

Cuantificación relativa de genes relacionados con la respuesta inmune antiviral en una población venezolana de *Aedes (stegomyia) aegypti*

Sergio Montaner¹, Zoraida Fernández¹, Angélica Jiménez¹, Johanny Ruiz², Marifel Carroza², José Rivero², Flor Herrera².

RESUMEN

El virus DENV-3 es el responsable del segundo mayor porcentaje de afecciones hemorrágicas severas causadas por este virus, solo superado por el virus DENV-2. La virulencia de este serotipo, causante de brotes epidémicos a gran escala en países como Venezuela donde circula activamente durante todo el año, es la razón principal del desarrollo investigativo en el campo de las interacciones virus-vector en la búsqueda de un control epidémico efectivo. En el presente trabajo, se evaluó la expresión de dos genes, RNAi (*dcr-2* y *ago-2*), que codifican para proteínas de respuesta antiviral en mosquitos con la finalidad de estudiar el cambio en la expresión de los mismos en el vector una vez infectado con el DENV-3. Para ello, se infectó artificialmente una población de *Aedes (stegomyia) aegypti* de Trujillo, elaborándose dos grupos experimentales (15dpi y 20dpi) y un control; posteriormente se aisló, cuantificó y se realizó transcripción reversa al RNA total aislado de los grupos. La infección en los grupos experimentales se evidenció por la detección de bandas de productos de PCR de 511pb para DENV y 290pb para DENV-3 mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, y se realizó la cuantificación relativa de la expresión genética por PCR en tiempo real. Como resultado, la expresión de los genes no presentó cambios con respecto a los mosquitos no infectados (grupo control) ($p < 0.05$). Estos resultados indican que el virus DENV-3 pudiera estar mostrando mecanismos de evasión sobre las vías de RNAi dentro del cuerpo del vector, y esto puede estar relacionado al hecho de que la replicación de los miembros del género *Flavivirus*, entre ellos el DENV, se lleva a cabo en el sistema de membranas y vesículas, lo que les permite evadir el encuentro en el citoplasma con las proteínas asociadas al complejo de RNAi.

Palabras clave: Dengue, PCR, RNA interferente, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Relative quantification of Antiviral immune response related genes in an *Aedes (stegomyia) aegypti* Venezuelan population.

DENV-3 is the responsible for the second major percentage of hemorrhagic severe affections caused by this virus, only overcome by DENV-2. The virulence of this serotype is the cause of broad scale fever outbreaks in different countries, especially in Venezuela where it circulates actively throughout the year. This is the main reason of investigative developments in the virus-vector interactions field to find an effective epidemic control. In this study, we evaluated the expression of *dcr-2* and *ago-2*, two

RNAi antiviral pathway genes in mosquitoes to study the fold change in the expression of these genes in the mosquito vector *Aedes (stegomyia) aegypti* infected with DENV-3. We artificially infected a population of mosquitoes from Trujillo state (Venezuela) and prepared three (3) experimental groups (15dpi, 20dpi and a control group). Later, we isolated, quantified and applied a reverse transcription to the total RNA obtained of mosquitoes and the infection in the experimental groups was detected performing a 2% agarose gel electrophoresis of the PCR products of the total RNA (511bp for DENV and 290bp for DENV-3). In addition, the infection in the experimental groups was confirmed by the detection of PCR products. The fold change in *dcr-2* and *ago-2* expression genes was quantified by Real Time PCR. As results, the fold change expression in the *ago-2* and *dcr-2* were equal to the non-infected mosquitoes "control group" ($p < 0.05$). These results indicate that DENV-3 could have evasion mechanisms of RNAi pathway inside vector's body, and this can be related to the fact that dengue virus replication is accomplished in the vesicle system and membrane system as well (endoplasmic reticulum and golgi complex) avoiding cytoplasmic encounter with the RNAi pathway proteins.

Key words: Dengue, PCR, RNA interference, *Aedes aegypti*.

INTRODUCCION

El dengue clásico o fiebre del dengue (FD) y la fiebre hemorrágica del dengue (FHD) son manifestaciones de la infección producida por el arbovirus dengue, género *Flavivirus*. La enfermedad puede ser causada por alguno de los cuatro serotipos del virus, estrechamente relacionados (DENV-1, DENV-2, DENV-3 o DENV-4), transmitidos a los humanos por la picadura del mosquito del género *Aedes* (1,2). Aunque los cuatro serotipos del virus dengue circulan activamente en muchos países tropicales y subtropicales como Sri Lanka y Venezuela, las personas que han presentado la forma severa de la enfermedad son frecuentemente las infectadas por DENV-3 (3,4).

A pesar de que no se conoce con detalle las interacciones a nivel celular que se dan entre vectores, hospedadores definitivos y algunos microorganismos, se ha logrado detectar que los vectores de la clase *Insecta* son capaces de generar una respuesta inmune innata, muy parecida a la de los mamíferos, que disminuye o elimina el título del agente patógeno que este causando la infección (5). Otros estudios, revelan la existencia de un mecanismo inmunológico adicional que juega un papel principal en la defensa antiviral, dependiente de los denominados RNA de interferencia (RNAi). Esta es una estrategia evolutivamente conservada para el silenciamiento de genes secuencia-específico guiado por RNAs de doble cadena (dsRNA) (6).

¹ Departamento de Biología, Universidad de Carabobo.

² Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Carabobo BIOMED-UC.

Correspondencia: Sergio Montaner

E-mail: sergiok3@gmail.com

Recibido: Julio 2010

Aceptado: Noviembre 2011

En *Drosophila* y en el género *Aedes* se ha reportado que el gen *dcr2* codifica para la proteína endonucleasa Dicer-2 (Dcr2) que detecta los RNAi y destruye dsRNA exógenos de gran tamaño, produciendo RNA de interferencia cortos (siRNA) de 21 a 25 pb. Con la acción de Dcr2 y la proteína R2D2 (proteína de reconocimiento y unión a dsRNA), una cadena de los siRNA es incorporada en un complejo de nucleasas denominado complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), que actúa como una secuencia guía y se alinea al RNA blanco por complementariedad de bases. Posteriormente, la proteína Argonauta-2 (Ago2), que se encuentra incorporada en el RISC, cliva el RNA blanco, lo que conlleva a su degradación (6,7). Sin embargo, aun se desconoce la forma en que se relacionan, regulan y complementan estas vías de señalización para patógenos bacterianos, fúngicos, protistas y virales.

Las vías de respuesta inmunológica antes mencionadas deberían ser capaces de controlar la infección por virus dengue dentro del mosquito vector, sin embargo, la respuesta es contraria a lo esperado. El virus dengue se ha convertido en un problema de distribución mundial, principalmente en aquellos que se encuentran en los trópicos. Las estadísticas estiman que cada año ocurren 100 millones de casos de dengue en todo el mundo (1,2).

No solo el número de casos de afectados por FD o FHD se incrementa cada año en los trópicos y se disemina a nuevas áreas, sino que aumentan los brotes epidémicos a nivel mundial, como en Venezuela: para el 2007 se reportaron ochenta mil (80.000) casos de FD incluyendo más de seis mil (6.000) casos de FHD. Durante las epidemias, los rangos de primo-infección son aproximadamente del 40% al 50%, aunque puede alcanzar el 80% o 90%. Además, se estima que un promedio de quinientas mil (500.000) personas con FHD requieren hospitalización cada año, donde una proporción alta corresponde a niños y a su vez el 2,5% de los afectados mueren. Sin el tratamiento apropiado, la mortalidad asociada a la FHD excede el 20%. (8).

Considerando el alto índice de casos de dengue a nivel mundial y específicamente en Venezuela, donde se ha convertido en un problema grave de salud pública, se planteó este trabajo de investigación con la finalidad de evaluar las interacciones a nivel inmunológico que existen entre el virus dengue y el mosquito vector *Ae. aegypti*, particularmente la respuesta de expresión genética de *dcr2* y *ago2* los cuales están asociados a la respuesta inmune antiviral mediante la maquinaria de RNA de interferencia. De esta manera, se buscaron posibles mecanismos innatos en la fisiología del mosquito que permitan eliminar o disminuir las partículas virales, permitiendo así plantear métodos para el control del virus a través de su vector.

MATERIALES Y METODOS

Colonia de mosquitos. Los huevos de *Ae. aegypti* de poblaciones de Trujillo fueron suministrados por la Dra. Elina Rojas del Instituto José Witremundo Torrealba, de la Universidad de los Andes. Se mantuvieron y eclosionaron en el Laboratorio de Entomología en Salud Pública de la Dirección de Salud Ambiental del Estado Aragua, en

condiciones controladas: 80% de humedad relativa, 28°C, alimentación de las larvas con Nestum 5 cereales (Nestle). Los adultos se alimentaron con solución de sacarosa al 10% y en un ciclo circadiano de 12:12 horas luz-oscuridad hasta obtener la primera generación (F1). De ésta forma, se redujo la probabilidad de utilizar en los experimentos ejemplares infectados por dengue de manera natural (9).

Cepa del virus dengue. El serotipo DENV-3 del virus fue suministrado por el Dr. Ferdinando Liprandi, del Laboratorio de Biología de Virus del Centro de Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Correspondió a una muestra aislada de un paciente denominado "paciente 9" con 10 pases en cultivo de células C6/36 HT de *Aedes albopictus* y con un título inicial de $1,3 \times 10^5$ UFP/mL. A dicha cepa se le realizaron dos pases de amplificación mediante el protocolo de "Shell Vial" y se tituló utilizando carboximetil celulosa al 3% con fijación mediante formol al 1% en tampón PBS y colorante de metanol-cristal violeta (10).

Infección de mosquitos *Ae. aegypti*. Se siguió el protocolo planteado (9) se preparó una solución sangre-virus y se le suministró, de forma artificial y por vía oral durante 40 minutos en un alimentador de vidrio con una membrana de papel parafilm, a un grupo de hembras de *Ae. aegypti*, que había permanecido en ayuna por 24 horas. Posteriormente, las hembras que presentaron el abdomen visiblemente hinchado y de color rojo se extrajeron cuidadosamente con un aspirador manual y se colocaron en una jaula donde se alimentaron con solución de sacarosa al 10%, durante un período de 15 a 20 días.

Extracción de RNA de poblaciones de mosquitos y evaluación de la infección. A los 15 y 20 días post-infección (dpi), un grupo de 40 hembras fue retirado de la jaula para ser analizado. Los ejemplares fueron sacrificados en frío y se aisló el RNA total de cada muestra utilizando el kit "RNAagents Total RNA Isolation System" (Promega) según protocolo del fabricante, con la precipitación final del RNA mediante isopropanol y lavados con etanol al 75%. En cada extracción se incluyeron controles positivos (200 µL de sobrenadante del cultivo de DENV-3) y negativos (mezcla de reacción sin muestra). El precipitado se secó en un Concentrador de ADN modelo Savant DNA120 (Thermo Electron Corporation), y se disolvió en agua conteniendo inhibidor de RNAsas 40u/µL (Promega).

Para confirmar la infección en las hembras de *Ae. aegypti* expuestas al proceso artificial, se sometió cada muestra de RNA total a Nested RT-PCR con los cebadores específicos para virus dengue (Tabla I) y se evaluó la presencia del virus (11), para ello se utilizó el Kit Access RT-PCR (Promega). El RNA viral se retrotranscribió a DNA complementario (cDNA), previo a la amplificación enzimática de DNA, usando una transcriptasa reversa (RT) y el cebador sentido consenso D2. La primera reacción se llevó a cabo durante 45 min a 48°C, seguida de un paso de desnaturalización enzimática de 2 min a 94°C. Para la amplificación de los cDNA, las muestras fueron incubadas

por 30 seg a 94°C, 1 min. a 55°C y 2 min a 72°C durante 30 ciclos y un paso final de extensión de 10 min. a 72°C. Seguido de una PCR-anidada utilizando los cebadores D1 y TS3 con ciclos de desnaturalización por 30 seg a 94°C, seguido de 1 min a 55°C y 2 min. a 72°C para la extensión, que se repitió durante 18 ciclos, para luego terminar con un paso final de 10 min. a 72°C. Tanto los productos de la RT-PCR como la PCR-anidada fueron evaluadas en geles de agarosa al 2%.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la transcripción reversa y amplificación del serotipo 3 del virus Dengue.

Cebadores	Secuencia (5' - 3')	Longitud (nt.)	Tm (°C)	%GC	Tamaño del amplicón (pb.)
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCAGAAACCG	28	62,27	50,00	511
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC	29	59,88	44,83	511
TS3	TAACATCATCATGAGACAGACC	22	49,52	40,91	290

nt: nucleótidos Tm: Temperatura de fusión %GC: % Guanina-Citosina pb.: pares de bases

Expresión de genes *dcr2* y *ago2*. Para la evaluación de la respuesta inmune innata en los mosquitos con 15 y 20 días post-infección, los cDNA necesarios para la reacción de RT-PCR, se sintetizaron a partir de los RNAs aislados, utilizando el kit "ImProm-II™ Reverse Transcription System" (Promega) y el sistema de cebadores Oligo (dT)₁₅ para obtener una población homogénea de cDNA contentiva de las secuencias necesarias para la amplificación por PCR en tiempo real.

El cDNA total obtenido se sometió a la reacción de cuantificación relativa mediante PCR en tiempo real utilizando un equipo abierto ABI 7500 (Applied Biosystem) aplicando el kit Plexor™ Two-Step qRT-PCR System (Promega) según indicaciones del fabricante. Para elaborar los cebadores correspondientes al gen *ago-2* se utilizó el código del GenBank XM_001662504 obteniendo así mediante el programa Plexor Primer Design (Promega) dos cebadores que permiten la amplificación una región localizada entre los nt 827 - 934 generando un producto de 107 pb y para el gen *dcr-2* se utilizó el código del GenBank: AY713296 para generar dos cebadores que permiten la amplificación de una región localizada entre los nt 705 - 771 para la obtención de un producto de 66pb (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Cebadores construidos para la amplificación por qRT-PCR del gen *ago-2* de *Ae. aegypti*.

Cebadores	Secuencia (5' - 3')	Longitud (nt.)	Tm (°C)	%GC
Sentido	5'-FAM™-iso-dC CAGTACCTCGCACATGAACCTCG	22	63	54,55
Antisentido	ATCAAAGCGTCCGTCCATCACA	22	64	50,00

Tabla 3. Cebadores construidos para la amplificación por qRT-PCR del gen *dcr-2* de *Ae. aegypti*.

Cebadores	Secuencia (5' - 3')	Longitud (nt.)	Tm (°C)	%GC
Sentido	5'-FAM™-iso-dC AGTAACATTCCAGAAAGACCGATTACAC	28	63	39,29
Antisentido	GGAACAATTTCTGAGGGTTCCTAAGT	26	63	42,31

El proceso de PCR en tiempo real constó de dos etapas principales, la primera de un único ciclo a 95°C por 2 minutos para la activación de la DNA polimerasa y desactivación de la transcriptasa reversa y una segunda etapa compuesta por tres pasos: el primero, se llevó a cabo en 30 segundos a 95°C, para garantizar la desnaturalización de los cDNA; y el segundo paso, realizado a 60°C por 45 seg. y 70°C por 60 seg, durante 40 ciclos repetitivos, según indicación del manual de instrucciones del software ABI 7500 Relative Quantification Guide. El análisis estadístico de los datos fue realizado con el mismo software del equipo mediante la prueba de t de Student para la determinación de las diferencias entre las medias muestrales, fijando antes del proceso un nivel de confianza del 95% y tomando como valores estadísticamente significativos todos aquellos con p<0,05 (12).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Figs. 1A y 1C, se muestra el sistema de infección artificial realizado en 150 hembras de *Ae. aegypti* con 5 días post-emergencia, siguiendo el protocolo descrito por Fernández, (9). Pasados los veinte minutos (20 min) de alimentación se lograron retirar 92 (62%) hembras con el abdomen visiblemente hinchado y rojizo (Fig. 1B), que se colocaron en jaulas de mantenimiento (Fig. 1D) con solución azucarada al 10% por los 15 y 20 dpi hasta verificar la infección.

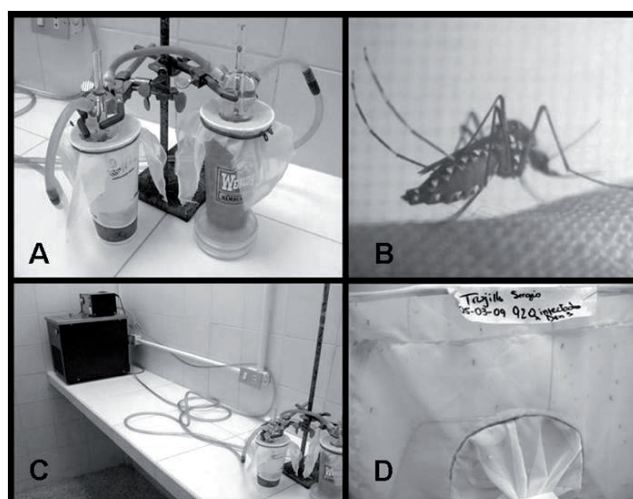


Figura 1. (A)(C) Sistema de infección artificial compuesto por un baño de circulación de agua caliente, mangueras de silicón, y alimentadores de vidrio. (B) Hembra de *Ae. aegypti* post-infección, con abdomen visiblemente ingurgitado. (D) Jaulas utilizadas para el mantenimiento de las hembras después del proceso de infección artificial.

La presencia del virus en las poblaciones de mosquito sometidos a la infección con DENV-3 se evidenció al detectar los productos de amplificación en gel de agarosa al 2% (Fig. 2) donde la RT-PCR genero un producto de 511pb y la Nested-PCR para confirmar el serotipo un producto de 290pb. Se puede afirmar que ambos grupos experimentales (15 dpi y 20 dpi) fueron exitosamente infectados de forma artificial debido a la presencia del producto de amplificación generado mediante la RT-PCR y la Nested-PCR.

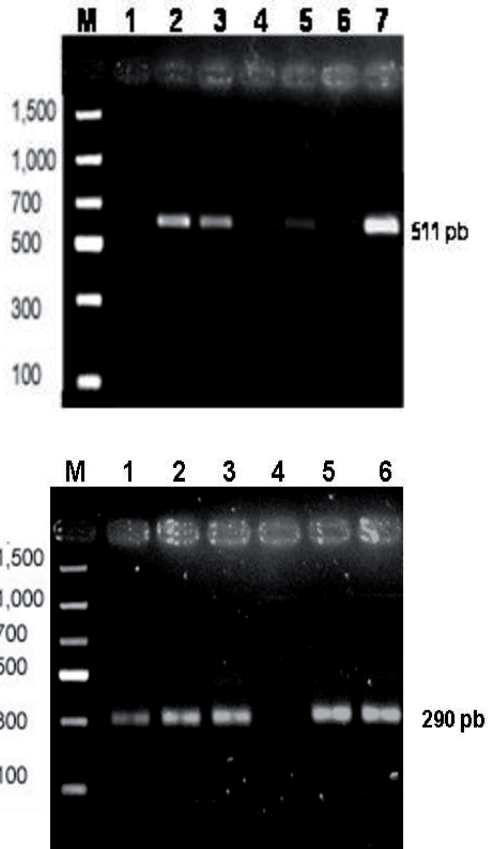


Figura 2. Amplificación del genoma del DENV-3 en una población de *A. aegypti*. (A) Amplificación del virus dengue con los cebadores D1 y D2; (M) marcador de peso molecular. En los carriles se encuentran las muestras de la población sometida al proceso de infección artificial (1-5), no infectados (6), y el control positivo (7). (B) Segunda amplificación específica de serotipo utilizando los cebadores D1 y TS3. (M) Marcador de peso molecular, los carriles 1 al 3 corresponden a la población infectada artificialmente con DENV-3, carril 4 no infectados y los carriles 5 y 6 contienen el control positivo para dicha amplificación.

Para examinar los mecanismos de respuesta inmune en una población de hembras de *Ae. aegypti* infectadas con virus DENV-3 (15 dpi y 20 dpi), se procedió a utilizar la técnica de PCR en tiempo real para cuantificar y comparar, con un grupo control, la expresión de dos genes relacionados directamente con la respuesta inmune antiviral y con la maquinaria de RNAi descrita anteriormente.

Los resultados obtenidos en el presente estudio revelan que no hubo activación de las vías de RNAi por parte de la

población de mosquitos infectados, con respecto al control sin infectar. En la Fig. 3 se observa que para el gen *dcr-2*, los resultados de cuantificación relativa no presentaron diferencias significativas en los grupos experimentales de mosquitos de la región de Trujillo, con respecto al grupo control (sin infectar). Estos resultados sugieren la presencia en el virus DENV-3 de algún mecanismo de inhibición o evasión de la vía de RNAi.

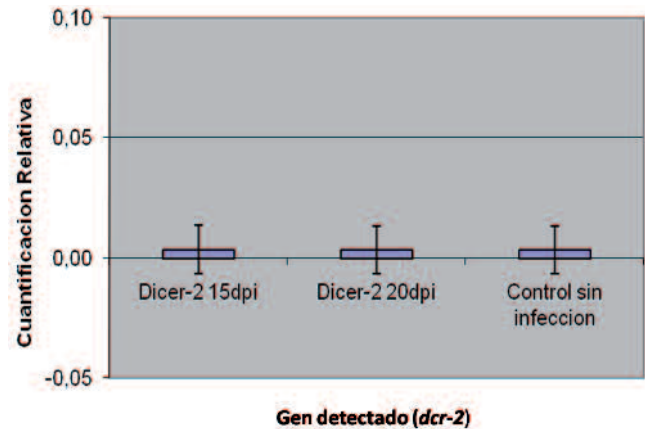


Figura 3. Cuantificación relativa del gen *dcr-2* en los 2 grupos experimentales y el grupo control de mosquitos de la localidad de Trujillo.

Adicionalmente estos resultados se complementan con la obtención de un patrón similar para el gen *ago-2* en la misma población estudiada. En la Fig. 4 se puede detallar la expresión de dicho gen, sin ningún cambio significativo en los grupos experimentales con respecto al grupo control. Ambos genes, *dcr-2* y *ago-2*, se mantuvieron en niveles basales de expresión genética a pesar de que la población infectada presentaba una viremia diseminada (presente en todo el cuerpo del mosquito) y bastante notable debido a que la concentración de RNA total en la población infectada duplicó la obtenida en la población control sin infectar, lo que permite inferir que se presentó una rápida replicación viral con altas concentraciones de viriones circulantes en el cuerpo del vector infectado, lo que es equivalente a un alto número de copias de RNA viral dentro de cada individuo de la población sometida al tratamiento experimental.

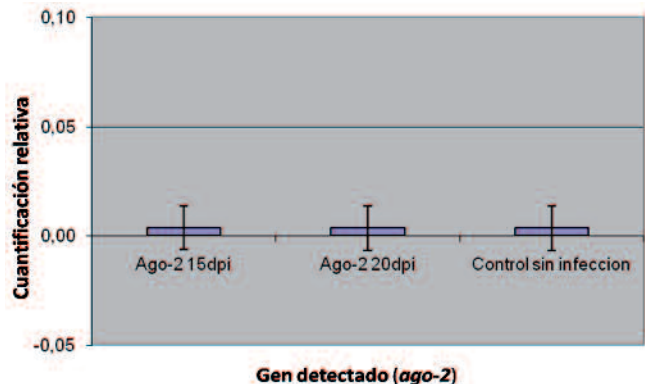


Figura 4. Cuantificación relativa del gen *ago-2* en la población de *Ae. aegypti* de Trujillo.

Los resultados obtenidos permiten plantear que el virus DENV-3 utilizado en este estudio, posee la capacidad de inhibir o evadir los mecanismos de RNAi del mosquito. Adicionalmente, sugieren que la inhibición de estos mecanismos antivirales debe estar directamente asociada a un bloqueo en la expresión de las proteínas citoplasmáticas de detección del material genético viral (*dcr-2* y *ago-2*), o en su defecto, a la evasión de las mismas mediante el camuflaje de la partícula viral. De esta forma se evita el contacto directo con los mecanismos de detección citoplasmáticos, produciéndose un aumento en la replicación viral y en la concentración de viriones dentro del cuerpo del mosquito.

Las teorías que surgen para explicar la capacidad evasora de los virus frente al sistema inmune de los insectos vectores son variadas. Diversos estudios señalan que la actividad antiviral no está mediada únicamente por los mecanismos de RNAi. Trabajos realizados (13,14) sugieren que estos patrones de inhibición ya han sido observados con anterioridad en algunas especies del reino animalia y plantae. Muchos de los virus que infectan a las plantas o virus patógenos de insectos expresan proteínas que son capaces de suprimir la repuesta de RNAi del hospedador mediante el bloqueo de los pasos clave del proceso, uniendo dsRNA largos o siRNA; estos supresores virales de los mecanismos de RNAi (VSR) son cruciales para la replicación y propagación de algunos virus.

Trabajos futuros en este campo apuntan hacia el descubrimiento de moléculas efectoras antivirales bajo el control de las vías de respuesta inmune Toll, JAK/STAT e IMD, las cuales pueden ser de gran utilidad en la ingeniería de mosquitos Arbovirus-resistentes (15,16).

Otros estudios señalan que los RNAi generados a partir de ciertas secuencias genómicas presentan poca actividad biológica debido a la incapacidad de ser reconocidos por las enzimas citoplasmáticas (DNAsas y RNAsas). Esto podría apuntar al hecho de tener secuencias de ácidos nucleicos resistentes a los mecanismos de RNAi, lo que impediría su degradación, permitiendo un aumento en la replicación viral (esto sin la necesidad de expresar VSRs) (17).

A pesar de que no se conocen con exactitud las interacciones virus-vector antes mencionadas, se ha demostrado en algunos estudios que los arbovirus parecen no haber evolucionado para suprimir los mecanismos de RNAi, pero si, para evadir este tipo de respuesta inmune. Un reporte reciente (7) sugiere que el virus DENV-2 es capaz de evadir las vías de respuesta inmune mediadas por RNAi en mosquitos de la especie *Ae. aegypti* y en cultivos de células de mosquito. Sin embargo, los sucesos que componen estos mecanismos de interacción virus-vector todavía permanecen sin dilucidar a cabalidad. Por otro lado, este mismo estudio sugiere que debido a que la replicación de alphavirus y algunos flavivirus se realiza dentro de sistemas de membranas o vesículas, la detección por parte de las proteínas asociadas a la maquinaria de RNAi podría verse dramáticamente afectada ya que la partícula viral madura no entraría en contacto con el citoplasma en ninguna de las etapas de su replicación. Por

tanto, los RNA exógenos virales estarían protegidos de la detección mediada por la proteína Dicer-2, y su posterior degradación por la RNasa Argonauta-2 y el complejo RISC.

Otras investigaciones señalan que inicialmente se pensaba que la replicación de los *Flavivirus* era exclusivamente citoplasmática, y que ocurría dentro de complejos de replicación unidos a membranas en el citoplasma del hospedador (18). Mediante análisis de microscopía y marcaje radiactivo del RNA viral lograron demostrar que una proporción significativa (alrededor del 20%) de la actividad RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRp) de células infectadas con virus del Oeste del Nilo (WNV), encefalitis equina del Japón (JEV) y DENV se realiza a nivel nuclear. Consistente con esta afirmación, las mayores proteínas replicasas NS3 y NS5 de JEV fueron localizadas dentro del núcleo. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el RNA viral, al menos en los *Flavivirus*, tiene poco contacto con los elementos de respuesta inmune innata presentes únicamente en el citoplasma de la célula, por lo que la replicación viral dentro de los vectores no se ve disminuida permitiendo así la diseminación del agente infeccioso.

Por otro lado, inmediatamente después de la infección celular, los *Flavivirus* como el WNV y DENV inducen una proliferación de los sistemas membranosos que se convierten en el sitio de replicación del RNA viral, por tanto la presencia de membranas adicionales entre el sitio replicativo del RNA viral y el citoplasma podría prevenir que los siRNA alcancen los RNA virales sintetizados que se encuentran activos (19). En contraste, cuando se utilizó la electroporación como técnica de inserción de siRNA en las células infectadas de WNV, se observó que los ácidos nucleicos y los componentes citoplasmáticos cruzaron las estructuras membranosas como el núcleo, retículo endoplasmático y vesículas membranosas, inducidas potencialmente por WNV a través de poros producidos por el choque eléctrico, entrando en contacto entre ellos y disminuyendo significativamente el título viral por acción de la maquinaria de RNAi.

Por otro lado, utilizando microscopia electrónica se han encontrado vesículas inducidas por el virus dengue, complejos membranosos y partículas virales derivadas del retículo endoplasmático. A su vez detectaron dsRNA, un marcador presuntivo de la replicación dentro de las vesículas inducidas por el virus (20). Asimismo, las tomografías electrónicas (ET) mostraron que las estructuras membranosas inducidas por el virus DENV parecen ser parte de la red derivada del retículo endoplasmático. Las ET también indicaron la presencia de poros en las vesículas que pudieran estar liberando el RNA viral sintetizado *de novo* y a su vez, la gemación de las partículas virales en las membranas del retículo endoplasmático (RE) directamente opuestas a los poros vesiculares. Es por ello, que concluyeron que el DENV no solo aumenta el número de cuerpos membranosos en la célula, sino que también

modifica la estructura membranosa del RE para promover la replicación y la encapsulación eficiente del genoma en las nuevas partículas virales. Esta arquitectura de la replicación del DENV y los sitios de ensamblaje podrían explicar la coordinación de los distintos pasos del ciclo de replicación de los *Flavivirus*.

Mientras se dilucidan los mecanismos que rigen la infección, diseminación y transmisión viral, este trabajo de investigación se inclina hacia la hipótesis relacionada con la replicación viral secuestrada en membranas y el aumento de los cuerpos membranosos dentro de la célula infectada con la subsecuente modificación de la arquitectura de los mismos, ya que muchos de los virus incluidos en la familia *Flaviviridae* poseen este tipo de mecanismo de infección y mantenimiento dentro de la célula del hospedador, sin entrar en contacto con el citoplasma celular. De ésta manera, evitan el contacto con los entes centinelas encargados de la destrucción viral de la maquinaria de RNAi, entre los cuales se encuentran *dcr-2* y *ago-2*, y donde se comprobó la capacidad del virus DENV-3 de emplear mecanismos de "evasión" o "camuflaje" para asegurar su mantenimiento en el tiempo en un juego de relaciones e interacciones entre este y su vector.

Por lo tanto, se sugiere para confirmar de las interrogantes que emergen a partir del presente estudio y cumplir con la meta final, que es el control vectorial (para controlar la diseminación viral), evaluar la expresión de otros genes relacionados con la maquinaria de RNAi y otras vías de respuesta inmune innata en insectos como Toll e IMD, para comprender la respuesta inmune del vector ante el virus y las distintas interacciones fisiológicas y genéticas que actúan en el proceso. Además, se debería comprobar las variaciones de la expresión de estos genes en distintas poblaciones de *Ae. Aegypti*, ya que la capacidad y competencia vectorial, es decir la capacidad de infección y capacidad de transmitir el virus varía entre poblaciones sometidas a distintas presiones selectivas por lo que debería haber poblaciones refractarias en distintas proporciones a la infección con virus dengue disminuyendo o aumentando su tasa de transmisión mediada por el vector.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Carabobo, en particular al Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (Biomed-UC), principalmente al laboratorio 4 de la Sección de Biología Molecular. Al FONACIT, por el financiamiento de este proyecto y otros mas a través del Proyecto de Grupo. Al Instituto José Witremundo Torrealba de la Universidad de los Andes a cargo de la Dra. Elina Rojas. Al Laboratorio de Entomología de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental del Estado Aragua. Al Laboratorio de Biología de Virus del Centro de Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), coordinado por el Dr. Ferdinando Liprandi, y en especial a la Lic. Marlene Gerder. A la sección de Caprinos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Central de Venezuela Núcleo Aragua, en especial al Dr. Alejandro

Salvador. A la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología por brindar su apoyo a través de la partida 407 para el financiamiento parcial de este proyecto de investigación.

Financiamiento FONACYT a través del Proyecto de grupo N° G-2001000999 "Estudio de la diversidad genética y susceptibilidad a la infección de mosquitos transmisores del dengue y la malaria y Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo partida 407 de ayudas a investigación.

REFERENCIAS

1. Montes T. Actualización en dengue: Parte 1. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 2001; 21(1), 39-45.
2. Montes T. Actualización en dengue: Parte 2. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 2001; 21(2): 78-84.
3. Vitarana UT, Jayasekera N, Withane N, Gubler DJ. Finding the cause of dengue hemorrhagic fever outbreaks in Sri Lanka. Arbovirus Research in Australia. 1993; 6, 125-29.
4. De Silva A.M, Sivananthan K, Withana N, Vorndam V, Gubler DJ. Dengue 3 virus is responsible for recent epidemics of dengue hemorrhagic fever in Sri Lanka. En Annual Meeting of the American Society for Tropical Medicine and Higiene; San Juan, Puerto Rico 1998.
5. Dostert C, Jouanguy E, Irving P, Troxler L, Galiana-Arnoux D, Hetru C, Hoffmann JA et al. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. Nat Immunol. 2005; 6(9):863-4.
6. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double stranded RNA. Nature. 2004; 431(7006):343-9.
7. Sanchez-Vargas I, Scott JC, Poole-Smith BK, Franz AWE, Barbosa-Solomieu V, et al. Dengue Virus Type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. PLoS Pathog. 2009; 5: e1000299. doi:10.1371/journal.ppat.1000299.
8. World Health Organization and Panamerican Health Organization. Regional Update of Dengue (17 de marzo de 2009). [En línea] World Health Organization [Accesado en 19 de abril 2009] Disponible en: www.paho.org/english/ad/dpc/cd/den_reg_rpt_2009_03_17.pdf
9. Fernández Z, Moncayo A, Forattini OP, Weaver S. Susceptibility of urban and rural strains of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo State, Brazil to infection by Dengue -1 and - 2 viruses. J Med Entomol. 2004; 41(5):961-4.
10. Caceda ER, Kochel TJ. Application of modified shell vial culture procedure for arbovirus detection. PLoS ONE. 2007; 2 (3): e1034. doi:10.1371/journal.pone.0001034.
11. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992; 30(3):545-51

12. Manual de hardware y software de ABI 7300/7500/7500 Fast Real Time PCR system. Site preparation guide (Relative Quantification assay). Copyright 2005 Applied Biosystem. All rights reserved.
13. Ding, S. W, Voinnet, O. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*. 2007; 130(3): 413-26.
14. Gordon KH, Waterhouse PM. Small RNA viruses of insects: expression in plants and RNA silencing. *Adv Virus Res*. 2006; 68, 459-502.
15. Franz AW, Sanchez-Vargas I, Adelman ZN, Blair CD, Beaty BJ, James AA, Olson KE. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci*. 2006; 103, 4198-4203.
16. Travanty EA, Adelman ZN, Franz AW, Keene KM, Beaty BJ, Blair CD, et al. Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004; 34(7):607-13.
17. Flynt A, Liu N, Martin R, Lai EC. Dicing of viral replication intermediates during silencing of latent *Drosophila* viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(13):5270-5
18. Uchil PD, Kumar A, Satchidanandam V. Nuclear localization of *flavivirus* RNA synthesis in infected cells. *J Virol*. 2006; 80(11):5451-64.
19. Geiss B, Pierson T, Diamond M. Actively replicating West Nile virus is resistant to cytoplasmic delivery of siRNA. *Virology J*. 2005; 2, 53. doi:10.1186/1743-422X-2-53.
20. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck C, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*. 2009;5(4):365-75.