

ARTICULO

Susceptibilidad a la infección oral por virus DEN-1 en poblaciones de *Aedes aegypti* de Venezuela

Martha Pernaleté¹, Zoraida Fernández², María Gabriela Rivera¹, ¹Jennifer Zarzour¹, ¹Johanny Ruiz¹, José Rivero¹, Elina Rojas³, Yasmín Rubio-Palis^{1,4}, Ferdinando Liprandi⁵, Flor Herrera¹.

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-UC), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua,

²Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología, FACYT, Universidad de Carabobo,

³Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba", Universidad de los Andes, Núcleo Trujillo,

⁴Dirección de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular para la Salud, Maracay, Estado Aragua,

⁵Centro de Microbiología y Biología de Virus, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Correspondencia: Flor Herrera

E-mail: flormhq@gmail.com

Financiamiento: Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) y el Inter-American Institute for Global Change Research/CRN-048.

RESUMEN

La enfermedad del dengue es causada por cualquiera de los cuatro serotipos del virus dengue, un miembro de la familia Flaviviridae, y transmitido a los huéspedes humanos por la picadura del mosquito *Aedes aegypti* (L.) infectado, ocasionando un grave problema de salud pública. Debido a que no existe una vacuna efectiva, las estrategias de control están dirigidas hacia el vector. En este trabajo se planteó estudiar la susceptibilidad a la infección oral de diferentes poblaciones de *Ae. aegypti* del país, para virus DEN-1 y determinar la expresión de uno de los principales genes del sistema inmune de los mosquitos (defensina) en virtud de aportar conocimientos en la dinámica de la relación vector-patógeno. Para ello se estandarizó un protocolo de alimentación que permitió a los mosquitos adquirir la infección viral y se utilizó la técnica de RT-PCR para la determinación, en estos insectos, del ARN total del virus dengue y del ARN mensajero de la defensina. Se observaron diferencias altamente significativas en cuanto a la susceptibilidad a la infección oral con virus DEN-1, entre las cinco poblaciones de mosquito estudiadas provenientes de los estados Aragua, Trujillo, Falcón, Bolívar y la control (cepa Rockefeller), siendo la más susceptible la población del estado Bolívar con 94% de infección. La expresión del gen defensina se presentó en sólo 5% de los

mosquitos infectados con virus dengue, lo que pudiera sugerir la existencia de un mecanismo de interferencia viral en estos insectos.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, virus dengue, susceptibilidad oral, defensiva

ABSTRACT

Susceptibility to oral infection by DEN-1 virus in *Aedes aegypti* populations in Venezuela

Dengue fever is caused by any one of four serotypes of the dengue virus, a member of the Flaviviridae family, and transmitted to human hosts by the bite of an infected *Aedes aegypti* mosquito, originating a serious public health problem. Since there is no an effective dengue vaccine available, control strategies are directed against the vector. The aim of this work was to study the susceptibility to oral infection with dengue 1 virus of different populations of *Aedes aegypti* of Venezuela and to determine the expression of one of the important gene (defensin) in the mosquito immune system. To this end, a feeding protocol was standardized to infect mosquitoes with dengue virus. The total viral RNA and the messenger RNA for defensin were determined in the mosquitoes by RT-PCR. It was observed highly significant differences in susceptibility to oral infection with dengue 1 virus among five studied populations of mosquitoes in the states of Aragua, Trujillo, Falcón, Bolívar and the control strain (Rockefeller). The most susceptible population was found in Bolivar state with 94% of infection. Expression of the defensin gene was only found in 5% of the infected mosquitoes with dengue virus which may suggest the existence of a mechanism of viral interference in these insects.

Key words: *Aedes aegypti*, dengue virus, oral susceptibility, defensin

INTRODUCCIÓN

El dengue es un arbovirus de la familia Flaviviridae transmitido al hombre, en las Américas, por la picadura del mosquito *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae), ocasionando un grave problema de salud pública ya que genera una enfermedad de rápida dispersión en las regiones tropicales. Se conocen cuatro serotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4) capaces de infectar y causar la enfermedad que se caracteriza por presentar un amplio espectro clínico, que va desde una fiebre aguda indiferenciada (FD), hasta Fiebre Hemorrágica (FHD) y/o Síndrome de Choque por Dengue (SCD). Anualmente un estimado de 100 millones de personas se infecta con FD y, aproximadamente, 500.000 con FHD en el mundo entero (1,2). En Venezuela, el dengue es endémico desde hace 60 años, a partir de la epidemia registrada durante 1941-1946 (3). Sin embargo, la reemergencia de la enfermedad y la emergencia de la FHD y el SCD se registra a partir de 1989 (OPS 1990) y, lamentablemente, el número de individuos en riesgo de ser infectados se ha incrementado con el crecimiento urbano descontrolado, la circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus y la dispersión del mosquito *Ae. aegypti* a lo largo de nuestra geografía.

Los esfuerzos para prevenir la transmisión del dengue son obstaculizados, principalmente, porque no hay una vacuna disponible, por lo que es crucial, además de mantener una vigilancia de laboratorio activa, estudiar la ecología y la biología de *Ae. aegypti*, muy especialmente su competencia como vector (4).

Uno de los factores fundamentales que determina la competencia de un vector es la susceptibilidad a infectarse al picar a un hombre portador del virus. Los virus

que son ingeridos por un vector, cuando se alimenta con sangre humana infectada, deben vencer varias barreras (5,6). Inicialmente, llegan al intestino, donde se replican y atraviesan esta primera barrera para llegar al hemocele. Seguidamente, se replican nuevamente y se diseminan en todo el cuerpo del mosquito y finalmente, alcanzan las glándulas salivales. Allí están listos para ser transmitidos a otro huésped susceptible cuando éste, al ser picado por un vector, reciba la saliva infectada del mismo. Ahora bien, una población normal de mosquitos contendrá los fenotipos que van desde individuos altamente susceptibles hasta muy refractarios a la infección viral. Por lo tanto, en estas condiciones, una epidemia tendrá lugar cuando una mayor proporción de mosquitos con genotipo de alta susceptibilidad esta presente en la población. Esto permite inferir que el estudio de la susceptibilidad a la infección oral por virus dengue en poblaciones de *Ae. aegypti* de una región determinada, puede ser útil en la detección de zonas de mayor riesgo epidémico; por consiguiente, puede contribuir al desarrollo de estrategias de control mejor adaptadas a las condiciones particulares de cada región.

Ha sido demostrado que poblaciones de *Ae. aegypti* de diferentes orígenes geográficos presentan variaciones en sus susceptibilidades a la infección oral con virus dengue y, por lo tanto, en la habilidad de transmitir la infección (5, 7-10). Estas variaciones son consecuencia de una heterogeneidad genética entre las poblaciones; de tal manera que, la estructura genética de las poblaciones y los factores ambientales son determinantes en la competencia vectorial (11-13). Todo esto indica que la constitución genética de los vectores es importante para el desarrollo de sus mecanismos de defensa contra el virus. En este sentido, los mosquitos expresan ciertos genes de inmunidad que al ser regulados positiva o negativamente afectan la susceptibilidad de ellos hacia el agente patógeno (14). Uno de estos genes es defensina ya que su expresión se puede incrementar en presencia de patógenos como bacterias, por lo que se le considera un blanco posible de manipulación genética para el control de enfermedades transmitidas por vectores (15).

En esta investigación, se estudió la susceptibilidad a la infección oral por virus Dengue-1 en poblaciones de *Ae. aegypti*, provenientes de cuatro estados de Venezuela (Aragua, Bolívar, Falcón y Trujillo) y, asimismo, se evaluó, en una muestra de mosquitos, si esta infección activa la síntesis del gen defensina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de mosquitos. Se trabajó con cepas de *Ae. aegypti* provenientes de los estados Aragua (cepa: Las Playitas), Bolívar (cepa: Tumeremo), Falcón (cepa: Los Pedros) y Trujillo, (cepa: Trujillo) de Venezuela (Tabla 1).

Tabla 1. Sitios de colecta: Estados, localidades o ordenadas geográficas

Estado	Localidad	Latitud	Longitud
Aragua	Las Playitas	-67,5914	10,2553
Bolívar	Tumeremo	-61,5049	7,27414
Falcón	Los Pedros	-69,0461	10,8036
Trujillo	Trujillo	-70,6239	9,28081

Las larvas fueron colectadas en las localidades seleccionadas, entre abril de 2005 hasta abril de 2006, trasladadas al insectario del Instituto de Altos Estudios en Salud Pública “Dr. Arnoldo Gabaldón” en Maracay, y criadas hasta alcanzar el estadio adulto; se alimentaron con sangre de paloma a fin de obtener progenie. Una vez obtenido el primer lote de huevos, estos se trasladaban al insectario “Octavio Suárez” del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), donde se desarrollaron hasta obtener la primera generación (F1), la cual fue mantenida, en condiciones controladas de temperatura (26°C), humedad relativa (65%), fotoperíodo (12 horas luz / 12 horas oscuridad) y alimentación con solución de glucosa al 10%. Adicionalmente, se empleó una cepa de *Ae. aegypti* control de la Fundación Rockefeller, donada en 1961 al IVIC. Para el experimento de infección se utilizaron hembras de cinco a siete días de edad.

Virus. Se utilizó la cepa DEN-1 (23644) aislada en 2004 en suero de paciente del Estado Aragua, por el Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV), ubicado en el BIOMED-UC. La muestra fue nuevamente inoculada (pase 2) en cultivo de células C6/36 (clon HT) derivadas de *Aedes albopictus* (Skuse), bajo condiciones controladas de nutrientes, para aumentar la concentración de partículas virales. El sobrenadante del cultivo de células fue colectado, centrifugado por 5 min a 1000 rpm, distribuido en crioviales de 1,5 mL y congelado a - 70°C hasta su uso. El título viral fue determinado mediante inmunofluorescencia directa utilizando policlonales específicos donados por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Puerto Rico.

Infección de mosquitos: La sangre fresca de carnero, colectada con el anticoagulante EDTA, fue lavada con solución salina fosfatada (PBS: phosphate tampón saline) pH 7,2, y centrifugada tres veces entre cada lavado. Los glóbulos rojos obtenidos se refrigeraron a 4°C hasta su utilización (16). Para la infección de la cepa Las Playitas (primera cepa) se preparó la solución sangre-virus con 200 µL de Sacarosa, 466 µL PBS, 660 µL de eritrocitos de cordero, 660 µL de virus y 25 µL de ATP (5 mmol/L) (16-19). Con el objetivo de mejorar los porcentajes de infección, las restantes cepas de mosquito fueron infectadas con una solución preparada con sangre/virus/ATP a razón de 1:1:0,05 mL, respectivamente (Dra. Marcia de Castro, Instituto Oswaldo Cruz-Brasil, comunicación verbal, 2005).

La solución sangre-virus se colocó en el alimentador artificial mantenido a 37°C, para atraer a los mosquitos. Las hembras de *Ae. aegypti*, fueron alimentadas durante una hora y media y las ingurgitadas, se mantuvieron durante 15 días en

el insectario bajo condiciones controladas alimentándolas con solución de glucosa al 10%.

Los porcentajes de infección y diseminación del virus se determinaron en cuerpo y patas de los mosquitos, respectivamente, mientras que la transmisión potencial fue evaluada en la saliva. Para la extracción de la saliva, se insertó la probóscis del mosquito, en un capilar que contenía aceite mineral. Cada mosquito se dejó en el capilar durante 20 min para luego realizar la extracción del virus (19). Todos los tubos que contenían las diferentes muestras del mosquito, (cuerpo, patas y saliva) fueron rotuladas y almacenadas a -70°C hasta su procesamiento.

Para la determinación de la expresión del gen defensina, se trabajó con dos grupos de 20 mosquitos. Uno fue alimentado con la solución sangre-virus y el otro con esta solución sin virus. Debido a que la expresión del gen defensina no es constante, se hizo necesario determinar paralelamente otro gen, cuya expresión fuera constitutiva en el mosquito y que sirviera como control positivo. En este caso se escogió al gen tubulina para verificar la validez del ensayo. Con esto se buscaba ver las diferencias en la expresión del gen defensina, en presencia y ausencia del virus dengue.

Extracción y amplificación del ARN total del virus. Se extrajo el ARN viral a partir de las muestras de mosquito (cuerpo, patas y saliva), utilizando el estuche comercial RNAgents (Total RNA Isolation System, Promega), con algunas modificaciones (20). Posteriormente, utilizando el estuche Access RT-PCR System (Promega), fue posible convertir el ARN viral presente en cada muestra, en ADN copia (ADNc) para su posterior amplificación en un sólo tubo de reacción, siguiendo una modificación del protocolo propuesto por Lanciotti y col. (1992) (21). Se preparó un volumen de 22.5 μl de la mezcla de la reacción con: 2.5 μl de la muestra de ARN, 5 μl del tampón 5x (AMV/Tfl), 1 mmol/L MgSO_4 , 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP's, 2 U RNAsin, 6.5 pmoles de cada cebador [D1 y D2 (22)], 2.5 U Tfl DNA polimerasa, 2.5 U de AMV reversa transcriptasa y agua libre de nucleasas. La reacción fue llevada a cabo en un termociclador PTC-200-96 (MJ Research).

Luego, se realizó una segunda amplificación para identificar al serotipo viral. Se prepararon 25 μL de la mezcla de la reacción que contenía: 2.5 μL del amplicón diluido 1/100, 1.25 U DNA *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen), 2.5 μL del tampón 10 x, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 216 $\mu\text{mol/L}$ dNTP's, agua libre de nucleasas, 10 pmoles del cebador D1 y 12.5 pmoles de cada uno de los cebadores (TS1, TS2, TS3 y TS4) usados para la serotipificación del virus (21). La reacción fue llevada a cabo según Lanciotti y col. (1992) (21), con algunas variaciones en los tiempos de los ciclos en el termociclador (21). Para evidenciar los productos amplificados se hizo una corrida en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y se visualizaron en el Gel Doc 1000 (BIO-RAD).

Detección del ARN mensajero de los genes defensina y tubulina. Para determinar la expresión de dichos genes, se realizó de igual forma, un ensayo de RT-PCR para transformar el ARN mensajero, que codifica la proteína (defensina o tubulina), en ADNc y amplificarlo en la reacción de PCR.

Las condiciones de la mezcla de reacción para la amplificación de dichos genes, fueron las mismas que se emplearon en la reacción de amplificación viral inicial, con excepción en cada caso, de los cebadores correspondientes a los genes

defensina y tubulina cuya secuencia se describe seguidamente. Otra modificación realizada, por tratarse de una amplificación selectiva del mensajero, fue la incorporación de 0.25 µg de oligo dT en la mezcla de reacción.

Secuencia de los cebadores: [tubulina (Forward) 5' - GCG TGA ATG TAT CTC CGT AC - 3' y tubulina (Reverse) 5' - CAT CGA CGA TTT CCT TTC CG - 3'], (diseñados en el laboratorio con ayuda de la secuencia publicada en el GenBank, N° acceso: AY432371) [defensina (Forward) 5'- TTC AAT TCC ACA AGC TCG TTC AAG - 3' y defensina (Reverse) 5'- ATT CCG ACA GAC GCA CAC CTT TCT TG - 3'] (15).

La reacción de amplificación de ambos genes se realizó, por separado, bajo las siguientes condiciones: 1 hora a 42°C, desnaturalización por 5 min a 95°C; incubación de las muestras por 30 seg. a 94°C, 40 seg. a 50°C y 40 seg. a 72°C durante 30 ciclos y un paso de extensión final de 5 min. a 72°C (PTC-200-96 MJ Research). El producto de amplificación para tubulina es de 347 pb y para defensina de 359 pb.

Análisis estadístico. Los valores de las frecuencias de infección, dispersión y transmisión de las cepas de mosquitos estudiadas, fueron agrupados en una tabla de contingencia de dimensión 5x2. Para el análisis de los resultados, se utilizó la prueba de homogeneidad basada en el estadístico Chi-cuadrado (χ^2) (22).

RESULTADOS

Poblaciones de *Ae. aegypti* expuestas a la infección con virus DEN-1. Fueron expuestos a la infección un total de 1003 hembras de *Ae. aegypti*, de todas las localidades mencionadas, en 16 ensayos diferentes. Se logró alimentar con sangre infectada (con título de $10^{6.24}$ TCID50/ml) un total de 226 mosquitos, de los cuales sobrevivió el 76%. El número de mosquitos expuestos por ensayo fue similar en todas las oportunidades, utilizándose un promedio de 63 mosquitos por jaula en cada ensayo de infección.

Detección de virus dengue en las cepas de mosquitos alimentadas experimentalmente por la técnica RT-PCR. Los ensayos de RT-PCR evidenciaron elevados porcentajes de infección por el virus en el cuerpo de los mosquitos (Figura 1-A). Los porcentajes encontrados en patas y saliva, que corresponden a los porcentajes de dispersión y transmisión del virus respectivamente, fueron menores (Figura 1-B, 1-C). Aquí se muestran como ejemplo, los resultados obtenidos en muestras de cuerpo, patas y saliva en 23 mosquitos de la población de Tumeremo.

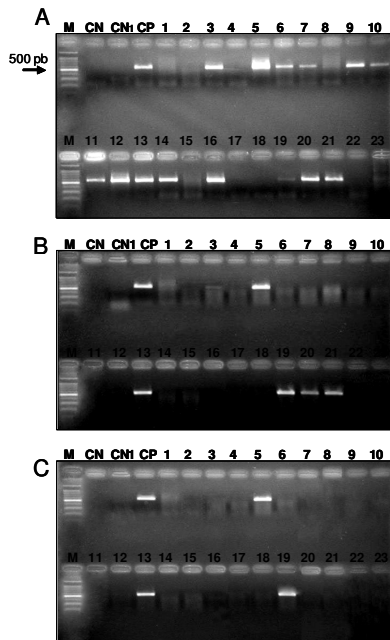


Figura 1. Productos obtenidos por RT-PCR en muestras de cuerpo (A), patas (B) y saliva (C) de la cepa Tumeremo. M: marcador de tamaño molecular (100 pb, Promega), CN: control negativo extracción, CN1: control negativo PCR, CP: control positivo DEN-3, A) Carriles 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 19, 20 y 21: Cuerpos positivos. B) Carriles 5, 13, 19, 20 y 21: Patas positivas. C) Carriles 5, 13 y 19: muestras de saliva positivas.

Porcentajes de infección, diseminación y transmisión. Estos porcentajes se evidencian en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentajes de Infección, diseminación y transmisión del virus DEN-1 en las poblaciones de *Ae. aegypti* evaluadas

Población	Porcentaje de Infección (%) ^a	Porcentaje de Diseminación (%) ^b	Porcentaje de Transmisión (%) ^c
Las Playitas	63[47,4-79,4](26/41)	62[40,9-82,1](16/26)	31[11,1-50,4](8/26)
Tumeremo	94[84,3-100](31/33)	84[69,3-98,4](26/31)	52[32,4-70,8](16/31)
Los Pedros	46[27,8-63,7](16/35)	44[16,3-71,2](7/16)	31[5,4-57,1](5/16)
Trujillo	78[55,8-99,8](14/18)	86[63,8-100](12/14)	57[27,6-86,6](8/14)
Rockefeller (Cepa control)	59[39-78,3](17/29)	88[70-100](15/17)	0[0-0](0/17)

^a (Nº de mosquitos infectados / Nº de mosquitos expuestos)

^b (Nº de mosquitos con infección en las patas / Nº de mosquitos infectados)

^c (Nº de mosquitos con infección en la saliva / Nº de mosquitos infectados)

En cada caso se presenta el intervalo de confianza de 95%; Titulo viral de la alimentación sanguínea: DEN-1 = 6,24 log₁₀ TCID₅₀/mL. ** *P* ≤ 0.01

Las cepas de *Ae. aegypti* de Tumeremo, Trujillo y Las Playitas presentaron los mayores porcentajes de infección (94%, 78% y 63%, respectivamente). La cepa del Estado Falcón presentó el menor índice de infección (46%), entre las cinco poblaciones estudiadas, seguido de la población control Rockefeller, con 59%. En relación al porcentaje de diseminación, la cepa control Rockefeller evidenció el mayor porcentaje con 88%, seguido de Trujillo con 86% y Tumeremo con 84%. Aragua y Falcón presentaron el menor porcentaje de diseminación. En lo referente a la capacidad de transmisión potencial (presencia del virus en la saliva), la cepa de Tumeremo reveló el mayor valor con 52%, seguido por Trujillo con 57%, y por las cepas de Aragua y Falcón cada una con 31%. La cepa Rockefeller mostró 0% de transmisión del virus.

Las poblaciones de mosquitos incluidas en este estudio, presentaron diferencias altamente significativas con relación a la susceptibilidad oral para infección con virus DEN-1. Esto se evidenció a través de la prueba de χ^2 , la cual reveló los siguientes resultados estadísticos para la infección ($p = 0,0004$), diseminación ($p = 0,0073$) y transmisión del virus ($p = 0,0023$).

Análisis para la determinación de los genes tubulina y defensina en la población Las Playitas, Estado Aragua. La expresión de una región del gen defensina se analizó en una muestra, no-infectada con virus dengue, conformada por 20 mosquitos de la cepa *Ae. aegypti* de Las Playitas (Estado Aragua). La expresión fue de 55% con una banda débil de 359 pb, lo que sugiere una expresión en forma parcialmente constitutiva.

Como control positivo se tomó la expresión de una región del gen tubulina; efectivamente, se comprobó la expresión constitutiva de dicho gen en 100% de las muestras, verificándose con este ensayo la validez del método para la expresión de genes a partir del ARN mensajero del mosquito (datos no mostrados).

Posteriormente, se analizó una muestra de 20 mosquitos que habían sido infectados previamente con el virus DEN-1, para la expresión de ambos genes (defensina y tubulina) (Figura 2).

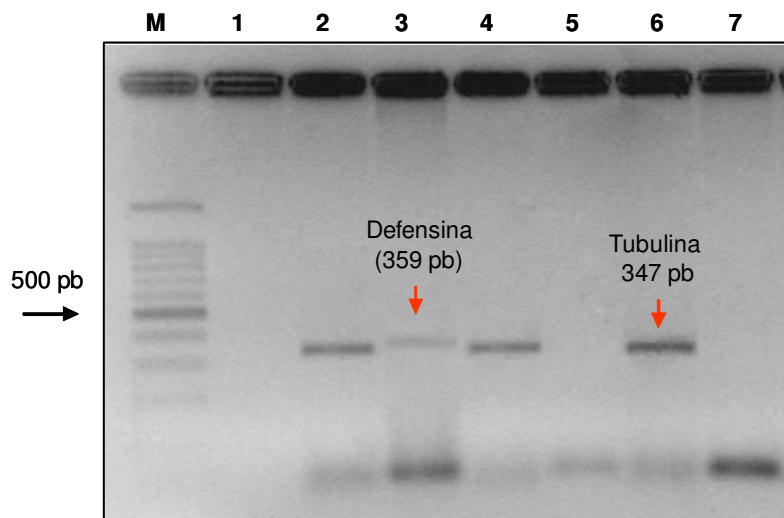


Figura 2. Amplificación de los genes para tubulina y defensina en mosquitos infectados con virus DEN-1. M: marcador de tamaño molecular (100 pb, Promega), carriles 2, 4, 6: muestran las reacciones utilizando los oligonucleótidos para tubulina y los carriles 3, 5 y 7: las amplificaciones con oligonucleótidos para defensina.

En gel de agarosa (2%), se pudo observar que 100% de los mosquitos presentó la banda indicativa del gen tubulina y sólo un mosquito presentó la banda característica del gen defensina.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se encontraron diferencias altamente significativas en la susceptibilidad para infección, diseminación y transmisión del virus DEN-1 entre las cepas de *Ae. aegypti* estudiadas. La heterogeneidad mostrada en los porcentajes de infección, puede relacionarse con la diferenciación genética existente entre las poblaciones de mosquitos.

Una de las causas de esta diferenciación podría ser la selección de ciertos genotipos, debido a la presión ejercida por la aplicación de insecticidas en el país, para controlar larvas y adultos del vector. En concordancia con lo anterior, una investigación realizada por Pérez y Molina de Fernández (2009) (23) determinó la existencia de niveles variables de resistencia a los insecticidas de uso más común, en diferentes cepas de mosquitos del estado Aragua, por lo que se recomienda, realizar una determinación periódica de la resistencia a insecticidas en las diferentes poblaciones de *Ae. aegypti* del país, así como una aplicación rotativa de los mismos. De ésta manera, se haría un mejor uso del químico con miras a controlar la densidad del vector y se evitaría o retardaría el desarrollo de la resistencia en las poblaciones de *Ae. aegypti*.

De igual forma, las características geográficas de las zonas donde se colectaron los mosquitos, pueden influir en las diferencias en los niveles de susceptibilidad. En este sentido, diversos estudios señalan que los porcentajes de infección heterogéneos están relacionados con la actividad humana y el desarrollo comercial activo de las zonas geográficas ya que en estas zonas de alta densidad poblacional existe una mayor aplicación de insecticidas, lo que promueve a su vez la diferenciación genética de las poblaciones de mosquitos (2,10). En

consecuencia, la estructura genética de las poblaciones de mosquitos es alterada, resultando en diferentes porcentajes de susceptibilidad a la infección, dispersión y transmisión del virus dengue (2, 9, 12).

En nuestro estudio, las localidades pertenecientes a los estados Aragua, Bolívar y Trujillo son zonas urbanas, que presentan condiciones ambientales favorables para el desarrollo del mosquito y con circulación de al menos un serotipo del virus dengue, lo cual hace el ambiente propicio para el desarrollo del mosquito como vector (24).

El caso de la población de *Ae. aegypti* de Tumeremo (estado Bolívar), con el mayor porcentaje de infección (94%), se puede explicar porque dicha población ha experimentado un rápido crecimiento poblacional, debido a las corrientes migratorias internas y externas, atraídas por la explotación minera e industrial, lo que ha promovido que se instalen pequeños caseríos improvisados a lo largo del territorio, sin servicio de distribución de agua adecuado, lo que favorece una mayor transmisión del virus dengue. Esto se confirmó con la alta incidencia de la enfermedad en el estado Bolívar, correspondiendo al 5% del total de casos acumulados en todo el país para el año 2006, año cuando se realizó este estudio (25). Además, desde el punto de vista geográfico, (vegetación de bosque húmedo tropical, con precipitación anual promedio de 1300 mm distribuida a lo largo del año, temperatura media mensual que oscila entre 22 y 26°C y humedad relativa promedio de 73%) presenta condiciones muy convenientes para la proliferación del vector.

Contrariamente, la cepa de mosquitos que presentó el menor porcentaje de infección fue la población de Los Pedros (estado Falcón) con un valor de 46%. Los Pedros, es un pequeño poblado, cercano a la carretera nacional Zulia-Falcón, sin embargo, este pareciera ser una "isla ecológica", en donde los mosquitos se encuentran circunscritos a ese territorio, ya que esta rodeado por kilómetros de médanos de arena, con muy poca vegetación alrededor (26). En esta zona del país, predomina el clima semiárido, de precipitaciones escasas y temperatura media anual de 30 °C. Estas condiciones climáticas pudieran explicar el bajo porcentaje presentado por los mosquitos de dicha zona en los niveles de infección, dispersión y transmisión para virus DEN-1. Así mismo, esta población de mosquitos presentó una mayor distancia genética, respecto a otras poblaciones de *Ae. aegypti* del país, lo que pudiera influir en su comportamiento frente a la infección experimental con virus dengue (26).

Ha sido reportado que en la medida en que se incrementa el número de generaciones de mosquitos y el tiempo de mantenimiento bajo condiciones controladas de laboratorio, aumenta su susceptibilidad a la infección (17). Sin embargo, en este trabajo se obtuvo lo contrario en la cepa control Rockefeller (Tabla 2). Las cepas colectadas en las localidades de estudio y criadas hasta la generación F1, parecen haber interactuado mejor con el virus en comparación con la cepa control, la cual se ha mantenido en el laboratorio del IVIC desde 1961. Esta afirmación concuerda con lo reportado por Lorenz y col. (1984) (27), quienes señalaron que el efecto de colonización de los mosquitos en condiciones de laboratorio sobre la susceptibilidad a la infección por *Flavivirus* es impredecible, por lo que recomiendan el uso de cepas recién colectadas en la naturaleza para tales experimentos.

Las diferencias en la susceptibilidad para la infección oral con *Flavivirus* entre cepas de *Ae. aegypti*, se han vinculado con un sistema de barreras presentes en diferentes tejidos y órganos del insecto (5, 7-9). Tales barreras pueden prevenir la infección de los vectores o impedir la diseminación del patógeno de un tejido a otro y están relacionadas, directamente, con la capacidad del vector en la transmisión del patógeno (6, 28). Se puede inferir de nuestros resultados que el virus DEN-1 fue capaz de vencer al sistema de barreras del vector, logrando una eficaz diseminación en los tejidos del mosquito que osciló entre 62% y 88%, con la excepción de la cepa de Falcón que presentó un porcentaje de 44%. Sin embargo, para un estudio más preciso acerca de la presencia o ausencia de las barreras contra la infección y diseminación del virus en el mosquito, es recomendable analizar estructuras más finas haciendo disección del abdomen y de las glándulas salivales.

Con relación al estudio de la capacidad potencial de transmisión del virus dengue, se determinó que todas las cepas (excepto la cepa control) son capaces de transmitir el virus encontrándose los porcentajes más altos en aquellas que reflejaron al mismo tiempo mayores porcentajes de infección y diseminación (Tabla 2). Cabe destacar que la cepa Rockefeller es capaz de tolerar bien la replicación del virus, ya que presentó el mayor porcentaje de diseminación (88%), sin embargo, reflejó un valor de 0% en su capacidad para la transmisión potencial del virus. La pérdida de esta capacidad podría deberse a los múltiples cruzamientos en el laboratorio que ha experimentado la cepa sin estar enfrentada al virus, por lo que sería muy interesante determinar el proteoma de esta cepa y compararlo con el de mosquitos capaces de transmitir el virus. La identificación de proteínas únicas sería clave en la elucidación de este mecanismo de resistencia a la transmisión.

En lo referente a la expresión del gen defensina, éste, no parece ser inducido por la presencia del virus DEN-1 en la muestra de mosquitos expuesta a la infección. En este aspecto, la literatura presenta resultados contradictorios. Hay trabajos que indican que la expresión de dicho gen se incrementa en los insectos en presencia de agentes patógenos como las bacterias, hongos y parásitos (14, 15, 29). Sin embargo, también hay estudios muy recientes que demuestran que el sistema inmune de insectos como *Drosophila melanogaster* responde a infecciones por distintos virus de manera diferente; en particular, el gen defensina no es inducido por el virus Rhabdovirus *Sigma* (30). Asimismo, en *Anopheles gambiae*, se han identificado nuevas defensinas que sólo responden a infecciones bacterianas en la etapa larvaria (31). Esto puede corresponderse con el fenómeno de interferencia viral que ha sido reportado en células infectadas y en otros sistemas a nivel transcripcional o post-transcripcional (32).

Finalmente, se sugiere que la vigilancia epidemiológica del vector del virus dengue en el país, se debería intensificar en las zonas donde el vector tenga mayor susceptibilidad a la infección por dicho virus. De esa manera se garantizaría un tratamiento eficaz y temprano en la prevención de futuras epidemias. Asimismo, en la medida en que se avance en el estudio de genes que interfieran en la relación virus-vector, se podrá conocer mejor la biología del mosquito lo que, indudablemente, ayudará al control de la transmisión.

AGRADECIMIENTOS Al Profesor Guillermo Comach (BIOMED-UC) por la donación de la cepa DEN-1 utilizada, al Prof. Luis Manuel Pérez (UC-Sede Aragua), por la asesoría en el manejo estadístico de los

resultados; al Sr. Jesús González (Dirección de Salud Ambiental) por la cría y mantenimiento de las colonias; a la Lic. Lourdes Acuña (Insectario "Octavio Suárez" del Centro de Microbiología y Biología de Virus, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas) por la ayuda en los ensayos de alimentación artificial experimental de los mosquitos. Al CDC San Juan, Puerto Rico por la donación de policlonales

.BIBLIOGRAFIA

1. Gubler D J, The global resurgence of arboviral diseases. *Trop Med Hyg* 1996; 90: 449-451.
2. Vazeille M, Mousson L, Rakatorivony I, Villeret R, Rodhain F, Duchemin J-B, Failloux A. Population genetic structure and competence as a vector for dengue type 2 virus of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:491-497.
3. Pinheiro F P, Corber S. Emergence of dengue and dengue hemorrhagic fever and its emergence in the Americas. *Wld Hlth Org* 1997; 15: 244-251. Organización Panamericana de la Salud. Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiol Bull* 1990; 11: 7-9.
4. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Control de *Aedes aegypti* en Venezuela. 2001; N° 07.
5. Bennett K E, Olson K E, Muñoz M, Salas-Fernández I, Fafan-Ale J A, Higgs S, Black IV W C, Beaty B. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and United States. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67: 85-92.
6. Hardy J L, Houk E J, Kramer L D, Reeves W C. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Ann Rev Entomol* 1983; 28: 229-262.
7. Lourenço de Oliveira R, Vazeille M, Bispo de Filiis A, Failloux A-B. Oral susceptibility to yellow fever virus of *Aedes aegypti* from Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97: 437-439.
8. Bosio Ch F, Beaty B J, Black IV W. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 965-970.
9. Bosio Ch F, Fulton R E, Salasek M L, Beaty B J, Black IV W C. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* 2000; 156: 687-698.
10. Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Chungue E, Failloux A B. Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the island of Tahiti and Moorea, French Polynesia. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 292-299.
11. Failloux A B, Vazeille-Falcoz M, Mousson, Rodhain F. Genetic control of vectorial competence in *Aedes* mosquitoes. *Bull Soc Pathol Exot* 1999; 92: 266-273.
12. Paupy Ch, Girod R, Salvan M, Rodhain F, Failloux A-B. Population structure of *Aedes albopictus* from La Réunion Island (Indian Ocean) with respect to susceptibility to a dengue virus. *Heredity* 2001; 87: 273-283.
13. Thongrunkiat S, Jirakanjanakit N, Apiwathnasorn C, Prummongkol S, Samung Y. Comparative susceptibility to oral infection with dengue viruses among local strains of *Aedes aegypti* (Diptera Culicidae) collected at different seasons of the year. *J Vector Ecol* 2003; 28:166-70.
14. Lowenberger C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 2001; 31: 219-229.
15. Bartholomay L C, Fuchs J F, Cheng L L, Beck E T, Vizioli J, Lowenberger C, Christensen B M. Reassessing the role of defensin in the innate immune response of the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 2004; 13:125-132.
16. Fernández Z, Moncayo A, Forattini O P, Weaver S. Susceptibility of urban and rural populations of *Aedes albopictus* from São Paulo State, Brazil, to infection by dengue-1 and 2 viruses. *J Med Entomol* 2004; 41: 961-964.
17. Vazeille M, Rosen L, Mousson L, Failloux A-B. Low oral receptivity for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from Southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 203-208.

18. Lourenço de Oliveira R, Vazeille M, de Filippis A M, Failloux A-B. *Aedes aegypti* in Brasil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98: 43-54.
19. Gonçalves de Castro M, Ribeiro R, Gonçalves H, Pereira M, Lourenço de Oliveira R. Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 809-814.
20. Urdaneta L, Herrera F, Pernalette M, Zoghbi N, Rubio-Palis Y, Barrios R, Rivero J, Comach G, Jiménez M, Salcedo M. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua State, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infect Genet Evol* 2005; 5:177-184.
21. Lanciotti R S, Calisher Ch H, Gubler D J, Chang G, Vorndam V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 545-551.
22. Agresti A. *Categorical data analysis*. New Jersey: Wiley-Interscience. 2002
23. Pérez E, Molina de Fernández D. Resistencia focal a insecticidas organosintéticos en *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) de diferentes municipios del estado Aragua, Venezuela. *Bol Malariol San Amb* 2009; 49: 20-25.
24. Referencias geográficas de algunos estados de Venezuela. [Sitio en Internet] Hallado en: <http://www.gobiernoenlinea.gob.ve/misc-view/index.pag>. Acceso el 12 de enero 2009.
25. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Dirección General de Salud Ambiental. 2006.
26. Herrera F, Urdaneta L, Rivero J, Zoghbi N, Ruiz J, Carrasquel G, Martinez J A, Pernalette M, Villegas P, Montoya A, Rubio-Palis Y, Rojas E Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 625-633.
27. Lorenz L, Beaty B J, Aitken T H, Wallis G P, Tabachnick W J. The effect of colonization upon *Aedes aegypti* susceptibility to oral infection with yellow fever virus. *Am J Trop Med Hyg* 1984; **33**:690-694.
28. Beerntsen B T, James A A, Christensen B M. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol Mol Biol Ver* 2000; 64:115-137.
29. Zhengrong H, Kasumba I, Lehane M J, Gibson W, Kwon J, Aksoy S. Tsetse immune response and trypanosome transmission: Implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. *PNAS* 2001; 98:12648-12653.
30. Tsai C W, McGraw E A, Ammar E-D, Dietzgen R G, Hogenhout S A. *Drosophila melanogaster* Mounts a Unique Immune Response to the Rhabdovirus *Sigma viru*. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 3251–3256.
31. Meredith J M, Hurd H, Lehane M J, Eggleston P. The malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* expresses a suite of larval-specific defensin genes. *Insect Mol Biol* 2008; 17: 103-112.
32. De Los Santos T, Avila B S, Weibler R, Grubman M J. The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. *J. Virol* 2006; 80:1906-1914