

SELECCIÓN POR ISOFAMILIAS DE CEPAS SUSCEPTIBLES Y  
REFRACTARIAS DE *Aedes aegypti* A INFECCIÓN CON VIRUS DENGUE-2, A  
PARTIR DE UNA POBLACIÓN OBTENIDA EN LA CIUDAD DE CALI

PAOLA ANDREA CAICEDO BURBANO

CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES  
MÉDICAS-CIDEIM  
UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
SANTIAGO DE CALI  
2008

SELECCIÓN POR ISOFAMILIAS DE CEPAS SUSCEPTIBLES Y  
REFRACTARIAS DE *Aedes aegypti* A INFECCIÓN CON VIRUS DENGUE-2, A  
PARTIR DE UNA POBLACIÓN OBTENIDA EN LA CIUDAD DE CALI

PAOLA ANDREA CAICEDO BURBANO

Trabajo de grado para optar al título de:  
Bióloga

Directora:  
CLARA B. OCAMPO  
Bióloga, M.Sc. Ph.D

Co-directora:  
OLGA LUCIA BARON A.  
Bacterióloga

Asesor:  
NELSON ROJAS  
Biólogo, M.Sc

CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES  
MÉDICAS-CIDEIM  
UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
SANTIAGO DE CALI  
2008

*A mis padres Orlando y Gladys, A mi  
hermano Willian y mi sobrino Juan  
Camilo.*

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por ser mi guía, mi fortaleza, mi confidente y el motor para salir adelante con mis metas y propósitos.

Al departamento de Biología de la Universidad del Cauca, por contribuir a mi formación integral como Bióloga durante mi pregrado. De forma especial a mis profesores por sus conocimientos y experiencias especialmente al profesor **Nelson Rojas**, por darme la oportunidad de conocer nuevos campos de trabajo y por su asesoría en este trabajo.

Con gratitud y aprecio a mis compañeros de estudio, con los que compartí grandes experiencias, locuras y momentos inolvidables.

A la Unidad de Entomología Médica, investigadores y personal del **Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas- CIDEIM**, institución en la que desarrollé mi trabajo y la cual lo financió en su totalidad. En especial a mi directora **Clara Ocampo**, por brindarme la oportunidad de aprender nuevas cosas y por depositar su confianza en mí.

A **Olga Lucía Barón**, mi co-directora, por compartir sus conocimientos, por su paciencia y por brindarme su gran amistad. Además de los “consejitos” que nunca estuvieron de más, es decir la “formación integral” que siempre estuvo dispuesta a dar.

A **Myriam Salazar**, por sus grandes consejos, su valiosa amistad, sus enseñanzas y compañía en este aprendizaje.

A mi amiga, confidente y compañera de estudio, **Neila Jullieeth Mina**, por su paciencia, afecto y colaboración en todo este trayecto. Por compartir conmigo los buenos y malos momentos de cada día.

A **Luis Ernesto Ramírez**, técnico de laboratorio de la Unidad de Entomología de CIDEIM, por su colaboración en el mantenimiento de la colonia de *Aedes aegypti*, y los “valiosos Hamster”.

A mis compañeras de estudio, **Julie Pauline Latorre, Eliana Henao, Lady Castro**, por el apoyo durante toda la carrera y momentos gratos e irremplazables. Especialmente **Clara Luz Muñoz y Elizabeth Londoño**, por su colaboración y paciencia durante el desarrollo de este trabajo.

A mis padres, por su sacrificio, el gran apoyo incondicional y el aliento que me brindaron cada día, para alcanzar mis metas. A mi hermano, por su colaboración, confianza y apoyo en esta etapa de mi vida. A mi familia, por sus consejos, apoyo y colaboración. Y con gratitud a mi primo José Luis, por su valiosa ayuda, fue un gran soporte en los largos trámites en la Universidad.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE A EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**ACTA DE TRABAJO DE GRADO**

Jurado conformado por los profesores:

- 1. PATRICIA EUGENIA VÉLEZ. Departamento de Biología**
- 2. LUIS REINEL VÁSQUEZ. Faculta de Ciencias de la Salud**

El día 3 de Junio de 2008, a las 3 P.M, se lleva a cabo la sustentación de Trabajo de Grado presentado por la estudiante:

**PAOLA ANDREA CAICEDO BURBANO. Código: 30012159  
PREGRADO EN BIOLOGÍA**

**Nombre de Trabajo de Grado:** “SELECCIÓN POR ISOFAMILIAS DE CEPAS SUSCEPTIBLES Y REFRACTARIAS DE *Aedes aegypti* A INFECCIÓN CON VIRUS DENGUE-2, A PARTIR DE UNA POBLACIÓN OBTENIDA EN LA CIUDAD DE CALI”

Director de Trabajo de grado: **CLARA BEATRIZ OCAMPO DURÁN.**

-----  
**CLARA B. OCAMPO D. MS.c,Ph.D**  
Director de trabajo de grado  
CIDEIM

-----  
**PATRICIA E. VÉLEZ. MS.c**  
Jurado. Departamento de Biología  
Universidad del cauca

-----  
**LUIS REINEL VÁSQUEZ. MS.c**  
Jurado. Facultad de Ciencias de la Salud.  
Universidad del Cauca

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>3 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>4.1 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>10</b>
<b>4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>10</b>
<b>5 MARCO CONCEPTUAL.....</b>	<b>11</b>
<b>5.1 EL DENGUE – Enfermedad.....</b>	<b>11</b>
<b>5.2 HISTORIA Y EPIDEMIOLOGÍA.....</b>	<b>11</b>
<b>5.3 EL VECTOR.....</b>	<b>14</b>
<b>5.4 VIRUS DENGUE Y SEROTIPOS.....</b>	<b>17</b>
<b>5.5 CICLO DE TRANSMISIÓN DEL VIRUS DENGUE.....</b>	<b>19</b>
<b>5.6 PREVENCIÓN Y CONTROL.....</b>	<b>21</b>
<b>5.7 COMPONENTES BIOLÓGICOS EN LA TRANSMISIÓN DE PATÓGENOS POR VECTORES.....</b>	<b>23</b>
<b>5.8 TABLAS DE VIDA.....</b>	<b>28</b>
5.8.1 Construcción de una tabla de vida.....	29
5.8.1.1 Curvas de sobrevivencia.....	29
<b>6 ANTECEDENTES.....</b>	<b>31</b>
<b>7 HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>

<b>8</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>35</b>
<b>8.1</b>	<b>OBTENCIÓN DE ADULTOS DE <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>8.2</b>	<b>ALIMENTACIÓN ARTIFICIAL DE HEMBRAS DE <i>Aedes aegypti</i>, UTILIZANDO ALIMENTADORES DE VIDRIO CON MEMBRANA SINTÉTICA.....</b>	<b>42</b>
8.2.1	Obtención y almacenamiento de huevos de <i>Aedes aegypti</i> . ....	46
<b>8.3</b>	<b>CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS C6/36.....</b>	<b>47</b>
<b>8.4</b>	<b>CULTIVO DEL VIRUS.....</b>	<b>48</b>
<b>8.5</b>	<b>MICROINYECCIÓN DE HEMBRAS DE <i>Aedes aegypti</i> CON VIRUS DEN-2.....</b>	<b>49</b>
<b>8.6</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA COMPETENCIA VECTORIAL DE <i>Aedes aegypti</i> A INFECCIÓN CON VIRUS DENGUE-2.....</b>	<b>51</b>
<b>8.7</b>	<b>INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA (IFI) PARA EVALUAR LA COMPETENCIA VECTORIAL DE <i>Aedes aegypti</i> A INFECCIÓN CON VIRUS DENGUE-2. ....</b>	<b>54</b>
<b>8.8</b>	<b>TITULACIÓN DE VIRUS DENGUE-2.....</b>	<b>61</b>
<b>8.9</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....</b>	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>9.1</b>	<b>RESULTADOS PRELIMINARES.....</b>	<b>63</b>
9.1.1	Resultados preliminares en CIDEIM.....	63
<b>9.2</b>	<b>PRIMERA PARTE: Pruebas preliminares del presente trabajo. ....</b>	<b>64</b>
9.2.1	Selección por isofamilias de cepas susceptibles y refractarias de <i>Aedes aegypti</i> a infección con virus Dengue-2, en generaciones consecutivas.....	64
9.2.1.1	Primer experimento .....	64
9.2.1.2	Segundo Experimento .....	66
<b>9.3</b>	<b>SEGUNDA PARTE: Selección de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> durante 3 generaciones alternas.....</b>	<b>68</b>
9.3.1	Evaluación del efecto de la infección por virus dengue-2 en el desarrollo biológico de los mosquitos de <i>Aedes aegypti</i> susceptibles y refractarios. ....	71
9.3.1.1	TABLAS DE VIDA HORIZONTALES DE <i>Aedes aegypti</i> .....	72
<b>10</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>109</b>
<b>10.1</b>	<b>Selección por isofamilias en generaciones alternas.....</b>	<b>109</b>

**10.2 Tablas de vida .....111**

**11 CONCLUSIONES ..... 115**

**RECOMENDACIONES**

**PERSPECTIVAS**

**BIBLIOGRAFÍA**

**ANEXOS**



## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Distribución del virus dengue y su mosquito vector <i>Aedes aegypti</i> en el mundo en el 2005. ....	13
Figura 2. Mesonoto de <i>Aedes aegypti</i> (izquierda) y <i>Aedes albopictus</i> (derecha) .....	15
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> . ....	16
Figura 4. Posibles criaderos para <i>Aedes</i> . ....	17
Figura 5. Estructura del virus del dengue .....	19
Figura 6. Transmisión y replicación del virus del dengue. ....	20
Figura 7. Ciclo de transmisión.....	21
Figura 8. Barreras anatómicas en mosquitos asociadas a la infección por virus.....	25
Figura 9. Rutas migratorias y sitios de desarrollo por virus en el mosquito .....	26
Figura 10. Principales tipos de curvas de sobrevivencia (Rabinovich, 1972) .....	29
Figura 11. Procedimiento para la obtención de cepas de <i>Aedes aegypti</i> con fenotipo susceptible y refractario a infección con virus Dengue-2. ....	36
Figura 12. Selección de isofamilias susceptibles y refractarias de <i>Aedes aegypti</i> a infección con virus Dengue-2.....	38
Figura 13. Mapa de Santiago de Cali por Comunas .....	40
Figura 14. Contenedores plásticos para la eclosión de huevos .....	41
Figura 15. Jaula para el mantenimiento de mosquitos.....	42
Figura 16. Membrana en recipiente con agua.....	43
Figura 17. Preparación del alimentador .....	44
Figura 18. Alimentador de vidrio preparado para la alimentación .....	44
Figura 19. Equipo de alimentación artificial con alimentadores de vidrio .....	45
Figura 20. Alimentación de mosquitos sobre la membrana .....	46
Figura 21. Monocapa de cultivo celular. ....	47
Figura 22. Equipo para microinyección.....	49
Figura 23. Cámara de bioseguridad.....	51
Figura 24. Recipientes para individualización de hembras infectadas (izquierda), Cámara de bioseguridad para el mantenimiento de hembras infectadas (derecha)..	52

Figura 25. Equipo para disección de cabezas e intestinos de <i>Ae. Aegypti</i> .....	55
Figura 26. Disección de cabezas de hembras de <i>Aedes aegypti</i> .....	56
Figura 27. Marcaje de placas para IFI .....	56
Figura 28. Aplastamiento de cabezas de <i>Aedes aegypti</i> para IFI.....	57
Figura 29. Delimitación de área de las muestras para IFI.....	57
Figura 30. Extracción de intestinos de <i>Ae. aegypti</i> .....	59
Figura 31. Evaluación de las barreras a la infección por virus dengue-2 en <i>Aedes aegypti</i> . .....	60
Figura 32. Titulación de virus Dengue-2 .....	61
Figura 33. Huevos obtenidos por cada hembra individualizada.....	69
Figura 34. Curvas de sobrevivencia de larvas de <i>Aedes aegypti</i> cepa Rockefeller filiales 2 a 6 y filial 1 de la población mixta. ....	72
Figura 35. Porcentaje de mortalidad de <i>Aedes aegypti</i> cepa Rockefeller durante las 6 generaciones evaluadas.....	73
Figura 36. Curvas de sobrevivencia de larvas de <i>Ae. aegypti</i> cepa susceptible a la infección por virus dengue-2.....	75
Figura 37. Curvas de sobrevivencia de larvas de <i>Ae. aegypti</i> cepa refractaria BEM a la infección por virus dengue-2. ....	76
Figura 38. Curvas de sobrevivencia de larvas de <i>Ae. aegypti</i> cepa refractaria BIM a la infección por virus dengue-2. ....	76
Figura 39. Porcentaje de mortalidad de larvas, pupas y adultos de <i>Aedes aegypti</i> , cepa susceptible (Filiales 1 a 7) comparado con la cepa Rockefeller.....	77
Figura 40. Porcentaje de mortalidad de larvas, pupas y adultos de <i>Aedes aegypti</i> , cepa refractaria con BEM (Filiales 1 a 7) comparado con la cepa Rockefeller. ....	78
Figura 41. Porcentaje de mortalidad de larvas, pupas y adultos de <i>Aedes aegypti</i> , cepa refractaria (Filiales 1 a 7) comparado con la cepa Rockefeller.....	78
Figura 42. Promedio de huevos por hembra de <i>Aedes aegypti</i> . Cepas susceptible, refractaria con BEM, refractaria BIM, Rockefeller y parentales.....	105
Figura 43. Porcentaje de eclosión de <i>Aedes aegypti</i> , cepa susceptible (Filiales 1 a 7) comparado con la cepa Rockefeller.....	107

## LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Parámetros para elaborar una tabla de vida horizontal o vertical .....	29
Tabla 2. Porcentaje de fenotipos susceptibles y refractarios de <i>Aedes aegypti</i> a infección con virus dengue-2 de las localidades iniciales y la cepa susceptible. ....	66
Tabla 3. Registro de mortalidad y sobrevivencia de estadios inmaduros de <i>Ae. aegypti</i> , cepa susceptible (filial 2) a infección con virus dengue-2.....	66
Tabla 4. Registro de mortalidad y sobrevivencia de estadios inmaduros de <i>Ae. aegypti</i> , cepa refractaria (Filial 2) a infección con virus dengue-2. ....	66
Tabla 5. Número de hembras infectadas con virus dengue-2. Filial 1, población mixta. ....	68
Tabla 6. Porcentajes de competencia vectorial de <i>Aedes aegypti</i> a infección con virus dengue-2. Filial 1, población mixta. ....	69
Tabla 7. Porcentajes de competencia vectorial de <i>Aedes aegypti</i> a infección con virus dengue-2, durante 3 generaciones alternas. Cepa susceptible.....	70
Tabla 8. Porcentajes de competencia vectorial de <i>Aedes aegypti</i> a infección con virus dengue-2, durante 2 generaciones alternas. Cepa refractaria BIM. ....	70
Tabla 9. Porcentajes de competencia vectorial de <i>Aedes aegypti</i> a infección con virus dengue-2, durante 3 generaciones alternas. Cepa refractaria BEM.....	70
Tabla 10. Modelo de regresión binomial negativo para mortalidad de larvas, pupas y adultos de <i>Ae. aegypti</i> cepa Rockefeller. ....	74
Tabla 11. Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, para comparar el tiempo de vida entre las cepas susceptible, refractaria con BEM, refractaria BIM y Rockefeller. ....	75
Tabla 12. Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de <i>Ae. aegypti</i> entre cepas Rockefeller, Susceptible, Refractaria con BEM y Refractaria BIM. ....	79
Tabla 13. Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de <i>Ae. aegypti</i> entre filiales de la cepa Susceptible. ....	79
Tabla 14. Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de <i>Ae. aegypti</i> entre filiales de la cepa refractaria con BEM. ....	79
Tabla 15. Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de <i>Ae. aegypti</i> entre filiales de la cepa Refractaria. ....	104
Tabla 16. Promedio de huevos por hembra de <i>Aedes aegypti</i> . ....	104

Tabla 17. Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, para evaluar diferencia entre número de huevos por hembra entre las cepas susceptible, refractaria con BEM y refractaria.....	105
Tabla 18. Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, para evaluar diferencia entre número de huevos por hembra entre filiales de las cepas susceptible, refractaria con BEM y refractaria. ....	106
Tabla 19. Comparación del porcentaje de eclosión de las cepas Susceptible, refractaria con BEM, Refractaria y Rockefeller. ....	107
Tabla 20. Comparación del porcentaje de eclosión entre filiales de la cepa refractaria con BEM. ....	107
Tabla 21. Comparación del porcentaje de eclosión entre las cepas Refractaria. ....	107
Tabla 22. Comparación del porcentaje de eclosión entre las filiales de la cepa Susceptible. ....	108
Tabla 23. Comparación del porcentaje de eclosión entre las filiales de la cepa Rockefeller.....	108

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. FORMATO PARA DILIGENCIAR DATOS PARA TABLA DE VIDA	127
ANEXO 2. FORMATO DE REGISTRO IFI PARA CABEZAS DE MOSQUITOS – COMPETENCIA VECTORIAL DE ISOLÍNEAS.....	128
ANEXO 3. FORMATO DE REGISTRO TITULACIÓN DE VIRUS DENGUE-2 EN CÉLULAS C6/36HT .....	129
ANEXO 4. TABLAS DE VIDA HORIZONTALES DE PARENTALES, FILIAL 1 Y CEPA ROCKEFELLER DE <i>Aedes aegypti</i> . .....	130
ANEXO 5. TABLAS DE VIDA HORIZONTALES CEPA SUSCEPTIBLE DE <i>Aedes aegypti</i> A INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE-2. ....	131
ANEXO 6. TABLAS DE VIDA HORIZONTALES CEPA REFRACTARIA CON B.E.M DE <i>Aedes aegypti</i> A INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE-2. ....	132
ANEXO 7. TABLAS DE VIDA HORIZONTALES CEPA REFRACTARIA DE <i>Aedes aegypti</i> A INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE-2. ....	133
ANEXO 8. PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA COMPARAR EL NÚMERO DE HUEVOS POR HEMBRA ENTRE CEPAS Y ENTRE FILIALES.....	134

## **LISTA DE SIGLAS**

**SIVIGILA:** Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública.

**CDC:** Centers of Disease Control and prevention (centros para el control y la prevención de enfermedades).

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPS:** Organización Panamericana de la Salud

## INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad febril producida por un virus del mismo nombre con genoma RNA. Según criterios biológicos e inmunológicos el virus se ha clasificado en cuatro serotipos: Dengue 1, 2, 3 y 4. El virus es transmitido a los humanos mediante la picadura de mosquitos del género *Aedes* (HOLMES *et al.*, 1999) principalmente *Ae. aegypti* el más importante en el hemisferio occidental (OPS 1994; GORROCHOTEGUI-ESCALANTE *et al.*, 2002) y en menor proporción por *Ae. albopictus* y *Ae. japonicum* (VAZEILLE *et al.*, 2001; PAUPY *et al.*, 2001).

La infección en humanos por el virus dengue causa diferentes síntomas, desde una ligera fiebre (dengue clásico) hasta las formas severas y letales de la enfermedad, fiebre hemorrágica y síndrome de choque por dengue (RIGAU *et al.*, 1998). El dengue es una enfermedad que está relacionada con las condiciones ambientales de los climas tropicales y subtropicales. En Colombia, aparecieron los primeros casos en Santander en límites con Venezuela a finales de 1989 y comienzos de 1990, los siguientes brotes aparecieron en 1992 en el Valle del Cauca y en Cali en 1995, donde la primera gran epidemia ocurrió con 566 casos con cuadros sospechosos de dengue hemorrágico (SIVIGILA 2002)

La incidencia de las enfermedades transmitidas por vectores ha aumentado a causa de diversos factores como la reinfestación urbana de zonas por *Ae. aegypti*, que ha favorecido la transmisión del virus y la interacción parásito-vector-hospedero. Según la Organización Panamericana de Salud (OPS), el incremento de los viajes aéreos, las condiciones climáticas, la urbanización no planificada, las dificultades en el abastecimiento de agua, sumados al deterioro de los programas de control del vector, la carencia de insecticidas con buena relación costo/efectividad, la falta de educación sanitaria y el incremento de la circulación de los cuatro serotipos del virus, son factores a los cuales se les atribuye la diseminación de la enfermedad (OPS 2002).

En consecuencia, la prevención y el control del vector y de la enfermedad ha tomado gran importancia para las autoridades de salud pública (PAUPY *et al.*, 2001). Los programas de control de los mosquitos se basan en la aplicación de insecticidas y en el establecimiento de barreras físicas que disminuyan su reproducción. Sin embargo, el implemento de métodos químicos afecta el medio ambiente y la salud humana, además del incremento de la resistencia a los insecticidas.

Hasta el momento no se cuenta con una vacuna segura contra el dengue y un tratamiento antiviral disponible, por lo tanto la prevención de los arbovirus se basa principalmente en el control de las poblaciones del vector (GUBLER 1998).

La importancia del vector en la transmisión de la enfermedad y la evidencia de que factores intrínsecos a ellos (genéticos y fenotípicos) afectan la capacidad de transmitir un patógeno (competencia vectorial) pueden tener un efecto en las variaciones geográficas de la epidemiología de la enfermedad. Estas diferencias de origen genético en la competencia vectorial, han abierto la posibilidad de utilizar herramientas moleculares para la identificación de genes asociados a ésta y de esta forma buscar nuevas estrategias de control como la manipulación genética de los vectores (ALPHEY *et al.*, 2002) (CRAIG & HICKEY 1967)

Estudios genéticos en poblaciones de *Ae. aegypti* basados en factores biológicos como la competencia vectorial se han llevado a cabo mediante técnicas moleculares y métodos de selección de cepas susceptibles y refractarias a la infección o diseminación de flavivirus (GUBLER & ROSEN 1974). El tipo de selección que se ha empleado con mayor frecuencia son las aislíneas, que son familias descendientes de hembras obtenidas en campo que permiten detectar un componente heredable como la susceptibilidad y/o refractoriedad hacia el virus dengue en poblaciones de *Ae. aegypti* (TARDIEUX *et al.*, 1991).

En este trabajo se seleccionaron cepas susceptibles y refractarias de *Ae. aegypti* a infección con virus dengue-2 de la ciudad de Cali, mediante la evaluación de su competencia vectorial y de la diseminación del virus en el mosquito a través de las barreras de infección, utilizando como técnica principal la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los resultados de este proyecto, proveen conocimientos sobre la especie en estudio, que podrán ser utilizados a futuro para el entendimiento de los mecanismos moleculares asociados a su competencia vectorial que la gobiernen y de esta forma buscar nuevas herramientas para los programas de prevención y control vectorial. De esta forma, los resultados brindan información que podrá ser aplicada a estudios en la genética de poblaciones, como es el estudio de genes responsables de dicha competencia vectorial, las relaciones virus-vector y trabajos de ingeniería genética, como la manipulación de mosquitos transformados genéticamente y el manejo de genes resistentes en especies vectores silvestres - susceptibles en áreas endémicas para reducir la intensidad de la transmisión (BEERNTSEN *et al.*, 2000).

Estudios previos realizados en CIDEIM han mostrado un alto porcentaje de mortalidad en la selección de aislíneas, esto debido al elevado grado de consanguinidad y al poco número de individuos utilizados. La nueva aproximación que se empleó, permitió contrarrestar estas desventajas empleando una nueva colección de mosquitos de campo para refrescar la colonia y a su vez éstos en mayor número.



## 1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El dengue es considerado un grave problema de salud pública. En las regiones de las Américas, el dengue clásico, junto con su forma más compleja el dengue hemorrágico y el síndrome del choque del dengue, han tenido un incremento significativo en el número de casos pasando de 66,011 en 1980, a más de 700,000 en el 2004 (OMS 2004); lo que ha ocasionado un aumento en los costos económicos, sociales y pérdida de vida (CDC 2005).

Las largas jornadas de los programas de erradicación de *Ae. aegypti*, vector del virus Dengue, empezaron en 1940 donde se eliminó el mosquito en gran número de países. Desafortunadamente la erradicación de este artrópodo vector no fue posible en su totalidad; ya que la pérdida de estos programas de control en los años 60, la falta de orientación y saneamiento doméstico, la resistencia a los programas verticales así como al uso de insecticidas, la falta de insecticidas efectivos, la baja prioridad y la falta de sostenibilidad, causaron que *Ae. aegypti* reapareciera en zonas tropicales y subtropicales con más fuerza llevándolo a jugar un importante rol en la epidemiología del dengue (OPS 1998).

Lo anterior, inquieta a las autoridades de salud pública para determinar nuevas alternativas de control (MONTES 2001). Esto ha impuesto la necesidad de profundizar en el estudio de las condiciones biológicas, epidemiológicas, entomológicas y genéticas del vector que transmite el virus (FAILLOUX *et al.*, 2002).

Las poblaciones de *Ae. aegypti* han sido utilizadas como modelos de estudio para evaluar el comportamiento y la estructura genética de los mosquitos con el fin de determinar la relación virus-vector. Así diversas técnicas en biología molecular como microsatélites, RFLPs<sup>1</sup> (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) y marcadores genéticos, están disponibles hoy día para el estudio de las poblaciones (FERREIRA & GRATTAPAGLIA 1998; HUBER *et al.*, 2002), las cuales a futuro podrían hacer parte de programas de vigilancia y de estudios epidemiológicos (LUNA *et al.*, 2003) que puedan incluir a termino futuro la manipulación genética y la diseminación de mosquitos transgénicos refractarios al virus (BEERNTSEN 2000).

---

<sup>1</sup> RFLPs: Por la sigla en inglés: Restriction Fragment Length Polymorphism

Debido a lo antes mencionado y a la importancia pública que cobra *Ae. aegypti* como principal vector en la transmisión de Dengue en Colombia, este mosquito se ha convertido en un objetivo para llevar a cabo numerosos estudios genéticos y de su competencia vectorial.

Estudios previos realizados en la ciudad de Cali por CIDEIM, demostraron que *Ae. aegypti* exhibe una variación global alrededor del 19 a 60% en competencia vectorial por flavivirus; la cual puede variar entre las poblaciones de mosquitos (OCAMPO & WESSON 2004). Esta variabilidad en la competencia vectorial de las poblaciones puede estar asociada a la presencia de diferentes barreras fisiológicas en el mosquito y factores genéticos que pueden influir en la función de estas barreras (OCAMPO & WESSON 2004).

## **2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Es posible obtener cepas de *Ae. aegypti*, susceptibles y refractarias a infección con virus Dengue-2 de la ciudad de Cali, en condiciones de laboratorio?

### 3 JUSTIFICACIÓN

El virus Dengue es el arbovirus que causa mayor morbilidad y mortalidad en zonas tropicales y subtropicales (GUBLER 1987; HENCHAL & PUTNAK 1990). Aunque se llevan a cabo programas de prevención y control del vector, esto no es suficiente para contrarrestar el impacto que el dengue causa dentro de estas áreas; más aún cuando no existe un tratamiento clínico específico o una *vacuna* evaluada que la prevenga.

La poca efectividad de estos programas ha llevado a la búsqueda de nuevas estrategias relacionadas con el control de los vectores a nivel genético (ZANOTTO *et al.*, 1996). El estudio de características que determinan si una especie es un buen vector o no, se convierte en un punto de interés para llevar a cabo estudios genéticos y de competencia vectorial; con el fin de encontrar nuevas alternativas de control vectorial (GUBLER 1998).

La genética de la competencia vectorial por flavivirus está siendo estudiada en *Ae. aegypti* mediante técnicas moleculares y métodos de selección de cepas susceptibles y refractarias a la infección o diseminación de los virus (BENNETT *et al.*, 2005). Un tipo de herramienta utilizado en este tipo de estudios, son las isoclinas (TARDIEUX *et al.*, 1991).

La selección por isoclinas que son familias descendientes de hembras, es un proceso de selección para detectar un componente heredable de una característica en particular. Algunos estudios genéticos en competencia vectorial sugieren que la susceptibilidad hacia el virus Dengue esta controlada por dos genes o conjunto de genes (WALLIS *et al.*, 1985; BLACK *et al.*, 2002).

La identificación de los mecanismos moleculares que producen un fenotipo particular de competencia vectorial, provee una estrategia para la manipulación genética de los mosquitos, como un nuevo método para el control de las enfermedades transmitidas por estos (WALLIS *et al.*, 1985; BLACK *et al.*, 2002).

Por esta razón mediante este trabajo se contribuyó al conocimiento de la competencia vectorial y las barreras asociadas a la infección con virus Dengue-2 en poblaciones de *Ae. aegypti* de la ciudad de Cali, mediante la obtención de cepas susceptibles y refractarias.

Este estudio brinda conocimientos de la relación virus-vector, que permitirán a futuro la utilización de técnicas moleculares para la identificación de genes que

intervienen en el desarrollo del virus en el vector. Así como también proporciona conocimientos que contribuirán al desarrollo de nuevos estudios de genes involucrados en la susceptibilidad o refractoriedad en vectores que podrán ser utilizados a futuro en la manipulación genética de mosquitos transfectados.

Transformar mosquitos como *Ae. aegypti* llegará a ser posible por medio de la ingeniería genética, creando mosquitos resistentes al patógeno. Los genes capaces de inhibir el desarrollo del virus podrán ser introducidos en el genoma de *Ae. aegypti* expresado en lugares específicos y ensayados para su habilidad de bloquear la transmisión del patógeno (BEERNTSEN *et al.*, 2000).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

1. Establecer cepas susceptibles y refractarias de *Ae. aegypti* a infección con virus Dengue-2 a partir de mosquitos obtenidos en la ciudad de Cali.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar mosquitos *Ae. aegypti* durante 3 generaciones a partir de descendientes de hembras con fenotipos susceptibles y refractarios a la infección con virus Dengue-2, a partir de una población obtenida en la ciudad de Cali.

2. Evaluar los cambios en la competencia vectorial (CV) y las barreras de control a la infección con virus Dengue-2 a través de la selección de familias susceptibles y refractarias de *Ae. aegypti*.

3. Evaluar el efecto de la infección por virus dengue-2 en el desarrollo biológico de los mosquitos de *Ae. aegypti* susceptibles y refractarios, en las diferentes generaciones seleccionadas; utilizando tablas de vida en comparación con la población original sin efecto de selección, colonizada en laboratorio.

## 5 MARCO CONCEPTUAL

### 5.1 EL DENGUE – Enfermedad

El dengue es una enfermedad viral cuyo agente causal se transmite por la picadura del mosquito *Ae. aegypti*, que puede ser ocasionada por uno de varios serotipos del virus (1 al 4) (MONATH & HEINZ 1996).

La enfermedad que produce resulta en un amplio espectro de presentación clínica, que va desde formas sub clínicas y leves hasta cuadros con severo compromiso vascular y hemostático (MARTÍNEZ 1998).

El *dengue clásico* se presenta habitualmente como un cuadro febril, de duración limitada (2 a 7 días), con intenso malestar general, cefalea, dolor retro ocular, y dolores articulares, acompañado algunas veces de erupción cutánea (GUBLER 1998).

Una complicación más letal del dengue, es la *fiebre hemorrágica del dengue* (FHD), reconocida en los años 50 y actualmente es la causa principal de muerte en niños en muchos países. Esta enfermedad incluye los síntomas del *dengue clásico*, a los que se agregan manifestaciones hemorrágicas. El principal factor de riesgo para la aparición de este tipo de dengue es haber tenido una infección previa por otro serotipo de Dengue, pero también influyen el origen geográfico de la cepa viral y susceptibilidad del huésped (MARTÍNEZ 1998). La expresión más severa de FHD es el *síndrome de choque del dengue*, que es una de las mayores causas de hospitalización y muertes en el mundo (JOHNSON 2002).

### 5.2 HISTORIA Y EPIDEMIOLOGÍA

La primera descripción del dengue data del año 265 al año 420 después de Cristo. Los primeros brotes de dengue se registraron en el Caribe y en las Indias Occidentales Francesas, en el siglo XVII (HALSTEAD 1988). En el siglo XVIII se describe el primer brote en los Estados Unidos, en Filadelfia. En 1889, esta enfermedad habría existido en Chile. El mosquito se erradicó en 1915 de Chile continental, con la excepción de la Isla de Pascua (UZCATEGUI *et al.*, 2003).

En la actualidad, los cuatro serotipos del virus Dengue son endémicos en muchos países tropicales. En Asia, los serotipos son altamente endémicos en la parte meridional de China y en Hainán, Vietnam, Laos, Camboya, Tailandia, Myanmar, India, Sri Lanka, Indonesia, Filipinas, Malasia y Singapur; la endemidad es menor en Nueva Guinea, Bangladesh, Nepal, Taiwán y gran parte de Polinesia. Desde 1983 han circulado en el norte de Australia serotipos del virus Dengue (PADILLA *et al.*, 1999).

Los cuatro serotipos son endémicos actualmente en África. Se han observado brotes limitados de dengue en la costa oriental de África, desde Mozambique hasta Somalia y en las Islas distantes como Seychelles (ASHBURN; CRAIG 1907).

La Segunda Guerra Mundial fue responsable de la propagación del dengue a partir del sureste de Asia a Japón y a las Islas del Pacífico. En 1977, se aisló virus Dengue tipo 1 de mosquitos y pacientes en Jamaica, desde donde se propagó a las Bahamas, Trinidad, Cuba y E.U.A. (CDC 2005).

La primer epidemia reportada de la fiebre de dengue (DF) ocurrió entre 1779 y 1780 en Asia, África, y Norteamérica. En 1979 apareció un brote epidémico de Dengue tipo 4 en Tahití donde se reportaron 6800 casos en la isla. En 1981, el Dengue tipo 4 fue identificado por primera vez en el hemisferio occidental, con los primeros casos en las Antillas Francesas y luego se propagó a otras islas, incluso Puerto Rico, Jamaica y Haití. En la actualidad el virus se propaga en tierras continentales de América Central y Sudamérica (PADILLA *et al.*, 1999).

En el continente americano e islas aledañas, la introducción o aparición sucesiva de los cuatro tipos de virus en la zona del Caribe y América Central se dio desde 1977 y su extensión a Texas en 1980.

En la actualidad son endémicos uno o más virus Dengue en México, muchas islas del Caribe y muchos países de América Central, así como en Venezuela, Colombia y Ecuador. Desde 1986, los grandes brotes en el Brasil se han propagado a Bolivia y Paraguay (UZCATEGUI *et al.*, 2003)

El primer informe de casos de dengue hemorrágico en América fue en Venezuela en 1968 y el primer brote ocurrió en Cuba en 1981, que afectó a 400.000 personas (CDC 2005) donde se aisló el virus Dengue-2 (MINISTERIO DE SALUD DE COSTA RICA 2002).

En el 2005, el dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores más importante que afecta a seres humanos; su distribución global (Figura 1) es comparable a la de la malaria, y un estimado de 2.5 mil millones de personas viven en áreas de riesgo para la transmisión de la enfermedad. Cada año, ocurren diez millones de casos de fiebre de dengue y, dependiendo del año, hasta

centenares de millares de casos de dengue hemorrágico. El índice de caso-fatalidad de dengue hemorrágico en la mayoría de los países es cerca del 5%, pero esto se puede reducir a menos del 1% con el tratamiento apropiado. La mayoría de los casos fatales ocurren entre niños y adultos jóvenes (CDC 2005)

**Figura 1.** Distribución del virus dengue y su mosquito vector *Aedes aegypti* en el mundo en el 2005.



(CDC, 2005)

En Colombia la problemática inicia cuando la campaña y la vigilancia que estableció el gobierno colombiano en 1950, con el objetivo de erradicar a *Ae. aegypti* y evitar el riesgo de fiebre amarilla urbana, se discontinuó en los años 70 después de declarar libre de *Ae. aegypti* el territorio Nacional. Debido a la presencia del vector en Venezuela y la resistencia al DDT, insecticida utilizado en esa época, *Ae. aegypti* reinfestó el país. Entonces, aparecieron las primeras epidemias con Dengue-2 en la Costa atlántica en los años 1971 y 1972, seguidas de epidemias con Dengue-3 entre 1975 y 1977 (BOSHELL *et al.*, 1986).

El primer caso de dengue hemorrágico se presentó en el año de 1989 en Puerto Berrio (Antioquia) y desde entonces han ido aumentando el número de casos en diferentes años. En Santander en límites con Venezuela, aparecen los primeros brotes a finales de 1989 y comienzos de 1990, el próximo brote aparece en 1992 en Santander y el Valle del Cauca y en Cali en 1995, donde la gran primera epidemia ocurre con 566 casos con cuadros sospechosos de dengue hemorrágico y empiezan a aparecer desde entonces síndromes de choque de dengue con desenlace fatal (SIVIGILA 2000). El serotipo Dengue-3 se volvió a presentar en el año 2002 en el municipio de Floridablanca, departamento de Santander (SIVIGILA 2002).



Para el año 2002 los departamentos con mayor aporte de casos por fiebre del dengue y fiebre hemorrágica del dengue fueron: Santander, Quindío, Santa Marta, Arauca, Huila y el Valle del Cauca.

En el Valle del Cauca, Santiago de Cali es una ciudad hiperendémica por presentar la circulación de múltiples serotipos, con una población de 2 millones de habitantes y con riesgo de adquirir infección por Dengue en varias localidades (SIVIGILA 2002)

Aunque por estudios virológicos se ha señalado la presencia de Dengue-1 en 1978, Dengue-2 y Dengue-4 en 1984 (BOSHELL *et al.*, 1986), en el año 2002 se detectó la presencia de Dengue-3 en el departamento de Santander; por lo tanto en Colombia se presenta una hiperendemicidad, por la circulación de los cuatro serotipos (SIVIGILA 2002).

### 5.3 EL VECTOR

Ashburn y Graig (1996), demostraron que el agente causal del dengue era un virus transmitido por la picadura del mosquito *Ae. aegypti*, especie del subgénero *Stegomyia* originario de África; y el más distribuido en el mundo. Posteriormente, en 1985 se evidenció un nuevo vector, *Ae. albopictus*, de origen Asiático (CHEN *et al.*, 1993; FOSTER & WALKER 2002).

En Colombia *Ae. aegypti* es el principal vector. La especie *Ae. albopictus* es considerado un importante vector para el sureste Asiático, su presencia fue registrada por primera vez en nuestro país en el año 1998 en Leticia (Amazonas) y en Buenaventura (Valle) (VELEZ *et al.*, 1998; SUAREZ 2001). Actualmente se ha esparcido a otros lugares como Cali, Yumbo y Yotoco (Comunicación Personal de la Secretaria Municipal de Salud de Cali 2006).

La fase aérea de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, la cual inicia cuando éstos emergen de la última fase acuática (pupa), es relativamente fácil de reconocer debido a los colores y formas que los caracterizan: son mosquitos negros con escamas de color plateado en el tórax. Las escamas de la región dorsal del tórax (mesonoto), dan la apariencia de una lira (figura 2) para *Ae. aegypti*, una línea recta en *Ae. albopictus* (SHROYER 1986).

Estos vectores comparten atributos biológicos y epidemiológicos similares. En este documento, se resaltarán las características biológicas de *Ae. aegypti*, ya que es el vector con mayor influencia y eficiencia en el desarrollo de la

enfermedad del dengue en Colombia (VELEZ *et al.*, 1998; SUÁREZ 2001; GIBBONS & VAUGHN 2002).

**Figura 2.** Mesonoto de *Aedes aegypti* (izquierda) y *Aedes albopictus* (derecha)



(En URL: [www.cenave.gov.mx](http://www.cenave.gov.mx). 2005)

*Aedes aegypti*, es vector de diferentes arbovirus causantes de enfermedades tropicales; es una especie de mosquito propio de las regiones tropicales y subtropicales dentro de los límites de 35' latitud norte y 35° latitud sur (BLACK *et al.*, 2002). Su distribución también está limitada por la altitud, que va desde el nivel del mar hasta áreas urbanas a 2.121 msnm en la India y a 2.200 msnm en Colombia (BORDONES 1994).

El mosquito vector tiene dos etapas en su ciclo de vida: la fase acuática con tres formas evolutivas diferentes (huevo, larva y pupa) y fase aérea de adulto o ímago; reproduciéndose y habitando exclusivamente en criaderos antropogénicos y otros naturales que contienen agua limpia, logrando cumplir su ciclo de vida pre-adulto en 48 horas (figura 3). La rapidez con que se desarrollan las larvas y pupas depende en gran medida de las características del microambiente (GUBLER, 1998).

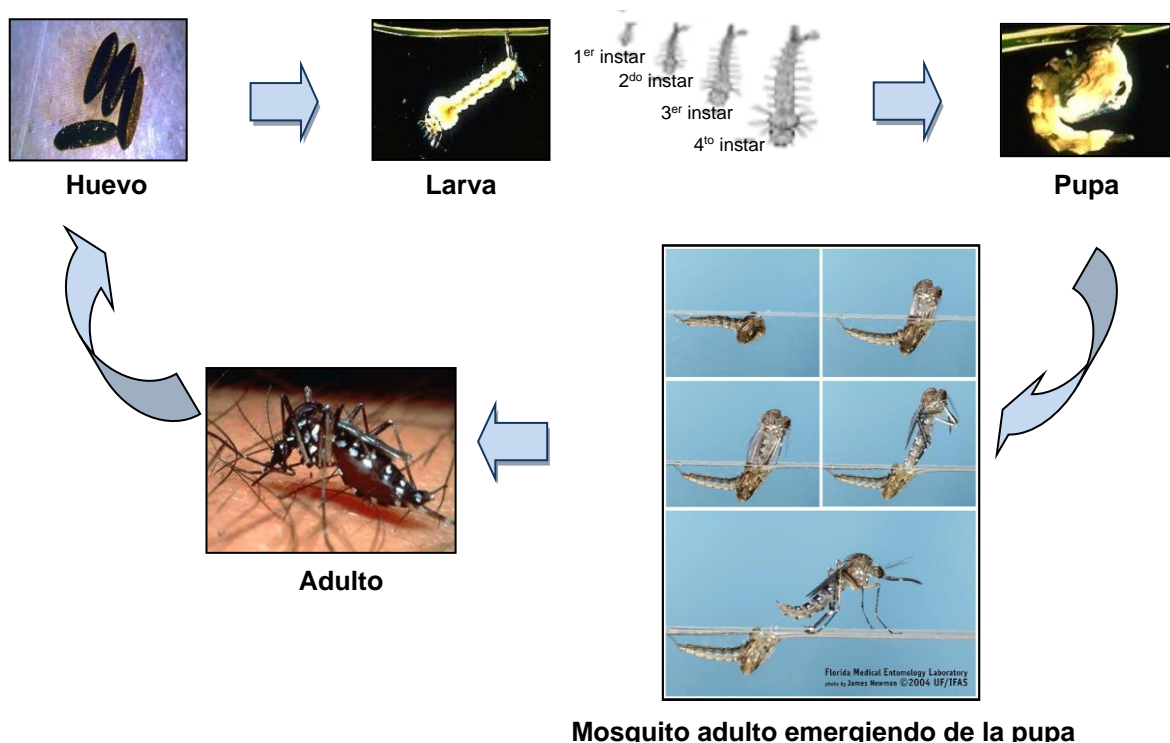
Las hembras son las que pican, por ser hematófagas obligadas, es decir, necesitan sangre para alimentarse y para que maduren los huevos. La hembra, se alimenta en humanos o animales domésticos, momento en el cual puede infectarse con el virus, aunque se ha observado que puede alimentarse fuera de las casas (GIBBONS & VAUGHN 2002).

Por lo regular, la hembra *Ae. aegypti* deposita los huevos en las paredes húmedas de los recipientes que contienen agua. Hay preferencia a ciertos tipos de recipientes, dependiendo de su oxigenación, temperatura, humedad, disponibilidad de materia orgánica, capacidad y estabilidad del agua, color y olor, entre otros; aunque esto no es limitante para encontrar ocasionalmente una gran diversidad de criaderos. Los huevos, son capaces de resistir desecación por varios meses hasta que las condiciones de temperatura y humedad les sean

propicias, momento en el cual se hidratan y rápidamente eclosionan (SECRETARIA DE SALUD DE MEXICO 2002).

La supervivencia de los mosquitos depende de la capacidad para alimentarse, reproducirse, protegerse y dispersarse. Entre cada ciclo gonotrófico, a diferencia de otros géneros de mosquitos, *Ae. aegypti* se alimenta varias veces de uno o varios huéspedes hasta satisfacer sus necesidades alimenticias, lo que representa un factor de importancia en su capacidad como transmisor de microorganismos patógenos (GIBBONS & VAUGHN 2002).

**Figura 3.** Ciclo biológico de *Aedes aegypti*.



En URL: [edis.ifas.ufl.edu/IN658](http://edis.ifas.ufl.edu/IN658). Modificado.

Los cuerpos de agua donde se lleva a cabo la fase acuática de *Ae. aegypti* por lo común se llaman criaderos (figura 4). En su mayoría son de tipo artificial, producidos por el hombre y ubicados dentro o cerca de las casas. Todo recipiente capaz de contener agua y con la presencia del mosquito puede transformarse potencialmente en criadero.

**Figura 4.** Posibles criaderos para *Aedes*.



**Materas**



**Tanques**



**Llantas**

En URL: [www.cenave.gov; users.servicios.retecal.es/tono/presentacion.htm](http://www.cenave.gov; users.servicios.retecal.es/tono/presentacion.htm)

La disponibilidad de agua es muy importante para aumentar la probabilidad de que los recipientes puedan convertirse en criaderos de mosquitos, como son los depósitos de agua de uso doméstico (tinajas, baldes, bebederos de animales o floreros), o almacenes temporales (llantas de vehículos y demás recipientes sujetos a llenarse de agua lluvia). Se ha descrito que de las características de los criaderos, depende la existencia de épocas de variación de las densidades de mosquitos y la presencia temporal o permanente de los mismos (GIBBONS & VAUGHN 2002).

Los mosquitos utilizan lugares oscuros y tranquilos para el reposo. De este modo seleccionan paredes, muebles y objetos colgados, tales como ropas, toallas y cortinas. Muchos de los sitios de descanso son de difícil acceso como closet de habitaciones, bajo las camas y muebles. En la vivienda se encuentra en las habitaciones, cuartos de baños y cocinas. Ocasionalmente se le halla en la vegetación exterior a la casa (GIBBONS & VAUGHN 2002).

## **5.4 VIRUS DENGUE Y SEROTIPOS**

En 1996, Ashburh y Craig identificaron por primera vez al virus Dengue como el agente etiológico de la fiebre dengue. El virus Dengue y el virus de la Fiebre Amarilla quedaron establecidos desde entonces como virus filtrables y microscópicos causantes de enfermedades en humanos (MONATH & HEIZ 1996). En 1943 y 1944, Kimura y Hotta aislaron por primera vez al virus Dengue en laboratorio, adaptando dos cepas de este virus a tejido neuronal de ratón. En 1954, Casal y Brown separaron los Arbovirus (“arbo” acrónimo del inglés *arthropod-borne*, transportado por artrópodos) en grupo “A” para alfavirus y grupo “B” para flavivirus, basándose en sus diferencias antigénicas y en la respuesta

humoral de reactividad cruzada durante ensayos de inhibición de Hemoaglutinación (IHA).

En 1984, el Comité Internacional para Taxonomía de Virus (ICTV) estableció al virus Dengue como un flavivirus de la familia Flaviviridae, ubicado en el grupo “B” de los Arbovirus (MONATH & HEIZ 1996).

La familia Flaviviridae agrupa virus ARN de cadena simple en sentido positivo que se multiplican en células de vertebrados y de insectos vectores. El género *Flavivirus* reúne en su mayoría (55%) virus asociados a enfermedades humanas y algunos patógenos de animales domésticos o de interés económico. Además, consta de más de 70 virus clasificados en 10 grupos (o especies), entre ellos: virus Dengue, virus de la Encefalitis Japonesa, ente otros (MONATH & HEIZ 1996).

El grupo virus Dengue esta representado por 4 serotipos (o subespecies): virus Dengue 1, virus Dengue 2, virus Dengue 3 y virus Dengue 4; los cuales exhiben características antigénicas y serológicas diferentes, y además pueden presentar variantes genéticas (genotipos y topotipos) dentro de un mismo serotipo relacionadas con la virulencia y la procedencia geográfica de la cepa (MONATH & HEIZ 1996; RICO-HESSE 1990).

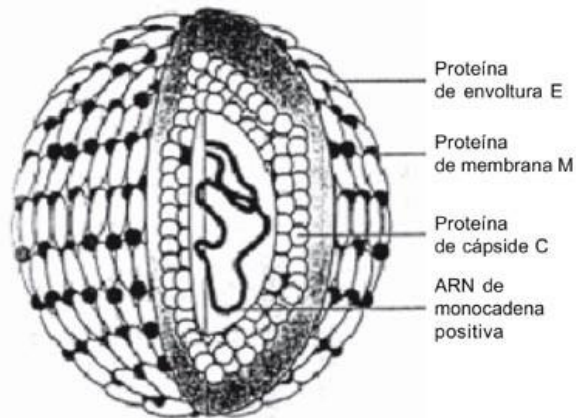
En general, los flavivirus poseen una estructura uniforme, la envoltura del virión es ligeramente esférica, la nucleocápside es icosaédrica y contiene al virión, la estructura de la partícula viral infecciosa del Dengue. La superficie viral es inusualmente lisa y la membrana esta completamente cubierta por la proteína E (Figura 5) (KUHN *et al.*, 2002).

El virión es infeccioso y está compuesto por 6% de ARN, 66% de proteínas, 9% de carbohidratos y 17% de lípidos (RICE 1996). El genoma tiene una longitud de 9500 a 12500 nucleótidos, y da lugar a 3 proteínas estructurales: la proteína E de envoltura, prM de membrana y la proteína C de cápside y a 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) (ROTHMAN 2004)

Todos los serotipos del virus Dengue se han aislado de casos autóctonos en las Américas; sin embargo, durante el periodo 1978-1991 solo circularon los serotipos de Dengue 1, 2 y 4; el virus Dengue 3 se aisló en 1977 en Colombia y Puerto Rico. El Dengue-1 y 4 fueron los serotipos que circularon predominantemente durante la década de 1980 (OLIVARES 2002).

La introducción del Dengue-4 en 1981 en América fue seguida por las epidemias en el Caribe, Centroamérica, México y el norte de América del Sur en los dos años sucesivos (OLIVARES 2002).

**Figura 5.** Estructura del virus del dengue



En URL: [www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-463420...](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-463420...)

Cada serotipo crea inmunidad específica a largo plazo contra el mismo serotipo (homólogo), así como una inmunidad cruzada de corto plazo contra los otros tres serotipos, la cual puede durar varios meses (CHIPARELL 2005). Los cuatro serotipos son capaces de producir infección asintomática, enfermedad febril y/o cuadros severos que pueden conducir hasta la muerte, dada la variación genética en cada uno de ellos (GUBLER 1998; CHIOU-FEN *et al.*, 2002). Algunas variantes genéticas parecen ser más virulentas o tener mayor potencial epidémico. Los serotipos Dengue-1 y Dengue-2 fueron aislados inicialmente en 1944, mientras que el Dengue-3 y el Dengue-4 se aislaron en 1957, todos en humanos. Posteriormente, se han logrado aislar los cuatro serotipos en mosquitos de la familia Culicidae, y en el caso del Dengue-2, también en otros primates (FIELDS 1990).

Los cuatro serotipos del virus del Dengue se encuentran distribuidos en diversos países; Sin embargo, debido a las facilidades que existen hoy en día para viajar, así como el movimiento migratorio alrededor del mundo, la distribución geográfica de este virus se ve modificada continuamente. En nuestro país, el serotipo que predomina es el Dengue-2, aunque los cuatro serotipos están presentes y causan brotes esporádicos (OLIVARES 2002).

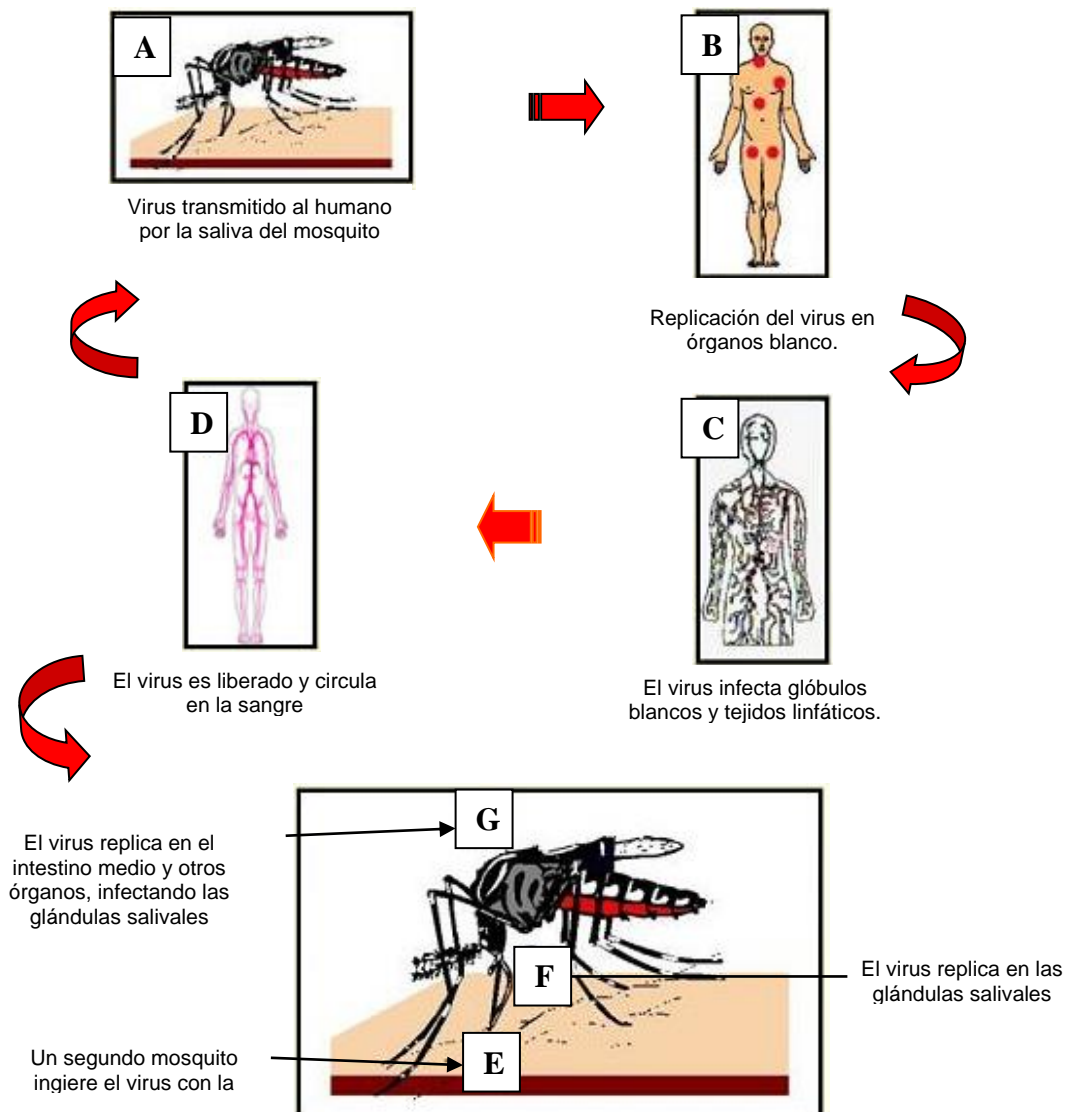
## **5.5 CICLO DE TRANSMISIÓN DEL VIRUS DENGUE**

El virus Dengue es transmitido a los humanos a través de la picadura de los mosquitos *Ae. aegypti* infectados (GUBLER 1998; RICE 1996) y puede presentar

varios ciclos de transmisión: un ciclo de transmisión enzoótico que involucra mosquitos del genero *Aedes* y primates en los bosques de Asia y África. Un ciclo de transmisión epidémico que ocurre en lugares rurales donde las poblaciones son pequeñas y un ciclo epidémico/endémico urbano donde el virus se transmite por *Ae. aegypti*-humano-*Ae. aegypti* (GUBLER 1998).

El ciclo urbano inicia cuando la hembra adulta ingiere sangre de persona infectada con el virus Dengue (figura 6, (E)).

**Figura 6.** Transmisión y replicación del virus del dengue.



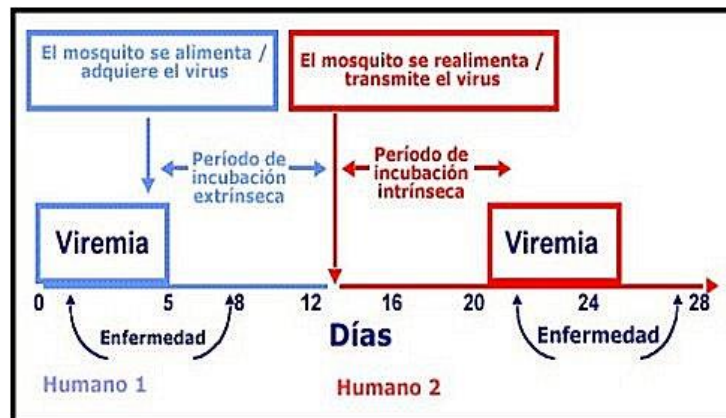
En URL: [www.cdc.gov/.../slideset/set1/i/slide05.htm](http://www.cdc.gov/.../slideset/set1/i/slide05.htm).

El virus entra en la hembra y se multiplica en el epitelio intestinal, en los ganglios nerviosos, cuerpo graso, cerebro, esófago y glándulas salivales (figura 6, (F y G)). El periodo de incubación extrínseco del virus en el mosquito usualmente es de 7 a 14 días. Después de este periodo el mosquito infectado transmite el virus a otros humanos durante la siguiente alimentación sanguínea (figura 6, (A)) (MENDOZA *et al.*, 2002; BLAIR *et al.*, 2000).

En el humano, el virus se replica en monocitos, células dendríticas, linfocitos y macrófagos. Posteriormente infecta órganos blanco como ganglios linfáticos y bazo; para luego liberarse a la sangre causando el periodo de viremia (tiempo de incubación intrínseco) en la persona infectada (figura 6 (B, C, D)).

Un segundo mosquito va a picar a esta persona infectada, en el periodo de viremia, y va a adquirir el virus. El dengue va a replicarse en el intestino medio del mosquito, después se replicará en las glándulas salivares, y así luego de 7 a 14 días de incubación, el mosquito infectará a otro hospedero susceptible por una nueva picadura (GUBLER 1998; RICE 1996) (figura 7).

**Figura 7.** Ciclo de transmisión



(CDC, 2002. En URL: [www.cdc.gov/.../slideset/set1/i/slide05.htm](http://www.cdc.gov/.../slideset/set1/i/slide05.htm))

## 5.6 PREVENCIÓN Y CONTROL

El dengue es una patología de alto poder epidémico que en los últimos años se ha presentado en sus formas clásica y hemorrágica en una gran parte del territorio nacional. Esto debido a la alta dispersión del vector en el país; además de otros factores externos como almacenamiento inadecuado de agua,



el acumulamiento de desechos sólidos, y la inaccesibilidad al desarrollo social, cultural y económico de la población, que propician un ambiente favorable para la formación de criaderos del vector y por ende la expansión de este en nuestro país (BIELEFELDT-OHMANN 1997).

De acuerdo a lo anterior, el dengue constituye un evento cuya vigilancia, prevención y control revisten especial interés en salud pública (MINISTERIO DE SALUD DE COLOMBIA 2002); especialmente porque *no* hay medicamentos que lo curen ni *ninguna* vacuna que lo prevenga.

Las organizaciones de salud aplican estrategias de control del dengue mediante intervenciones integrales como: programas de educación comunitaria en la eliminación y control de criaderos de mosquitos, programas de prevención de la enfermedad, vigilancia, control vectorial y factores de riesgo ambiental (OPS 1998).

Generalmente para el control de los estados larvales, se utilizan métodos *físicos* (barreras físicas mosquitos/criaderos y eliminación de criaderos), *químicos* (uso de insecticidas) y/o *biológicos* (modelos ecológicos depredador/presa como peces larvívoros y *Bacillus thuringiensis*), que están dirigidos a la eliminación del vector o al control de cualquier depósito donde se desarrollen o puedan desarrollarse las larvas de *Ae. aegypti* (SECRETARIA DE SALUD DE MÉXICO 2004).

Otra medida de prevención es el control de pacientes infectados con el virus del dengue, sus contactos y su ambiente. Esto se logra aislando al paciente a efectos de evitar el acceso de los mosquitos de actividad diurna, hasta que cese la fiebre; empleando toldillos y/o rociando los alojamientos con algún insecticida que sea activo contra las formas adultas.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS 2002), para combatir el dengue, las autoridades comunitarias y municipales, deben planear un buen abastecimiento de agua potable, crear sistemas eficaces de recolección de residuos para eliminar posibles criaderos de mosquitos, llevar a cabo visitas domiciliarias para eliminar criaderos de mosquitos y realizar campañas de educación sanitaria para explicar a la comunidad la naturaleza de la enfermedad y las medidas que hay que tomar para combatirla.

Las acciones de control que se han implementando no han sido totalmente efectivas, por lo que la erradicación hemisférica del *Ae. aegypti* ya no es real; pues la sostenibilidad y continuidad de actividades de control están

constantemente comprometidos por otras demandas de salud y política con las cuales compiten y por la poca capacidad de coordinación intersectorial (CDC 2005).

Las características de la enfermedad, la ausencia de drogas antivirales contra la misma, el incremento de número de enfermos, la aparición de fenómenos como la resistencia a insecticidas, el aumento de países afectados y la dificultad para el control del vector, han convertido el desarrollo de vacunas contra el dengue en una prioridad para la salud pública mundial, aunque el desarrollo de una vacuna para el dengue es muy difícil, debido a que cualquiera de los cuatro serotipos del virus pueden causar la enfermedad.

Por lo tanto, en la actualidad, la lucha ante esta problemática se enfoca en el campo científico, a través de estudios y procesos genéticos (manipulación genética) y moleculares (marcadores moleculares) enfocados en el desarrollo de estrategias de control vectorial basadas en los factores que involucran o determinan el virus y su desarrollo en el vector (GUBLER 1998).

De esta manera, los estudios realizados en *Ae. aegypti* como: colonización, dispersión de genes, deriva genética, fuerzas de evolución selectivas y variabilidad genética asociada a características de importancia epidemiológica como los *componentes de transmisión*, competencia vectorial y resistencia a insecticidas, resultan como nuevas alternativas para el desarrollo de mejores estrategias de control vectorial (FAILLOUX 2002).

Así diversas técnicas en biología molecular se aplican actualmente en el estudio de las poblaciones de mosquitos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA 1998; HUBER *et al.*, 2002) los cuales hacen parte de programas de vigilancia (LUNA *et al.*, 2003).

## **5.7 COMPONENTES BIOLÓGICOS EN LA TRANSMISIÓN DE PATÓGENOS POR VECTORES**

Las poblaciones de *Ae. aegypti* han sido utilizadas como modelos de estudio para evaluar el comportamiento y la estructura genética de los mosquitos en respuesta a diferentes procesos de selección (YAN *et al.*, 1999) como el uso de insecticidas (OCAMPO & WESSON, 2004), control biológico, cambios climáticos (FOUQUE 2001), transporte y diseminación de los mosquitos (PAUPY *et al.*, 2001).

Dentro del estudio de las poblaciones de vectores ha existido un interés en entender las relaciones celulares y bioquímicas intrínsecas entre la relación

virus-mosquito y el control genético de estos fenotipos; a través del estudio de los factores biológicos que hacen parte del proceso de transmisión de patógenos como la capacidad vectorial, definida como el potencial o riesgo de transmisión de un patógeno por una población (BOSIO *et al.*, 1999; BLACK *et al.*, 2002).

Una vez los mosquitos son infectados con el virus, el proceso post infección se integra por una serie de factores que tienen gran influencia sobre la diseminación y transmisión del patógeno al hospedero vertebrado (BOSIO *et al.*, 1998).

Los factores *endógenos* propios del sistema virus–vector, condicionan la competencia vectorial o la habilidad fisiológica de un vector en adquirir y transmitir un patógeno (HARDY 1983; WOODRING *et al.*, 1996). Este componente se ha estudiado en asocio con la genética cuantitativa con el fin de conocer la existencia de un posible control genético de la susceptibilidad del vector al patógeno (BOSIO *et al.*, 1999; BLACK *et al.*, 2002). Los *factores exógenos* que son de tipo ambiental sumados con los endógenos, determinan la capacidad vectorial (TRAVI 1994) que es el producto de componentes como alimentación, tasa de sobrevivencia, competencia vectorial y duración del período de incubación extrínseco (BOSIO *et al.*, 1999; BLACK *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta lo anterior, las herramientas de biología molecular y genómica son una alternativa en la investigación de la biología del vector para conocer en detalle las relaciones entre el mosquito vector y el virus, obtener mosquitos modificados por ingeniería genética los cuales serían resistentes al virus y manejar genes resistentes en especies vectores silvestres susceptibles en áreas endémicas para reducir la intensidad de la transmisión (BEERNTSEN *et al.*, 2000).

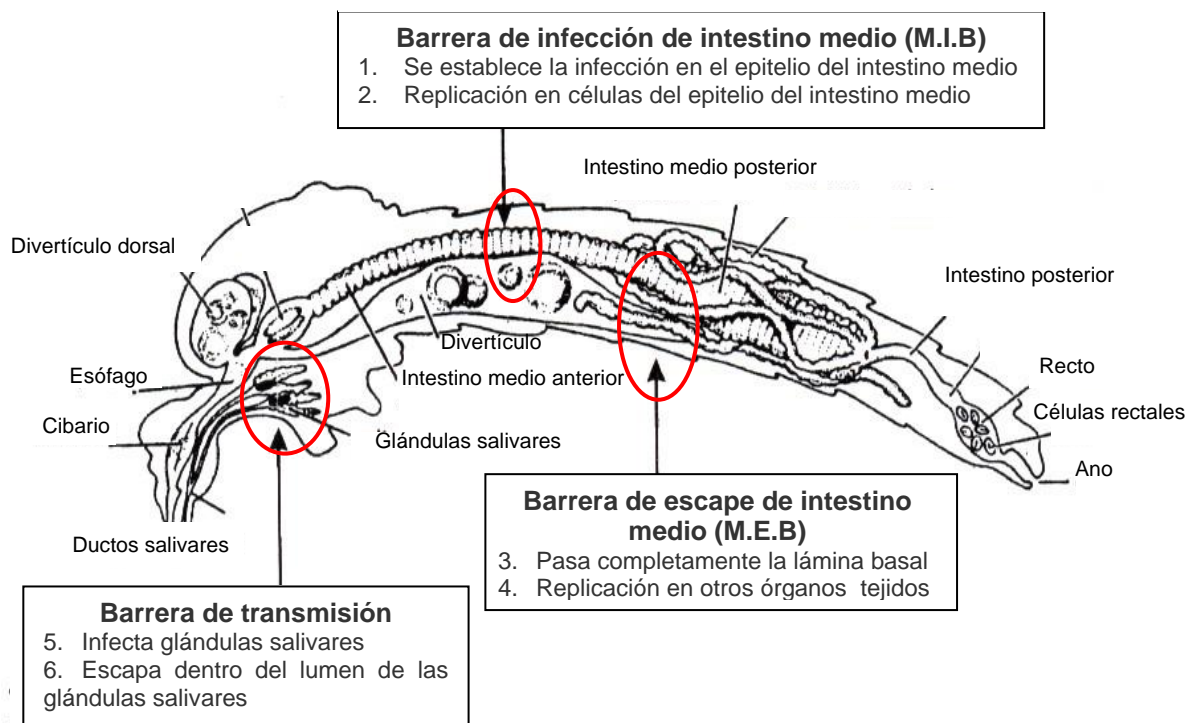
La capacidad vectorial se define cuantitativamente y es influenciada por variables tales como la densidad del vector, la frecuencia de picadura, la longevidad y la competencia del vector. La capacidad vectorial toma en cuenta el ambiente, el desarrollo celular y los factores bioquímicos que influyen en la asociación entre un vector y el patógeno. Una especie de mosquito puede ser genética y bioquímicamente compatible para el desarrollo completo de un patógeno. Asimismo, la competencia vectorial está dirigida por factores intrínsecos (genéticos) que influyen la habilidad del vector para transmitir un patógeno (BEERNTSEN *et al.*, 2000). Esta característica permite que sea un blanco interesante en el momento de realizar estudios genéticos, para la creación de nuevas herramientas para el control vectorial.

En el caso de *Ae. aegypti*, este exhibe una variación global en cuanto a su competencia vectorial por flavivirus; aunque subespecies como *Ae. aegypti*

*formosus*, presentan baja competencia vectorial principalmente por la presencia de una barrera de infección en intestino medio (GUBLER 1998).

La transmisión del virus dengue involucra un complejo de interacciones entre los virus y su vector *Ae. aegypti*, en el ciclo humano–vector, ya que la competencia vectorial está asociada con un número de barreras anatómicas para producir la infección (ver figura 8).

**Figura 8.** Barreras anatómicas en mosquitos asociadas a la infección por virus.

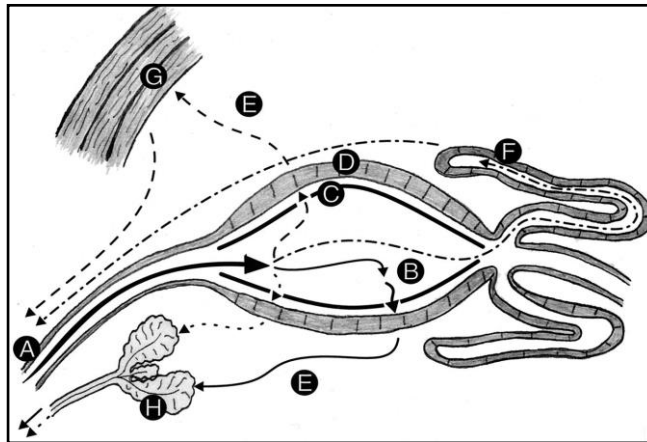


(Black et.al, 2002. modificado)

Cuando un mosquito de la especie *Ae. aegypti*, ingiere sangre (sitio A, figura 9) infectada con el virus Dengue, el virus debe atravesar diferentes barreras presentes en el mosquito hospedero, para luego poder ser transmitido al hospedero vertebrado. Una vez esté en el intestino medio, el virus está expuesto a las enzimas proteolíticas que son secretadas en el lumen para la digestión de la sangre. Estas enzimas digestivas pueden tener un impacto positivo o negativo sobre los patógenos y además pueden influenciar en la competencia del vector (GASS 1977).

En el proceso de ingestión de sangre se inicia en el mosquito la formación de una estructura quitinosa llamada *matriz peritrófica* (sitio C, fig.9), la cual rodea la sangre ingerida y la separa físicamente del epitelio del intestino medio hasta ser totalmente digerida.

**Figura 9.** Rutas migratorias y sitios de desarrollo por virus en el mosquito



(Beerntsen *et al.* 2000)

El virus gasta más de unas pocas horas en el lumen del intestino medio. Así, la matriz peritrófica presenta una barrera que debe ser atravesada por el virus para penetrar el epitelio del intestino medio durante la migración a otro sitio de desarrollo (SHAHABUDDIN 1998; GASS 1977). Ya, en el intestino medio, el virus se encuentra con una *barrera de infección de intestino medio (BIM)* (sitio B, figura 9) que debe cruzar completamente para establecer una infección en las células epiteliales del mismo. Si se establece una infección a este nivel, el virus debe escapar de las células del intestino medio y esparcirse a tejidos secundarios del mosquito para establecer la diseminación de la infección. Si el virus no es capaz de esto, entonces el mosquito tiene una *barrera de escape de intestino medio (BEM)* (SHAHABUDDIN 1998; GASS 1977). La *BEM* esta asociada con un ensamblaje ineficiente o maduración de los virus en las células del intestino medio y con la inhabilidad de que los virus escapen a través de estas células a la lámina basal e infecten órganos y tejidos secundarios (sitio F, G figura 9) (SHAHABUDDIN 1998; GASS 1977).

Finalmente, una vez el virus alcanza una mayor titulación, debe infectar el hemocele (sitio E, figura 9) y subsecuentemente las glándulas salivares (sitio H, figura 9) donde puede ser transmitido a el próximo hospedero vertebrado susceptible durante las continuas alimentaciones del mosquito (CRHISTENSEN 1989).

En mosquitos vectores que presentan una barrera de infección en intestino medio potente, el virus no se puede replicar en las células de intestino medio. Esto puede ser debido a la presencia de receptores de superficie bien sea celular o del virus que impiden dicha infección (CHRISTENSEN 1989).

Infecciones experimentales sugieren que las barreras de infección pueden variar entre las poblaciones de mosquitos y posiblemente estas diferencias afecten la competencia vectorial intra e ínter específica. Esta variabilidad en la CV de las poblaciones sugieren que factores genéticos y ambientales pueden influir en la función de estas barreras (BLACK *et al.*, 2002; BENNETT *et al.*, 2002).

Aunque el vector puede controlar la infección a través de estas barreras y el sistema inmune, es posible que la infección afecte su supervivencia, fecundidad, comportamiento de alimentación y costo reproductivo; probablemente existe una relación entre la infección específica de un tejido y cambios en el comportamiento del vector (KLOWDEN 2002; PLATT *et al.*, 1997; BEERNTSEN *et al.*, 2000).

Muy poco es conocido acerca de los eventos que ocurren en la infección por flavivirus en los diferentes vectores. Para el caso de otro arbovirus como *orbivirus* y *bunya* hay un prerrequisito para que se lleven a cabo procesos proteolíticos en las proteínas de la superficie del virus para una interacción eficiente con las células del intestino medio del vector (LUDWIG 1991). Sin embargo no hay información concerniente acerca de receptores en células de intestino para flavivirus.

La genética de la competencia vectorial por flavivirus esta siendo estudiada en *Ae. aegypti* mediante técnicas moleculares y métodos de selección de cepas susceptibles y refractarias a la infección o diseminación de virus (GUBLER & ROSEN 1976).

Un método de selección ampliamente utilizado son las isolíneas (TARDIEUX *et al.*, 1991). Las isolíneas, son familias descendientes de hembras colectadas en campo, las cuales pueden presentar un fenotipo resistente o susceptible al virus. Se han utilizado como un proceso de selección para detectar un componente heredable en la característica fenotípica a evaluar. Estudios genéticos en competencia vectorial han sugerido que la susceptibilidad hacia el virus puede estar controlada por dos genes o conjunto de genes (WALLIS *et al.*, 1985; BLACK *et al.*, 2002).

Por esta razón la selección de una característica fenotípica presente en la naturaleza, provee información de la interacción virus vector y crea la posibilidad de utilizar la manipulación genética de los mosquitos, como una nueva estrategia para el control de las enfermedades transmitidas por mosquitos (BEERNTSEN *et al.*, 2000). El desarrollo de isolíneas con alta y baja competencia vectorial son la

base para otras investigaciones que permitan la caracterización de los transcriptos expresados diferencialmente en el primer sitio de infección (intestino medio) en el mosquito vector y descubrir por marcadores genéticos los loci involucrados en susceptibilidad y resistencia hacia los virus (CAMPBELL & WILSON 2002; BLACK *et al.*, 2002).

## 5.8 TABLAS DE VIDA

Las tablas de vida representan una manera sintética de plasmar en forma cuantitativa las principales características de mortalidad y fecundidad de una población determinada (RABINOVICH 1978). En consecuencia, son un punto de partida para evaluar parámetros poblacionales como: longevidad, fecundidad y proporción sexual, que son útiles para tipificar y caracterizar una población.

Las tablas de vida corresponden a dos tipos:

- **Tabla de vida horizontal o específica por edades:** Se basa en los sucesos que le ocurren a un número de individuos que hayan nacido al mismo tiempo ó cohorte real y se lleva un registro de ellos desde el nacimiento hasta su muerte (p.e: poblaciones de insectos con generaciones discontinuas). En este tipo de tablas de vida, se sigue el destino de los individuos a lo largo del tiempo, a medida que van siendo afectados por las diversas causas de mortalidad y finalmente se obtiene un registro directo del número de muertos que permite elaborar una tabla de vida específica por edades.
- **Tabla de vida vertical o temporal:** Está basada en una cohorte imaginaria obtenida a partir de la estructura de edades en un momento dado a base de una estimación muestral y con una superposición de generaciones (RABINOVICH 1978). En este método los individuos han nacido a diferentes tiempos, por tanto es un requisito reconocer e identificar las edades de los individuos de la población.

En esta clase de tablas de vida, se producen tablas de vida estáticas ya que es una “foto instantánea” de supervivencia dentro de la población durante un corto plazo. Además, requiere que la población no esté ni creciendo ni declinando y que no presente inmigración ni emigración (población estable) (RABINOVICH 1978). Una manera de registrar la edad de muerte de un gran número de individuos, puede ser por captura y marcado o recobrando las marcas después de muerto.

**5.8.1 Construcción de una tabla de vida:** La elaboración de una tabla de vida de un tipo u otro, dependerá de la accesibilidad y facilidad que se tenga para obtener la información fundamental de mortalidad. Para poblaciones de mosquitos como el caso de *Ae. aegypti*, se emplean tablas de vida horizontales.

La tabla de vida consta de una serie de columnas que se definen de la siguiente manera:

**Tabla 1.** Parámetros para elaborar una tabla de vida horizontal o vertical

Símbolo	Definición	Cálculo
<b>X</b>	Edad	
<b>lx</b>	Proporción de sobrevivientes a la edad x.	$N_x / N_0$
<b>dx</b>	Número de individuos que mueren entre las edades x-1 y x.	$N_{(x-1)} - N_x$
<b>qx</b>	Es la probabilidad de morir entre las edades x-1 y x.	$dx / N_{(x-1)}$
<b>Lx</b>	Media de la probabilidad de supervivencia entre dos edades sucesivas.	$(l_x + l_{x+1}) / 2$
<b>Tx</b>	Número de días que quedan de vida a los sobrevivientes que han alcanzado la edad x, donde m es la edad máxima alcanzable.	$\sum_{x}^{m} L_x$ M
<b>ex</b>	Expectativa de vida, indica cuánto vivirá en promedio, un individuo de la edad x.	$T_x / L_x$

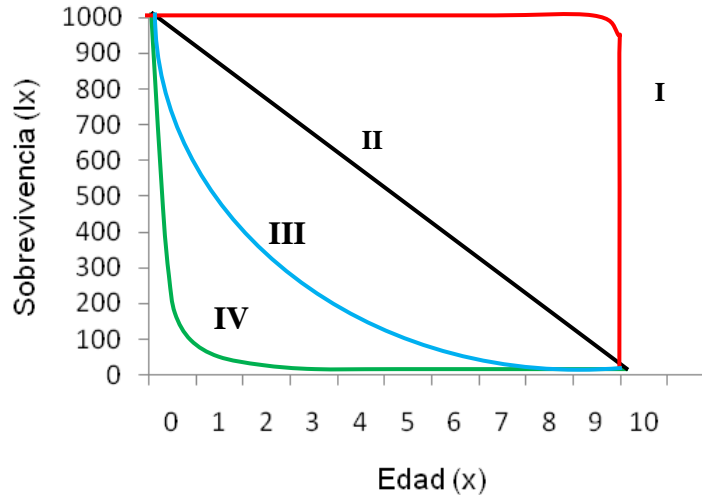
Los parámetros determinados, permiten observar el comportamiento de una población y así construir patrones de supervivencia ( $l_x$ ). Estos patrones pueden ser graficados como curvas de supervivencia para facilitar su análisis.

**5.8.1.1 Curvas de supervivencia:** El parámetro de supervivencia, se conoce como la probabilidad de supervivencia, dado que representa la proporción de individuos vivos a una cierta edad, en relación con el número inicial. Una curva de supervivencia resume los patrones de supervivencia de una población en función del tiempo. Los patrones de estas curvas, varían de una especie a otra dependiendo del ambiente y de las circunstancias e incluso pueden variar dentro de una misma especie (RABINOVICH 1978).

Según Deevey (1947) existen cuatro tipos de curvas de supervivencia (figura 10).

**Figura 10.** Principales tipos de curvas de supervivencia





Rabinovich, 1972

La *curva tipo I* corresponde a poblaciones cuya probabilidad de sobrevivir durante todas las etapas de la vida hasta prácticamente el final es constante e igual a 1 0 1000, ocurriendo una muerte masiva hacia las edades finales o máximas de los individuos, es decir refleja una mortalidad concentrada en los individuos viejos. La *curva de tipo II* representa una población en la cual hay un número constante de animales que muere por unidad de tiempo, independientemente del número de animales que han sobrevivido, es decir, al ser la curva una recta, significa que al aumentar la edad en una unidad el número de animales que mueren es el mismo para un incremento en edades jóvenes y para un incremento en edades avanzadas. La *curva de tipo III* representa una población en la cual hay una fracción constante de animales vivos que mueren en cada uno de los intervalos de edad, es decir que el número de individuos que muere es menor a medida que la población envejece, dado que el número de sobrevivientes va disminuyendo con la edad. En la *curva tipo IV* la mortalidad afecta fundamentalmente a los individuos jóvenes, cuando se han superado las etapas juveniles la mortalidad se reduce en grado considerable produciendo una supervivencia casi constante.

Las curvas de supervivencia son idealizadas, no se puede decir que ninguna de esas curvas es una curva típica o representativa de una población animal real, evaluada en las condiciones de campo normales, las cuales originan una serie de causas de mortalidad en individuos en la población. En general, dado que a medida que los individuos envejecen, se hacen susceptibles a diferentes causas de mortalidad, al final, lo que se obtiene es una curva de supervivencia que representa una mezcla de algunos de los cuatro tipos de curvas.

## 6 ANTECEDENTES

Los arbovirus poseen diferentes patrones de infección en las diversas especies de mosquitos que pueden alterar la habilidad de transmisión de un patógeno (HARDY *et al.*, 1988). Por muchos años, *Ae. aegypti* ha sido reconocido como el principal vector del virus Dengue (GUBLER *et al.*, 1979, BOROMISA *et al.*, 1987). Sin embargo, la susceptibilidad varía entre cepas de mosquitos y especies (ROSEN *et al.*, 1974); por esto es importante evaluar la competencia de los vectores en cada área epidémica o endémica en el momento de aplicar estrategias de vigilancia y control.

Los estudios pioneros en evaluar la susceptibilidad tanto de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* hacia la infección del virus Dengue se realizaron en cepas originadas de diferentes localidades geográficas (GUBLER *et al.*, 1979).

Previos estudios sugieren que la susceptibilidad de *Ae. aegypti* al virus de la Fiebre Amarilla es influenciada por genes en la misma región del cromosoma 2 que contiene un loci que influye en la susceptibilidad a *Brugia malayi* y *Plasmodium gallinaceum* (BEERNTSEN *et al.*, 2000). Recientemente, estudios de genética cuantitativa en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y artrópodos transmisores de la Universidad de Colorado, evaluaron la transmisión de la fiebre de Dengue (DEN) en dos subespecies de *Ae. aegypti*. Estos estudios sugirieron que mínimo dos genes controlaban la competencia vectorial para el Dengue en *Ae. aegypti*. Uno de estos genes o el grupo de genes controlaba la barrera de infección del intestino medio y el otro controlaba la barrera de escape que previene la diseminación de la infección (BEERNTSEN *et al.*, 2000).

El entendimiento del complejo control genético de la competencia del vector para cualquier patógeno podría requerir el establecimiento de una especie particular de vector y la circulación del patógeno responsable de la enfermedad mantenidos en una área geográfica particular (BEERNTSEN *et al.*, 2000).

Es importante considerar la historia de la coevolución en la relación vector-parásito en un área geográfica. Por ejemplo, *An. albimanus*, vector del parásito del nuevo mundo *Plasmodium falciparum*, es susceptible a los parásitos que son originarios de América Central pero no puede ser infectado por *Plasmodium falciparum* originario de África (BEERNTSEN *et al.*, 2000). Otro ejemplo es la variación en la susceptibilidad en la infección oral con arbovirus entre mosquitos de diferentes localidades geográficas, en el caso de dengue la variación en el porcentaje de infección de *Ae. aegypti* sugiere la posibilidad del control genético para el virus en esta especie (GUBLER *et al.*, 1979).

La susceptibilidad de los mosquitos a infección por virus Dengue es una característica importante considerada en los estudios de genética de poblaciones que evidencian relaciones filogenéticas de los virus de dengue endémicos y epidémicos transmitidos a humanos por mosquitos antropofílicos *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, es decir evidencian la adaptación de los virus a estos vectores (MONCAYO *et al.*, 2004). El concepto de alterar la competencia vectorial para crear un mosquito refractario al parásito en una población susceptible fue propuesto en 1968 por Chris Curtis de la Escuela de Medicina Tropical e Higiene de Londres (CURTIS 1968).

Los estudios de competencia vectorial en *Ae. aegypti* han mostrado que existe una variación en la susceptibilidad entre cepas geográficas a nivel regional y local determinado por un componente genético y otro ambiental (TABACHNICK 1985). La genética de la competencia vectorial por flavivirus en *Ae. aegypti* ha sido estudiada mediante métodos de selección de cepas por isólinas y técnicas moleculares (TARDIEUX *et al.*, 1991).

En 1985, Wallis y Tabachnick seleccionaron líneas de *Ae. aegypti* susceptibles y refractarias a infección con virus de la fiebre amarilla. De igual manera, Miller & Michell en 1991 seleccionaron líneas completamente refractarias de una población de *Ae. aegypti formosus* y una línea altamente susceptible (>90% C.V) de una población de *Ae. aegypti aegypti* de Puerto Rico hacia el virus de la fiebre amarilla. Tardieux en 1991 seleccionó líneas de *Ae. aegypti* de una colonia de la polinesia francesa usando líneas de isohembras, concluyendo que la variación en la susceptibilidad oral de *Ae. aegypti* hacia el virus Dengue-2 es parcialmente controlada por factores genéticos.

En el año 2005 Kristine Bennett seleccionó dos cepas de *Aedes aegypti* que difieren en la susceptibilidad a la infección con virus Dengue-2 a través de la selección de fenotipos basado en isofamilias (BENNETT *et al.*, 2005).

Las investigaciones indican que el nivel de infección por Dengue en *Ae. aegypti* es una variable cuantitativa que parece ser distribuida continuamente entre los individuos y esta sujeta a efectos ambientales. Recientes avances moleculares, genéticos y estadísticos permiten realizar mapeos de los loci que afectan la expresión de características cuantitativas o QTL (Quantitative Trait Loci) (SEVERSON *et al.*, 1994). Severson y colaboradores, mapearon en *Ae. aegypti* el QTL que condiciona la susceptibilidad a las filarias (KILAMA & CRAIG 1969).

El primer mapa de ligamiento genético fue construido para *Ae. aegypti* usando marcadores moleculares de RFLP (SEVERSON *et al.*, 1993). La disponibilidad de estos conocimientos ha permitido a los investigadores empezar a estudiar el complejo genético de ciertos aspectos de la competencia vectorial (SEVERSON *et al.*, 1993).

Bosio y colaboradores mapearon y caracterizaron los QTL que controlan la infección en el intestino medio y las barreras de escape (BEM), las cuales condicionan la competencia vectorial en *Ae. aegypti* para virus Dengue (BOSIO *et al.*, 2000). Los QTL para la BEM en *Ae. aegypti* fueron detectadas en el cromosoma II y III. Recientemente, Bennett ha identificado un QTL para la barrera de escape en el intestino medio sobre el cromosoma 1 (BOSIO *et al.*, 2000).

En 1996, se registraron estudios donde se les proporcionó la refractoriedad al virus de Dengue a cepas susceptibles de *Ae. aegypti*, usando el virus Sindbis para expresar un RNA antisentido complementario a fragmentos del genoma del virus dengue (OLSON *et al.*, 1996). El sistema de Sindbis virus puede ser muy importante para evaluar *in vivo* los efectos de los genes candidatos para ser antipatógenos. Estas moléculas pueden ser sobre expresadas y su actividad puede ser evaluada por examinación de parámetros tales como prevalencia y medida de intensidad de infección. Sin embargo este sistema de expresión es temporal y no heredable (OLSON *et al.*, 1996).

En Colombia se han desarrollado estudios para detectar el virus Dengue en mosquitos colectados en campo, pero aun faltan estudios de diferentes localidades geográficas de Colombia donde se encuentra distribuido *Ae. aegypti* (ROMERO-VIVAS *et al.*, 1998). En la ciudad de cali se evaluó la competencia vectorial en poblaciones de diferentes localidades de la ciudad, concluyendo una heterogenicidad entre las poblaciones de vectores de la ciudad, demostrando cambios a nivel de la competencia vectorial que varían en tiempo y muestran variaciones en un rango desde 19% hasta 60% para el virus dengue-2 (OCAMPO & WESSON, 2004).

Estudios iniciales de selección por isolíneas de cepas de *Ae. aegypti* con diferente competencia vectorial hacia el virus Dengue-2 en la ciudad de Cali, reportan una alta letalidad en larvas y demostraron que no fue posible obtener una cepa que presente una baja susceptibilidad hacia el virus dengue-2, esto debido posiblemente al alto grado de consanguinidad que se presenta en las filiales avanzadas de las isofamilias establecidas.

De acuerdo a esta experiencia preliminar, se plantearon nuevas estrategias para la selección de cepas de *Ae. aegypti* con alta (susceptibles) y baja (refractarias) competencia vectorial hacia el virus DEN-2, bajo condiciones de laboratorio. El éxito en esta selección permitió entender mejor la interacción virus-vector, asociar factores genéticos y ambientales de las poblaciones, que permitirán encontrar características relacionadas a la competencia vectorial y nuevas estrategias o alternativas que conlleven a realizar estudios para controlar las enfermedades transmitidas por mosquitos.

## 7 HIPÓTESIS

- Las poblaciones de *Ae. aegypti* de diferentes localidades de la ciudad Santiago de Cali presentan diferencia en su competencia vectorial a la infección con virus Den-2.
- La diferencia en competencia vectorial de las poblaciones de *Ae. aegypti*, permitirá seleccionar cepas susceptibles y refractarias a infección con virus Dengue-2.
- Los datos registrados en las tablas de vida, permitirán evaluar el efecto del virus Dengue-2 en los aspectos biológicos de individuos susceptibles y refractarios de *Ae. aegypti*.

## 8 METODOLOGÍA

El desarrollo de los objetivos, se llevó a cabo realizando pruebas preliminares basadas en trabajos elaborados en CIDEIM; con el fin de estandarizar las condiciones de trabajo para la presente propuesta.

A continuación se describe a nivel macro la metodología de las pruebas preliminares (parte I) y la de este trabajo (parte II). Posteriormente se detallan los procesos realizados en cada parte.

**PRIMERA PARTE - pruebas preliminares de este trabajo.** Los ejemplares de *Ae. aegypti* que se emplearon en este estudio para formar la población mixta de parentales de campo, fueron colectados en diferentes localidades de la ciudad de Cali, con el fin de tener una muestra representativa de la ciudad.

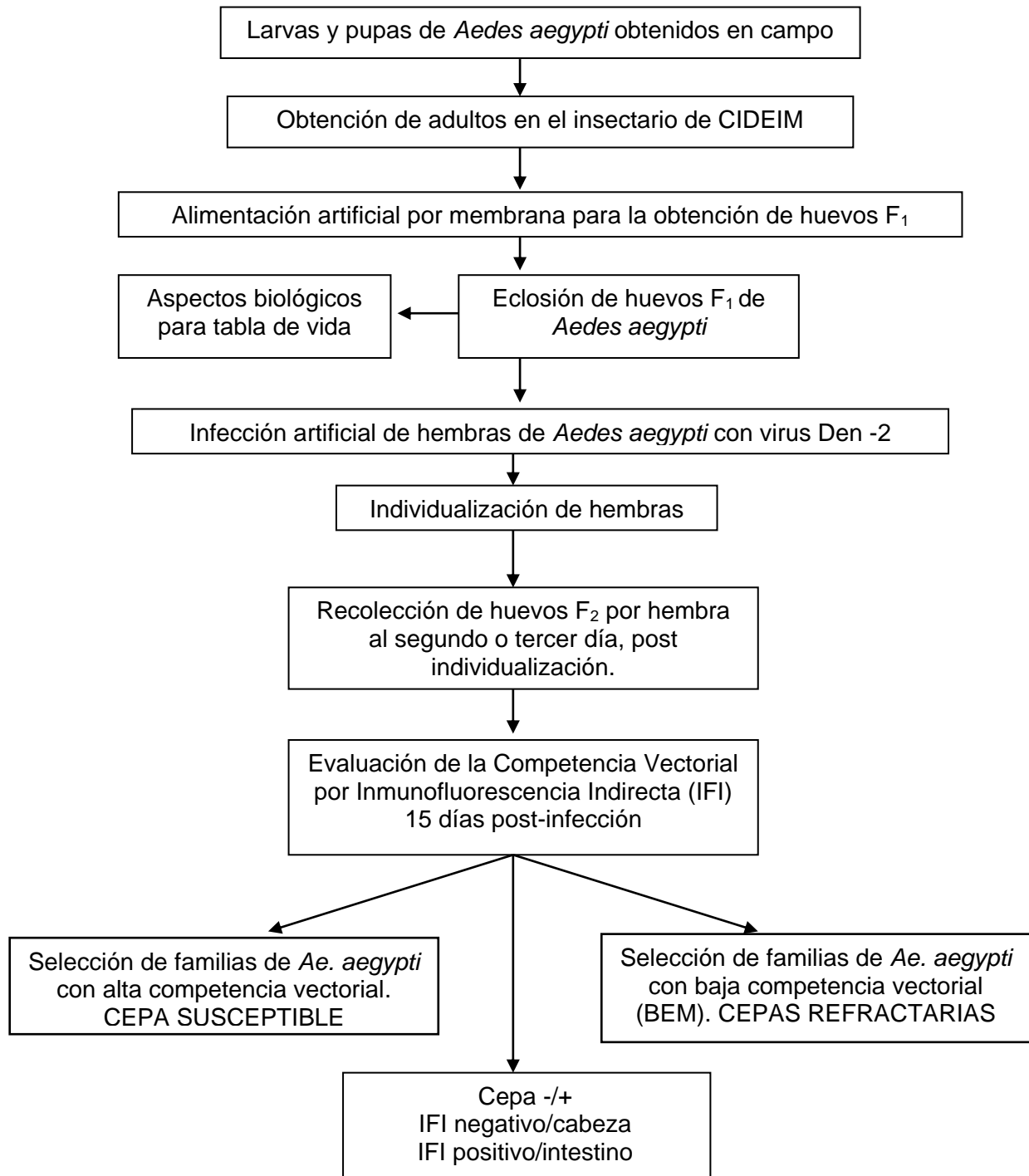
A los parentales de *Ae. aegypti* obtenidos en la primera salida de campo, se les alimentó artificialmente con el fin de obtener huevos que conformaran la Filial 1 (F<sub>1</sub>). Con estos huevos se inició la primera selección de cepas de *Ae. aegypti* con alta y baja competencia vectorial (ver figura 11).

Inicialmente, se eclosionaron los huevos F<sub>1</sub> de la población mixta (población I) de la ciudad de Cali. Una vez obtenidos los adultos, se realizó la infección artificial por membrana de las hembras de *Ae. aegypti* con sangre mezclada con virus Dengue-2. Al día siguiente se individualizaron las hembras alimentadas en un recipiente pequeño, y se colocaron en la cámara de Bioseguridad. Al segundo o tercer día se recolectaron los huevos F<sub>2</sub> de cada hembra, los cuales se utilizaron para proseguir con el proceso de selección de cepas. Al día 15 post infección, se realizó la disección de cabeza de estas hembras infectadas, y se guardó el cuerpo a -45°C para posteriores análisis. Mediante análisis de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) se evaluó la presencia o no del virus en las cabezas obtenidas, lo cual permitió establecer el porcentaje de competencia vectorial de la población. Todo este procedimiento se desarrolló con altas condiciones de bioseguridad (BSL2).

Las hembras susceptibles fueron aquellas que presentaron el virus en la cabeza (IFI positiva de cabeza). Si la IFI de cabeza daba un resultado negativo, se le realizaba disección de intestino a esa hembra y su análisis por IFI. Si el resultado negativo se mantenía, estas hembras se clasificaban como refractarias a la infección por el virus con barrera de infección de intestino medio. De acuerdo con estos resultados, se procedió a eclosionar en una bandeja los huevos F<sub>2</sub> de todas las hembras con fenotipo susceptible y en otra bandeja los huevos F<sub>2</sub> de todas las

hembras con fenotipo refractario. De esta forma se inició la obtención de cepas susceptibles y refractarias de *Ae. aegypti* a la infección con virus Den-2 mediante la selección por isofamilias.

**Figura 11.** Procedimiento para la obtención de cepas de *Aedes aegypti* con fenotipo susceptible y refractario a infección con virus Dengue-2.



De igual forma, en una bandeja aparte se eclosionaron los huevos de las hembras que presentaron IFI negativa de cabeza e IFI positivo de intestino (cepa -/+), para analizar el comportamiento de la cepa y por ende el efecto del virus a través de las filiales generadas.

Con el fin de evitar un alto grado de consanguinidad en las filiales obtenidas, se realizó una segunda salida de campo para obtener una segunda población (población II) y de esta manera refrescar la colonia inicial (población I). A esta segunda población se le aplicó el mismo procedimiento que la población inicial para obtener de igual forma cepas susceptibles y refractarias (ver figura 12). Una vez obtenidos los huevos F<sub>2</sub> de ambas poblaciones, se hizo el cruce entre susceptibles (I y II) y refractarias (I y II). Se eclosionaron las cepas susceptibles y refractarias de cada población por separado para realizar la tabla de vida de cada una de ellas. Una vez obtenidos los adultos de las cepas de las poblaciones I y II, se mezclaron entre aquellas que presentaron igual fenotipo (ver figura 12).

En los experimentos de esta primera parte sólo se logró seleccionar una cepa susceptible. La cepa refractaria no fue posible seleccionarla debido a la alta mortalidad en estadios larvales (ver resultados).

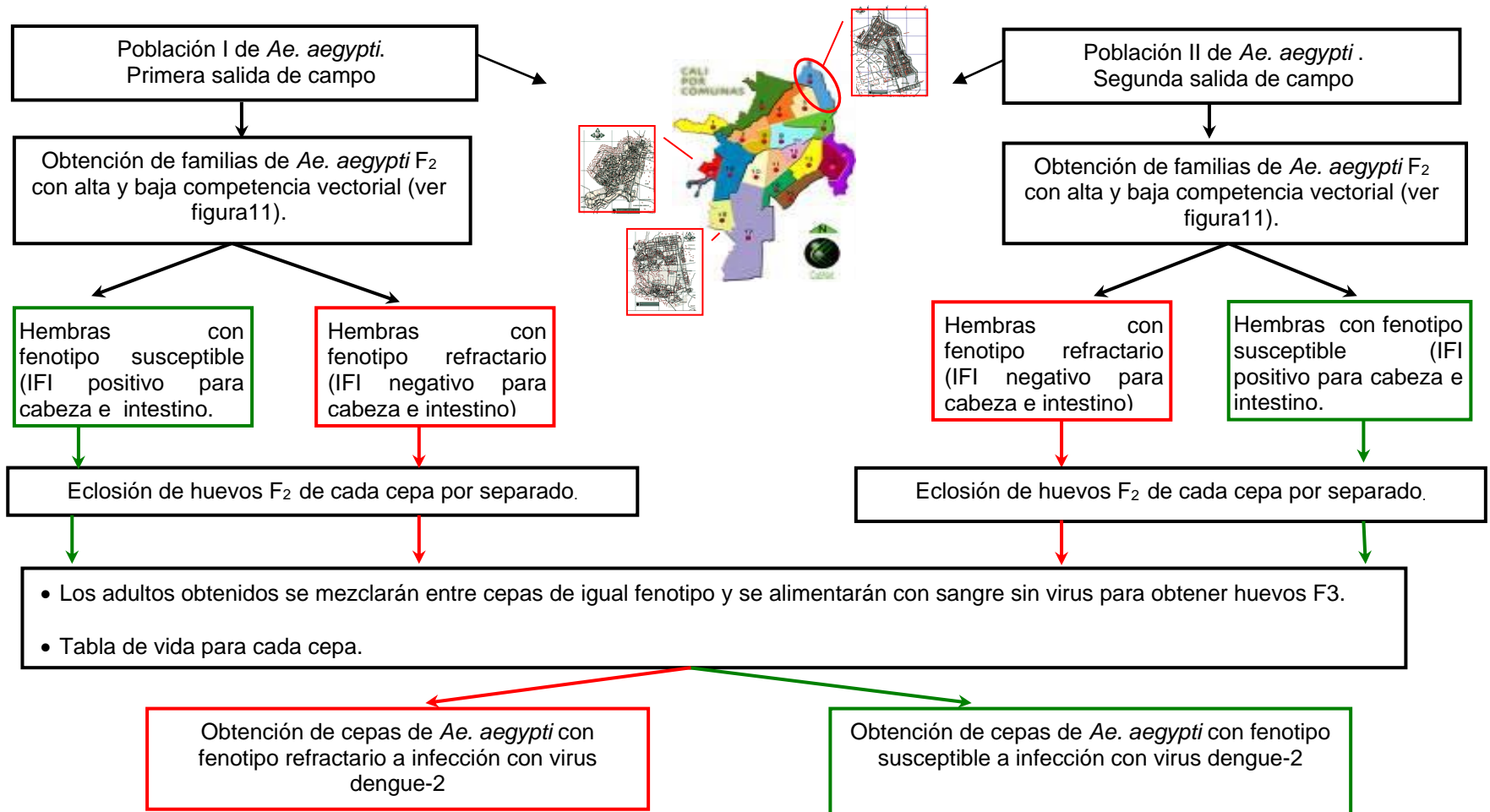
**SEGUNDA PARTE:** teniendo en cuenta los resultados preliminares de esta propuesta, se modificó la estrategia experimental y se decidió coleccionar nuevos ejemplares de campo. En esta población se emplearon nuevas aproximaciones para disminuir el porcentaje de mortalidad de las larvas por el efecto del virus. De esta manera, el proceso de selección de las cepas se llevó a cabo en *generaciones alternas*, es decir, se infectó una filial y la próxima filial se eclosionó pero sin presión de selección. Este procedimiento se repitió de manera intercalada en el proceso de selección de las cepas susceptibles y refractarias.

El propósito del estudio fue repetir el protocolo para la evaluación de la competencia vectorial (figura 11), empleado en las pruebas preliminares, hasta obtener una cepa de *Ae. aegypti* con alto porcentaje de competencia vectorial (CV) y otra cepa de *Ae. aegypti* con bajo porcentaje de CV a infección con virus Dengue-2. Durante el periodo de selección y a medida que se fueron eclosionando los huevos de las cepas seleccionadas, se hizo el seguimiento del desarrollo de la cepa Rockefeller de *Ae. aegypti* como cepa control en el laboratorio sin someterla a ninguna infección por virus; con el fin de establecer comparaciones con las cepas infectadas.

En el anteproyecto de este trabajo, se planteó realizar el seguimiento de la población de campo F1 como cepa control, pero debido a dificultades presentadas en laboratorio con el material de trabajo, se decidió tomar la cepa Rockefeller como control de eclosión por cada generación evaluada.



**Figura 12.** Selección de isofamilias susceptibles y refractarias de *Aedes aegypti* a infección con virus Dengue-2. Pruebas preliminares.



Para evaluar el efecto de la infección por virus Dengue-2 en individuos susceptibles y refractarios de *Ae. aegypti* y reconocer los factores que pudieran influir en la tasa de mortalidad de cepas susceptibles y refractarias de *Ae. aegypti*; se construyeron tablas de vida de las diferentes poblaciones en estudio. De esta forma, fue posible realizar comparaciones cuantitativas de parámetros analizados en las cepas seleccionadas, con una cepa control mantenida en condiciones de laboratorio.

En este trabajo se realizaron tablas de vida horizontales en cada eclosión de huevos por cada cepa que se evaluó en el trabajo (cepas susceptibles, refractarias, +/- y control), con el fin de llevar un registro de una cohorte de mosquitos desde el momento de la eclosión hasta su muerte (BEGON *et al.*, 1988; RABINOVICH 1980).

Los datos a registrar fueron: Sobrevivencia, duración media de cada estadio, número de huevos promedio por hembra, número de larvas eclosionadas, larvas muertas y su estadio, número de pupas y pupas muertas, así como también el número de adultos obtenidos. Todos estos datos se registraron diariamente en un formato establecido para esta actividad (ver anexo 1).

Las condiciones de eclosión (temperatura, humedad, densidad de larvas, cantidad de agua y alimento) y mantenimiento en laboratorio fueron iguales para todas las poblaciones establecidas.

A partir de los datos registrados para cada cepa eclosionada, se establecieron los siguientes parámetros:

- **$a_x$** : Número total de individuos observados al inicio de cada estadio.
- **Sobrevivencia ( $l_x$ )**: Proporción de la cohorte original que sobrevive al inicio de cada estado o estadio ( $N_x/N_0$ ). A fin de estandarizar los datos se considera  $l_0= 1,000$ .
- **Número de individuos muertos ( $d_x$ )**: Proporción de la cohorte original que muere en cada estadio  $d_x = l_x - l_{x+1}$
- **Probabilidad de muerte ( $q_x$ )**: Tasa de mortalidad ( $d_x/l_x$ ).
- **Mortalidad ( $m_x$ )**: número de individuos muertos en cada estadio.

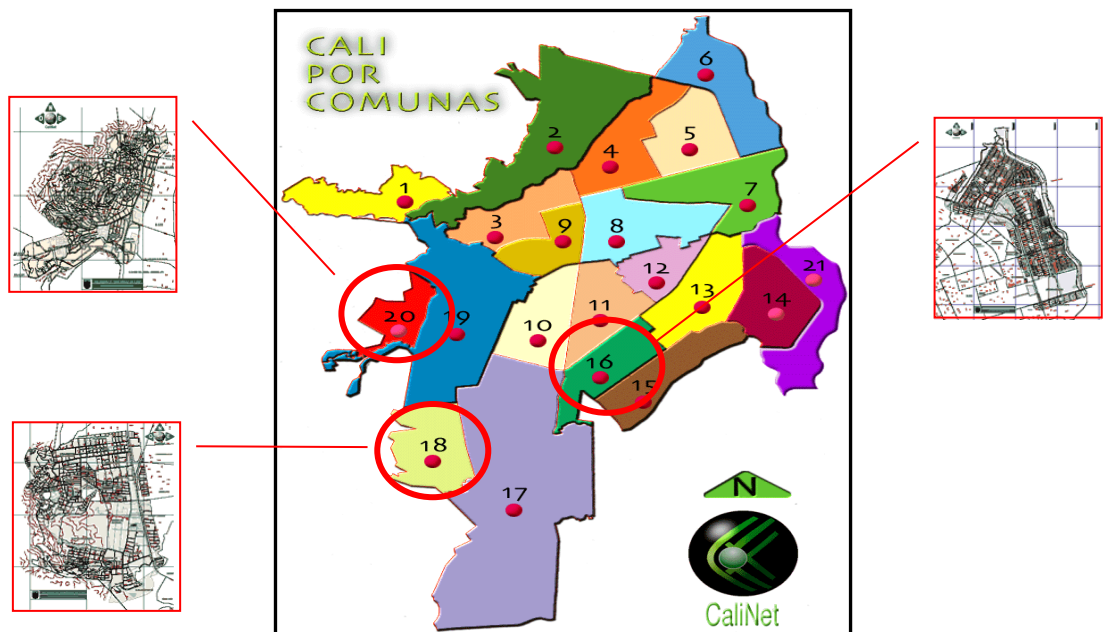
Las tablas de vida permitieron evaluar otros factores como número de huevos puestos por hembra, porcentaje de eclosión y tiempo de duración de larvas durante todo el ciclo biológico.

Basados en la estrategia experimental planteada para este estudio, a continuación se describe el protocolo empleado para la obtención de cepas susceptibles y refractarias de *Ae. aegypti* a infección por virus dengue-2.

## 8.1 OBTENCIÓN DE ADULTOS DE *Aedes aegypti*

Los ejemplares de *Ae. aegypti*, que fueron utilizados para la obtención de las cepas, se colectaron en diferentes localidades escogidas de forma aleatoria en la ciudad de Cali (figura 13). Las colecciones comprendieron larvas y/o pupas, las cuales se obtuvieron de contenedores o criaderos artificiales (llantas, tarros, etc.) presentes en las casas de las localidades.

**Figura 13.** Mapa de Santiago de Cali por Comunas



En URL. [www.cali.gov.co/publico2/calicomunas.htm](http://www.cali.gov.co/publico2/calicomunas.htm)

Con la ayuda de cucharones y goteros se obtuvieron las muestras de agua de los criaderos de *Ae. aegypti*, y se depositaron en un contenedor plástico (bandeja) para escoger el material biológico y separarlo en recipientes más pequeños (tazas), con el fin de facilitar su transporte. Cada muestra fue debidamente rotulada (fecha y localidad), almacenada y protegida de la luz solar directa. Posterior a esto, se trasladaron las muestras al insectario (laboratorio) de CIDEIM, con el propósito de establecer las colonias de *Ae. aegypti*.

Las larvas se mantuvieron en contenedores plásticos (bandejas) (27x34x13cm) con 2 litros de agua de clorada (agua potable que se deja reposar por 24 horas), con una densidad de 300 larvas por contenedor; estas larvas se alimentaron con

solución de hígado de res y se observó su crecimiento diariamente (figura 14). Las bandejas se taparon con una malla para evitar contaminaciones.

Las pupas obtenidas de estas larvas, y las pupas obtenidas en campo, se trasladaron a vasos desechables con agua declorada dentro de una jaula con malla, a la cual se le colocó un algodón humedecido con solución azucarada y otro con agua declorada sobre la malla, para la alimentación de los adultos que emergieron a partir de este experimento (figura 15).

**Figura 14.** Contenedores plásticos para la eclosión de huevos



CIDEIM (2006)

Las jaulas se rotularon debidamente (ver modelo de rótulo) con el nombre de la localidad, número de la filial, especie de mosquito, fechas respectivas de recolección, eclosión de huevos, obtención de pupas y el número de pupas; estos datos fueron necesarios para llevar el registro de cada colonia que se estableció.

- Modelo de rótulo para jaulas y bandejas de eclosión de huevos de *Ae. aegypti*

**SILOE *Aedes aegypti* F1**

**Recolección de huevos:** diciembre/20/ 2006

**Eclosión de huevos:** enero 15 de 2007

**Obtención de pupas:** 22-enero-2007

**Número de pupas:** 122

**Figura 15.** Jaula para el mantenimiento de mosquitos



CIDEIM (2006)

Los mosquitos se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio; temperatura ( $28, \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa (70%), y fotoperiodo (Día:Noche, 12:12). Los adultos parentales de *Ae. aegypti* obtenidos (ejemplares de campo), se utilizaron para la obtención y almacenamiento de huevos F<sub>1</sub> mediante alimentación artificial por membrana. Una parte de estos huevos se utilizó para el proceso de selección y la otra parte para el mantenimiento de la colonia original.

## **8.2 ALIMENTACIÓN ARTIFICIAL DE HEMBRAS DE *Aedes aegypti*, UTILIZANDO ALIMENTADORES DE VIDRIO CON MEMBRANA SINTÉTICA.**

Las hembras parentales de *Ae. aegypti* colectadas en la salida de campo, se alimentaron artificialmente con sangre varias veces, para recolectar y almacenar huevos, que fueron utilizados para la obtención de nuevas generaciones de mosquitos F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, etc. Esto fue posible gracias a que los huevos de *Ae. aegypti* presentan diapausa, que es un periodo de crecimiento suspendido, reposo y de metabolismo reducido en el ciclo de vida de los mosquitos; y a la tolerancia al almacenamiento (ARCHIBOLD 1995).

El objetivo de la alimentación artificial por membrana fue simular las características de la alimentación normal de un mosquito sobre un hospedero vertebrado. Los mosquitos contenidos en las diferentes jaulas que correspondieron a las localidades de Cali, se alimentaron por membrana con alimentadores de vidrio durante un periodo de 1 a 2 horas. Se utilizó membrana de intestino de cerdo, la cual se preservó con sal en una bolsa plástica en la nevera a 4°C para evitar su descomposición. La porción de membrana fue de 20 a 30 cm o más dependiendo del número de alimentadores necesarios. Se sacó la membrana de la nevera, se realizaron varios lavados y se colocó en un recipiente con agua por treinta minutos antes de iniciar la alimentación, con el fin de eliminar la sal de la membrana y que los mosquitos no la rechazaran (figura 16).

**Figura 16.** Membrana en recipiente con agua



CIDEIM (2006)

Una vez transcurridos los treinta minutos, se realizaron varios lavados de la membrana para asegurarse de eliminar toda la sal. Cuidadosamente se abrió la membrana con tijeras y se cortaron trozos pequeños de 4 o 5 cm, de tal manera que cubrieran la base de los alimentadores de vidrio completamente. Una vez cubiertos, la membrana se aseguró con una banda de caucho para evitar que se derramara la sangre durante la alimentación (figura 17).

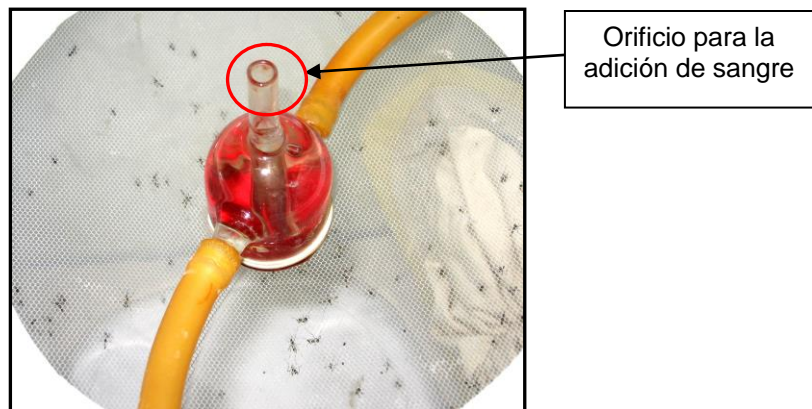
**Figura 17.** Preparación del alimentador



CIDEIM (2006)

Ya con los alimentadores preparados (figura 18), se realizó el montaje del sistema de alimentación. Inicialmente se ubicaron las jaulas en el sitio donde se realizó la alimentación y se encendió el baño maría.

**Figura 18.** Alimentador de vidrio preparado para la alimentación



CIDEIM (2006)

Para mantener la temperatura adecuada de la sangre de los alimentadores, fue necesario utilizar una bomba de circulación de agua, la cual se colocó en el baño

maría a 37°C, simulando la temperatura corporal. Esta bomba tuvo una salida de la cual emergía una manguera que estuvo conectada al primer alimentador.

Los alimentadores armados se colocaron sobre la malla de las jaulas y se conectaron entre sí con trozos de manguera. La manguera que salía del último alimentador iba hacia el baño maría permitiendo así la circulación del agua entre los alimentadores (figura 19). De esta manera, se mantuvo la sangre a una temperatura de 37°C.

Al conectar todo el sistema de alimentación, se aseguró que funcionara bien (sin escape de agua de los alimentadores o entre ellos) para luego adicionar la sangre con una pipeta plástica en los depósitos de los alimentadores de vidrio (figura 18). La sangre debía cubrir toda la superficie de la membrana.

**Figura 19.** Equipo de alimentación artificial con alimentadores de vidrio



CIDEIM (2006)

Se revisaron las jaulas constantemente, para controlar la alimentación de los mosquitos y/o algún error o accidente que ocurriera durante este procedimiento.



**Figura 20.** Alimentación de mosquitos sobre la membrana



CIDEIM (2006)

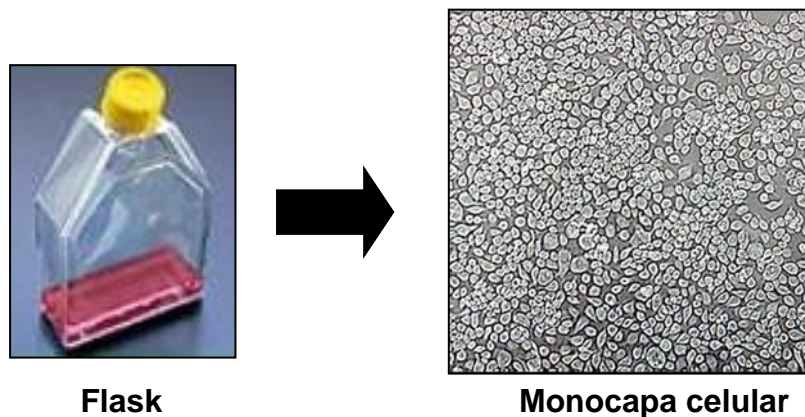
Después de 2 horas de alimentación, se desarmó el equipo de alimentación con precaución, evitando el derrame de la sangre y el agua de los alimentadores. Para retirar con seguridad la membrana y la sangre, se introdujeron los alimentadores en un recipiente que contenía solución desinfectante (Lophene).

**8.2.1 Obtención y almacenamiento de huevos de *Aedes aegypti*:** Terminado el proceso de alimentación de los mosquitos, se colocaron vasos desechables de 7 onzas con agua de cloro (10 ml). Sobre las paredes de los vasos se colocaron cuadros de papel filtro humedecido de 5cm x 5cm.

Al segundo ó tercer día, se retiró el papel filtro con los huevos y se secaron sobre una toalla absorbente para almacenarlos hasta que fuera necesario utilizarlos. La toalla absorbente se marcó con el nombre de la población, el número de la filial y la fecha de recolección. El papel filtro con los huevos se almacenó en una bolsa de sellado, ubicada en un recipiente tapado, el cual contenía otra toalla absorbente humedecida en el fondo para evitar la desecación de los huevos. Estos huevos se guardaron por un tiempo máximo de tres (3) meses (tiempo de viabilidad). Los vasos desechables con papel filtro se cambiaron el número de veces que fue necesario, o hasta obtener el número de huevos necesarios para posteriores experimentos.

### 8.3 CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS C6/36

Figura 21. Monocapa de cultivo celular.



En URL: [www.raylab.co.nz](http://www.raylab.co.nz); [pathport.vbi.vt.edu](http://pathport.vbi.vt.edu)

Los cultivos celulares son utilizados para el estudio del crecimiento de diversos virus. La mejor línea celular empleada para el aislamiento del virus dengue, es la línea de células de *Ae. albopictus* C6/ 36 HT (KUNO 1997).

El cultivo celular C6/36 HT, se mantuvo en flask de 50 ml con 5 mL de medio de crecimiento celular Lebovitz suplementado con suero fetal bovino al 10% (medio L-15 con SFB al 10%). Con el fin de mantener el cultivo de células *in vitro* en monocapas (figura 21) y preservar sus propiedades fisiológicas, se realizó un pase celular cada 7 días.

El pase celular se realizó por duplicado, por si se presentaba una contaminación o algún percance en alguno de los flask. El crecimiento celular se revisó continuamente, para evitar una sobreconfluencia. Cuando la monocapa presentó una confluencia celular del 80% aproximadamente, se realizó el pase de las células. Para ello, primero se verificó el estado de la monocapa de las células o el porcentaje de confluencia celular en ambos flasks en el microscopio de luz invertida.

En una cabina de flujo laminar, se realizó el mantenimiento de las células. Inicialmente se desechó el medio de cultivo (medio L-15 con SFB al 10%) que contenían los flask, por el lado contrario al que estaba la monocapa en un beaker que contenía desinfectante (Lophene). Se adicionaron 5 mL de PBS 1X para lavar las células y retirar todas las células sueltas, mediante movimientos circulares. Se descartó el PBS de los flask de igual forma que el medio y se adicionó 1 mL de medio L- 15 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Con la ayuda de un policia de vidrio se removió la monocapa deslizando desde arriba hacia abajo

con movimientos suaves para no dañar las células. Se retiró la suspensión de células y se dejaron solamente 200µL en cada flask, el restante se descartó. Finalmente se agregaron 5 mL de medio L- 15 con SFB al 10% a los flask, se mezcló bien y se incubaron a 32°C ± 1°C.

Cuando se necesitaba tener mayor cantidad de cultivos o flask del remanente, se adicionaron 200µL de la suspensión de células en cada nuevo flask que se necesitaba preparar.

## **8.4 CULTIVO DEL VIRUS**

El cultivo de células C6/36 HT se mantuvo en 2 flask de 50ml (ver 9.3) y se utilizó para realizar la amplificación del virus Dengue-2 (cepa New Guinea).

Una vez obtenida una monocapa celular (ver 9.3), la infección de las células C6/36 HT se realizó con 800 µL de sobrenadante de virus DEN-2, el cual se encontraba alicuotado en tubos eppendorf y almacenado a -45°C.

El sobrenadante del virus, se sacó de la nevera en una materia con hielo para descongelarlo lentamente. Una vez descongelado se llevó a la cabina con nivel de bioseguridad tipo III, usando guantes, tapabocas y la bata adecuada para trabajar en este lugar. Posteriormente, se adicionaron 800 µL del virus a cada flask con monocapa celular y se incubaron por 1 hora a 37°C, agitando con suavidad durante el tiempo de la incubación con el fin de que el virus penetrara en las células.

Los flask se marcaron con la fecha en la que se realizó la infección, y la fecha en la cual se recolectó el sobrenadante empleado, el número del pase o las veces que hubiera sido multiplicado.

Transcurrido el tiempo de incubación, se descartó el sobrenadante de los flask en un beaker con desinfectante y se agregaron 6 mL del medio L-15 suplementado con SBF al 2% a cada flask para obtener la multiplicación adecuada del virus. Se incubaron los dos flask infectados a 32°C sin presencia de CO<sub>2</sub> (la tapa del flask se sella con Parafilm, por bioseguridad).

A los 14 días, tiempo durante el cual el virus se multiplicó en las células, se desprendieron las células de los flask con la ayuda de un policía de vidrio y se colectó el medio con las células de cada flask en un tubo falcon de 15mL. Una vez

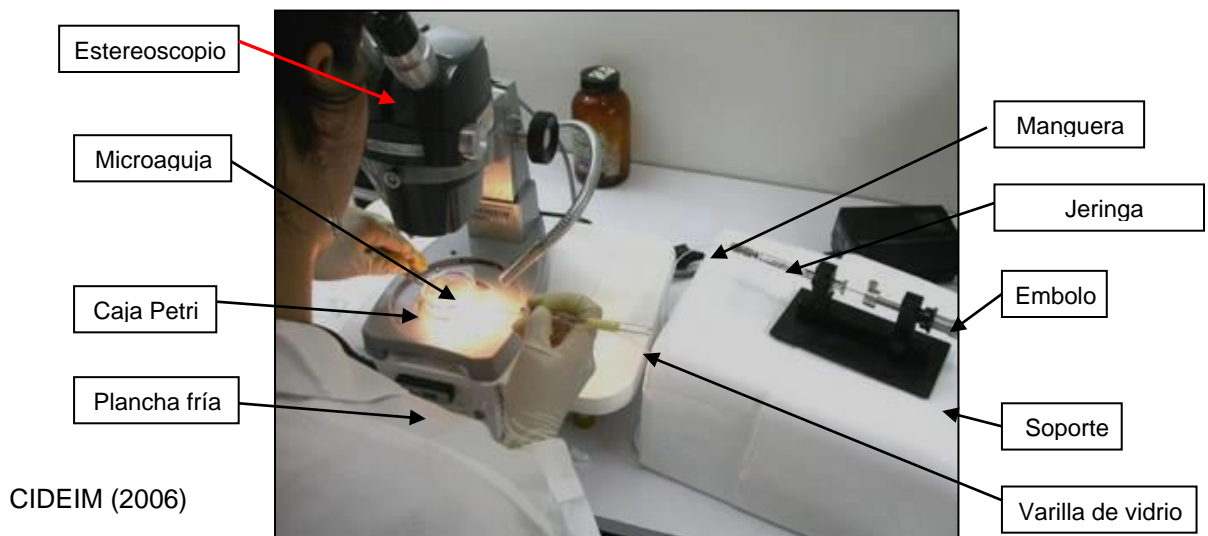
se extrajo el medio y las células de los flask, estos se descartaron en el beaker. Este proceso también se llevó a cabo en la cabina de bioseguridad tipo III.

Con el fin de obtener el sobrenadante del virus Dengue-2 y descartar las células, se centrifugó el tubo falcon a 1500 r.p.m durante 5 minutos. El sobrenadante del virus se alicuotó en tubos eppendorf de 1.5 mL y las células (el botón al fondo del tubo) se descartó en el tubo falcon. Los sobrenadantes obtenidos en este experimento se almacenaron a  $-45^{\circ}\text{C}$ . Estos sobrenadantes se utilizaron en los experimentos de infección para la evaluación de la competencia vectorial de *Ae. aegypti* y microinyecciones intratorácicas de los mosquitos.

### 8.5 MICROINYECCIÓN DE HEMBRAS DE *Aedes aegypti* CON VIRUS DENGUE-2.

La microinyección es una metodología que permite la introducción mecánica de microorganismos ya sean virus, bacterias u hongos al interior de un organismo, sistema o célula. Este procedimiento se realizó con el fin de obtener mosquitos infectados para ser utilizados como controles positivos de infección con virus Dengue-2 en los análisis por inmunofluorescencia indirecta. Este procedimiento, se realizó en mosquitos de la cepa de referencia Rockefeller suministrada por el laboratorio del CDC de San Juan de Puerto Rico y mantenida en el insectario de CIDEIM. Los mosquitos que se microinyectaron se separaron de la colonia (preferiblemente hembras) y se colocaron en otra jaula. Se montó el equipo de microinyección, el estereoscopio y la plancha fría (figura 22).

Figura 22. Equipo para microinyección



El sistema de microinyección (figura 22) está formado por una jeringa Hamilton, la cual se conecta a una manguera de 3 mm de diámetro sujeta a una varilla de vidrio. La microaguja que se emplea para microinyectar se hace a partir de un capilar de vidrio que se ha pasado por un equipo (Vertical Pipete Puller) que por calor genera el extremo en forma de aguja.

El equipo de microinyección se llenó con aceite corporal, incluyendo la manguera y la aguja. Durante este procedimiento se tuvo la precaución de no dejar burbujas. Se verificó que el aceite saliera y que solamente se moviera el émbolo; es decir que la aguja Hamilton estuviera bien fija al soporte. Se observó la punta de la microaguja en el estereoscopio para constatar que ésta se encontrara en perfectas condiciones.

Una vez el equipo estuviera montado, se retiró el tubo eppendorf con el virus Dengue-2 del congelador de  $-45^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo en una materia con hielo. Se tomaron unos mosquitos de la jaula con el aspirador bucal y se tapó el tubo con un tapón de algodón. El aspirador bucal se colocó dentro de una nevera de icopor con bloques de hielo por cinco (5) minutos, para dormir los mosquitos. Mientras se enfriaban los insectos, se colocaron  $30\mu\text{l}$  del virus Dengue-2 sobre una lámina portaobjetos. En el equipo de microinyección, se eliminó una cantidad de aceite de la aguja y se tomaron los  $30\mu\text{l}$  del virus. Se tuvo precaución de no romper la punta de la aguja y en evitar que al sistema de inyección le entrara aire. Posteriormente se retiró el aspirador con los mosquitos de la nevera y se verificó que los insectos estuvieran dormidos. Los mosquitos se colocaron sobre una caja Petri con malla, la cual se encontraba sobre la plancha fría que ayudó a mantenerlos dormidos; se cerró la caja de Petri y se puso sobre ella un bloque de hielo. Durante este tiempo, se observaba que los insectos estuvieran dormidos para abrir la caja de Petri e inocular los mosquitos.

Con la pinza entomológica se acomodaron los insectos para realizar la microinyección. El cuerpo de los mosquitos siempre se tuvo en contacto con la malla de la caja de Petri para que no se despertaran. Se observó el mosquito por el estereoscopio, se ubicó lateralmente y se inculó en el mesoepimeron. El volumen de la inoculación es de  $0.0334\mu\text{l}$  de virus por mosquito, que equivalen a dos vueltas de la jeringa Hamilton. El insecto inoculado se puso dentro de otra jaula previamente rotulada. Se tuvo cuidado al quitar el tampón de algodón del tubo cada vez que se puso un mosquito microinyectado, para evitar que los que se encontraban en la jaula se escaparan. Las jaulas con los mosquitos inyectados se colocaron dentro de la cámara de bioseguridad (ver figura 23). Sobre la malla se colocó un algodón humedecido con agua y otro con solución de azúcar al 10%.

Diariamente y con cuidado se humedecieron los algodones introduciendo las manos protegidas con guantes a través de las mangas de la cámara de bioseguridad nivel 2. Después de siete (7) días, se revisaron las jaulas para

asegurar que no hubieran insectos muertos; se sacrificaron por congelación los mosquitos que sobrevivieron a la microinyección y se guardaron en tubos eppendorf a -45°C para utilizarlos como controles positivos en análisis de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

**Figura 23.** Cámara de bioseguridad



CIDEIM (2006)

## **8.6 EVALUACIÓN DE LA COMPETENCIA VECTORIAL DE *Aedes aegypti* A INFECCIÓN CON VIRUS DENGUE-2.**

La evaluación de la competencia vectorial en poblaciones de *Ae. aegypti* permitió determinar la susceptibilidad o refractoriedad de estos a la infección, replicación y transmisión del virus Dengue-2, determinando las barreras anatómicas a la infección del virus; lo que permitió seleccionar cepas con alta y baja susceptibilidad a la infección.

Para llevar a cabo este procedimiento, se sincronizaron las actividades necesarias previamente para llevar a cabo este experimento; como la obtención de los flask con células C6/36 HT (8 días antes de la infección) los cuales se utilizaron para realizar la infección de estas con virus Dengue-2.

Tanto la eclosión de los huevos de la población de interés como la infección de células se realizaron el mismo día (ver cuadro 1).

**Figura 24.** Recipientes para individualización de hembras infectadas (izquierda), Cámara de bioseguridad para el mantenimiento de hembras infectadas (derecha).



(CIDEIM 2006)

## Evaluación de la Competencia vectorial de *Ae. aegypti* a infección con virus dengue 2.

### Obtención de Adultos

- Día 1. Eclosión de huevos de población de interés en contenedores plásticos (27 x 34x13cm) con agua de clorada.
- La densidad por contenedor de 200 a 300 larvas. Estas larvas se alimentaron con solución de hígado de res y se siguió su crecimiento diariamente.
- Las pupas, se trasladaron a vasos desechables con agua de clorada dentro de una jaula con malla, a la cual se les colocó un algodón humedecido con solución azucarada y otro con agua de clorada, para la alimentación de los adultos.
- Las jaulas se rotularon con fechas de recolección, eclosión de huevos, obtención de pupas, número de pupas y localidad.
- Día 15. Los mosquitos se mantuvieron en condiciones óptimas de laboratorio; temperatura (28, ± 2°C), humedad relativa (70%), y fotoperiodo (D:N, 12:12).

### Infección de Células C6/36 HT con Virus Dengue-2

- Día 1. La infección se hizo por duplicado (en dos flask). Las células con una confluencia celular del 80% fueron infectadas con el virus Dengue-2.
- En la cámara de Bioseguridad III, se eliminó el medio de cultivo por lado contrario a la monocapa. Se adicionaron 800 µL de virus Dengue-2 a cada flask y se movieron suavemente por 5 minutos, con el fin de facilitar la entrada del virus a las células. Los dos flask se incubaron a 37°C por una hora.
- Transcurrido este tiempo, se retiró el virus con la ayuda de una Micropipeta y se adicionaron 6 mL de medio de cultivo L-15 con SFB al 2%, se cubrió la tapa con parafilm y se incubaron a 32°C ±1° por 14 días.

**\*NOTA:** El virus se almacenó a -45°C. Para realizar la infección celular se sacó del congelador en una materia con hielo y se descongeló lentamente.

#### Obtención de virus Dengue-2:

- Día 15. El virus se recolectó al día 15 post infección de células C6/36. En la cámara de Bioseguridad III, se removió la monocapa de células con un policia de vidrio y el contenido del flask se recolectó en un tubo Falcon de 15 mL. De esta suspensión (células+ virus) se tomaron 500 µL y se almacenaron en un tubo eppendorf. La suspensión restante contenida en el tubo Falcon, se centrifugó por 5 minutos a 1500 r.p.m. De este sobrenadante (medio+virus), se tomaron 500µL y se almacenaron en otro tubo eppendorf. Los tubos eppendorf se marcaron con la fecha de infección, recolección y el respectivo contenido. Se colocaron en un recipiente o materia con hielo y se guardaron a -45°C para la próxima titulación.
- El medio y las células restantes (5ml) se resuspendieron para realizar la infección de mosquitos mediante alimentación artificial con membrana con alimentadores de vidrio.

### Día 15. Infección de hembras de *Aedes aegypti* con virus Dengue - 2



**Día 15. Infección de hembras de *Aedes aegypti* con virus Dengue – 2**

- Día 15. Se mezclaron 5mL de sangre desfibrinada de conejo con los 5mL del cultivo de células infectadas con virus Dengue-2 (proporción 1:1); y la infección se realizó alimentando las hembras con la mezcla de sangre y virus por membrana artificial por un periodo de 2 horas.
- En tubos eppendorf, se colectaron muestras de: sangre sin infectar, sangre infectada al inicio de la alimentación y sangre infectada al final de esta. Se guardaron 1000 $\mu$ L de cada muestra. Estas muestras se utilizaron en la prueba de titulación para determinar la concentración de virus empleada.
- Una vez alimentadas, las hembras se colocaron en la cámara de bioseguridad (figura 24). Las hembras que no se alimentaron fueron sacrificadas.

### **Individualización**

- Las hembras de *Ae. aegypti* alimentadas, se individualizaron en recipientes pequeños, dentro de la cámara de bioseguridad. Cada recipiente llevaba en el fondo un trozo de algodón humedecido y sobre este, papel filtro para que las hembras pusieran huevos; además tenían un algodón con agua y otro con azúcar sobre la malla del recipiente. Diariamente se humedeció el papel filtro y los algodones. Cada recipiente se marcó con un número, el nombre de la población y la fecha de infección.
- Al segundo o tercer día, se recolectaron los huevos y se guardaron en bolsas zipper pequeñas marcadas con su correspondiente código. Las hembras se dejaron en los recipientes hasta el día 14 post-infección, cuando se realizó el análisis de las hembras por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

**Cuadro 1.** Evaluación de la CV en *Aedes aegypti* a infección con virus Den-2.

## **8.7 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) PARA EVALUAR LA COMPETENCIA VECTORIAL DE *Aedes aegypti* A INFECCIÓN CON VIRUS DENGUE-2.**

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se basa en la unión específica de un anticuerpo marcado con un fluorocromo a su antígeno homólogo. El fluorocromo de más amplia aplicación es el *isotiocianato de fluoresceína* (FITC). A partir de los años 50, la IFI ha sido ampliamente utilizada para la identificación de parásitos, bacterias y numerosos virus, así como para la detección de anticuerpos contra estos agentes.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta aplicada a ejemplares de mosquitos hembras de *Ae. aegypti*, infectadas artificialmente con virus Dengue-2, permitió evaluar la susceptibilidad de estas al virus y las posibles barreras anatómicas del mosquito asociadas al control de la infección.

Al día 14 post-infección, las hembras se sacrificaron por congelación, y se realizó la disección de cabeza de cada una de ellas.

**Figura 25.** Equipo para disección de cabezas e intestinos de *Ae. Aegypti*



CIDIEM 2006)

Se revisó cada recipiente en los que se encontraban las hembras infectadas dentro de la cámara de bioseguridad, asegurándose de que no hubieran mosquitos muertos, y si es el caso se eliminaron. Se sacaron los recipientes pequeños de la cámara de bioseguridad y se colocaron dentro de un recipiente grande para llevarlas al congelador donde se dejaron por 15 minutos; tiempo suficiente para sacrificarlas.

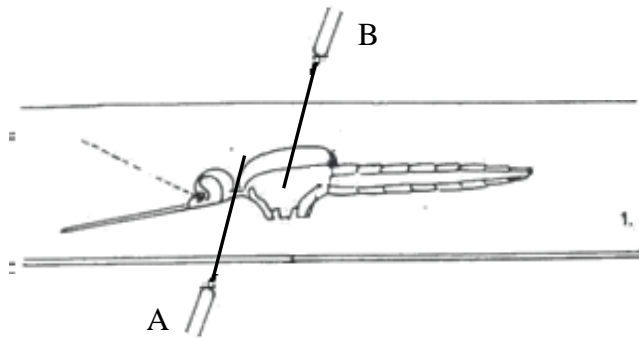
#### **a) Disección de cabeza de hembras de *Aedes aegypti* infectadas**

Sobre la plancha fría (ver figura 25) se colocó una toalla absorbente y sobre ella una lámina portaobjetos, donde se puso el mosquito al cual se le extrajo la cabeza. Simultáneamente, se colocó una toalla absorbente sobre un bloque de hielo, y sobre este se colocó la lámina portaobjeto donde se colocaron las cabezas disectadas, con el fin de evitar la degradación del virus, si había. Las

láminas se marcaron con un lápiz con punta de diamante con el nombre de la población, el número de experimento y el número de cada placa (ver figura 27). Al mismo tiempo se llevó un registro de cada placa en el formato establecido para la IFI (ver anexo 2). Por cada placa se colocarán 8 muestras y 2 controles, uno positivo para Dengue-2 (mosquito microinyectado) y otro negativo (mosquito de la cepa Rockefeller).

Una vez preparado el material de trabajo se observó el mosquito a través del estereoscopio. Con una aguja entomológica, se sostuvo el cuerpo del mosquito desde el tórax (figura 26, B) y con la otra se hizo un corte en la parte superior del tórax del mosquito (figura 26, A) para extraer la cabeza, asegurándose de tomar las glándulas salivares.

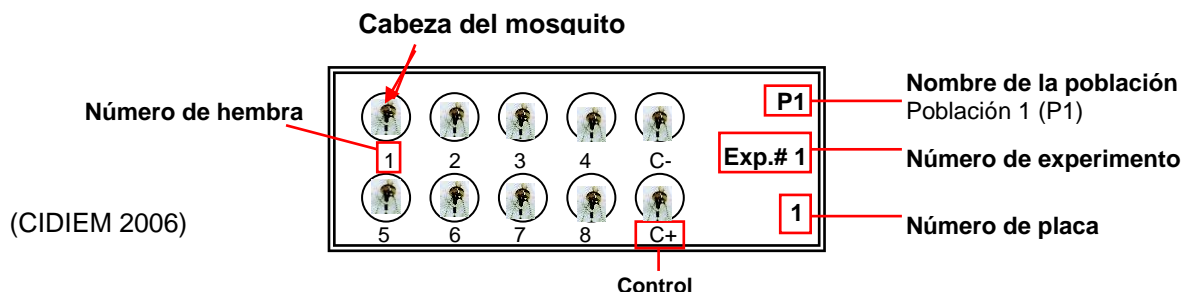
**Figura 26.** Disección de cabezas de hembras de *Aedes aegypti*



(Mendoza, NM *et al.*, 2000)

La cabeza se colocó sobre la lámina portaobjetos que se encontraba sobre el bloque de hielo (figura 27). Los abdómenes de las hembras disectadas se guardaron en tubos eppendorf marcados con el número de la hembra, el nombre de la población y la fecha de infección. Los tubos se colocaron dentro de una materia con hielo mientras se terminaba todo el proceso de disección para evitar la muerte del virus. Posteriormente, los tubos eppendorf se guardaron a  $-45^{\circ}\text{C}$  para posteriores análisis.

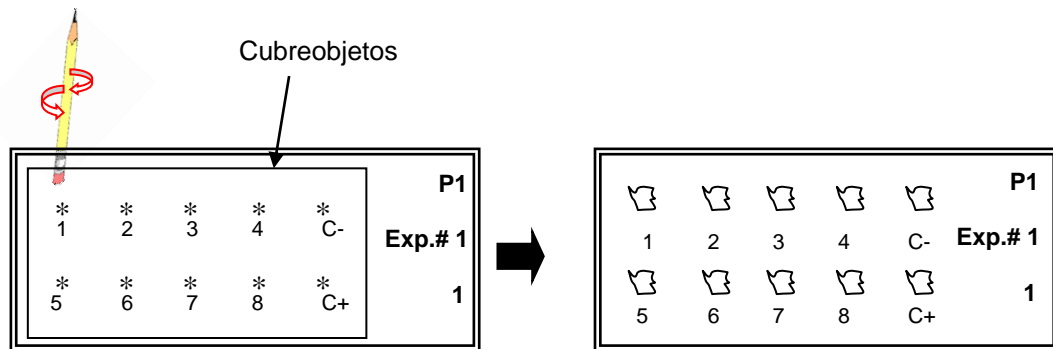
**Figura 27.** Marcaje de placas para IFI



(CIDIEM 2006)

Cuando la lámina estaba completa, se colocaba una lámina cubreobjetos sobre las cabezas y se aplastaban con el borrador de un lápiz (figura 28) para extender el tejido y permitir una buena lectura de la inmunofluorescencia. Se levantaba el cubreobjetos, se descartaba en el guardián y con pinzas, se removían cuidadosamente los restos de tejido.

**Figura 28.** Aplastamiento de cabezas de *Aedes aegypti* para IFI

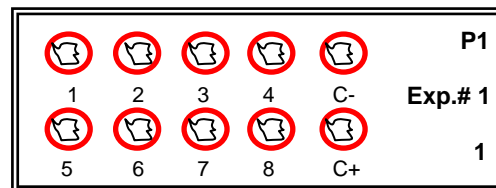


(CIDEM 2006)

La placa, se colocó en un recipiente para coloración (koplin) con solución de acetona: PBS (3:1) por treinta minutos a 4°C para fijar los tejidos. Luego de la fijación se sacaron las láminas y se dejaron secar a temperatura ambiente sobre una toalla absorbente.

Posteriormente se delimitó el área de la muestra con un círculo utilizando un marcador metálico que permitió crear bordes alrededor de la muestra para que no se derramara el anticuerpo cuando se realizará la inmunofluorescencia. Se dejó secar el marcador por 10 minutos (ver figura 29).

**Figura 29.** Delimitación de área de las muestras para IFI



(CIDEM 2006)

El anticuerpo policlonal que reconoce los cuatro serotipos de virus Dengue y que se utilizó en este experimento, fue suministrado por el CDC. Es un anticuerpo IgG murino unido a el fluorocromo FITC, el cual se preparó en un solo paso en una

dilución de 1:200 con PBS estéril. El anticuerpo se montó en una cámara húmeda, donde se colocaron las placas preparadas (figura 29).

Para construir la cámara húmeda se requirió de un recipiente plástico de 30 cm de diámetro y con 5 cm de profundidad, cubierto con papel aluminio en las paredes internas, un cuadro de vidrio de 30 cm<sup>2</sup> y una toalla absorbente.

La cámara húmeda se preparó colocando el vidrio sobre una mesa; sobre el vidrio se colocó la toalla absorbente húmeda. Las placas preparadas se colocaron sobre la toalla absorbente. En cada pozo delimitado de las placas, se adicionó el anticuerpo hasta cubrirlos totalmente (aproximadamente 40µL por pozo). Cuando se adicionó el anticuerpo en todas las placas, se taparon las muestras con el recipiente recubierto con papel aluminio evitando así la pérdida del fluorocromo FITC. Las placas se incubaron a 37°C por 30 minutos.

Pasado el tiempo de incubación, se colocaron las placas en un recipiente para coloración (KOPLIN) y se realizaron 3 lavados. Los dos primeros lavados se hicieron con PBS estéril y el último con agua destilada; cada uno se realizó por un minuto. Se sacudieron las placas sobre una toalla absorbente y se agregó en cada pozo una gota de glicerina tamponada al 90%, y luego se cubrió con una lámina cubreobjetos. Este proceso se debe realizar rápidamente debido a la sensibilidad del anticuerpo a la luz. Las placas se guardaron en un estuche porta láminas y se procedió a realizar la lectura en el microscopio de Inmunofluorescencia. Si la lectura de las placas no se realizaba en el momento; las placas se guardaban a 4°C hasta el día siguiente como máximo.

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

#### ***b) Extracción de intestinos de hembras de *Aedes aegypti* con IFI negativo de cabeza.***

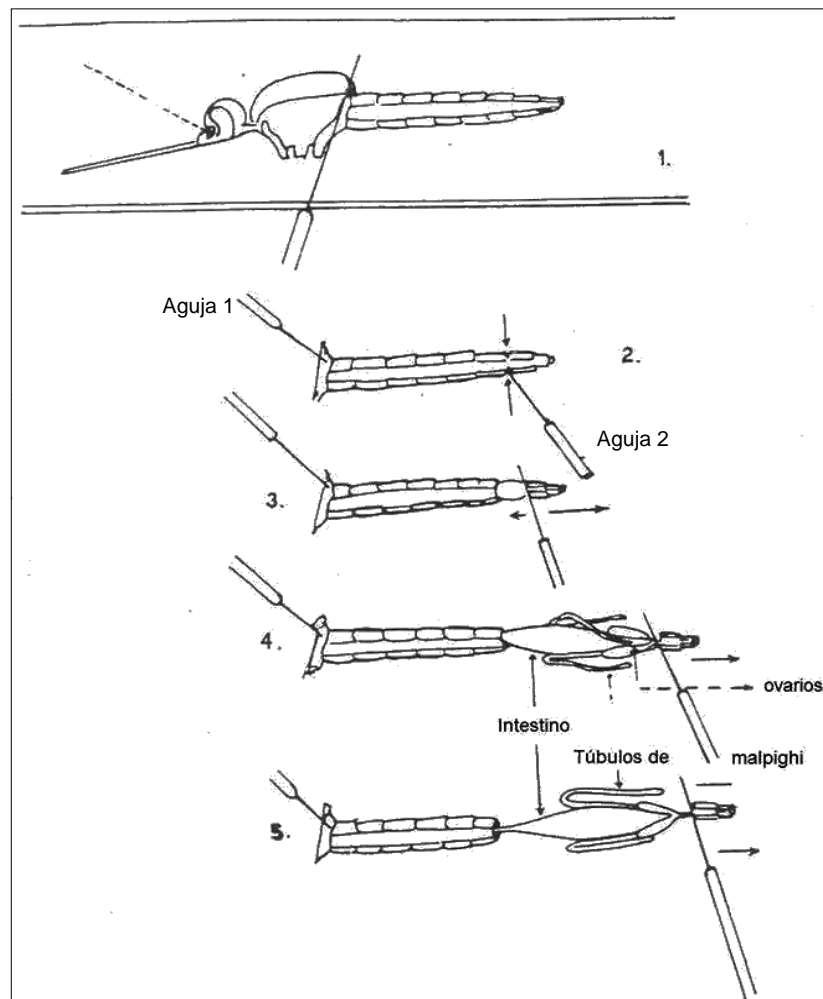
Para realizar la extracción de los intestinos se empleó el mismo equipo de disección utilizado en la disección de cabezas (figura 25).

Para extraer el intestino de los mosquitos, se tomaron los abdómenes de los mosquitos guardados a – 45° C, y se pusieron en una materia con hielo para evitar la muerte del virus, si había. Con una pinza entomológica se sacó el cuerpo del mosquito y se colocó sobre una lámina portaobjetos, ubicada sobre la plancha fría (ver figura 25).

Observando a través del estereoscopio, se procedió a realizar la extracción de los intestinos. Con la aguja número 1 (figura 30) se presionó suavemente entre el tórax y la parte superior del abdomen y con la aguja número 2 se desprendieron los últimos segmentos abdominales. Se haló suavemente el intestino y se empujó el contenido pasando la aguja número 2 por el abdomen desde arriba hacia abajo.

Una vez se tuvo el intestino afuera; se retiraron los túbulos de Malpighi y el intestino se colocó en una gota de PBS sobre la placa donde se iba a realizar la IFI, ubicada en una toalla absorbente sobre un bloque de hielo. Cuando se tuvieron todos los intestinos a evaluar en la placa, se realizó el mismo procedimiento que se utilizó con las cabezas de los mosquitos para llevar a cabo su análisis mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

**Figura 30.** Extracción de intestinos de *Ae. aegypti*

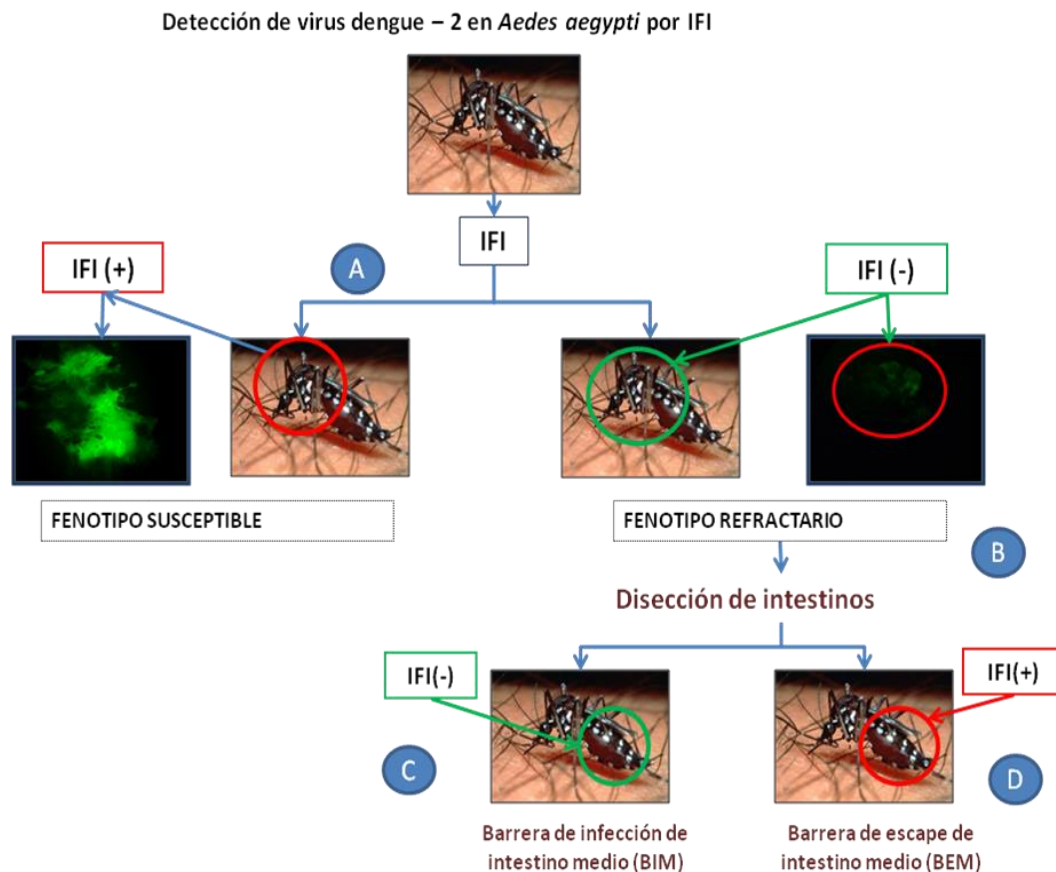


(Mendoza, NM *et al.*, 2000)

✓ **Determinación de fenotipos susceptibles y/o refractarios:** Con las placas procesadas anteriormente, se procedió a determinar el fenotipo de las hembras infectadas mediante los análisis de IFI. Si los resultados de **IFI de cabeza** eran positivos, esta lectura indicaba la presencia de infección por el virus dengue-2, por lo que la hembra y su descendencia se clasificaban como **fenotipo susceptible** o (+/+) (figura 31, A). Si el resultado de IFI de cabeza era negativo, se procedía a realizar la disección de intestino con el fin de evaluar la presencia de las barreras a la infección (figura 31, B).

Los resultados de la IFI de intestinos permitieron determinar los dos fenotipos restantes. Si la IFI de intestino era positiva indicaba la presencia de una Barrera de Escape de Intestino Medio (BEM), entonces las hembras y su descendencia se clasificaron como **fenotipo refractario con BEM ó fenotipo (-/+)** (figura 31, C), pero si la IFI era negativa estos resultados indicaban la presencia de una barrera de Infección de Intestino Medio (BIM), por tanto estas hembras se clasificaron como **fenotipo refractario o (-/-)** (figura 31, D).

**Figura 31.** Evaluación de las barreras a la infección por virus dengue-2 en *Aedes aegypti*.

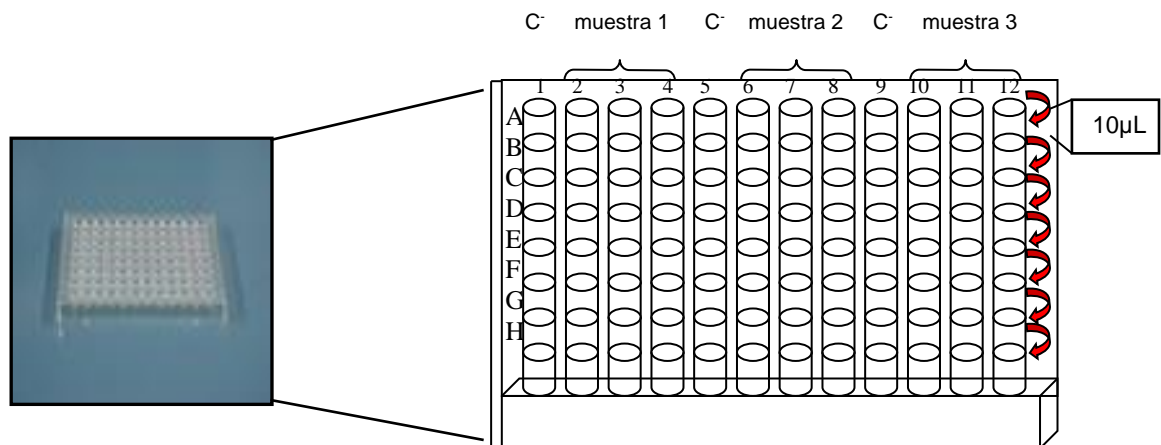


CIDEIM (2007)

## 8.8 TITULACIÓN DE VIRUS DENGUE-2

La titulación del virus Dengue-2, se realizó con el fin de conocer la concentración del virus Dengue-2 en el cultivo celular C6/36 y en la sangre utilizada para la infección de los mosquitos. Para esto, se titularon, el sobrenadante del virus, la sangre infectada tomada al inicio de la infección y la sangre infectada tomada al final de la alimentación. La sangre no infectada se tituló para evaluar que la sangre utilizada en las alimentaciones estuviera completamente estéril. En los resultados de este experimento se esperaba obtener titulaciones similares en las muestras utilizadas por cada infección.

**Figura 32.** Titulación de virus Dengue-2



Se montaron tres replicas por muestra y un control entre cada una de estas, como se muestra en la figura 32. Se adicionaron 90 µL de medio L-15 al 10% en cada pozo de la placa excepto la primera fila, en la cual se colocaron 100 µL de la muestra de sangre o sobrenadante.

La titulación se realizó removiendo con una micropipeta 10 µL de la fila A a la fila B (figura 32) y consecutivamente haciendo diluciones seriadas de 10. Es importante resaltar que las puntas de la micropipeta se cambiaron entre cada dilución que se realizó.

Una vez terminadas las diluciones, se adicionaron 100 µL de células C6/36 HT con medio L-15 con suero fetal bovino (SFB) al 2% a todos los pozos. Las células se obtuvieron de dos flasks de 50 mL previamente desprendidas y suspendidas en 15 mL de medio L-15 SFB al 2%.



Una vez terminado el procedimiento, las placas se forraron con plástico de envoltura y se incubaron por 7 días a  $32^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

Al séptimo día, se descartó el sobrenadante de los pozos y se fijaron las muestras con 150  $\mu\text{L}$  de solución de acetona: PBS (3:1) por 30 minutos; se descartó la solución y se dejó secar la placa a temperatura ambiente. Finalmente se envolvió la placa en papel aluminio y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Posteriormente a cada pozo, se le realizó el mismo protocolo de Inmunofluorescencia Indirecta, descrito para la evaluación de la competencia vectorial (ver 9.7). Los datos obtenidos se registraron en el formato establecido para este experimento (ver anexo 3)

Todo este procedimiento se realizó en la cámara de bioseguridad nivel III, empleando tapabocas, guantes y la bata respectiva para trabajar en esta área.

## **8.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Se realizaron análisis estadísticos de los parámetros determinados con las tablas de vida. La base de datos creada para los datos registrados fueron exportados al programa SPSS versión 10 para realizar los análisis respectivos.

Teniendo en cuenta que los valores de mortalidad de larvas y pupas de las cepas seleccionadas y la cepa Rockefeller (4 cepas) son conteos, las comparaciones entre las cepas evaluadas se analizaran por medio de un modelo de regresión de Poisson o Binomial negativa, según el caso. Inicialmente se utilizó un modelo de regresión de Poisson, pero el ajuste no fue bueno, por tanto se utilizó un modelo de regresión binomial negativa para todas las comparaciones de conteos.

Para comparar el porcentaje de eclosión entre las 4 cepas y entre filiales se utilizó la prueba chi-cuadrado para la comparación de k proporciones para muestras independientes.

Para el análisis del promedio huevos entre cepas y entre filiales y para comparar el tiempo de vida de cada cepa, se empleó la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de los datos y no se consiguió. De este modo, se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.

## 9 RESULTADOS

### 9.1 RESULTADOS PRELIMINARES.

#### 9.1.1 Resultados preliminares en CIDEIM

Estudios previos realizados en CIDEIM se llevaron a cabo con el fin de seleccionar isofamilias de *Ae. aegypti* (con diferentes niveles de competencia vectorial (CV)) para obtener cepas con alta y baja CV e identificar el tipo de barrera presente en mosquitos refractarios. En estos estudios, se analizaron 5 localidades en la ciudad de Cali (Santa Rosa, Meléndez, Puerto Mallarino, Salomia y Comuneros), y la cepa Rockefeller como control. Los análisis de CV se realizaron inicialmente usando disecciones de cabeza (diseminación de la infección) e intestino (barrera de intestino medio-BIM). La variación en la CV de cada localidad permitió identificar diferencias significativas entre las poblaciones, determinada por el análisis chi-cuadrado ( $p < 0,05$ ). Se seleccionaron las poblaciones con mayor y menor CV para realizar el proceso de selección por isolíneas. Las poblaciones seleccionadas fueron Santa Rosa (CV: 96%) y Meléndez (CV: 55,6%).

La metodología planteada para estos experimentos estaba basada en la obtención de huevos de madres (isohembras) pertenecientes a las poblaciones seleccionadas (Santa Rosa y Meléndez) para determinar el porcentaje de CV de 1/3 parte de sus hijos. Se obtuvieron huevos de 41 hembras de la población susceptible y 28 de la población refractaria. De estas familias, se evaluaron las familias con un mayor número de huevos; un total de 12 y 11 familias para las poblaciones susceptible y refractaria.

Los resultados de la CV en estas familias, mostraron una alta variación en las familias provenientes de la cepa susceptible y una alta susceptibilidad en las familias provenientes de la cepa menos susceptible (Datos no mostrados)., El proceso de selección lo continuaron a partir de las familias más y menos susceptibles durante dos generaciones consecutivas. Aunque obtuvieron adultos de las familias susceptibles y refractarias, encontraron altas tasas de mortalidad en adultos para ambas poblaciones. Finalmente lograron evaluar la CV en las filiales 1 y 2 de las familias susceptibles pero no de las refractarias, debido a la alta mortalidad encontrada.

Las dificultades encontradas en este proceso de selección de cepas susceptibles y refractarias por isolíneas, como las altas tasas de mortalidad, las pocas familias analizadas, la alta consanguinidad, la aparición de posibles genes deletéreos y la larga duración de los experimentos, conllevaron a diseñar nuevas aproximaciones

con el fin de lograr este objetivo. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se planteó iniciar el proceso con un mayor número de familias para analizar. Se seleccionó la descendencia de madres con fenotipo conocido (madres infectadas); que posteriormente fueron eclosionadas en un mismo recipiente para conformar una sola cepa y de esta forma aumentar la heterocigocidad en las cepas.

## **9.2 PRIMERA PARTE: Pruebas preliminares del presente trabajo.**

### **9.2.1 Selección por isofamilias de cepas susceptibles y refractarias de *Aedes aegypti* a infección con virus Dengue-2, en generaciones consecutivas**

Teniendo en cuenta los estudios anteriores de selección de cepas de *Ae. aegypti* realizados en CIDEIM, y las dificultades encontradas en la metodología empleada, se realizaron las pruebas preliminares del presente trabajo y se modificó la anterior estrategia experimental.

En la nueva metodología se empleó un mayor número de mosquitos de campo, obtenidos a partir de diferentes localidades de la ciudad de Cali con los que se estableció una sola población. A partir de esta población se llevó a cabo el proceso de selección de cepas susceptibles y refractarias de *Ae. aegypti* a infección con virus dengue-2.

Con el fin de refrescar la colonia obtenida en la primera salida de campo y aumentar el número de híbridos de las cepas seleccionadas, se realizó una segunda salida de campo para contrarrestar la alta mortalidad en estadios inmaduros de *Ae. aegypti* encontrados anteriormente.

#### **9.2.1.1 Primer experimento**

##### *✓ Obtención de ejemplares silvestres de *Ae. aegypti*:*

Se realizó una salida de campo a diferentes localidades de la ciudad de Cali, con el fin de coleccionar estadios inmaduros (larvas y pupas) de *Ae. aegypti* (ver numeral 8.1). Los barrios en los cuales se hizo la recolección fueron: Puerto Mallarino, Olaya Herrera y Siloe. En el insectario de CIDEIM se establecieron las poblaciones de mosquitos a partir de los estadios inmaduros colectados en cada barrio visitado. La colonia de mosquitos fue mantenida bajo condiciones de laboratorio como se describió previamente en la metodología. Una vez obtenida la

primera filial (F<sub>1</sub>) de las 3 poblaciones de campo se inició la selección de los fenotipos susceptibles y refractarios de *Ae. aegypti* a la infección por virus dengue-2.

✓ *Evaluación de la competencia vectorial de Aedes aegypti a Infección con virus dengue-2.*

Las infecciones artificiales se realizaron con la mezcla de sangre y virus dengue-2 en las 3 poblaciones de mosquitos. Las hembras alimentadas fueron individualizadas en frascos para obtener su ovipostura. Cumplido el período de incubación intrínseco del virus (14 días), se realizó la inmunofluorescencia indirecta (IFI) de las cabezas e intestinos de las hembras infectadas. Se evaluó el porcentaje de CV de las 3 poblaciones y se inicio el proceso de selección de fenotipos susceptibles (IFI<sup>(+)</sup>cabeza/IFI<sup>(+)</sup>intestino) y refractarios BIM (IFI<sup>(-)</sup>cabeza/IFI<sup>(-)</sup>intestino) a infección por virus dengue-2.

Para continuar con el proceso de selección, se mezclaron los huevos de las hembras de las 3 poblaciones que expresaron el mismo fenotipo, con el fin de aumentar el número de ejemplares y de híbridos por cada cepa seleccionada. De esta manera se estableció una cepa mixta con fenotipo susceptible y una cepa mixta con fenotipo refractario que fueron seleccionadas por dos generaciones (tabla 2).

Las infecciones artificiales se lograron realizar solo en dos generaciones consecutivas, debido a que en la tercera generación se presentó una alta mortalidad de larvas en segundo estadio (~80%) para ambas poblaciones (dato no registrado). En la cepa refractaria las larvas permanecieron por 15 días en segundo estadio y murieron, mientras que en la cepa susceptible se lograron obtener algunos adultos a los cuales se les evaluó el porcentaje de CV (tabla 2). Se hicieron dos replicas de este experimento encontrando resultados de mortalidad similares.

Este inconveniente impidió seguir con el proceso de selección de ambas cepas, por lo que se realizó otra salida de campo para reiniciar el proceso de selección de la cepa refractaria y refrescar la cepa susceptible generada en la primera selección.

**Tabla 2** Porcentaje de fenotipos susceptibles y refractarios de *Aedes aegypti* a infección con virus dengue-2 de las localidades iniciales y la cepa susceptible.

FILIAL	CEPA	% DE INDIVIDUOS CON FENOTIPO:	
		Susceptible	Refractario
F1	Siloe (n=35)	88,6	11,42
	1ª con 52 (n=26)	76,9	23,1
	Puerto Mallarino (n=41)	87,8	12,4
F2	Población Mixta Susceptible (n=28)	60,71	39,28

### 9.2.1.2 Segundo Experimento

Con los resultados obtenidos en el primer experimento, se decidió realizar una segunda salida de campo. En este experimento se realizaron tablas de vida para evaluar las tasas de mortalidad y determinar las causas de los inconvenientes presentados en el proceso de selección.

Los estadios inmaduros de *Ae. aegypti* de las diferentes localidades de Cali obtenidos en la segunda salida de campo, se mezclaron y se estableció una segunda población, para reiniciar con la selección de cepas susceptibles y refractarias. Aunque se logró obtener ejemplares de *Ae. aegypti* hasta la segunda filial (F<sub>2</sub>) en ambas cepas, se observó una alta mortalidad en larvas en segundo y tercer estadio que no permitió continuar la selección (tabla 3 y 4). Los resultados de CV de este experimento no se evaluaron.

**Tabla 3.** Registro de mortalidad y sobrevivencia de estadios inmaduros de *Ae. aegypti*, cepa susceptible (filial 2) a infección con virus dengue-2.

**Tabla 4.**

Día evaluado	Nº DE LARVAS		Nº DE PUPAS		Nº DE ADULTOS			
	Vivas	Muertas	Muertas	Vivas	Obtenidos		Muertos	
					♀	♂	♀	♂
1	267	0	-----	-----	--	--	--	--
2	267	0	-----	-----	--	--	--	--
3	220	32(II estadio)	-----	-----	--	--	--	--
4	119	101(II estadio)	-----	-----	--	--	--	--
5	69	50(II estadio)	-----	1	--	--	--	--
6	28	41(III estadio)	1	-----	--	--	--	--
7	25	3(III estadio)	2	5	--	1	3	--
8	10	15(III estadio)	1	--	--	5	--	1

Registro de mortalidad y sobrevivencia de estadios inmaduros de *Ae. aegypti*, cepa refractaria (Filial 2) a infección con virus dengue-2.

Día evaluado	Nº DE LARVAS		Nº DE PUPAS		Nº DE ADULTOS			
	Vivas	Muertas	Muertas	Vivas	Obtenidos		Muertos	
					♀	♂	♀	♂
1	200	0	0	0	--	--	--	--
2	200	0	0	0	--	--	--	--
3	178	22(II estadio)	0	0	--	2	--	--
4	140	38(II estadio)	0	0	--	--	--	--
5	98	42(II estadio)	0	2	--	--	--	--
6	49	49(III estadio)	1	2	1	1	--	--
7	36	13(III estadio)	1	0	--	--	--	--
8	8	28(III estadio)	2	0	--	--	--	--

Durante el proceso de selección de las poblaciones obtenidas en los dos experimentos anteriores, tanto en la cepa susceptible como en la refractaria, se observó que un grupo representativo de mosquitos presentaron una barrera de escape de intestino Medio (BEM), indicando que este fenotipo también podría seleccionarse. A partir de este hallazgo se comenzó a establecer una nueva cepa denominada cepa refractaria BEM (IFI<sup>(-)</sup> cabeza/ IFI<sup>(+)</sup> intestino (-/+)).

En los mosquitos de fenotipo refractario BEM, se llevo a cabo el mismo seguimiento, con el fin de evaluar los cambios de CV que se presentaran en el proceso de selección.

Con los resultados de los experimentos realizados, solo fue posible seleccionar la cepa susceptible y refractaria BEM de la población mixta de *Ae. aegypti* hasta la F2. Por lo tanto, se procedió a obtener nuevos ejemplares de campo y realizar el proceso de selección empleando una nueva modificación al diseño experimental, para disminuir las tasas de mortalidad. Basados en consultas con otros investigadores, se diseñó una nueva aproximación, donde se realizaron infecciones experimentales con el virus dengue-2 en **generaciones alternas**, es decir dejando descansar por una generación las cepas seleccionadas.

Adicionalmente, se realizaron tablas de vida por cada generación para registrar parámetros como mortalidad y sobrevivencia de los estadios inmaduros de *Ae. aegypti* en cada cepa establecida.

Basados en estas pruebas preliminares, se presentan los resultados de la presente propuesta.

### 9.3 SEGUNDA PARTE: Selección de mosquitos *Aedes aegypti* durante 3 generaciones alternas

Para desarrollar esta nueva estrategia se retomaron las condiciones de trabajo de las pruebas preliminares llevadas a cabo durante el desarrollo de este trabajo y se estandarizaron las nuevas condiciones para lograr los objetivos propuestos, estas condiciones fueron:

1. Seleccionar mosquitos *Aedes aegypti* ante la infección con virus dengue-2, durante 3 generaciones alternas y no en generaciones consecutivas como se realizó en las pruebas preliminares.
2. Elaborar tablas de vida para las cepas seleccionadas, con el fin de evaluar el efecto del proceso de selección y del virus sobre los mosquitos.

#### ✓ **Obtención de ejemplares de *Ae. aegypti* en campo.**

Se realizó una tercera salida de campo para obtener estadios inmaduros de *Ae. aegypti*. Los ejemplares de cada localidad se pusieron en una sola bandeja plástica para mezclarlos y formar una población mixta representativa de Cali. Una vez obtenidos los huevos de la filial 1 (F<sub>1</sub>), se inició el proceso de selección en generaciones alternas de fenotipos susceptibles y refractarios (BEM y BIM) de *Ae. aegypti* a la infección con virus dengue-2.

#### ✓ **Evaluación de la competencia vectorial (CV) de *Aedes aegypti* a la infección con virus dengue-2.**

**Competencia vectorial en la Filial 1.** Se eclosionaron los huevos F<sub>1</sub> de *Ae. aegypti* de la población mixta, y se obtuvieron 192 adultos entre machos y hembras (Anexo 8. Tabla B). Al tercer día post-emergencia, se infectaron las hembras. Se lograron alimentar 49 hembras de *Ae. aegypti* (tabla 5), las cuales se individualizaron para la obtención de huevos F<sub>2</sub> por cada hembra (figura 33).

**Tabla 5.** Número de hembras infectadas con virus dengue-2. Filial 1, población mixta.

<b>Nº de hembras</b> <b>Población</b>	<b>Obtenidas en la eclosión</b>	<b>Infectadas con virus D-2</b>	<b>Muertas durante los 14 días post-infección</b>	<b>Vivas obtenidas y que pusieron huevos</b>
Población mixta F1	96	49	2	38

**Figura 33.** Huevos obtenidos por cada hembra individualizada.



CIDEIM (2006)

Una vez transcurrido el periodo de incubación intrínseco del virus se sacrificaron las hembras que habían puesto huevos (n=38), y se les evaluó su fenotipo y la presencia de barreras anatómicas a la infección (tabla 6). Los fenotipos susceptibles y refractarios se determinaron como se planteó en la metodología (ver numeral 8.7)

**Tabla 6.** Porcentajes de competencia vectorial de *Aedes aegypti* a infección con virus dengue-2. Filial 1, población mixta.

FILIAL	CEPA	% DE INDIVIDUOS CON FENOTIPO:		
		Susceptible	Refractario BEM	Refractario BIM
F1	Población inicial (n=38)	65	26,3	8

**Competencia vectorial de las filiales seleccionadas.** Una vez obtenido el análisis de IFI de la población inicial (F<sub>1</sub>), se procedió a establecer las cepas susceptibles y refractarias. Los huevos F<sub>2</sub> de las hembras que presentaron fenotipos iguales se mezclaron para establecer las cepas de cada fenotipo establecido.

Para continuar con el proceso de selección de mosquitos *Ae. aegypti* durante 3 generaciones alternas, se eclosionó la F<sub>2</sub> de cada cepa establecida por separado, pero esta vez sin presión de selección, es decir, sin realizar la infección experimental con virus dengue-2. De esta eclosión se lograron obtener huevos F<sub>3</sub> de las 3 cepas, que fueron nuevamente seleccionadas con el virus. En cada proceso de selección se evaluó la CV por cada cepa (Tabla 7, 8 y 9). Los fenotipos iguales obtenidos en cada evaluación de las cepas fueron mezclados para aumentar la variabilidad. Este nuevo proceso de selección permitió continuar con el proceso de selección, que en este trabajo llegó hasta la F<sub>7</sub>.



**Tabla 7.** Porcentajes de competencia vectorial de *Aedes aegypti* a infección con virus dengue-2, durante 3 generaciones alternas. Cepa susceptible.

FILIAL	CEPA	% DE INDIVIDUOS CON FENOTIPO:		
		Susceptible	Refractario con BEM	Refractario
F3	Susceptible (n=23)	<u>82,6</u>	8,7	8,7
F4	Susceptible (n=36)	<u>80,5</u>	19,4	0
F6	Susceptible (n=12)	<u>91,6</u>	8,4	0

**Tabla 8.** Porcentajes de competencia vectorial de *Aedes aegypti* a infección con virus dengue-2, durante 2 generaciones alternas. Cepa refractaria BIM.

FILIAL	CEPA	% DE INDIVIDUOS CON FENOTIPO:		
		Susceptible	Refractario con BEM	Refractario
F4	BIM (n=20)	75	<u>25</u>	0
F6	BIM (n=88)	67	<u>36,4</u>	10,3

**Tabla 9.** Porcentajes de competencia vectorial de *Aedes aegypti* a infección con virus dengue-2, durante 3 generaciones alternas. Cepa refractaria BEM.

FILIAL	CEPA	% DE INDIVIDUOS CON FENOTIPO:		
		Susceptible	Refractario con BEM	Refractario
F3	Refractaria (n=5)	40	40	<u>20</u>
F4	Refractaria (n=17)	41	12	<u>47</u>
F6	Refractaria (n=48)	54,48	10,1	<u>35,4</u>

Las infecciones con virus dengue-2 se realizaron de manera alterna en las 3 generaciones con el fin de recuperar el fitness (eficacia biológica, éxito reproductivo, valor adaptativo) de las cepas. Con esto se estableció una cepa susceptible de *Ae. aegypti* con un alto porcentaje de CV (**91,6%**), una cepa refractaria BEM con un porcentaje de CV del **36,4%** y una cepa refractaria BIM (-/-) con un porcentaje de CV de **35,4%**

Para determinar si las concentraciones del virus en las infecciones fueron similares, se tituló cada una de las muestras de sangre tomadas al inicio y al final de la infección (ver numeral 8.8). La titulación del virus dengue-2 empleado en las

infecciones experimentales tuvo un rango de  $10^8$  a  $10^{8,5}$  dosis infectiva por 50% del cultivo de tejido por ml (50% tissue culture infective doses/mL- TCID<sub>50</sub>/mL) al inicio de la infección y de  $10^{7,2}$  a  $10^{7,4}$  TCID<sub>50</sub>/mL al final de la misma. De la misma forma se evaluó la sangre sin virus para corroborar la ausencia de cualquier virus que tuviera una reacción cruzada con dengue-2 en la IFI y que la sangre fuera completamente estéril. En ningún momento se observó que la sangre utilizada estuviera infectada.

Los ejemplares de *Ae. aegypti* seleccionados presentaron un incremento en el porcentaje de competencia vectorial del 65,8% (población inicial) al 91,6% (F<sub>6</sub>), a través del proceso de selección en el caso de la cepa susceptible. La cepa refractaria BIM, presentó un incremento en el porcentaje de individuos con fenotipo refractario del 8% al 35,4%, de igual manera el porcentaje de los ejemplares de la cepa refractaria BEM aumentó de un 26,3% a un 36,4%.

Durante el proceso de selección, en las cepas refractaria BIM y refractaria BEM, se observó que la producción de un alto porcentaje de individuos susceptibles. Esto sugiere que este fenotipo es dominante ante los otros y es más abundante en la población. En contraste, La cepa susceptible no presentó un cambio significativo en los otros fenotipos, y se logró eliminar los individuos refractarios (tabla 7).

### **9.3.1 Evaluación del efecto de la infección por virus dengue-2 en el desarrollo biológico de los mosquitos de *Aedes aegypti* susceptibles y refractarios.**

Para evaluar el efecto de la infección por virus dengue-2 en las cepas de *Ae. aegypti* seleccionadas, se registró por cada cepa, en cada generación el número de huevos eclosionados, y la mortalidad de larvas, pupas y adultos. De estos datos se realizaron las tablas de vida horizontales en cada filial obtenida, tanto en las filiales de reposo como las filiales que fueron infectadas artificialmente. Adicionalmente, se registraron los mismos datos para la cepa control, cepa Rockefeller de *Ae. aegypti*, y para la primera filial de la población obtenida en campo con la cual se inició la selección de las cepas susceptibles y refractarias.

Con las tablas de vida se determinaron parámetros como: número de huevos puestos a eclosionar, número de larvas en cada estadio, sobrevivencia (lx) de larvas, pupas y adultos, número de individuos muertos en cada estadio de desarrollo (dx), porcentaje de mortalidad (m), probabilidad de morir entre un estadio y el otro (qx) y la duración de cada estadio larval (t).

Todas las eclosiones tanto de las cepas seleccionadas como la cepa control se realizaron en igualdad de condiciones de alimentación, densidad de larvas por

volumen y condiciones ambientales de mantenimiento en el laboratorio, con el fin de evitar variaciones entre cada experimento (ver numeral 8.1).

### 9.3.1.1 TABLAS DE VIDA HORIZONTALES DE *Aedes aegypti*

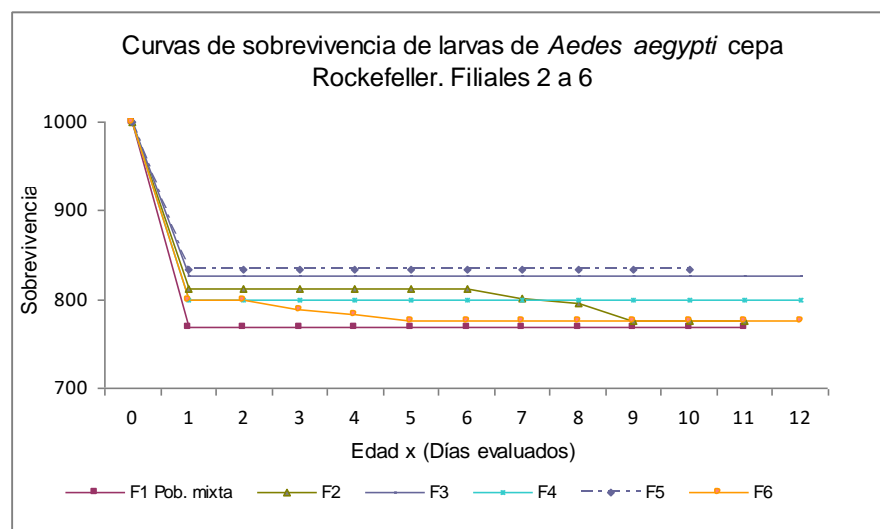
#### 9.3.1.1.1 Cepa Rockefeller y filial 1 de la población mixta de *Aedes aegypti*.

Durante el proceso de selección de las cepas, se tuvo como control la cepa de *Ae. aegypti* Rockefeller, tanto para la CV como para la obtención de tablas de vida. En total se hizo un seguimiento de esta cepa durante 6 generaciones. Bajo las condiciones del laboratorio, el ciclo de vida de esta cepa fue de 12 a 14 días en promedio.

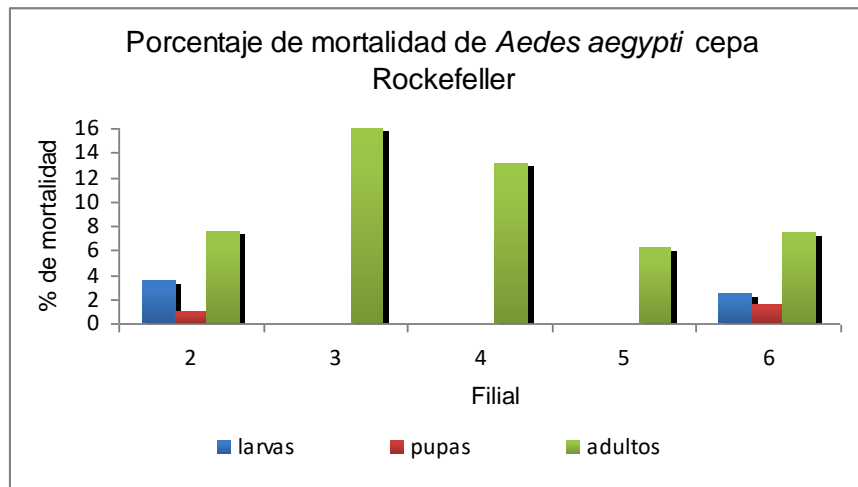
En resumen, los huevos eclosionaron entre el primer y segundo día después de sumergirlos en el agua; Las larvas que emergieron, duraron 2 días aproximadamente en cada uno de los 4 instar larvales; y las pupas completaron su desarrollo hasta la emergencia del adulto en 1 a 3 días (Anexo 8. Tablas C a G). En general el desarrollo de esta cepa de mosquitos de *Ae. aegypti* se llevó a cabo de acuerdo al tiempo reportado para esta especie (GADELHA D 1985).

Los resultados obtenidos con la cepa Rockefeller fueron comparados con los de la cepa mixta F1 de Cali. Se obtuvieron gráficas de sobrevivencia en larvas (figura 34) y porcentaje de mortalidad en todos los estadios hasta su emergencia (figura 35).

**Figura 34.** Curvas de sobrevivencia de larvas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller filiales 2 a 6 y filial 1 de la población mixta.



**Figura 35.** Porcentaje de mortalidad de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller durante las 6 generaciones evaluadas.



En las tablas de vida de la cepa Rockefeller y la F<sub>1</sub> de la población mixta (Anexo 8. Tablas A a G), se observa en todas las filiales una probabilidad de sobrevivencia (lx) de 700/1000 a 800/1000 en los 4 estadios larvales (figura 34). En general se observa que la mortalidad total de los diferentes estadios de los mosquitos no sobrepasa el 15% del total de huevos eclosionados en cada filial (Anexo 8. Tablas A a G) (figura 35)

La caída de sobrevivencia que se observa entre el tiempo 0 y 1 día después, corresponde al número de larvas que eclosionan. Este comportamiento es el esperado para las cepas de *Ae. aegypti* (GADELHA D 1985). Es posible que los huevos no eclosionaron porque son inactivos o residuales (GADELHA D 1985). Una vez las larvas eclosionaron se presentó una mortalidad menor al 1% en todos los estadios larvales.

En las filiales de la cepa Rockefeller, la mayor mortalidad se observó en adultos (15%). En larvas se observó una mortalidad del 0-3% y en pupas de 0-2 % (figura 35). La mortalidad en los adultos se observó en el momento de su emergencia y no en los días posteriores a esta. El modelo de regresión binomial negativa (tabla 10), mostró que no existe una diferencia significativa ( $p=0,705$ ;  $p>0,05$ ) entre los porcentajes de mortalidad en larvas, pupas y adultos entre las filiales de la cepa control Rockefeller, lo que nos indica que la cepa presentó un comportamiento similar en todos los experimentos realizados.

**Tabla 10.** Modelo de regresión binomial negativo para mortalidad de larvas, pupas y adultos de *Ae. aegypti* cepa Rockefeller.

Estadio	Valor z	Valor p
Larva	*	*
Pupa	0,38	0,705

\* Para las larvas los datos fueron 0

**9.3.1.1.2 Tablas de vida de *Aedes aegypti* cepas: susceptible, refractaria BEM y refractaria BIM a la infección por virus dengue-2:** al igual que la cepa control, para las cepas de *Ae. aegypti* que fueron seleccionadas a la infección por virus dengue-2, se les realizaron tablas de vida horizontales para las fases inmaduras de los mosquitos, y a partir de estas se construyeron las curvas de sobrevivencia (Ix), y mortalidad específica por edades por cada filial de cada cepa.

Mediante estos parámetros se observó el efecto de la presión selectiva por virus dengue-2 en el desarrollo de los instar larvales, pupa y adulto de los mosquitos en cada una de las 7 filiales eclosionadas, tanto las de reposo como las que se infectaron.

#### ✓ Duración del ciclo de vida

A partir del registro diario de los datos de sobrevivencia (Ix) y mortalidad (m) en larvas, pupas y adultos en las tablas de vida, se elaboraron las curvas de sobrevivencia. Estas curvas permitieron observar la duración de los instar larvales en las 7 filiales de las 3 cepas seleccionadas y comparar estos datos con los de la cepa Rockefeller y la filial 1 de la cual se inició el proceso de selección (figuras 36 a 38).

Con base en las tablas de vida y curvas de sobrevivencia, se observaron cambios en el tiempo que demoran los diferentes estadios de las cepas seleccionadas. En general se observó que el desarrollo de los mosquitos de las cepas seleccionadas, presentaron de 1 a 2 días de retraso en la duración de cada uno de los 4 instar larvales (2 a 4 días por instar larval), en comparación con la cepa Rockefeller y la filial 1 (1 a 2 días por instar larval) (Anexos 8, 9, 10, 11). De la misma forma, las pupas tardaron un 3 o 4 días en llegar a adulto (Anexos 9, 10, 11). A su vez, se observó que los adultos no podían tomar sangre a los 3 días post-emergencia como la cepa control y requerían de 7 a 8 días para madurar sus partes bucales y poder alimentarse (anexos 9, 10, 11 columna t).

Las tablas de vida permitieron evidenciar una diferencia significativa en el tiempo de vida de las larvas de cada cepa evaluada en comparación con la cepa Rockefeller (tabla 11). En promedio las cepas seleccionadas presentaron una

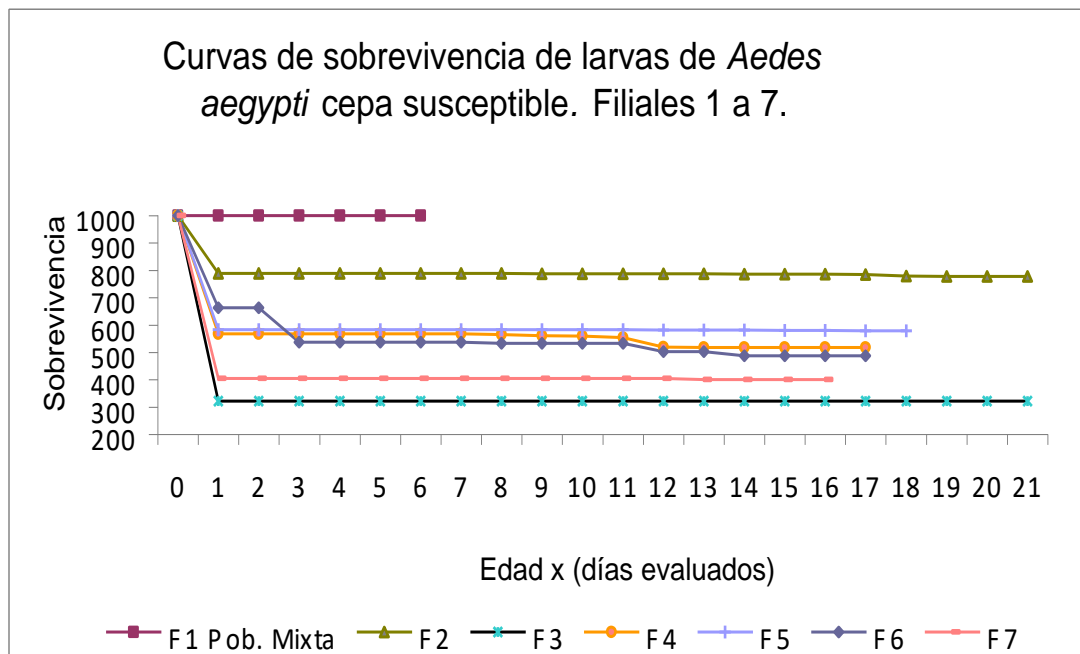
duración de 23 días en el estadio de larva en las 7 filiales, comparado con 12 días en la cepa Rockefeller (figuras 36 a 38).

**Tabla 11.** Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, para comparar el tiempo de vida entre las cepas susceptible, refractaria con BEM, refractaria BIM y Rockefeller.

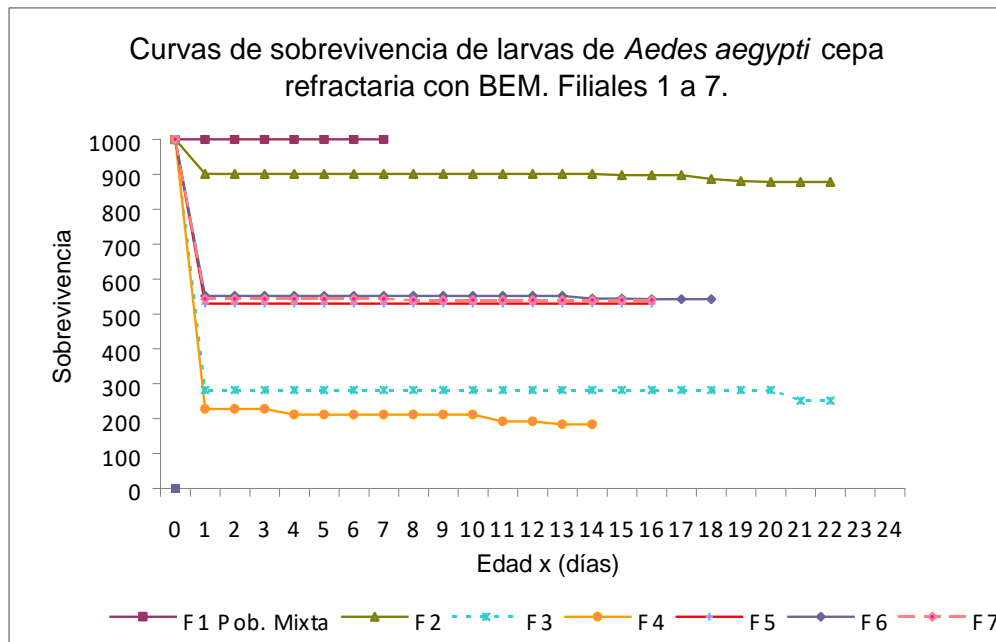
Prueba	Días evaluados
Chi-cuadrado	11,607
Valor p	0,021

De igual manera, se observó que a medida que avanzó el proceso de selección de los tres fenotipos, se disminuyó la probabilidad de sobrevivencia de las larvas de 800/1000 en la filial 2 a 300/1000 en las filiales 4 a 6 (Figuras 36 a 38 y anexos 9, 10, 11, columna lx).

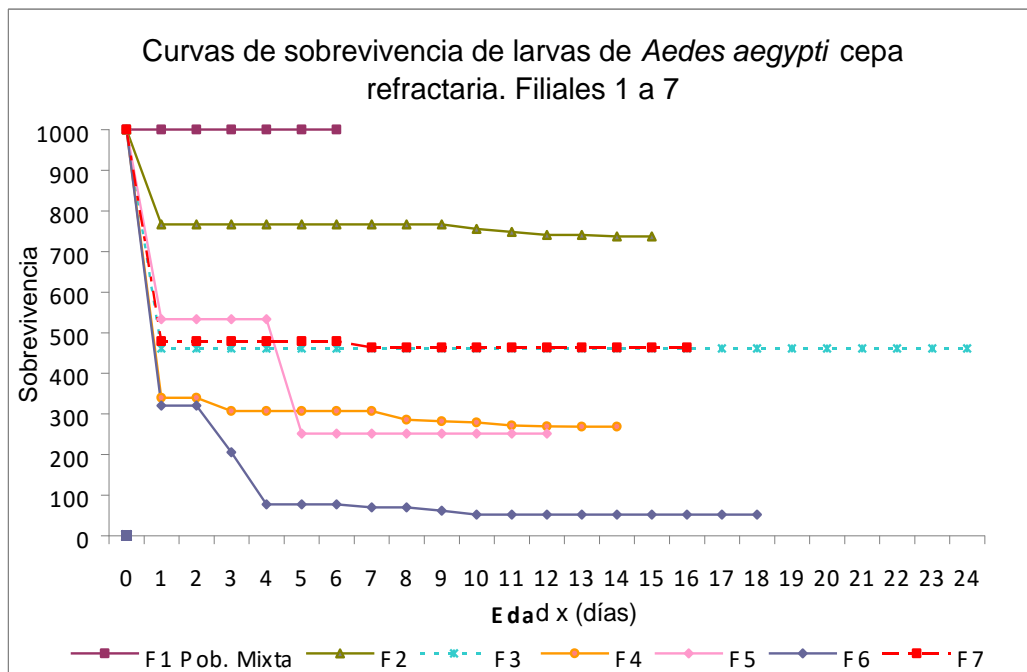
**Figura 36.** Curvas de sobrevivencia de larvas de *Ae. aegypti* cepa susceptible a la infección por virus dengue-2.



**Figura 37.** Curvas de sobrevivencia de larvas de *Ae. aegypti* cepa refractaria BEM a la infección por virus dengue-2.



**Figura 38.** Curvas de sobrevivencia de larvas de *Ae. aegypti* cepa refractaria BIM a la infección por virus dengue-2.

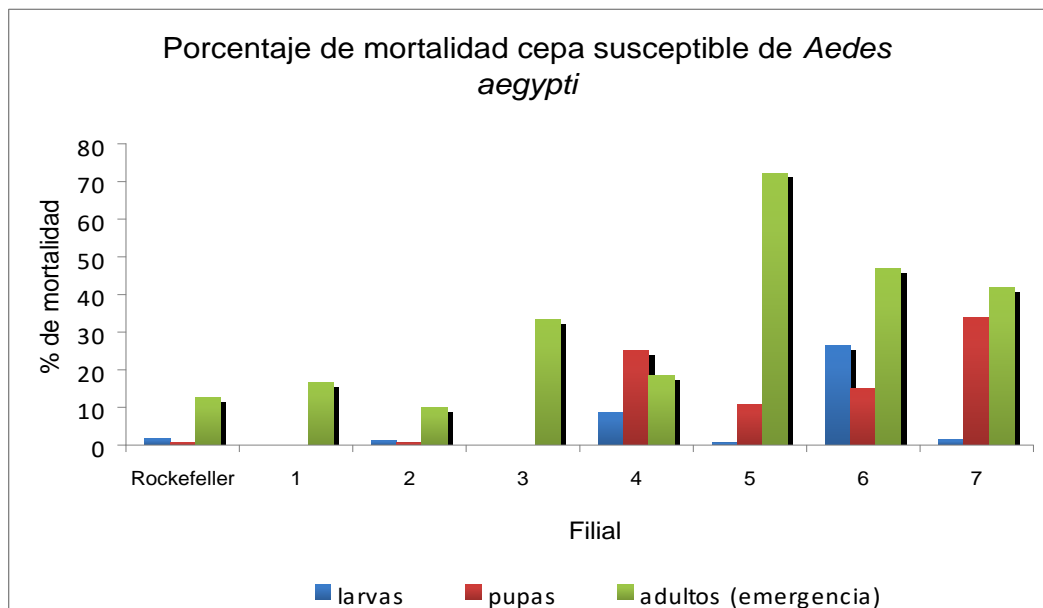


### ✓ Mortalidad de *Aedes aegypti* cepas susceptible, refractaria BEM y refractaria BIM

El porcentaje de mortalidad de las cepas susceptible y refractaria BEM, presentó un comportamiento similar durante las 7 filiales estudiadas en los estadios de larva, pupas y adulto (Figuras 39 y 40). Durante las filiales 1 a 3 se registró una mayor mortalidad en adultos para las dos cepas (Anexos 9 y 10, tablas columna m). Así mismo, a partir de la filial 4 la mortalidad aumentó para todos los estadios evaluados. Este porcentaje de mortalidad comenzó a disminuir en la F7. (Figura 39 y 40).

La cepa refractaria presentó un comportamiento variable en los porcentajes de mortalidad en los estadios de larva, pupa y adulto entre las 7 filiales. (Figura 41, anexo 11. tablas, columna m).

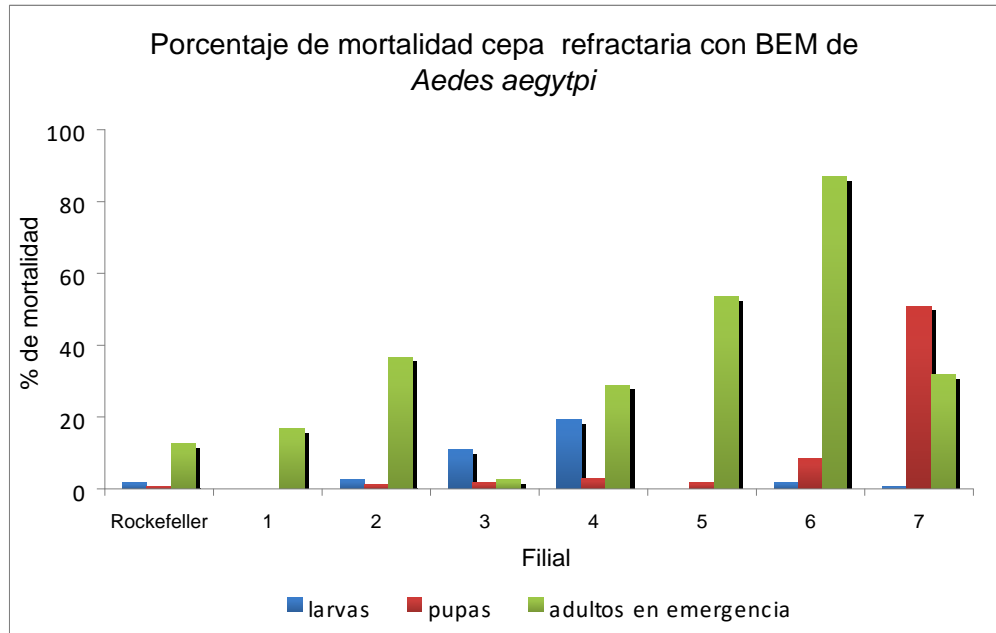
**Figura 39.** Porcentaje de mortalidad de larvas, pupas y adultos de *Aedes aegypti*, cepa susceptible (Filiales 1 a 7) comparado con la cepa Rockefeller.



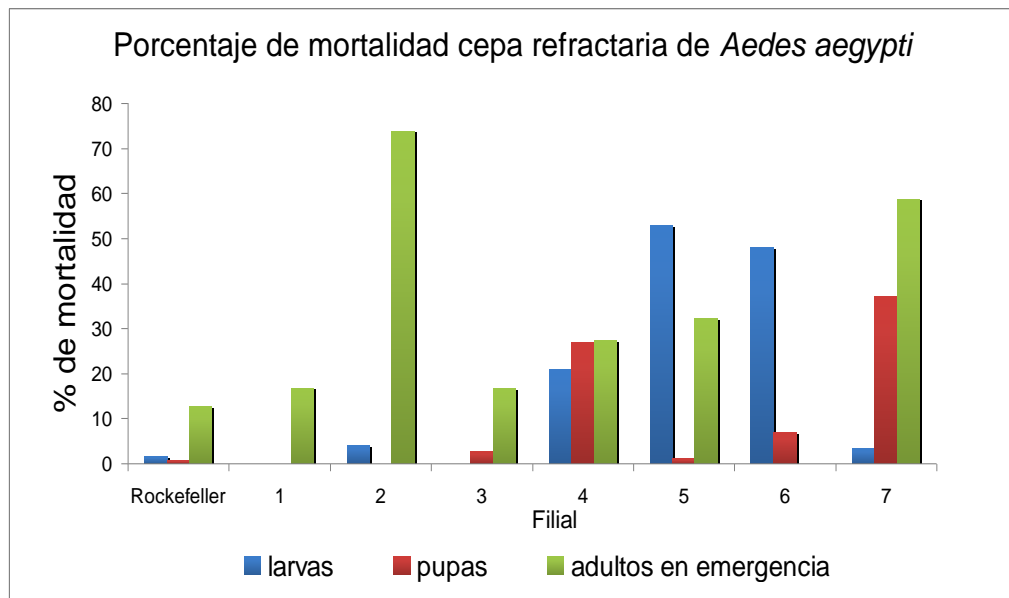
\* Los datos de mortalidad en larvas, pupas y adultos de las 7 filiales de la cepa Rockefeller se promediaron debido a que los porcentajes fueron similares entre filiales.



**Figura 40.** Porcentaje de mortalidad de larvas, pupas y adultos de *Aedes aegypti*, cepa refractaria con BEM (Filiales 1 a 7) comparado con la cepa Rockefeller.



**Figura 41.** Porcentaje de mortalidad de larvas, pupas y adultos de *Aedes aegypti*, cepa refractaria (Filiales 1 a 7) comparado con la cepa Rockefeller.



A pesar de que se observa una variación en los porcentajes de mortalidad entre las filiales de cada cepa, y entre las tres cepas en las figuras 39, 40 y 41; el análisis estadístico (modelo de regresión binomial) no muestra diferencia significativa entre los datos de mortalidad de las tres cepas ( $p > 0,05$ ) (tabla 12), solamente se observa diferencia en la mortalidad de larvas en tercer estadio ( $p = 0,031$ ).

**Tabla 12.** Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de *Ae. aegypti* entre cepas Rockefeller, Susceptible, Refractaria con BEM y Refractaria BIM.

Variable	Error estándar	Valor z	Valor p
Larva 1	1,9409	-0,13	0,896
Larva 2	0,8511	0,04	0,967
Larva 3	9,49	2,15	0,031
Larva 4	0,304	-0,42	0,672
Pupas	0,589	0,04	0,964
Adultos	0,180	-0,46	0,644

\*los valores fueron 0

Igualmente, no se observa diferencia significativa entre los valores de mortalidad entre las filiales de cada cepa (tablas 13 a 15), aunque en la cepa refractaria con BEM se evidencia una diferencia significativa con un valor  $p = 0,000$ , para el estadio de pupa entre sus filiales.

**Tabla 13.** Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de *Ae. aegypti* entre filiales de la cepa Susceptible.

Variable	Error estándar	Valor z	Valor p
Larva 1	*		
Larva 2	1442,77	0,58	0,565
Larva 3	3,71	0,53	0,597
Larva 4	0,496	0,46	0,648
Pupas	0,858	1,57	0,117

**Tabla 14.** Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de *Ae. aegypti* entre filiales de la cepa refractaria con BEM.

Variable	Error estándar	Valor z	Valor p
Larva 1	0,43	-0,57	0,567
Larva 2	0,198	-1,63	0,104
Larva 3	*	*	*
Larva 4	*	*	*
Pupas	0,2804	5,33	0,000

\* Los datos fueron cero

**Tabla 15.** Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de *Ae. aegypti* entre filiales de la cepa Refractaria.

Variable	Error estándar	Valor z	Valor p
Larva 1	*	*	*
Larva 2	5,349	0,26	0,798
Larva 3	4,867	1,88	0,061
Larva 4	0,45	0,32	0,751
Pupas	0,684	1,38	0,169

### ✓ Ovipostura

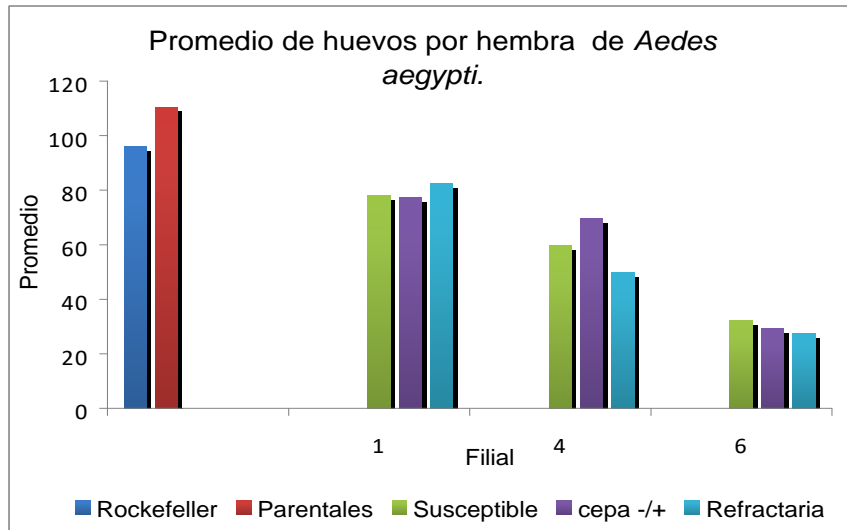
Otro factor biológico en el que se evaluó el efecto de la presión de selección por virus dengue-2 sobre el desarrollo biológico de *Ae.aegypti*, fue el tiempo en el cual las hembras colocaron sus huevos. Se observó, que una vez se realizaron las infecciones experimentales, a partir de la filial 3 de las 3 cepas, las hembras demoraron más tiempo en realizar la ovipostura (4 ó 5 días post-alimentación); mientras que la cepa control Rockefeller y F1 presentaron un tiempo de ovipostura de 2 días post-alimentación.

Las tres cepas presentaron una dinámica similar en las filiales evaluadas (Figura 42). En la filial 1 se registró un promedio de 110 huevos por hembra, y ya en la última presión de selección en la filial 6, se registraron 40 huevos promedio por cada hembra (tabla 16). Esto permitió evidenciar una reducción en el número de huevos. La cepa control no presentó variación; se registraron 96 huevos promedio por hembra en los diferentes experimentos realizados (figura 42)

**Tabla 16.** Promedio de huevos por hembra de *Aedes aegypti*.

CEPA	FILIAL		
	1	4	6
Susceptible	78,0	59,7	32,0
Refractaria con BEM	77,3	69,6	29,3
Refractaria	82,3	49,7	27,4
Rockefeller	96	94	97
Parentales	110,4	----	----

**Figura 42.** Promedio de huevos por hembra de *Aedes aegypti*. Cepas susceptible, refractaria con BEM, refractaria BIM, Rockefeller y parentales.



\*Solamente se registraron los datos de número de huevos por hembra en las filiales en las que se realizaron infecciones artificiales. Para la cepa Rockefeller se promedió el número de huevos por hembra por la similitud de los datos.

El análisis estadístico (prueba no paramétrica Kruskal-Wallis), mostró que hubo diferencia significativa ( $p=0,00$ ,  $p<0,05$ ) entre el número de huevos puestos por hembras entre las cepas (Tabla 17 y anexo 15). Adicionalmente, se detectó diferencias significativas entre las filiales de la cepa susceptible y refractaria (BEM) y no se observaron diferencias en la cepa refractaria BIM (tabla 18).

**Tabla 17.** Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, para evaluar diferencia entre número de huevos por hembra entre las cepas susceptible, refractaria con BEM y refractaria.

Prueba	Variable: Huevos por hembra entre cepas
Chi-cuadrado	58,339
Valor p	0.000

**Tabla 18.** Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, para evaluar diferencia entre número de huevos por hembra entre filiales de las cepas susceptible, refractaria con BEM y refractaria.

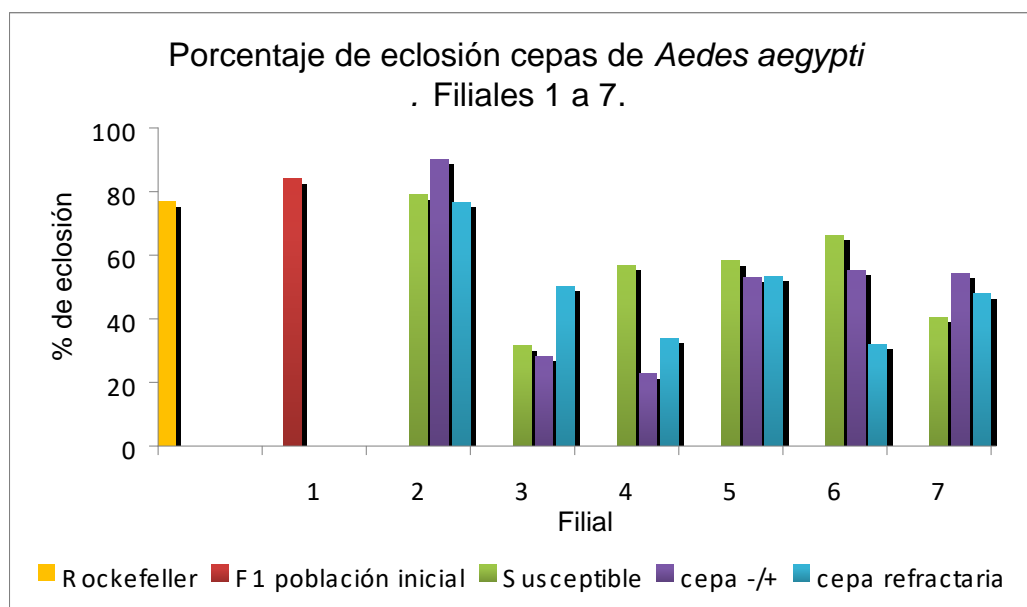
<b>Cepa</b>	<b>Prueba</b>	<b>Variable: Huevos por hembra entre cepas</b>
Susceptible	Chi-cuadrado	63,91
	Valor p	0,000
Refractaria con BEM	Chi-cuadrado	27,79
	Valor p	0.000
Refractaria	Chi-cuadrado	4,336
	Valor p	0,114

✓ **Porcentaje de eclosión**

Las tres cepas seleccionadas mostraron una disminución en el porcentaje de eclosión de los huevos a medida que avanzó el proceso de selección (figura 43).

El comportamiento de las cepas susceptible y refractaria con BEM fue similar: se presentó una disminución en el porcentaje de eclosión del 84 % en la filial 1 a un 35% en la filial 3 para las dos cepas. Este valor se recuperó a medida que avanzó el proceso de selección a un 55% en las filiales 5, 6 y 7 (Figura 43). La cepa refractaria presentó un comportamiento variable durante las 7 generaciones, comparado con las dos cepas restantes pues no presentó una recuperación constante en el porcentaje de eclosión como las cepas susceptible y refractaria con BEM, al contrario mostró una alta variabilidad entre las filiales (ver figura 43).

**Figura 43.** Porcentaje de eclosión de *Aedes aegypti*, cepa susceptible (Filiales 1 a 7) comparado con la cepa Rockefeller.



Para comparar el porcentaje de eclosión entre las cepas seleccionadas y sus filiales, se utilizó la prueba chi-cuadrado.

Los resultados del análisis mostraron que existe una diferencia entre los porcentajes de eclosión entre las tres cepas evaluadas ( $p=0,000$ ) y entre los valores de las filiales establecidas para cada cepa (ver tablas 19 a 23)

**Tabla 19.** Comparación del porcentaje de eclosión de las cepas Susceptible, refractaria con BEM, Refractaria y Rockefeller.

Ni	Chi-cuadrado Xi	Valor p	p media	q media
17543	859.380	0,000	0.539	0.461

**Tabla 20.** Comparación del porcentaje de eclosión entre filiales de la cepa refractaria con BEM.

ni	xi	Valor p	p media	q media
7347	1078.393	0,000	0.471	0.529

**Tabla 21.** Comparación del porcentaje de eclosión entre las cepas Refractaria.

ni	xi	Valor p	p media	q media
5458	234.119	0,000	0.427	0.573

**Tabla 22.** Comparación del porcentaje de eclosión entre las filiales de la cepa Susceptible.

<b>ni</b>	<b>Xi</b>	<b>Valor p</b>	<b>p media</b>	<b>q media</b>
17543	1766.376	0,000	0.577	0.423

**Tabla 23.** Comparación del porcentaje de eclosión entre las filiales de la cepa Rockefeller.

<b>ni</b>	<b>Xi</b>	<b>Valor p</b>	<b>p media</b>	<b>q media</b>
1881	2.813	0.590	0.825	0.175

## 10 DISCUSIÓN

### 10.1 Selección por isofamilias en generaciones alternas

En estudios previos realizados en CIDEIM, la selección de cepas de *Ae. aegypti* susceptibles y refractarias a infección por virus dengue-2, solo se logró por 3 generaciones consecutivas (datos no publicados).

La aplicación del proceso de selección en generaciones alternas en este trabajo, permitió obtener mayor porcentaje de sobrevivencia en los mosquitos y mantener las cepas durante un mayor número de generaciones (F<sub>7</sub>). De igual forma, con este proceso se contrarrestaron factores como la mortalidad en estadios tempranos de *Ae. aegypti* observados en los resultados preliminares. Resultados similares fueron descritos por Hardy et al. en 1978, donde mostró la pérdida de cepas de *Culex tarsalis* seleccionadas con el virus de la encefalitis equina en la F<sub>6</sub> por altas tasas de mortalidad en estadios juveniles y maduros. Las nuevas medidas adoptadas por este autor involucraron el aumento de la progenie empleada y la infección en generaciones alternas de las cepas en estudio (HARDY et al., 1978). Es relevante anotar, que la selección de generaciones alternas dentro de este trabajo fue adoptada después de las experiencias preliminares y discusiones con otros investigadores y no por el trabajo de Hardy et al 1978.

Este esquema de selección adoptado en el presente estudio, permitió que se mejoraran las condiciones genéticas de la población. Asimismo, la eclosión de las cepas seleccionadas con filiales de reposo durante generaciones alternas permitió recuperar el fitness de la población y aumentar el número de ejemplares en la progenie de cada cepa seleccionada. Caso contrario se presentó cuando la selección se realizó en generaciones continuas y la descendencia se limitó al número de huevos obtenidos en el proceso de individualización de cada hembra evaluada.

Aunque las ventajas del proceso de selección establecido, hayan permitido cumplir con nuestros objetivos, cabe resaltar, que las mortalidades registrados en las tablas de vida en estadios juveniles y maduros de *Ae. aegypti*, se pueden deber a la presencia de alelos recesivos deletéreos mencionados en otros estudios (BENNETT 2005).

La obtención de cepas que difieren en su susceptibilidad a la infección por virus dengue-2 fue posible debido a que la susceptibilidad de *Ae. aegypti* a este virus se atribuye a factores genéticos y ambientales (BLACK et al., 2002; BENNETT et al., 2002).



Mediante la técnica de IFI, se evaluaron los porcentajes de CV y se identificaron 3 barreras de infección al virus dengue-2 (de Diseminación, De escape e Infección de intestino medio), La técnica permitió identificar los fenotipos susceptible y refractarios (BIM y BEM) en los individuos analizados y de esta forma seleccionar las cepas esperadas. Procedimientos similares para la evaluación de competencia vectorial, se llevaron a cabo en los estudios realizados por Bennett y colaboradores en la selección de cepas de *Ae. aegypti* que diferían en la susceptibilidad a infección con virus dengue-2 (BENNETT 2005).

Estudios de la variación en susceptibilidad a la infección con virus dengue sugieren que la titulación de virus empleada en cada experimento debe ser constante ya que este es un factor cuantitativo importante que afecta la CV (GUBLER 1979). En este trabajo se realizaron las infecciones artificiales con una titulación de virus que osciló entre  $10^7$  y  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL entre cada experimento. La estabilidad de las infecciones utilizadas en estos experimentos permiten certificar los resultados obtenidos y el proceso de selección.

La obtención de cepas altamente refractarias y susceptibles requirió de un proceso de selección durante varias generaciones. El esquema de selección empleado influye en el proceso, ya que es probable la aparición de cepas mutantes durante la selección y es necesario evitar otros factores como la alta consanguinidad dentro de las cepas (HARDY *et al*; 1978).

Una vez se obtuvo estabilidad en los fenotipos de las cepas seleccionadas, el procedimiento de selección se volvió más rápido. De esta manera se obtuvieron tres de cepas de *Ae. aegypti* con diferentes porcentajes de CV a la infección por virus dengue-2 (tablas 7, 8 y 9). Estos valores de CV fueron cambiando a medida que se realizaron las infecciones experimentales.

Aunque, los porcentajes de fenotipos susceptibles y refractarios en las cepas evaluadas no fueron de un 100%, si se logró aumentar los valores en los porcentajes en los fenotipos seleccionados. Un factor que pudo intervenir en la dificultad de obtener altos porcentajes de refractoriedad o susceptibilidad al virus dengue-2, es que, al igual que en estudios realizados por Hardy y colaboradores, en los machos que copularon con las hembras evaluadas por cada cepa, no se determinó el fenotipo ante la infección por el patógeno (HARDY 1978).

Si bien, el modo exacto de herencia de los fenotipos refractarios o susceptibles no se determinó en este trabajo, la susceptibilidad a la infección por virus dengue-2 fue dominante en el proceso de selección en las tres cepas seleccionadas (tablas 7, 8 y 9). El número de individuos con fenotipo susceptible se incrementó progresivamente tanto en la cepa susceptible como en las cepas refractaria con BEM y refractaria. Estos datos difieren a los reportados por Gubler & Rosen en 1976, quienes sugieren que el fenotipo de

*Ae. aegypti* resistente a virus dengue-2 es dominante sobre el susceptible (GUBLER & ROSEN 1976). No obstante, Hardy (1978) reporta en el proceso de selección de cepas resistentes de *Cx. tarsalis* a infección por virus de la encefalitis equina, la dominancia total o parcial del fenotipo susceptible de los mosquitos sobre el resistente (HARDY *et al*; 1978).

## 10.2 Tablas de vida

En función de los resultados obtenidos, el efecto de la infección por virus dengue-2 en el desarrollo biológico de *Ae. aegypti* de cepas susceptibles y refractarias, se estudió teniendo en cuenta las características de las tablas de vida en las filiales seleccionadas bajo condiciones de infección y de reposo.

La cepa Rockefeller de *Ae. aegypti* tomada como cepa control en el desarrollo de este trabajo, presentó un desarrollo acorde al reportado para la especie (10 días de huevo a adulto) (GADELHA D 1985) (Anexo 8. Tablas C a G). Con una probabilidad de sobrevivencia de 800/1000 en las 6 filiales evaluadas, el tipo de curvas de sobrevivencia evidenciado por esta cepa, se cataloga como una curva tipo IV (ver figura 10) según lo estimado por Deevey (1947). La curva tipo IV estimada (ver numeral 5.8.1.1), representa una cepa en la cual la tasa de mortalidad afecta fundamentalmente los estadios tempranos como es el caso de los huevos (Anexo 8. Tablas C a G). Una vez se superó la etapa de eclosión de huevos, la mortalidad en los estadios larvales, de pupa y adulto se redujo de manera considerable y finalmente se observó una sobrevivencia casi constante (Figura 34).

La disminución en el porcentaje de sobrevivencia entre el estado de huevo y el primer instar larval que se presenta en cada filial de la cepa Rockefeller, se debe probablemente al número de huevos inactivos o residuales que no eclosionaron con respecto al número total de larvas que emergieron (anexo 8). No obstante, el tipo de fuente de alimentación de los mosquitos puede afectar la fertilidad de los huevos en cada ovoposición, debido a las variaciones en la calidad de sangre y nutrientes obtenidos a partir de esta (MAHMOOD 1989). Sin embargo este no fue el caso en nuestros experimentos ya que estas variables estaban controladas.

En general, la disminución en la sobrevivencia en los estadios de huevo y larva en las cepas susceptibles y refractarias fue muy similar a la encontrada por Mahmood y Nayar (1989) cuando estudiaron las tablas de vida de cepas susceptibles y refractarias de *Ae. aegypti* a la infección por *Dirofilaria immitis* (MAHMOOD & NAYAR 1989).

Al igual que la cepa Rockefeller, las cepas susceptible y refractaria con B.E.M, presentaron curvas de sobrevivencia que se adaptan a las curvas tipo IV, aunque estas varían en su concavidad de forma dependiente a la filial en las

que se realizaron o no infecciones experimentales (figuras 36 y 37). En las filiales con procesos de infección la sobrevivencia disminuye, pero en las filiales de reposo, la población recupera su fitness y los porcentajes de sobrevivencia aumentan en larvas, pupas y adultos (Anexos 9, 10 y 11).

La cepa refractaria, presenta curvas de sobrevivencia variables durante sus filiales. Se pueden observar curvas tipo IV en las filiales 2,3 y 7, pero en las filiales 4,5 y 6 se presentan curvas que representan una mezcla de curvas tipo I, II, III y IV (Figura 38). En estas filiales, se presentan caídas bruscas en las curvas que indican las altas tasas de mortalidad entre un estadio larval y el otro, pero, cuando la cepa superó esta disminución en la sobrevivencia y se recupera, entonces se observa una curva tipo II (ver numeral 5.8.1.1)

Las diferencias en los porcentajes de mortalidad, entre la cepa control y las cepas seleccionadas podrían convertirse en un factor relevante que muestra el efecto de la presión selectiva con virus dengue-2 sobre poblaciones de *Ae. aegypti*. Esto coincide con los resultados obtenidos por Hardy en 1978, en la selección de cepas susceptibles y refractarias de *Cx. tarsalis* a infección por el virus de la encefalitis equina. Sin embargo, el hecho de que todas las cepas seleccionadas presentaron patrones similares en mortalidad, sugiere que los cambios son producto de la selección y no del virus en sí.

A través del proceso de selección, las tablas de vida mostraron un aumento en la tasa de mortalidad de adultos en emergencia posiblemente producto de la alta consanguinidad y presencia de genes deletéreos (BENNETT, K *et al.*, 2002) (figuras 4,5,6). La cepa *refractaria* presentó además una mayor mortalidad en los estadios inmaduros (larvas y pupas) durante su desarrollo. Los análisis estadísticos de los resultados en el presente trabajo muestran diferencia significativa entre las mortalidades en larva, pupa y adulto con respecto a la cepa Rockefeller. Asimismo, el desarrollo normal de la cepa control en laboratorio corrobora que las condiciones de laboratorio no influenciaron en el desarrollo biológico de *Ae. aegypti*.

Otro factor que evidencia el efecto por la presión selectiva, es la diferencia en el tiempo de duración de los instar larvales de las cepas seleccionadas comparadas con la cepa Rockefeller. La prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, permitió confirmar la diferencia entre el tiempo de vida de las cepas susceptible, refractaria con BEM, refractaria y Rockefeller.

En el proceso de selección se observó la disminución en el promedio de huevos por hembra y en el porcentaje de eclosión (figuras 43 y 44). Se presentó un aumento en el tiempo de desarrollo de los mosquitos seleccionados de las 3 cepas en comparación con la cepa control Rockefeller evidenciando el costo reproductivo y los cambios en el comportamiento del vector, al disminuir los híbridos en la población. Adicionalmente, se observó en

el proceso de colonización que las cepas susceptibles produjeron un mayor número de huevos seguidos por BEM y BIM.

Varios estudios han reportado, que la resistencia a los patógenos es costosa para el mosquito en el momento de desencadenar una respuesta inmune asociada a su defensa, aunque esto ha sido difícil de demostrar sin utilizar controles adecuados (HURD 2005). El costo que genera la relación inmunidad-fitness, está asociado en la disminución de huevos por hembra, en la disminución en la eclosión de huevos y sobrevivencia de los mosquitos en sus estadios juveniles y maduros (HURD 2005).

La relación entre inmunidad y fitness es frecuentemente atribuido a la competencia por recursos escasos dentro de un sistema (HURD 2005). Si esto fuera así, en el modelo virus dengue-mosquito, se podría explicar la disminución en el número de huevos por unidad de hematina y la disminución en la eclosión cuando el sistema inmune está siendo usado contra el virus (NAPPI & VASS 1993). Adicionalmente, se ha demostrado que la reducción de la fecundidad, resulta de la reabsorción de los oocitos, iniciada por la apoptosis de las células epiteliales del folículo (HURD 2003).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que el efecto de la infección por virus dengue-2 en las cepas susceptibles y refractarias de *Ae. aegypti* seleccionadas, se manifestó en la disminución de huevos por hembra en cada filial y en su porcentaje de eclosión de cada cepa. Además estos valores difieren entre las cepas. La prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, permite corroborar estos resultados y compararlos con la cepa Rockefeller ( $p < 0,05$ ). No obstante, los estudios realizados por Hurdy (1978) en los cuales se obtuvieron resultados similares, no descartan la probabilidad de que los cambios presentados en el fitness de las cepas seleccionadas, se atribuyan a la tolerancia de la infección, a la adaptación de las cepas a las condiciones de laboratorio y/o al proceso de selección utilizado.

Estudios similares observaron que el número de huevos desarrollados por una cepa de *Ae. aegypti* susceptible a la infección por *Brugia*, después de una alimentación con sangre infectada con *B. pakangi* o *D. repens* no fue significativamente diferente comparado con mosquitos alimentados con sangre sin parásitos (JAVADIAN & MACDONALD 1974). Sin embargo, cuando se realizó una segunda infección en ambos grupos de mosquitos, los mosquitos infectados presentaron una pérdida significativa en el número de huevos y una reducción en el tamaño de los mismos. Además, la infección resultó en una disminución del número de hembras activas por generación.

Así mismo, Kershaw (1953) mostró que el desarrollo de *D. immitis* y otras filarias en los mosquitos vectores pueden causar efectos patológicos que pueden subsecuentemente reducir la sobrevivencia del vector y la fecundidad

(KERSHAW *etal.*, 1953, KERSHAW & DUKE 1954, JAVADIAN & MACDONALD 1974; COURTNEY *etal.*, 1985).

Otro factor estudiado por Kershaw (1953) en cepas de *Ae. aegypti* susceptibles a la infección por filarias es el estrés generado por la infección en las hembras. Sus resultados muestran que esta característica pudo haber influido en la reducción de huevos y su porcentaje de eclosión, debido al costo de generar una respuesta inmune.

Un aspecto que cabe resaltar en este trabajo, es el retraso en 2 días en el tiempo de eclosión de las cepas seleccionadas con respecto a la cepa Rockefeller. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kershaw (1954) en procesos de selección de cepas de *Ae. aegypti* a infección por filarias, donde este factor se atribuye probablemente a la influencia del proceso de infección en la embriogénesis, aspectos genéticos y fisiológicos del mosquito (KERSHAW 1953).

Los resultados de este estudio han sido de gran importancia, ya que fueron uno de los pasos iniciales para caracterizar genes involucrados en la susceptibilidad de *Ae. aegypti* hacia la infección por virus dengue-2, a partir de la construcción de librerías de expresión génica (BARÓN *et al.*, en preparación). Además, permitirán continuar con futuros estudios que involucren la investigación de la susceptibilidad en el modelo natural de infección de *Ae. aegypti*.

Cabe resaltar, que las cepas susceptibles y refractarias obtenidas se seguirán utilizando para continuar con futuros estudios genéticos en CIDEIM, relacionados con la susceptibilidad y/o refractoriedad de *Ae. aegypti* a la infección por virus dengue-2.

## 11 CONCLUSIONES

- A través de 4 selecciones por virus D-2 en generaciones alternas, se logró la selección de cepas susceptibles y refractarias (BIM y BEM) de *Ae. aegypti*, con un aumento en el porcentaje de individuos con los fenotipos esperados en cada selección.
- Mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), se evaluaron los porcentajes de competencia vectorial y se identificaron 3 barreras de infección al virus Dengue-2 (de Diseminación, De escape e Infección de intestino medio) permitiendo identificar los diferentes fenotipos en los individuos analizados y seleccionar las cepas esperadas.
- A partir de una población de *Ae. aegypti* obtenida en campo en la ciudad de Cali con una CV de 65.8%, se seleccionaron tres cepas con fenotipos: Susceptible, Refractario con barrera de escape de intestino (BEM), y Refractario con barrera de infección de intestino (BIM),
- El proceso de selección por isofamilias, permitió incrementar de 65.8% a 91.6% la CV en la cepa susceptible; en la refractaria con BEM de 26.3% a 36.4% y en la cepa refractaria con BIM de 8 a 35,4%.
- A través del proceso de selección, las tablas de vida mostraron un aumento en la tasa de mortalidad de adultos en emergencia posiblemente producto de la alta consanguinidad y presencia de genes deletéreos (BENNETT, K *et al.* 2002). La cepa *refractaria* presentó además una mayor mortalidad en los estadios inmaduros (larvas y pupas) durante su desarrollo.
- En el proceso de selección se observó la disminución en el promedio de huevos por hembra y en los porcentajes de eclosión. Se presentó un aumento en el tiempo de desarrollo de los mosquitos seleccionados de las 3 cepas en comparación con la cepa control Rockefeller. Lo anterior evidencia el costo reproductivo y los cambios en el comportamiento del vector, al disminuir los híbridos en la población.
- La aplicación del proceso de selección en generaciones alternas permitió obtener mayor porcentaje de sobrevivencia en los mosquitos y por tanto mantener las cepas durante un mayor número de generaciones (7); debido a que en estudios previos realizados en CIDEIM, no se lograron seleccionar cepas de *Ae. aegypti* a infección por virus D-2 por más de 3 generaciones consecutivas (datos no publicados).

## RECOMENDACIONES

- Para el mantenimiento de las colonias de *Aedes aegypti*, es necesario establecer condiciones de laboratorio estables, como son: temperatura, humedad relativa, fotoperiodo, cantidad de alimento y agua, número de ejemplares por bandeja a eclosionar y de adultos en las jaulas de mantenimiento. Estos parámetros permiten lograr un crecimiento equitativo de los mosquitos y evitar altas tasas de mortalidad en cualquier estadio del ciclo de vida de *Ae. aegypti*.
- Generalmente, en las colonias de mosquitos es común encontrar hormigas, las cuales intervienen en el mantenimiento de ejemplares adultos. Es importante limpiar con alcohol el lugar de mantenimiento de los mosquitos y de las jaulas, para evitar la mortalidad de adultos y de huevos por las hormigas.
- En un esquema de selección de cepas de mosquitos, es importante mantener un proceso de selección en generaciones alternas. Esto, con el fin de recuperar el fitnes de las cepas y evitar la mortalidad en larvas y pupas.
- Es importante emplear un número grande de mosquitos (4000 a 5000) en los estudios de competencia vectorial, para obtener un buen número de hembras para evaluar, mayor descendencia y así disminuir el grado de consanguinidad en las cepas a seleccionar.

## PERSPECTIVAS

- Continuar con futuros estudios que involucren la investigación de la susceptibilidad en el modelo natural de infección con virus dengue de *Ae. aegypti*.
- Evaluar la expresión diferencial de genes del intestino medio en *Ae. aegypti* susceptibles y refractarios a la infección por virus dengue-2 de la exposición al virus
- Buscar moléculas que puedan estar interviniendo en el desarrollo del virus dengue en *Ae. aegypti*, con el fin de desarrollar nuevas estrategias biotecnológicas que permitan disminuir la transmisión del virus.
- Determinar si los genes de la respuesta inmune seleccionados influyen en la susceptibilidad y refractoriedad del intestino medio de *Ae. aegypti* a la infección por virus dengue 2.



## BIBLIOGRAFÍA

AHMED, A. M., R. MAINGON, P. ROMANS, AND H. HURD.. Effects of malaria infection on vitellogenesis in *Anopheles gambiae* during two gonotrophic cycles. *Insect Molecular Biology*. Vol. 10 (2001); p. 347–356.

ALONSO, J *et al.* La infección por virus dengue en áreas de riesgo del NEA. *Bol. Inst. Pat. Reg.* (1987). IX- X:29-41.

ADELMAN, Z *et al.* Sindbis virus-induced silencing of dengue viruses in mosquitoes. *Insect molecular Biology*. Vol. 10, No. 3 (2001); p. 265-273.

ARMSTRONG, P. & RICO-HESSSE, R. Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 68, No. 5 (2003); p. 539–544.

ASHBURN, P., CRAIG, C. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever infeccions. Vol 4 (1907); p. 325-440.

BEERNTSEN, B., ANTHONY, J., and CHRISTENSEN, B. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and molecular biology review*. Vol. 64, No. 1 (2000); p. 115–137.

BENNETT, K *et al.* Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from México and the united states. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 67, No. 1 (2002); p. 85-92.

BENNETT, K *et al.* Quantitative trait loci that control dengue-2 virus dissemination in the mosquito *Aedes aegypti*. *The Genetic Society of America*. Vol. 175 (2005); p. 185-194.

BIELEFELDT-OHMANN, H. Pathogenesis of dengue virus diseases: missing pieces in the jigsaw. *Reviews. Trends in Microbiology*. Vol. 5 (1997); p. 409-413.

BLAIR, C., ADELMAN, Z. and OLSON, K. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus Transmission by mosquitoes. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 13, No. 4 (2000); p. 651-661.

BLACK, W *et al.* Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research*. Vol. 33 (2002); p. 379-388.

BOSIO, C.F., BEATY, B.J. & BLACK, W.C. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 59 (1998); p. 965–970.

BOSIO, C. F. Dissertation. Colorado State University, Fort Collins. (1999)

BOSIO, C.R *et al.* Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *The Genetics Society of America*. (2000).

BOSHELL, J., GROOT, H *et al.* Dengue en Colombia. *Biomédica*. Vol. 6, No 3, 4 (1986); p. 101-106.

BORDONES, S. Estudio de la participación comunitaria en el control de *Aedes aegypti* en el sector 1UDI de la urbanización Caña de Azúcar. Maracay. Estado Aragua. Tesis de Grado. (1994)

BOROMISA, R. D., RAI, K. S. & GRIMSTAD, P. R. Variation in the vector competence of geographic strains of *Aedes albopictus* for dengue-1 virus. *The Journal American Mosquito Control Association*. Vol. 3 (1987); p. 378-386.

CHEN , W. J *et al.* Vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to Dengue 1 virus on Taiwan: Development of the virus in orally and parenterally infected mosquitoes. *The Journal of Medical Entomology*. Vol. 30, No. 3 (1993); p. 524-530.

CHIOU-FENG, L *et al.* Endothelial Cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *The Journal of Immunology*. Vol. 169 (2002); p. 657-664.

CHRISTENSEN, B. M & TRACY, J. W. Arthropod-transmitted parasites: mechanisms of immune interaction. *American Zoology*. Vol. 29 (1989); p. 387-389.

CAMPBELL, C. L & WILSON, W.C. Differentially expressed midgut transcripts in *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) following Orvivirus (Reoviridae) oral feeding. *Insects Molecular Biology*. Vol. 11, No. 6 (2002); p. 505-604

CDC. Dengue fever. División of vector-borne infectious diseases. En URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/index.htm>. (2005)

CHIPARELL, H. Dengue, una enfermedad emergente muy cerca de nuestro país. Montevideo, Uruguay. En URL: [www.infecto.edu.uy](http://www.infecto.edu.uy). (2005).

CRAIG, G. B & HICKEY, W. A. Genetics of *Aedes aegypti*. In *Genetics of Insect Vectors of Disease*, edited by WRIGHT, J. W & ELSEVIER. Amsterdam/London/New York. (1967); p. 67-131.

DÍAZ, A. G *et al.* Cuadro clínico de la fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque del dengue en adulto. *Bol. Oficina Sanit. Panam.*, (1988).

FAILLOUX, A.B *et al.* Genetic differentiation associated with commercial traffic in the Polynesian mosquito, *Aedes polynesiensis* Marks 1951. *Biology Journal Linnean Society*, Vol. 60 (1997); p. 107-118.

FERNANDEZ, Z *et al.* Vector competence of rural and urban strains of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) from Sao Paulo State, Brazil for IC, ID, and IF Subtypes of Venezuelan Equine Encephalitis Virus. *The Journal of Medical Entomology*. Vol. 40, No. 4 (2003).

FIDEL, M. En URL: <http://www.netsalud.sa.cr/ms/estadist/enferme/dengueh.htm>. Hospital Universitario del Valle. Santiago de Cali. (feb. 1998).

FIELDS, B. N. *Virology*. Raven Press, New York, N.Y. (1990).

FOSTER, W.A & WALKER, E. Mosquitoes (Culicidae). Medical and Veterinary Entomology. Elsevier Science (USA). (2002); p. 203-205.

FOUQUE, F *et al.* *Aedes aegypti* in French Guiana: Susceptibility to a dengue virus Vol. 6, No. 1(2001); p. 76-82.

GADELHA, D. Biologia e comportamento do *Ae. aegypti*. Rev Bras Malariol D Trop; Vol. 37 (1985): p. 29-36.

GASS, R. F.. Influences of blood digestion on the development of *Plasmodium gallinaceum* (Brumpt) in the midgut of *Aedes aegypti* (L). Acta Tropical. Vol. 34 (1977); p. 127–140.

GIBBONS, R. V, VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. Clinical review. The Journal Molecular Biology. No. 321 (2002); p. 1563-1566.

GOMEZ-MACHORRO *et al.* Quantitative trait loci affecting dengue midgut infection barriers in an advanced intercross line of *Aedes aegypti*. The Royal Entomological Society. ( 2004); p. 637–648.

GONÇALVES, M *et al.* Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol. 99, No. 8 (dec. 2004); p. 809-814.

GONZÁLEZ, G., CABRALES, C. C y RINCÓN, B. Dengue y Dengue Hemorrágico. Revista de los Estudiantes de Medicina de la Universidad Industrial de Santander. MEDICAS UIS. Vol. 12. (Nov. –Dic. 1998); p. 327-332.

GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N *et al.* The breeding structure of *Aedes aegypti* populations in México varies by region. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. (2002).

GROOT, H., BOSHELL, J. Dengue, dengue hemorrágico y fiebre amarilla. Capítulo 120 en Medicina Interna, 3 ed. Fundación Instituto de Reumatología e Inmunología, BOEHRINGER, I., CHALEM, F., ESCANDÓN, J., CAMPOS, J., ESGUERRA, R, Editores. (1998).

GROOT, H. The reinvaion of Colombia by *Aedes aegypti*: aspects to remember. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 29, No. 3; p. 1980:330-338.

GUBLER, D. Current Research on Dengue. In Current Topics in Vector Research. Edited by K. F. Harris. New York: Springer-Verlag. Vol. 3 (1987); p. 37-56.

GUBLER, D., NALIM, S., SAIPAN, T and SAROSO, J. Variation in susceptibility to oral infection with Dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 28 (1979); p. 1045-1052.

GUBLER, D. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 11, No. 3 (1998); p. 480-496.

HARDY, J. L *et al.* Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. Annual Review Entomology. Vol. 28 (1983); p. 229–262.

- HARDY, J. Susceptibility and resistance of vector mosquitoes. The Arboviruses: Epidemiology and Ecology, edited by T. P. MONATH. CRC Press, Boca Raton, FL. (1988); p. 87-126.
- HALSTEAD, A. B. Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. Science. No. 239 (1988); p. 476 – 481.
- HALSTEAD, S.B., NIMMANNITYA, S & COHEN, S.N. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. Yale Journal Medical Biology. Vol. 42 (1970); p. 311-328.
- HENCHAL, E. A. & PUTNAK, J. R. The dengue viruses. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 3 (1990); p. 376-396.
- HOLMES, J. L *et al.* Selection of refractory and permissive strains of *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) for transovarial transmission of La Cross Virus. Journal Medical Entomology. Vol. 36 (1999); p. 671-678.
- HUBER, K *et al.* Temporal genetic variation in *Aedes aegypti* populations in Ho Chi Minh City Vietnam). Heredity. Vol. 89 (2002); p. 7–14.
- JOHNSON, B.W *et al.* Inhibition of luciferase expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes by Sindbis virus expression of antisense luciferase RNA. Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 96 (1999); p. 13399–13403.
- JOHNSON, B *et al.* Vector competence of brazilian *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* for a brazilian yellow fever virus isolate. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 96 (2002); p. 611-613.
- KILAMA, W.L., CRAIG, G.B. Monofactorial inheritance of susceptibility to *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes aegypti*. Annual Tropical Medical Parasitology. Vol. 63 (1969); p. 419-432.
- KLOWDEN, M. J & DUTRO, S. M. Effects of carbohydrate ingestion on the pre-oviposition behavior of the mosquito *Aedes aegypti* (L.). Bull. Soc. Vector Ecol. Vol. 15 (1990); p. 59-62.
- KUNO, G. Factors influencing the transmission of dengue viruses. Gubler DJ, Kuno G, eds. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. London: CAB International. (1997); p. 61–68.
- KUHN, R. J *et al.*, Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., *et al.* (2002) *Cell* 108, 717–725.
- LORENZ, B *et al.* The effect of colonization upon *Aedes aegypti* susceptibility to oral infection with yellow fever virus. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 33, No. 4 (1984); p. 690-494.
- LOURENÇO, R *et al.* Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *aedes albopictus* from brazil, the united states, and the cayman islands. Paris, France. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 69, No. 1 (2003); p. 105–114.
- LUDWIG, G. V *et al.* Monoclonal antibodies directed against the envelope glycoproteins of La Crosse virus. Microbiology of Pathogeny. Vol. 11, No. 140 (1991); p. 411–421.
- LUDWIG, G. V *et al.* Role of La Crosse virus glycoproteins in attachment of virus to host cells. Virology. No. 181 (1991); p. 564–571.

LUDWIG, G. V., KONDIG, J. P & SMITH, J. F. A putative receptor for Venezuelan equine encephalitis virus from mosquito cells. *Journal of Virology*. Vol. 70 (1996); p. 5592–5599.

LUNA, C *et al.* Characterization of three Toll-like genes from mosquito *Aedes aegypti*. *The Royal Entomological Society. Insect Molecular Biology*. Vol 12, No. 1 (2003); p. 67–74.

MAHMOOD, F AND NAYAR, J. K. IFAS-University of Florida, Florida Medical Entomology Laboratory 200 9th Street S.E., Vero Beach, Florida 32962

MARTÍNEZ, E. Dengue hemorrágico en niños. Bogotá, Colombia, INS. (1990).

MARTÍNEZ, E. Dengue y dengue hemorrágico. Editorial Universidad Nacional de Quilmes. Jacc Impresores S.A., Buenos Aires. (1998); p. 269.

MENDOZA, M *et al.* Putative receptor for Dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45 Kda glycoprotein. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 67, No, 1 (2002); p. 76-84.

MENDOZA, N.M *et al.* Manejo integral de malaria. 1 ed. Bogotá D:C: Instituto Nacional de Salud. (2000).

MILLER, B And MITCHELL, C. Genetic selection of a flavivirus–refractory strain of the yellow fever Mosquito *Aedes aegypti*. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 45, No. 4 (1991); p. 399-407.

MITCHELL, C., BARRY, M and GUBLER, D. Vector competence of *Aedes albopictus* from Houston. Texas, for Dengue Serotypes 1 to 4, Yellow Fever and Ross River Viruses. *Journal of the American Mosquito Control Association*. Vol. 3, No. 3.

MICHAEL, T and LUNDSTROM, J. Effect of environmental temperature on the vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus* for Ockelbo Virus. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 43, No. 5 (1990); p. 543-550, 89-317.

MINISTERIO DE SALUD DE COLOMBIA. Guía Integral de Manejo de las Enfermedades Transmitidas por Vectores, Módulo 4, Unidad Administrativa Especial de Campañas Directas, (1996).

MINISTERIO DE SALUD DE COLOMBIA. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional (IQEN), Instituto Nacional de Salud, Vol. 2, No. 19 (1997), Vol. 3, No. 4, 6 (1998).

MINISTERIO DE SALUD DE COLOMBIA. Sistema de Vigilancia en Salud Pública, Oficina de Epidemiología, No. 9, 16, 38, 50, 51 (1998). MINISTERIO DE SALUD DE COSTA RICA. Distribución Del Dengue. Costa Rica. En URL: [www.netsalus.sa.cr](http://www.netsalus.sa.cr). (2002).

MINISTERIO DE SALUD COLOMBIA. Comportamiento por Regiones del Dengue en el 2000. Boletín Epidemiológico Nacional. Semana No. 2. Bogota: Sivigila, Ministerio de Salud, Colombia. (2002).

MINISTERIO DE SALUD COLOMBIA. Prevención y Control del Dengue. Boletín Epidemiológico Nacional. Semana No. 42. Bogota: Sivigila, Ministerio de Salud, Colombia. (2001).

MONATH, T. P., HEINZ, F. X. Flavivirus. En: Fields Virology. FIELDS, B. N *et al*, Editors. 3 ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. (1996); p. 961-1034.

NALIM, S *et al*. Studies on the susceptibility of a large urban population of *Aedes aegypti* to infection with dengue viruses. Southeast Asian Journal Tropical of Medical Public Health. Vol. 9, No. 4 (1978); p. 494-499.

OCAMPO, C., WESSON, D. Population dynamics of *Aedes aegypti* form Dengue hyper-endemic urban setting in Colombia. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 71, No. 4 (2004); p. 506-13.

OLIVARES, R. Dengue, Crónica de una epidemia anunciada: Introducción y epidemiología. Unidad de Infectología, Departamento de Medicina, Hospital Clínico U. de Chile. Medwave. Año 2, No. 8 (sep. 2002).

OLSON, K.E *et al*. Development of Sindbis virus expresión system that efficiently express green fluorescent protein in midguts of *Aedes aegypti* following per os infection. Insect Molecular Biology. Vol. 9 (2000); p. 57-65.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Dengue haemorrhagic fever, diagnosis, treatment, prevention and control, OMS, 2 ed (1997).

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Number of Reported Cases of Dengue & Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion). En URL: [www.paho.org](http://www.paho.org). (2004)

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Situación de la salud en las Américas, indicadores básicos, OMS, 2 ed, 2005.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control (1995).

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. La salud en las Américas. Washington. En URL: <http://www.paho.org/Spanish/DPI/100/100feature08.htm>. Vol. 1, No. 569 (1998).

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Definiciones de casos. Dengue. Boletín Epidemiológico. Vol. 21, No. 2 (2000); p. 14-15.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. El dengue y la fiebre hemorrágica de dengue en las Américas: una visión general del problema. Boletín Epidemiológico. Vol. 13, No. 1 (1992); p. 9 -10.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Resurgimiento del dengue en las Américas. Boletín Epidemiológico. Vol. 18, No. 2 (1997); p. 1 – 6.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Retorno del Dengue a las Américas, llamada de alerta a los sistemas de vigilancia. Washington, DC. En URL: <http://www.paho.org/Spanish/DPI/100/100feature08.htm>. (feb. 2002).

PADILLA, J.C., GUHL, F., SOTO, J y ALVAREZ, G. Diagnóstico y terapéutica de las enfermedades transmitidas por vectores en Colombia. Sociedad Colombiana de Parasitología y Medicina Tropical. (1999); p. 89-106.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control. Washington. No. 548 (1994); p. 98.

PAUPY, C *et al.* Population structure of *Aedes albopictus* from La Reunion Island (Indian Ocean) with respect to susceptibility to a dengue virus. *Heredity*. Vol. 87 (2001); p. 273-283

PIERRO, D *et al.* Development of an orally infectious sindbis virus transducing system that efficiently disseminates and expresses green fluorescent protein in *Aedes aegypti*. *Insects Molecular Biology*. Vol. 12. No. 2 (2003); p. 107-116.

PLATT, K *et al.* Impact of dengue virus infection on feeding behaviors of *Aedes aegypti*. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 57, No. 2 (1997); p. 119-125.

RABINOVICH, J. E. Mortalidad y Tablas de vida. En: *Ecología de Poblaciones Animales*. Monografía. Organización Panamericana de la Salud. (1978); p. 39-60.

RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their the replication. En: *Fields Virology*. FIELDS, B. N *et al.* Editors. 3 ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. (1996); p. 931-960.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue virus type 1 and 2 in nature. *Virology*. Vol. 174 (1990); p. 479-493.

RIGAU-PÉREZ, J. G *et al.* Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Lancet*. Vol. 352 (1998); p. 971-977.

RODHAIN, F. The situation of dengue in the world. *Bull Soc Pathol Exot*. Vol. 89, No. 2 (1996); p. 87-90.

ROMERO-VIVAS, C., LEAKE, C and FALCONAR, K. Determination of dengue virus serotypes in individual *Aedes aegypti* mosquitoes in Colombia. *Medical and Veterinary entomology* vol. 12 (1998); p. 284-288.

ROSEN, L., GUBLER, D. J. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 23 (1974); p. 1153-1160.

ROTHMAN, A. L. Viral pathogenesis of dengue infections. *In* D. J. Gubler and G. Kuno (ed.), *Dengue and dengue haemorrhagic fever*. CAB International, London, United Kingdom. (1997); p. 245-272.

SAAD, A. C *et al.* Vigilancia intensificada sobre el dengue y los primeros casos de dengue hemorrágico confirmados en Colombia durante el primer semestre de 1990. *Biomédica*. Vol. 6, No. 3,4 (1989); p. 99-1-104.

SECRETARIA DE SALUD DE MEXICO. Control del Dengue y Participación Comunitaria. En URL: [www.cenave.gov.mx](http://www.cenave.gov.mx). (2005).

- SEVERSON, D.W *et al.* Chromosomal mapping of two loci affecting filarial worm susceptibility in *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*. Vol. 3 (1994); p. 67–73.
- SEVERSON, D.W *et al.* Restriction fragment length polymorphism mapping of quantitative trait loci for malaria susceptibility in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*. Vol. 139 (1995); p. 1711–1717.
- SHAHABUDDIN, M., COCIANCICH, S & ZIELER, H. The search for novel malaria transmission-blocking targets in the mosquito midgut. *Parasitology. Today*, Vol. 14 (1998); p. 493–497.
- SHROYER, D. A. Vertical maintenance of dengue-1 virus in sequential generations of *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* Vol. 6 (1990); p. 312-314.
- SIVIGILA. Ministerio de salud. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana Epidemiológica N° 2. (2000-2002).
- SIVIGILA (Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública). Boletín Epidemiológico Semanal. Semana Epidemiológica N° 2. (ene. 2002).
- SUÁREZ, M. *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera, Culicidae) en Buenaventura, Colombia. (2001).
- TABACHNICK, W *et al.* Oral infection of *Aedes aegypti* with yellow fever virus: geographic variation and genetic consideration. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 34, No. 6 (1985); p. 1219-1224.
- TARDIEUX, I *et al.* Analysis of inheritance of oral susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to Dengue-2 virus using isofemale lines. *The Journal of Medical Entomology*. Vol. 28, No. 4 (1991); p. 518-521.
- UZCATEGUI, N. Y *et al.* Molecular epidemiology of dengue virus 3 in Venezuela. *J Gen Virol*. Vol. 84 (2003); p. 1569-1575.
- VAZEILLE, M *et al.* Population genetic structure and competence as a vector for dengue type 2 of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Madagascar. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 65, No. 5 (2001); p. 491-497.
- VAZEILLE-FALCOZ, M *et al.* Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of population of *Aedes aegypti* from the island of Tahiti and Moorea, French Polynesia. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 60, No. 2 (1999); p. 292-299.
- VÉLEZ, I. D *et al.* Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia Amazonas, Colombia. *Biomédica*. Vol. 18, No. 3 (1998); p. 192 - 98.
- WATSON, T and KAY, B. Vector competence of *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae) for Barmah forest Virus and of this species and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for dengue 1-4 viruses in Queensland, Australia. *Journal of Medical Entomology*. Vol. 36, No. 4 (1999); p. 508-514.
- WALLIS, G *et al.* Selection for susceptibilities and refractoriness of *Aedes aegypti* to oral infection with yellow fever virus. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 34, No. 6 (1985); p. 1128-1231.



WOODRING, J. L., HIGGS, S., BEATY, B. Natural cycles of vectorborne pathogens. Beaty B, Marquardt WC, eds. In: *The Biology of Disease Vectors*. Niwot, CO: University Press of Colorado, (1996); p, 51–72.

YAN, G., CHADEE, D.D., SEVERSON, D.W. Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics*. Vol. 148 (1998); p. 793–800.

ZANOTTO, P *et al.* A reassessment of the higher taxonomy of viruses based on RNA polymerases. *Journal Virology*. Vol. 70 (1996); p. 6083–6096.

**ANEXO 1. FORMATO PARA DILIGENCIAR DATOS PARA TABLA DE VIDA**

**SELECCIÓN DE CEPAS DE *Aedes aegypti*.**

Fecha de recolección de huevos: \_\_\_\_\_ Población: -----  
 Fecha de eclosión de huevos: \_\_\_\_\_ Fecha de obtención de pupas: \_\_\_\_\_  
 Fecha de obtención de adultos: \_\_\_\_\_

Fecha dd/mm/aa	Nº huevos	Nº DE LARVAS			Nº DE PUPAS		Nº DE ADULTOS			
		Eclosio nadas	Muertas	Nº total de larvas vivas	Muertas	Vivas	Obtenidos		Muertos	
							♀	♂	♀	♂

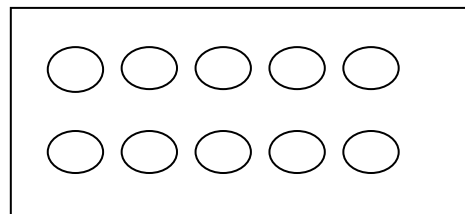
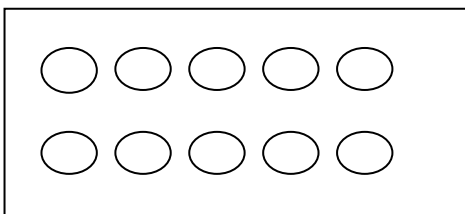
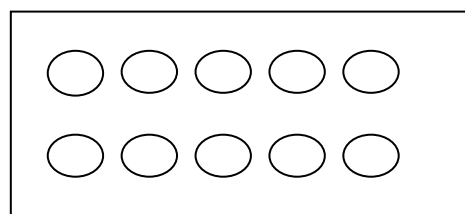
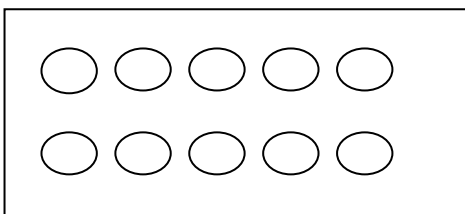
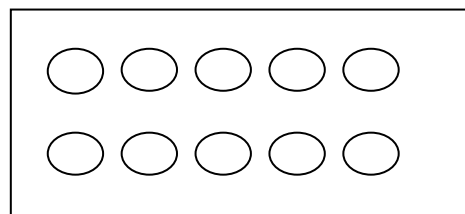
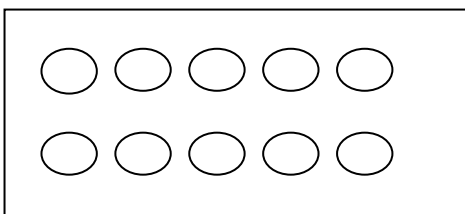
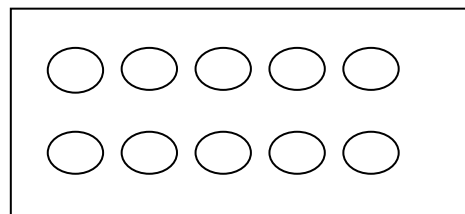
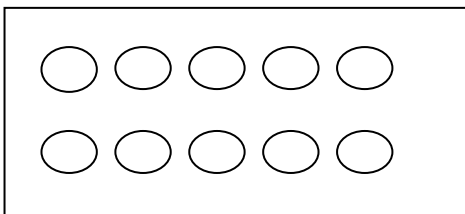
**ANEXO 2. FORMATO DE REGISTRO IFI PARA CABEZAS DE MOSQUITOS – COMPETENCIA VECTORIAL DE ISOLÍNEAS**

Código: <b>FOR 090</b>		Versión: <b>01</b>	
Creado por:	<i>Olga Lucia Barón</i>	Modificado por:	
Fecha de creación:	<b>Mayo 10/2006</b>	Última modificación:	
Aprobación del Garante de Calidad: <b>Clara Ocampo, Mayo/2006</b>			

Fecha: \_\_\_\_\_

Localidad: \_\_\_\_\_

Responsable: \_\_\_\_\_



OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_

**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL- CIDEIM**

**ANEXO 3. FORMATO DE REGISTRO TITULACIÓN DE VIRUS DENGUE-2 EN CÉLULAS C6/36HT**

Código: <b>FOR 090</b>		Versión: <b>01</b>	
Creado por:	<i>11.1.1.1 Olga Lucia Barón</i>	Modificado por:	11.1.2
Fecha de creación:	<b>12 Mayo 10/2006</b>	Última modificación:	<i>12.1.1.1</i>
Aprobación del Garante de Calidad: <b>Clara Ocampo, Mayo/2006</b>			

A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	A
B	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	B
C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	C
D	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	D
E	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	E
F	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	F
G	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	G
H	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	H
E	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

---



---



---



---

**OBSERVACIONES**

---



---



---



---

**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL- CIDEIM**

**ANEXO 4. TABLAS DE VIDA HORIZONTALES DE PARENTALES, FILIAL 1 Y CEPA ROCKEFELLER DE *Aedes aegypti*.**

**Tabla A.** Parentales de *Aedes aegypti* de la Población Mixta de campo.

Etapa	n	lx	dx	m	qx	t
Huevo	-	-	-	-	-	-
Larva I	63	1,000	0	0	0	1,5
Larva II	63	1,000	0	0	0	2
Larva III	63	1,000	0	0	0	2
Larva IV	63	1,000	0	0	0	2
Pupa	63	1,000	0	0	0	1
Adulto	63	1,000	0	0	0	*

**Tabla B.** Filial 1 población de campo de *Aedes aegypti*.

Etapa	N	lx	dx	m	qx	t
Huevo	250	1,000	58	23,2	0,23	
Larva I	192	0,768	0	0	0	1,5
Larva II	192	0,768	0	0	0	1,5
Larva III	192	0,768	0	0	0	2
Larva IV	192	0,768	0	0	0	2
Pupa	192	0,768	0	0	0	1
Adulto	192	0,768	32	12,8	0,17	*

**Tabla C.** *Aedes aegypti* cepa Rockefeller, Filial 2.

Etapa	N	lx	dx	m	qx	t
Huevo	318	1,000	80	25,15		
Larva I	238	0,748	0	0	0	2
Larva II	238	0,748	0	0	0	1,5
Larva III	238	0,748	0	0	0	2
Larva IV	227	0,713	11	3,46	0,05	2,5
Pupa	227	0,713	3	0,94	0,01	1
Adulto	224	0,628	46	14,47	0,20	*

**Tabla D.** *Aedes aegypti* cepa Rockefeller, Filial 3.

Etapa	N	lx	dx	m	qx	t
Huevo	300	1,000				
Larva I	248	0,826	0	0	0	2
Larva II	248	0,826	0	0	0	1,5
Larva III	248	0,826	0	0	0	2
Larva IV	248	0,826	0	0	0	2,5
Pupa	248	0,776	0	0	0	1
Adulto	248	0,616	48	16	0,2	*

**Tabla E.** *Aedes aegypti* cepa Rockefeller, Filial 4

Etapa	n	lx	dx	m	qx	t
Huevo	350	1,000				
Larva I	280	0,800	0	0	0	2
Larva II	280	0,800	0	0	0	1,5
Larva III	280	0,800	0	0	0	2,5
Larva IV	280	0,800	0	0	0	2,5
Pupa	280	0,800	0	0	0	1
Adulto	280	0,668	75	21,4	0,3	*

**Tabla F.** *Aedes aegypti* cepa Rockefeller, Filial 5

Etapa	n	lx	dx	m	qx	t
Huevo	324	1,000				
Larva I	207	0,638	0	0	0	2
Larva II	207	0,638	0	0	0	1,5
Larva III	207	0,638	0	0	0	2,5
Larva IV	207	0,638	0	0	0	2,5
Pupa	207	0,638	0	0	0	1
Adulto	207	0,577	72	22,2	0,35	*

**Tabla G.** *Aedes aegypti* cepa Rockefeller, Filial 6

Etapa	n	Lx	dx	M	qx	t
Huevo	589	1,000	178	30,22		
Larva I	411	0,697	0	0	0	2
Larva II	411	0,697	0	0	0	1,5
Larva III	404	0,680	7	1,19	0,02	2,5
Larva IV	397	0,674	7	1,19	0,02	2,5
Pupa	397	0,674	9	1,52	0,03	1
Adulto	344	0,584	44	7,47	0,11	*

n: número promedio contabilizado; lx: sobrevivencia; dx: individuos muertos; m: porcentaje de mortalidad; qx: probabilidad de morir entre un estadio y otro (x-1 y x); t: tiempo de duración en días.

\*Los adultos fueron sacrificados antes de completar su tiempo de vida natural.

**ANEXO 5. TABLAS DE VIDA HORIZONTALES CEPA SUSCEPTIBLE DE *Aedes aegypti* A INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE-2.**

**Tabla A.** Cepa Susceptible de *Aedes aegypti*, Filial 2 en reposo.

Etapa	N	lx	dx	m	qx	T
Huevo	4021	1,000	1358	33,8		
Larva I	2663	0,622	0	0	0	2
Larva II	2162	0,537	501	12,5	0,2	2,5
Larva III	2162	0,537	0	0	0	2,5
Larva IV	1962	0,487	200	4,97	0,1	3,5
Pupa	1962	0,487	399	9,92	0,2	2,5
Adulto	1563	0,077	1250	31,1	0,6	*

\*se sacrificaron a los 15 días post-infección.

**Tabla B.** Cepa susceptible de *Aedes aegypti*, Filial 3 con infección.

Etapa	N	lx	dx	m	qx	t
Huevo	1281	1,000	762	59,5		
Larva I	519	0,405	0	0	0	1,5
Larva II	519	0,405	0	0	0	2
Larva III	519	0,405	0	0	0	1,5
Larva IV	512	0,399	7	0,55	0,01	2
Pupa	512	0,403	175	13,7	0,3	1,5
Adulto	342	0,097	217	17	0,4	*

**Tabla C.** Cepa susceptible de *Aedes aegypti*, filial 4 con infección

Etapa	N	lx	dx	m	qx	t
Huevo	3355	1000	708	21,1	0,21	
Larva I	2467	0,735	0	0	0	2
Larva II	2467	0,735	0	0	0	2,5
Larva III	2467	0,735	0	0	0	3
Larva IV	2427	0,723	40	1,2	0,02	3
Pupa	2409	0,723	18	0,5	0,01	14
Adulto	2079	0,620	330	9,8	0,14	*

**Tabla D.** Cepa susceptible de *Aedes aegypti*, Filial 5 en reposo.

Etapa	n	lx	dx	m	qx	t
Huevo	3265	1,00	2215	32,16		
Larva I	1050	0,32	0	0	0	2
Larva II	1050	0,32	0	0	0	2,5
Larva III	1050	0,32	0	0	0	3,5
Larva IV	1050	0,32	0	0	0	4,5
Pupa	1049	0,32	1	0,030	0	2
Adulto	1049	0,32	349	10,69	0,3	*

**Tabla E.** Cepa susceptible de *Aedes aegypti*, Filial 6 con infección.

Etapa	n	lx	dx	M	qx	t
Huevo	1746	1,000	756			
Larva I	990	0,567	0	0	0	2
Larva II	990	0,567	0	0	0	2,5
Larva III	990	0,567	0	0	0	3,5
Larva IV	906	0,517	86	4,92	0,09	4
Pupa	894	0,512	249	14,26	0,27	2
Adulto	645	0,265	182	10,42	0,20	*

**Tabla F.** Cepa susceptible de *Aedes aegypti*, Filial 7 en reposo.

Etapa	n	lx	dx	m	qx	t
Huevo	3785	1,000	1619			
Larva I	2256	0,582	0	0	0	1,5
Larva II	2256	0,582	0	0	0	1,5
Larva III	2251	0,580	5	0,13	0,01	2
Larva IV	2243	0,578	8	0,21	0,01	3,5
Pupa	2243	0,578	244	6,5	0,11	3
Adulto	1999	0,095	1630	43,1	0,73	*

**ANEXO 6. TABLAS DE VIDA HORIZONTALES CEPA REFRACTARIA CON B.E.M DE *Aedes aegypti* A INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE-2.**

**Tabla A.** Cepa con BEM de *Aedes aegypti*, Filial 2 en reposo.

Etapa	N	lx	dx	m	qx	t
Huevo	1953	1,000	876	44,8		
Larva I	1077	0,551	0	0	0	2,5
Larva II	1077	0,551	0	0	0	1,5
Larva III	1077	0,551	0	0	0	2,5
Larva IV	1058	0,541	19	0,97	0,02	4,5
Pupa	1058	0,541	91	4,9	0,09	2
Adulto	967	0,015	836	42,8	0,8	*

**Tabla D.** Cepa con BEM de *Aedes aegypti*, Filial 3 con infección.

Etapa	n	Lx	dx	m	qx	t
Huevo	2210	1,000	1587	71,8		
Larva I	623	0,281	0	0	0	1,5
Larva II	623	0,281	0	0	0	1,5
Larva III	623	0,281	0	0	0	3,5
Larva IV	555	0,251	68	3,07	0,11	2,5
Pupa	555	0,251	10	0,45	0,02	2
Adulto	545	0,239	15	0,68	0,03	*

**Tabla B.** Cepa con BEM de *Aedes aegypti*, Filial 4 con infección.

Etapa	N	lx	dx	m	qx	t
Huevo	713	1,000	71	9,96		
Larva I	642	0,900	0	0	0	2
Larva II	642	0,900	0	0	0	2
Larva III	642	0,900	0	0	0	2
Larva IV	628	0,877	16	2,24	0,025	3
Pupa	620	0,880	8	1,12	0,013	1
Adulto	620	0,539	235	32,9	0,38	*

**Tabla E.** Cepa con BEM de *Aedes aegypti*, Filial 5 en reposo.

Etapa	n	Lx	dx	m	qx	t
Huevo	645	1,000	295	45,7		
Larva I	350	0,542	0	0	0	2
Larva II	350	0,542	0	0	0	2
Larva III	350	0,542	0	0	0	2
Larva IV	348	0,539	2	0,31	0,006	2
Pupa	348	0,539	178	27,6	0,51	1
Adulto	170	0,168	111	17,2	0,32	*

**Tabla C.** Cepa con BEM de *Aedes aegypti*, Filial 6 con infección.

Etapa	N	lx	dx	m	qx	t
Huevo	643	1,000	497	77,3	0	
Larva I	146	0,227	10	1,5	0,02	1,5
Larva II	136	0,227	0	0	0	2,5
Larva III	136	0,227	0	0	0	2,5
Larva IV	118	0,183	18	2,8	0,13	3,5
Pupa	118	0,183	4	0,6	0,03	2
Adulto	114	0,111	42	6,5	0,4	*

**Tabla F.** Cepa con BEM de *Aedes aegypti*, Filial 7 en reposo.

Etapa	n	Lx	dx	m	qx	t
Huevo	1183	1,000	557	47,1		
Larva I	626	0,529	0	0	0	2
Larva II	626	0,529	0	0	0	2,5
Larva III	626	0,529	0	0	0	2,5
Larva IV	626	0,529	0	0	0	3,5
Pupa	626	0,520	10	0,8	0,02	2,5
Adulto	616	0,229	435	36,8	0,7	*

**ANEXO 7. TABLAS DE VIDA HORIZONTALES CEPA REFRACTARIA DE *Aedes aegypti* A INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE-2.**

**Tabla A.** Cepa refractaria de *Aedes aegypti*, Filial 2 en reposo.

Etapa	n	lx	Dx	m	qx	t
Huevo	270	1,000	63	23,3		
Larva I	207	0,766	0	0	0	2
Larva II	207	0,766	0	0	0	2,5
Larva III	207	0,766	0	0	0	2,5
Larva IV	199	0,737	8	2,96	0,04	3
Pupa	199	0,737	0	0	0	2
Adulto	199	0,170	153	56,7	0,8	*

**Tabla D.** Cepa refractaria de *Aedes aegypti*, Filial 3 con infección

Etapa	n	lx	dx	m	qx	t
Huevo	192	1,000	100	52,1		
Larva I	92	0,479	0	0	0	1,5
Larva II	92	0,479	0	0	0	1,5
Larva III	92	0,479	0	0	0	2
Larva IV	89	0,463	3	1,56	0,03	2
Pupa	89	0,462	34	17,7	0,38	2
Adulto	55	0,005	1	0,52	0,01	*

**Tabla B.** Cepa refractaria de *Aedes aegypti*, Filial 4 con infección.

Etapa	N	lx	dx	m	qx	t
Huevo	1304	1,000	861	66,0		
Larva I	442	0,339	0	0	0	2,5
Larva II	442	0,285	70	5,36	0,16	2,5
Larva III	367	0,268	22	1,68	0,05	2,5
Larva IV	350	0,268	0	0	0	3,5
Pupa	350	0,268	118	9,04	0,34	2
Adulto	232	0,085	121	9,27	0,35	*

**Tabla E.** Cepa refractaria de *Aedes aegypti*, Filial 5 en reposo.

Etapa	n	Lx	dx	m	qx	t
Huevo	199	1,000	93	46,7		
Larva I	106	0,532	0	0	0	1,5
Larva II	71	0,356	35	17,6	0,33	2
Larva III	50	0,251	21	10,5	0,3	3,5
Larva IV	50	0,211	8	4,02	0,16	3,5
Pupa	42	0,211	1	0,50	0,02	2
Adulto	41	0,035	34	17,1	0,80	*

**Tabla C.** Cepa refractaria de *Aedes aegypti*, Filial 6 con infección.

Etapa	n	lx	dx	m	qx	t
Huevo	906	1,000	616	67,9		
Larva I	290	0,320	0	0	0	1,5
Larva II	290	0,320	0	0	0	1,5
Larva III	63	0,069	123	13,6	0,42	2,5
Larva IV	47	0,051	16	1,76	0,25	3,5
Pupa	47	0,051	20	2,21	0,42	2
Adulto	27	0,029	0	0	0	*

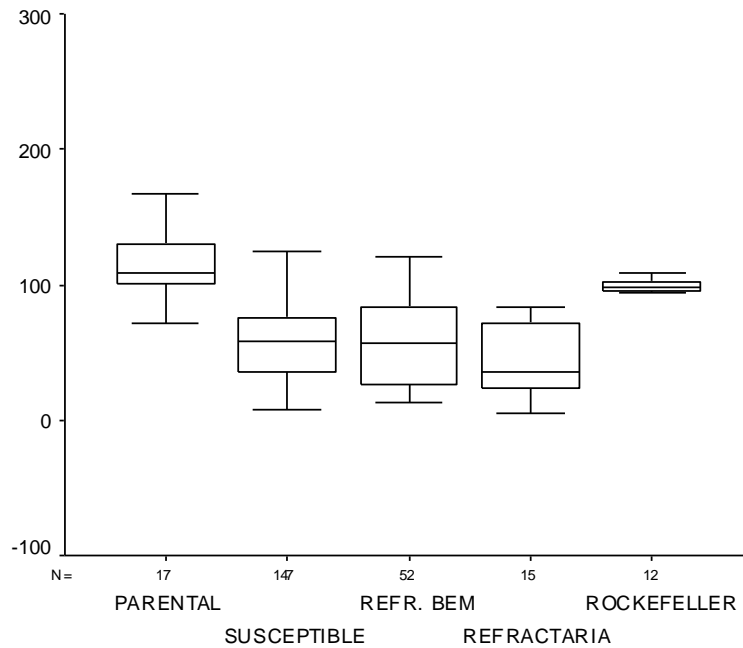
**Tabla F.** Cepa refractaria de *Aedes aegypti*, Filial 7 en reposo

Etapa	n	Lx	dx	m	qx	T
Huevo	2588	1,000	1395	53,9		
Larva I	1193	0,460	0	0	0	2,5
Larva II	1193	0,460	0	0	0	2,5
Larva III	1193	0,460	0	0	0	3,5
Larva IV	1193	0,460	0	0	0	3,5
Pupa	1193	0,460	31	1,2	0,03	2,5
Adulto	1162	0,372	197	7,6	0,17	*

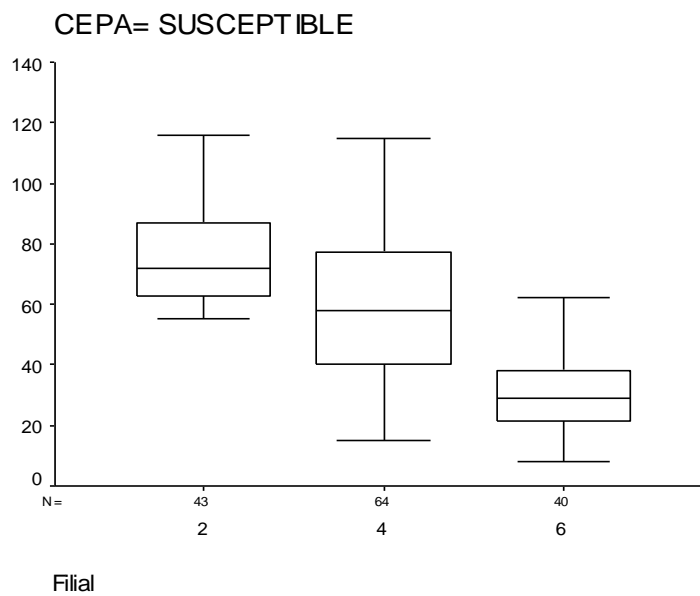


## ANEXO 8. PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA COMPARAR EL NÚMERO DE HUEVOS POR HEMBRA ENTRE CEPAS Y ENTRE FILIALES

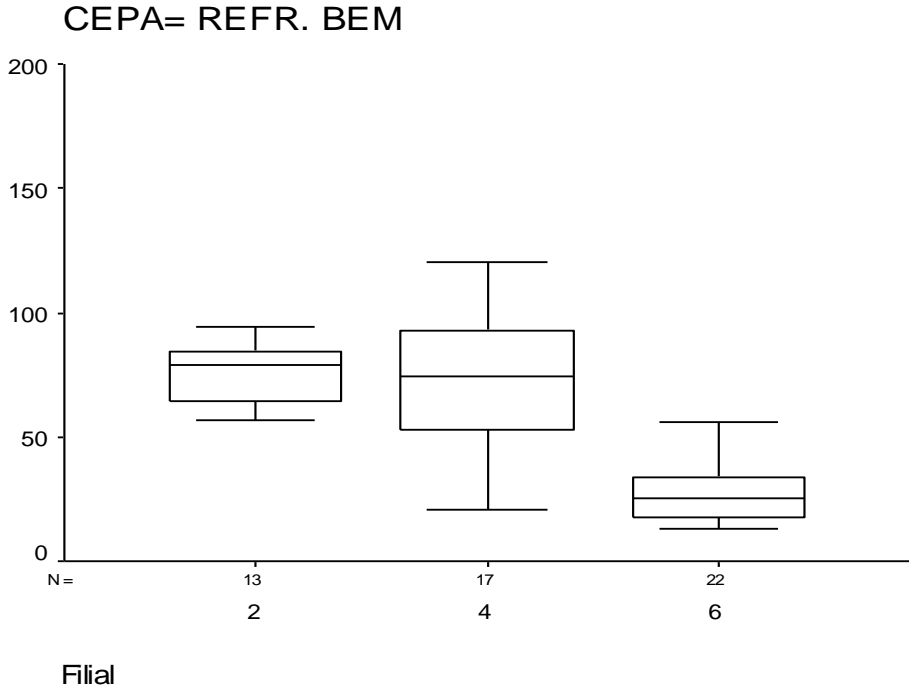
**Figura 1.** Diferencia entre número de huevos por hembra entre cepas: susceptible, refractaria con BEM, refractaria y Rockefeller



**Figura 2.** Número de huevos por hembra entre filiales de la cepa susceptible.



**Figura 3.** Número de huevos por hembra entre filiales de la cepa refractaria con BEM.



**Figura 4.** Número de huevos por hembra entre filiales de la cepa refractaria.

