang J. and Bughrara S. 2007. Monitoring of gene expression profiles and identification of candidate genes involved in drought responses in *Festuca mairei*. *Molecular Genetic Genomics*. 277:571–587.

89. World Health Organization. 1999. Prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever: comprehensive guidelines WHO Regional publication SEARO, No 29.
90. World Health Organization. 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd. Geneva: WHO.
91. Xi Z., Ramirez JL. and Dimopou G. 2008. The Aedes aegypti Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. Pathogens 4(7):e1000098.
92. Yan G., Romero-Severson J., Walton M., Chadee DD. and Severson DW. 1999. Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. Molecular Ecology. 8:951-63.
93. Zhong D., Pai A. and Yan G. 2003. Quantitative trait loci for susceptibility to tapeworm infection in the red flour beetle. Genetics. 165: 1307-1315.
94. Zhong, D, Pai A. and Yan G. 2004. AFLP-based genetic linkage map for the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Journal Heredity. 95:53-61.