

**EVALUACIÓN DE LA COMPETENCIA VECTORIAL DE *Aedes aegypti*
A LA INFECCIÓN POR EL VIRUS ZIKA**

Presentado por;
Harry Bravo Castillo

Centro Internacional De Entrenamiento e Investigaciones
Médicas (CIDEIM)
Universidad ICESI
Facultad De Ciencias Naturales
Departamento de Ciencias farmacéuticas
Santiago de Cali
2018

Evaluación de la competencia vectorial de *Aedes aegypti* a la infección por el virus Zika.

Harry Bravo Castillo

Proyecto de grado para optar al título de pregrado en química farmacéutica

Dirigido por:

Directora:

Paola Andrea Caicedo Burbano, PhD.

Co-directoras:

Clara Ocampo, PhD

Idalba Mildred Serrato, MSc.

Centro Internacional De Entrenamiento e Investigaciones
Médicas (CIDEIM)
Universidad ICESI
Facultad De Ciencias Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas
Santiago de Cali
2018

Aprobado por:

Nombre correspondiente
Evaluador

Nombre correspondiente
Evaluador

Clara Ocampo
Co-Directora del proyecto

Idalba Mildred Serrato
Co-directora del proyecto

Paola Andrea Caicedo
Directora del proyecto

Santiago de Cali y 22 / noviembre / 2018

Agradecimientos

Inicialmente, quiero agradecerles a Dios y a mi familia por permitirme la valiosa oportunidad de estudiar. A mis padres, que han hecho todo lo que ha estado a su alcance para brindarme, entre sus posibilidades, lo mejor que han podido. Mi esfuerzo y dedicación son de las cosas más pequeñas que puedo hacer para agradecerles el amor que me han brindado de manera incondicional. Este logro no solo es mío, este logro es de Dios y de mi familia. Seguido a ellos, quisiera agradecer a todas aquellas personas que en algún momento han sacado un poco de su tiempo para enseñarme a ser un mejor profesional: profesores, compañeros y colaboradores. A mi excelente tutora y profesora, Paola Andrea Caicedo Burbano, por hacer de mí una persona mucho más crítica, disciplinada y consciente de sus acciones; con ello, implícitamente, un mejor ser humano. No me alcanzan las palabras para agradecerle toda la paciencia que ha tenido conmigo y todo lo que he aprendido de ella, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

1. LISTA DE FIGURAS	6
2. LISTA DE TABLAS	7
3. RESUMEN DEL PROYECTO:.....	8
4. INTRODUCCIÓN.....	8
5. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	9
5.1 Pregunta y problema de investigación.....	9
6. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	10
6.1 El Zika – enfermedad.....	10
6.2 El vector.....	11
6.3 Ciclo de transmisión	12
6.4 Epidemiología	13
6.5 Interacción virus- vector	14
4.5.1 Competencia vectorial:.....	15
7. OBJETIVOS	17
7.1 objetivo general	17
7.2 objetivos específicos.....	17
8. METODOLOGÍA.....	18
8.1 Cinética de infección de ZIKAV	18
6.1.2 Mantenimiento de cultivo celular:.....	18
8.1.3 Infección de células C6/36 HT con ZIKAV:.....	18
8.1.3.1. Amplificación de virus Zika:	18
8.1.4 Extracción de RNA.....	19
8.1.5 Síntesis de cDNA.....	19
8.1.6 Detección del virus Zika por qPCR	20
8.2 Evaluación de la competencia vectorial.....	20
8.2.1 Mantenimiento de mosquitos	20
8.2.2 Infección artificial de <i>Aedes aegypti</i>	22
8.2.3 Disección de intestino medio	22
8.2.4 Evaluación del fenotipo de <i>Aedes aegypti</i> a la infección por ZIKAV	23
6.2.5 Determinación de fenotipos susceptibles y/o refractarios;	24
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
9.1 Cinética de infección de ZIKAV	25
9.2 Evaluación del fenotipo de <i>Aedes aegypti</i> a la infección por ZIKAV	30
10. CONCLUSIÓN.....	35
11. RECOMENDACIONES	36
12. BIBLIOGRAFÍA.....	37
13. ANEXOS	40

1. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> (CDC, 2016).	12
Figura 2. Tipos de transmisión del ZIKAV (OPS, 2015).....	13
Figura 3. Casos notificados de enfermedad por virus Zika en el 2018 vs 2017 (INS, 2018).....	14
Figura 4. Barreras fisiológicas de contención del virus en el mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Black & al, 2002).	15
Figura 5. Placa de cultivo C6/36HT utilizada para la incubación de células infectadas con sobrenadante de ZIKAV a los 4, 7 y 10 días.....	19
Figura 6. Sistema de alimentación artificial para el mantenimiento de mosquitos	21
Figura 7. Mantenimiento de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> en CIDEIM. (A) Jaulas. (B) Contenedores plásticos con agua de clorada para eclosión de huevos (Caicedo, 2008).....	21
Figura 8. Disección de intestino de <i>Ae. aegypti</i> con pinzas entomológicas. (Caicedo, 2008).....	23
Figura 9. Electroforesis en geles de agarosa al 1%.....	26
Figura 10. Ciclos de amplificación qPCR de curvas cinéticas de infección..... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 11. Muestras positivas de cepa Rockefeller en gel agarosa al 1%.	30
Figura 12. Muestras de cepa Cali-S en gel de agarosa al 1%.	31
Figura 13. Productos de PCR convencional visualizados en gel de agarosa al 1% de sangres usadas en el primer (S1) y segundo experimento (S2) para la infección artificial de la totalidad de los individuos.....	33
Figura 14. Control positivo de RNA viral de zikaV.	46
Figura 15. Electroforesis cepa Rockefeller primer experimento.	46

2. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de RNA total primera curva de ZIKAV en células C6/36 HT y relación de absorbancia.	25
Tabla 2. Cuantificación de RNA total segunda curva de ZIKAV en células c6/36HT y relación de absorbancia.	25
Tabla 3. Ciclos de amplificación obtenidos en los ensayos de RT-qPCR de las infecciones realizadas a nivel de cultivo celular de células C6/36HT de intestino medio de Ae. albopictus a los 4, 7 y 10 días post infección (dpi) de la primera replica biológica.	28
Tabla 4. Ciclos de amplificación obtenidos en los ensayos de RT-qPCR de las infecciones realizadas a nivel de cultivo celular de células C6/36HT de intestino medio de Ae. albopictus a los 4, 7 y 10 días post infección (dpi) de la segunda replica biológica.	29
Tabla 5. Resultados correspondientes a la evaluación del fenotipo de infección a ZIKAV y competencia vectorial.	33
Tabla 6. Relación de individuos infectados y no infectados con respectivas barreras de infección ante la infección con ZIKAV. S: susceptible; MIB: barrera de infección de intestino medio; MEB: Barrera de escape del intestino medio.	34
Tabla 7. Cuantificación de RNA viral Zika en Aedes aegypti Rockfeller	40
Tabla 8. Cuantificación de RNA viral Zika en Aedes aegypti susceptible	42
Tabla 9. Cuantificación de RNA de cepa Rokefeller segundo experimento. ¡Error! Marcador no definido.	

3. RESUMEN DEL PROYECTO

El virus Zika (ZIKAV) pertenece a la familia Flaviviridae, género *Flavivirus* con un genoma tipo RNA no segmentado, monocatenario positivo. Es un arbovirus, es decir, que se reproduce y transmite con la ayuda de mosquitos vectores, principalmente, *Aedes aegypti*; y causa la enfermedad conocida con el mismo nombre. En Colombia, el número de casos de Zika superó los 106 mil en el año 2016, de los cuales, 20 mil fueron mujeres embarazadas y representaron la población de mayor interés, pues, la enfermedad en algunos casos genera secuelas específicas sobre el desarrollo del embrión una vez la madre ha sido infectada. Un hecho que soporta la necesidad de comprender la enfermedad es que aún se reportan casos de Zika en el país (INS, 2016), lo que lleva a pensar que los programas de control enfocados principalmente en el vector no han sido completamente eficaces.

En recientes años ha habido un progreso considerable en el conocimiento sobre las arbovirosis como dengue (vDEN), Zika (ZIKAV) y chikungunya, sin embargo, hay muchos aspectos que deben ser investigados en términos de transmisión por el principal vector, *Aedes aegypti*. En el CIDEIM han desarrollado investigaciones dirigidas al estudio de las relaciones virus dengue-vector, específicamente la respuesta inmune innata de *Ae. aegypti* a la infección por virus dengue (vDEN). Para ello, seleccionaron dos cepas de *Ae. aegypti* de Cali con diferente susceptibilidad o competencia vectorial (CV) a la infección por VDEN tipo II, a partir de mosquitos colectados en campo, se usó para este proyecto, una de las dos cepas, denominada Susceptible (Cali-S, 96%) y otra cepa referencia denominada Rockefeller (susceptible 98%). Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se evaluó la competencia vectorial en las cepas Cali-S y Rockefeller hacia la infección con ZIKAV. Esto, con el objetivo de determinar y entender si presentan al igual que para dengue, variaciones en su fenotipo, pero en este caso, a la infección con ZIKAV. Los resultados mostraron que las cepas Rockefeller y Cali-S difieren de su competencia vectorial en un 45.45% de susceptibilidad para la cepa Rockefeller y en un 6.66% de susceptibilidad a la infección por ZIKAV comparado con la que presentan a la infección por VDEN-2; 97% de susceptibilidad en Rockefeller y 96% en Cali-S. Por lo que se podría sugerir que, la cepa Cali-S y Rockefeller tienen mecanismos de respuesta diferentes para los dos tipos de virus, lo que las hacen menos competentes a la infección por ZIKAV comparado con la infección a VDEN-2. Estos resultados podrían ser empleados a futuro para entender la dinámica de la transmisión de estos virus en el campo y permitir el desarrollo de herramientas de control que posibiliten disminuir la transmisión de ZIKAV y otros virus transmitidos por el mismo vector.

4. INTRODUCCIÓN

El virus Zika se identificó por primera vez en 1947 en África oriental. El primer brote registrado ocurrió en la Isla de Yap (Estados Federados de Micronesia) en 2007. Hasta el año 2015 apareció en Brasil y a finales del mismo año se dieron los primeros reportes de casos asociados al virus en Colombia en el departamento de Bolívar (INS, 2016). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el virus Zika si bien no causa una enfermedad mortal, es altamente incapacitante. No existe cura para la enfermedad en la actualidad y tampoco vacuna (OMS, 2017). El virus se transmite por medio del vector *Aedes aegypti*, el cual además de servir de vehículo para el virus, es común en zonas tropicales generalmente ubicadas por debajo de los 2.200 msnm (INS, 2016). Es una enfermedad que solo se da una vez en la vida, no obstante, se ha encontrado evidencia que ha permitido relacionar casos con implicaciones posteriores a contraerla, tales como; microcefalia en neonatos procedentes de madres que hayan padecido el virus durante el embarazo y en la población en general (adultos y niños mayores) problemas autoinmunes asociados al síndrome Guillan Barre (CDC, 2015). Esto conlleva a la generación de información que ayude a entender la enfermedad y el virus que la origina, desde como infecta el mosquito, se replica el virus en el mismo, hasta las estrategias de transmisión que usa el virus para llegar al ser humano.

En ese orden de ideas, entre los factores relacionados con el vector, el interés de este proyecto se centra en estudiar la competencia vectorial del mosquito *Aedes aegypti* a la infección por virus Zika. La competencia vectorial es considerada de gran importancia, pues se refiere a la capacidad intrínseca del vector para infectarse con el virus, permitir su replicación y posteriormente su transmisión a un huésped susceptible (Gil et al, 2010). Este proyecto tuvo como objetivo, evaluar y comparar la competencia vectorial de cepas con un fenotipo de infección ya caracterizado para virus Dengue-2; Cali-S (96% susceptible) y Rockefeller (98% susceptible) de esa manera, determinar si existe similitud entre los dos tipos distintos de virus que usan como vehículo el mismo vector. Esta información aportará conocimiento valioso en el entendimiento de la dinámica vectorial en cuanto a las medidas de control del vector *Aedes aegypti* a la infección por ZIKAV.

5. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

5.1 Pregunta y problema de investigación

Las enfermedades transmitidas por vectores son causadas por agentes patógenos, entre ellos los virus. En todo el mundo se registran cada año más de 1000 millones de casos y más de 1 millón de defunciones como consecuencia de estas enfermedades (OMS, 2016). Las afecciones de este tipo más estudiadas se asocian con artrópodos, y también son conocidas como enfermedades causadas por arbovirus o virus transmitidos por artrópodos” (CDC, 2016). Entre los arbovirus mas conocidos y recientes, se destaca el virus zika (ZIKAV).

Las largas jornadas de los programas de erradicación de *Ae. aegypti*, principal vector del ZIKAV, empezaron en 1940 donde se eliminó el mosquito en gran número

de países (OPS 1998). 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 resistencia a los programas verticales, así como al uso de insecticidas, la baja prioridad, la falta de sostenibilidad, y otros factores causaron que *Ae. aegypti* reapareciera en zonas tropicales y subtropicales con más fuerza (Caicedo et al, 2008).

En los últimos años, la globalización de los desplazamientos y el comercio, la urbanización no planificada y los problemas medioambientales, entre ellos el cambio climático, están influyendo considerablemente en la transmisión de las enfermedades causadas por virus transmitidos por vectores como el dengue, Zika y chikungunya (OMS, 2016). Estas enfermedades han dejado 1764 personas afectadas hasta marzo de 2017. Una diferencia de 6309 casos si se compara el número de afectados por dichas enfermedades durante el primer trimestre del 2016, cuando hubo 8073 reportes (INS, 2016). De lo anterior, es posible afirmar que no existe una estrategia completamente efectiva para el control de la transmisión de enfermedades de tipo vectorial, y de ello se genera la necesidad de buscar información relevante que brinde conocimiento en pro de generar mejores planes de acción a los actuales contra el vector y al mismo tiempo, contra la transmisión de este tipo de enfermedades como el Zika.

En este sentido, entidades como el CIDEIM, desarrollan investigaciones enfocadas en el conocimiento de la biología de los vectores, así como en el entendimiento de la relación virus-vector, principalmente en los mecanismos moleculares asociados a la competencia vectorial (CV) de *Ae. aegypti* hacia diferentes arbovirus (Barón et al, 2010; Ocampo et al, 2013; Caicedo et al, 2013). Como resultado de estas investigaciones seleccionaron mosquitos *Ae. aegypti* colectados en campo en la ciudad de Cali para obtener cepas que difieren en su CV hacia la infección por el virus dengue, una cepa susceptible (Cali-S, 96%) y otra refractaria (Cali-MIB, 50%) (Caicedo et al, 2013). Además, cuentan con la cepa Rockefeller (cepa de referencia), la cual es 97% susceptible a la infección al virus dengue. Teniendo en cuenta lo anterior, y que *Aedes aegypti* es el vector para el virus Zika, en este trabajo se plantea la evaluación de la CV de las cepas Cali-S y Rockefeller hacia la infección por este virus y si existe un comportamiento similar o no, para virus dengue (serotipo 2) pero con virus zika. Asimismo, la finalidad radica en generar información que permita a futuro el desarrollo de herramientas de control que conlleven a la disminución de la transmisión de las enfermedades de tipo arboviral.

6. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

6.1 El Zika – enfermedad.

El Zika es un virus que causa un espectro clínico variable que va desde formas asintomáticas, cuadros febriles leves (similares a la influenza) o moderados-graves (similares al dengue). Las formas sintomáticas son cuadros autolimitados que tienen una duración promedio de 4 a 7 días y se caracterizan por presentar síntomas como fiebre, conjuntivitis no purulenta, cefalea, mialgia, artralgia, astenia, exantema maculopapular que inicia en la región cefálica y se extiende en sentido cefalocaudal, edema en miembros inferiores y, con menor frecuencia, dolor retroocular, anorexia, vómitos, diarrea o dolor abdominal (Ramírez et al, 2016).

Cualquier población (niños, adultos o adultos mayores) es susceptible de adquirir el virus por la picadura del mosquito infectado. Sin embargo, y aunque la cantidad de defunciones asociadas a Zika son muy escasas, es de especial atención las condiciones clínicas presentadas en poblaciones específicas, como neonatos y recién nacidos, luego de haber estado en contacto con el virus por medio de madres gestantes infectadas. Estas condiciones incluyen microcefalia, anomalías cerebrales, síndromes polimalformativos que agrupan lesiones cerebrales, disfunción del tronco cerebral y ausencia del reflejo de deglución (Ramírez et al, 2016).

El manejo es sintomático, basado en la condición clínica de cada paciente. No hay tratamiento curativo, pero puede ser manejado en casa, teniendo muy en cuenta la hidratación, el reposo y el uso de toldillo. El manejo en casa se realiza con acetaminofén o paracetamol, para controlar la fiebre y el dolor; y con antihistamínicos, para el prurito (INS, 2016). Teniendo en cuenta, la escasez de estrategias de control del vector y la falta de tratamiento distinto a uno paliativo, hace de esta enfermedad una afección interesante y necesaria de estudiar.

6.2 El vector.

El virus del Zika es transmitido por mosquitos con actividad diurna y ha sido aislado a partir de varias especies en el género *Aedes*, como *Ae. aegypti*, además de mosquitos arborícolas como *Ae. africanus*, *Ae. apicoargenteus*, *Ae. furcifer*, *Ae. hensilli*, *Ae. luteocephalus* y *Ae. vitattus*. Los estudios muestran que el periodo de incubación extrínseco en los mosquitos es aproximadamente de 10 días (Hayes, 2009).

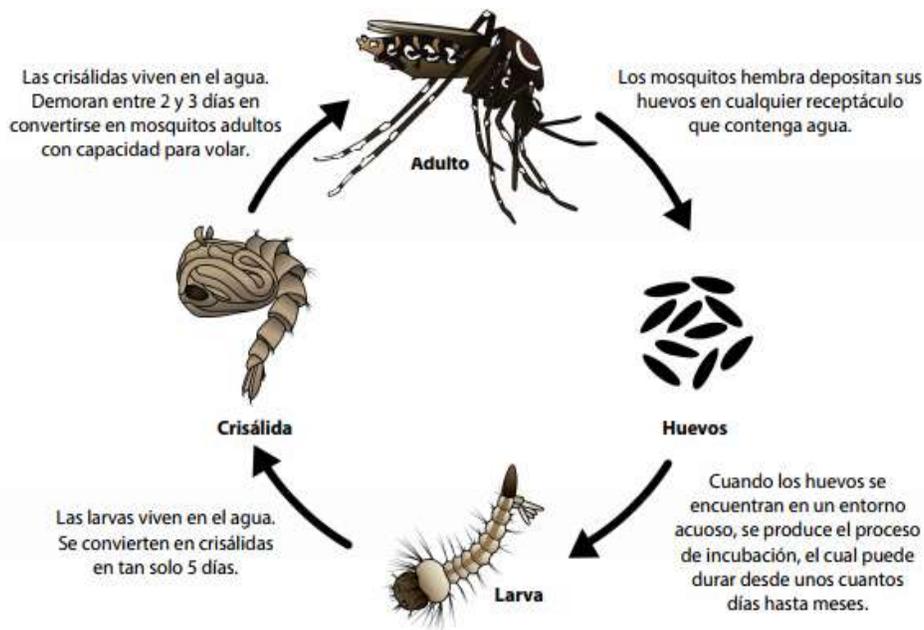


Figura 1. Ciclo de vida de *Aedes aegypti* (CDC, 2016).

Este vector, es un díptero perteneciente a la familia Culicidae originario de África, y el más distribuido en el planeta debido a la exitosa colonización de sitios fuera de sus hábitats nativos (Braks et al, 2003; Juliano & Lounibos, 2005). El vector antes de estar en su forma madura (adulto), la cual, es la que funciona como vehículo del virus, pasa por diferentes estadios (Figura 1). El primero de ellos, es en su forma de huevo, los cuales, para que puedan eclosionar, deben estar en un entorno acuoso libre de esterilizantes o larvicidas. Una vez el huevo ha eclosionado y se encuentra cubierto por agua, el mosquito pasa por su estadio de larva, el cual es sumamente activo e incluye 4 etapas de maduración. Una vez se encuentran en la etapa larval, pasan por un proceso de metamorfosis. En la metamorfosis, se da la formación de una pupa (cubierta que permite la absorción de órganos juveniles para dar lugar a la máxima maduración del mosquito). Una vez se dé la ruptura de la pupa sumergida en agua, emerge el mosquito adulto (CDC, 2016).

Ahora bien, cuando se tiene el mosquito en su estado adulto, la hembra, tiene el potencial característico de ser vector a lo largo de su vida si se llegase a alimentar de sangre que contenga el virus. Lo anterior se debe a que sólo pican los mosquitos hembra ya que tienen una dieta hematófaga (Métode, 2015).

6.3 Ciclo de transmisión

Existen dos formas en la que se puede dar la trasmisión del virus Zika, una, en donde el mosquito está infectado con el virus y sirve como vector de la enfermedad, a lo que se conoce como trasmisión autóctona. Y la otra, es decir, la importada, en donde un individuo sirve como transportador del virus, el mosquito se alimenta de la sangre infectada, volviéndose así, el nuevo vector, el cual, puede picar a un individuo sano y transmitir el virus (OPS, 2015). Un esquema de lo mencionado se puede ver gráficamente en la **Figura 2**.

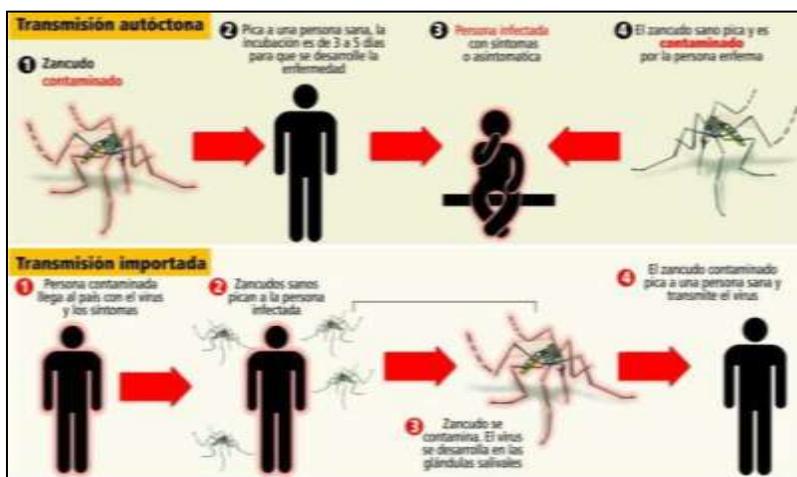


Figura 2. Tipos de transmisión del ZIKAV (OPS, 2015)

Se conoce de la enfermedad que, después de que el virus es ingerido por el mosquito mediante el proceso de picadura de un hospedero virémico, se transporta hasta las células epiteliales del intestino medio donde se replica (Beerntsen, 2000). Posteriormente, el virus se disemina por el mosquito hasta alcanzar las glándulas salivares, las cuales son consideradas como los órganos más importantes para una transmisión efectiva (OMS, 2016) después de su previa replicación a nivel de células de intestino. Una vez el virus se encuentre en la saliva, cuando se alimente nuevamente de otro huésped, inoculará el virus previamente replicado en el hospedero.

6.4 Epidemiología

En Colombia, el virus Zika en el año 2015 fue considerado como un virus con alta capacidad de infección, pues, de acuerdo al Instituto Nacional de Salud, Colombia alcanzó en Latinoamérica, el segundo puesto, siendo el país con más cantidad de casos reportados; hasta enero de 2017, se registraron 13531 casos (Gómez F. R., 2017). La propagación rápida del virus se debió a la presencia del mosquito *Ae. aegypti* en casi todo el continente, con excepción de Canadá y parte del Chile continental.

Desde octubre de 2015 hasta la primera semana de 2016, el país tuvo un total de "776 casos confirmados por laboratorio", "10.837 casos confirmados por clínica" y "1.918 casos sospechosos", de acuerdo con el primer balance del 2016, revelado por el INS. De estos, 5.449 casos ratificados y 1.151 sospechosos se presentaron en la zona del Caribe, que incluye a las ciudades de Cartagena y Santa Marta (INS, 2016). Del total general hasta el cierre de la fase epidemiológica, se dieron 12.802 casos de mujeres embarazadas con sospecha o confirmación de infección por el virus del Zika. Del total, en 1.703 se confirmó la infección por el virus del Zika a través de pruebas de laboratorio; los 11.099 restantes habían presentado síntomas del virus Zika sin confirmación de laboratorio (INS, 2016).

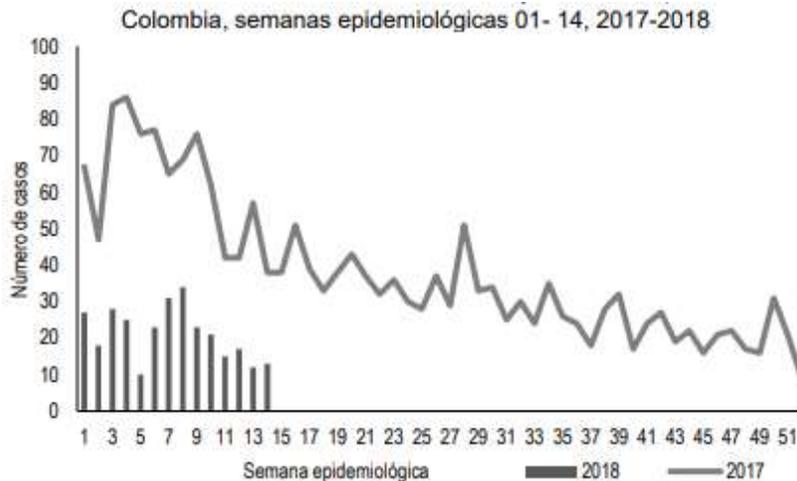


Figura 3. Casos notificados de enfermedad por virus Zika en el 2018 vs 2017 (INS, 2018)

Si bien el cierre de la fase epidemiológica se dio en junio el año 2016, aún se siguen presentando casos de Zika en el país de acuerdo al Instituto Nacional de Salud. De esta manera, hasta la semana epidemiológica 14 de 2018 se notificaron al Sivigila 12 casos de Zika y en la misma semana del año 2017 se notificaron 38 casos. Lo que indica una efectiva contención contra la enfermedad. A la fecha actual, han ingresado 297 casos de Zika, 235 (79,1 %) casos confirmados por clínica, 61 (20,5 %) casos sospechosos y un caso confirmado por laboratorio (0,3 %) (INS, 2018).

Ahora bien, el Zika es un virus que se sigue manifestando en el país, hasta la semana epidemiológica 51, 26 entidades territoriales del orden departamental y distrital han notificado casos de Zika al sistema de vigilancia. De los casos notificados a semana epidemiológica 14 de 2018, el 60,6 % proceden de Valle del Cauca, Putumayo y Norte de Santander; y por municipio de procedencia, el 22,2 % (66) de los casos son de Cali, el 21,5 % (64) de Villa Garzón y el 11,4 % (34) de Cúcuta (INS, Instituto Nacional de Salud; Boletín Epidemiológico, 2018).

6.5 Interacción virus- vector

Si bien la infección por virus Zika no es mortal para *Ae. aegypti*, es posible que 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 (Caicedo, 2008; Klöwden, 1990).

Cuando un mosquito de la especie *Ae. aegypti*, ingiere sangre infectada con el virus, el virus debe atravesar diferentes barreras presentes en el mosquito hospedero, para luego poder ser transmitido al hospedero vertebrado. La primera de ellas se encuentra a nivel del intestino medio y a su vez, el virus debe de atravesarla completamente para poder migrar a otro sitio de desarrollo, lo que garantiza no solo

una adecuada infección sino también la replicación y posterior a ello, la trasmisión del virus (Caicedo, 2008; Shahabuddin, 1998; Gass, 1977).

Ahora bien, 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 virus (Caicedo, 2008; Gubler et al 1976). Para el caso del presente proyecto, se tiene como herramientas técnicas de biología molecular para determinar la competencia vectorial para virus Zika.

6.5.1 Competencia vectorial: La competencia vectorial se define como la capacidad intrínseca del vector para infectarse con un virus, permitir su replicación y transmitirlo nuevamente (Quintero Gil et al, 2010). Por lo tanto, existe una relación entre factores genéticos propios del vector con la interacción del virus, que determinan la manera en que se infecta el mosquito y posteriormente, puede además de replicarlo, trasmitirlo (Quintero Gil et al, 2010). En la Figura 3 se observan las diferentes barreras que atraviesa el virus previamente a llegar a las glándulas salivares del mosquito y ser transmitido.

Por lo anterior, las barreras anatómicas que tienen los mosquitos (*Ae. aegypti*) para evitar la infección en su organismo se encuentran en; la barrera de infección del intestino medio (MIB, *por sus siglas en inglés*), la barrera de escape del intestino medio (MEB), la barrera de infección de las glándulas salivares (SGIB) y la barrera de escape de las glándulas salivares. En el proceso de ingestión de sangre se inicia en el mosquito la formación de una estructura quitinosa llamada matriz peritrófica, la cual rodea la sangre ingerida y la separa físicamente del epitelio del intestino medio hasta ser totalmente digerida (Caicedo et al, 2013).

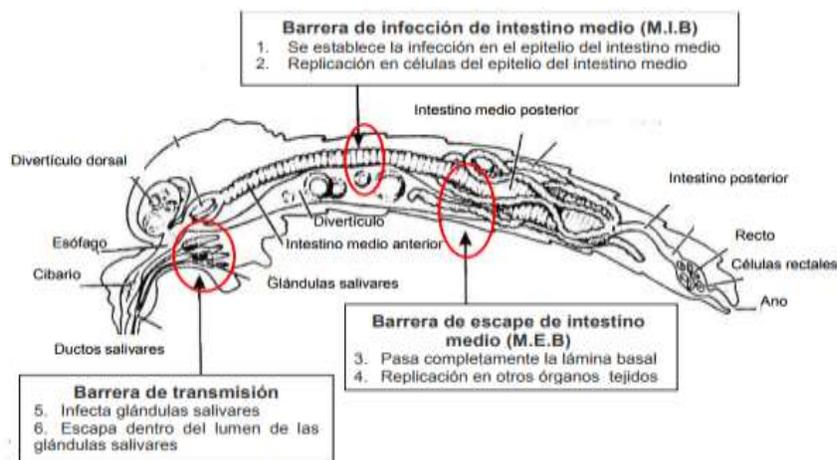


Figura 4. Barreas fisiológicas de contención del virus en el mosquito *Aedes aegypti* (Black & al, 2002).

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) 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 está asociada con un ensamblaje ineficiente o maduración de los virus en las células del intestino medio y con la inhabilidad de que los virus escapen a través de estas células a la lámina basal e infecten órganos y tejidos secundarios (Shahabuddin, 1998; Gass.1977). Finalmente, una vez el virus alcanza una mayor titulación, debe infectar el hemocele y subsecuentemente las glándulas salivares donde puede ser transmitido a el próximo hospedero vertebrado susceptible durante las continuas alimentaciones del mosquito (Christensen, 1989).

7. OBJETIVOS

7.1 objetivo general

Evaluar la competencia vectorial de dos cepas de *Aedes aegypti* Cali-S y Rockefeller a la infección por virus Zika.

7.2 objetivos específicos

- Determinar tiempo de infección mínimo en el cual se obtiene la concentración máxima de virus Zika para la infección de las dos cepas de *Aedes aegypti* Cali-S y Rockefeller.
- Evaluar el porcentaje de infección por virus Zika en las cepas Cali-S y con mayor énfasis, en la cepa Rockefeller de *Aedes aegypti*.

8. METODOLOGÍA

8.1 Cinética de infección de ZIKAV

8.1.2 Mantenimiento de cultivo celular: Para llevar a cabo la amplificación del ZIKAV, fue necesario realizar cultivos celulares de las células de mosquito *Aedes albopictus* C6/36 HT en frascos de 50 mL, con 5mL de medio de cultivo Leivobitz (L15) suplementado con suero fetal bovino (SBF) al 10% (Caicedo, 2008), realizando pases celulares cada semana. Una vez se obtuvo un 80% de confluencia celular, la cual se observó a través de un microscopio invertido, se llevó a cabo la amplificación del ZIKAV.

8.1.3 Infección de células C6/36 HT con ZIKAV:

8.1.3.1. Amplificación de virus Zika: Para la infección de células C6/36HT, se empleó sobrenadante del ZIKAV obtenido a partir de suero de pacientes suministrado por el Instituto Nacional de Salud (INS). Para realizar la amplificación del virus se eliminó el medio, y se adicionaron 200uL del sobrenadante ya mencionado al frasco que contenía la monocapa celular y se incubó por dos horas con agitación constante a una temperatura de 37°C. Cada frasco se rotuló con el número de pase celular y fecha en que se realizó la infección (Caicedo, 2008).

Transcurrido el tiempo de incubación, se descartó el sobrenadante de los frascos y se agregaron 7mL de medio de cultivo con SBF al 2% y se incubó por 10 días, tiempo necesario para que el virus se replicara en las células, a una temperatura de $\pm 31^{\circ}\text{C}$ (Caicedo, 2008). Todo este proceso se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar tipo II en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Icesi.

8.1.3.2. Diseño experimental para realizar la cinética de infección de ZIKAV: Con el fin de realizar la cinética se realizó un muestreo de cultivo en placa infectado a los 4, 7 y 10 días post infección (dpi). Para ello, se realizó en placas de 6 pozos de fondo plano (figura 5). En primer lugar, se realizó el cultivo celular C6/36HT en las placas partiendo de un cultivo celular mantenido en frascos de 50mL como se describió antes. Pasados x días se realizó la infección de las células, en primer lugar, se adicionaron 50 μL de sobrenadante de ZIKAV (amplificado previamente) en las placas. Las placas fueron marcadas como e muestra en la figura 5 (representa una real), en general se realizaron 2 réplicas técnicas y 2 biológicas por cada tiempo a evaluar en la cinética de infección (4, 7 y 10 días de incubación del virus), se tomaron muestras por duplicado de 500uL de sobrenadante a los 4, 7 y 10 días post- infección (dpi), las cuales se almacenaron a -80°C .

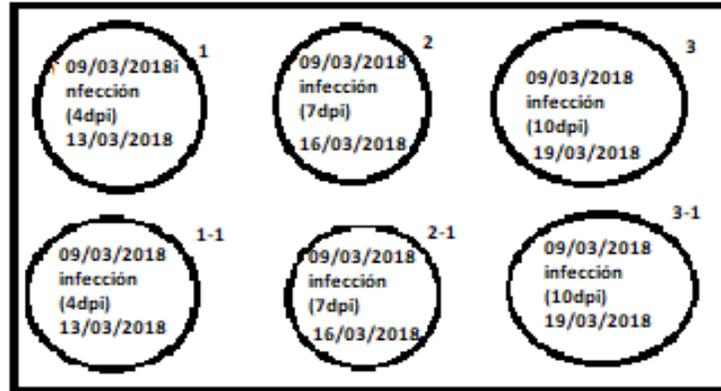


Figura 5. Esquema de laca de cultivo C6/36HT utilizada para la incubación de células infectadas con sobrenadante de ZIKAV a los 4, 7 y 10 días.

8.1.4 Extracción de RNA

Con las muestras recolectadas en el punto anterior, se hizo la extracción de RNA total de cada muestra de sobrenadante, utilizando Trizol Reagent®.

El protocolo de Trizol consistió en; primero tomar 500 µL de cada muestra de sobrenadante y adicionar a cada una 1mL de Trizol y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Segundo, al terminar este tiempo, se agregaron 200µL de cloroformo, luego, se mezcló suavemente por 10 min y se dejó reposar a temperatura ambiente, para una posterior centrifugación a 12000rpm por 15 minutos a 4°C. Tercero, terminada la centrifugación, se observó una fase orgánica (proteína) y una acuosa (RNA); se tomó la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo de plástico de 1,5ml estéril al cual se le adicionaron 300 µL de isopropanol, se mezcló por 10 min a temperatura ambiente para una posterior centrifugación al mismo tiempo, temperatura y velocidad de la anterior. Hecha la centrifugación, se eliminó el sobrenadante obtenido y se agregó 1mL de etanol frío al 75% para ser nuevamente centrifugado. Cuarto, se descartó el sobrenadante y se removieron los restos de alcohol colocando cada tubo boca abajo sobre una servilleta limpia durante 30 min a temperatura ambiente; eliminados los restos de alcohol, el pellet se re suspendió en 20 µL de agua libre de RNAsas para ser almacenado a -80°C con el fin de preservar el RNA extraído.

8.1.5 Síntesis de cDNA

Una vez realizadas las extracciones de RNA de los sobrenadantes, se procedió a obtener cDNA para llevar a cabo una qPCR. El cDNA se obtuvo primero haciendo el mix, que, para el total de las reacciones, es decir, de los días colectados por duplicado más un control negativo, consiste en: 7µL del primer reverse para Zika, 5´-CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-3, 7 µL de dNTPs [10mM], 14µL de solución Buffer 5x y 5µL de la muestra de RNA extraído anteriormente de los cultivos, a excepción del control negativo. Esta mezcla se colocó en el termociclador

a 65°C durante 5 minutos. Terminado este tiempo de incubación, las muestras se colocaron en hielo y se les adicionó el segundo mix que contenía: 2 µL de buffer 5x y 1 µL de DTT [0,1M] para ser nuevamente colocados en el termociclador a 42°C por 2 minutos. Terminado este tiempo, las muestras se dejaron a temperatura ambiente y se les adicionó 1µL de la enzima Super Script II® para ser incubado a 42°C durante 50 minutos y 15 min a 70°C durante. Finalmente, la reacción se llevó a infinito a 12°C.

8.1.6 Detección del virus Zika por qPCR

Obtenido el cDNA, se realizó el protocolo de qPCR en un termociclador 7500 fast-real time PCR system para la cuantificación del ZIKAV en las muestras de la curva (4, 7 y 10 días), siguiendo el protocolo descrito por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention). En general, se usó una mezcla de reacción de 560µL en las siguientes condiciones; 191.8 de agua libre de RNasas, 350µL de la mezcla de enzimas del kit, 7 µL de primer Forward: 5´- CCGCTGCCCAACACAA-3, 7 µL de primer Reverse: 5´-CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-3, 4.2 µL de sonda FAM a 25uM con secuencia 5´-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-3´ y 1µL de la muestra de cDNA de cada día por duplicado. La ejecución de la amplificación contenía un control positivo y uno negativo. El control negativo consistió en el mix de reacción y agua. Para el control positivo, se utilizó sobrenadante de virus Zika extraído a partir del stock del sobrenadante donado por el INS. Para la activación de la polimerasa, se hace un ciclo a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación de 15 segundos a 95 ° C y 1 minuto 60 ° C. Según las directrices del CDC, las muestras que presentaron amplificación en ciclos menores a 38 se consideraron positivas y mayores a 40, negativas.

8.2 Evaluación de la competencia vectorial

8.2.1 Mantenimiento de mosquitos

Las cepas de mosquitos *Ae. aegypti* (Cali-S y Rockefeller) fueron mantenidas en el insectario de CIDEIM, el cual cuenta con las normas de bioseguridad (BSL+2) necesarias para llevar a cabo el mantenimiento de los mosquitos con factores controlados, específicamente: Temperatura (24°C - 28 °C), humedad relativa (70% - 80%) y fotoperiodo (12:12) (Ortiz, 2017).

Para llevar a cabo los objetivos de este estudio, primero fue necesario obtener los ejemplares de las cepas Cali-S y Rockefeller de *Ae. aegypti*. Se alimentaron los mosquitos con sangre a través de un sistema de alimentación artificial (figura 6). Para la recolección de huevos, para lo se dispuso dentro de la jaula de los mosquitos alimentados un vaso plástico recubierto en su interior con papel filtro, lugar donde los mosquitos depositan los huevos. Posteriormente, el papel fue retirado y los huevos pasaron por un proceso de secado por 48 horas. Los huevos fueron almacenados en el insectario a una temperatura de 25°C – 28°C y a una humedad relativa de 70% - 80% envueltos en papel y debidamente rotulados (Ortiz, 2017). Para su eclosión fue necesario colocarlos en bandejas plásticas en un litro de agua

decolorada y las bandejas fueron cubiertas con una malla de tela para evitar posibles contaminaciones (figura 7). Después de la eclosión de los huevos emergió el primer estadio larvario y pasa por tres estadios más (II a IV). Para la alimentación de las larvas se utilizó una solución de hígado (DIFCOTM Liver) proporcionado a través de una pipeta (Ortiz, 2017).



Figura 6. Sistema de alimentación artificial para el mantenimiento de mosquitos (Caicedo, 2008).

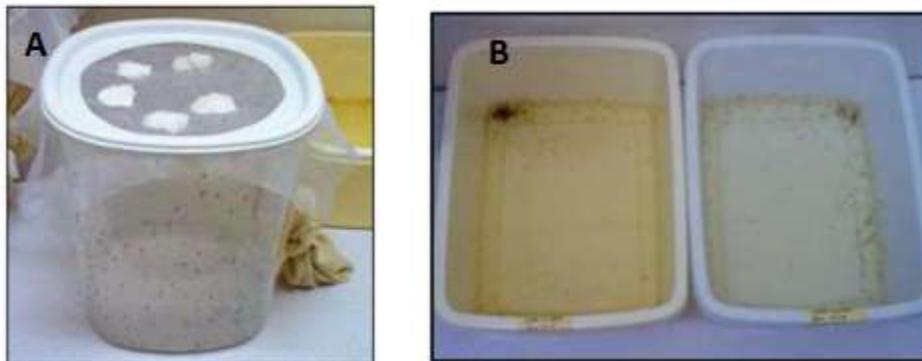


Figura 7. Mantenimiento de mosquitos *Ae. aegypti* en CIDEIM. (A) Jaulas. (B) Contenedores plásticos con agua decolorada para eclosión de huevos (Caicedo, 2008).

Las larvas de estadio IV pasaron a pupas. Durante este periodo no se requirió alimentación y fueron separadas de las larvas en un vaso plástico para que emergieran al estadio adulto. El vaso que contenía las pupas fue trasladado a una jaula cubierta con una malla de tela donde se mantuvieron los adultos emergidos. La alimentación de los adultos se realizó con solución azucarada al 10% a través

de un algodón humedecido sobre la malla de la jaula (Ortiz, 2017).

8.2.2 Infección artificial de *Aedes aegypti*

Una vez se conoce el tiempo mínimo requerido para la infección de ZIKAV, se procedió a alimentar las cepas Cali-S y Rockefeller de *Ae. aegypti* a través de un sistema de membrana utilizando sangre de conejo mezclada con ZIKAV (1:1) con 3 mL de sangre y 3 ml de sobrenadante de virus, simulando condiciones naturales de infección; 37°C usando un sistema de recirculación de agua a dicha temperatura tal como se muestra en la figura 4. Se seleccionaron hembras alimentadas observando en éstas un abdomen rojo y distendido, las cuales, se mantuvieron en jaulas durante 10 días, lo cual corresponde al periodo extrínseco de incubación del virus. Es decir, el tiempo durante el cual el virus se replica en el mosquito (Ortiz, 2017).

Cabe destacar que se tomó una muestra de sobrenadante, sangre sola, sangre mezclada con virus antes y después de la infección para conocer la concentración del ZIKAV a la cual fueron expuestos los mosquitos y verificar que la sangre empleada fuera negativa para el ZIKAV.

8.2.3 Disección de intestino medio

Terminado el periodo de post infección se procedió a realizar disección de intestino medio con ayuda de pinzas entomológicas, ya que es donde se replica el virus al interior del mosquito. Posteriormente, se almacenaron a 4°C en RNA later. Previo a la disección del intestino medio, primero, se mataron los mosquitos colocándolos a -20°C durante 5 ± 10 minutos, luego, se guardaron en tubos eppendorf de 1.5 mL rotulados con el número y nombre de la cepa de *Ae. aegypti* para posteriormente, ser almacenados a -80°C. Al momento de diseccionar cada mosquito se pusieron sobre un porta objetos con una gota de PBS estéril en donde visto desde el esteróscopio, primero, se retiraron la cabeza, las patas y las alas del mosquito, quedando el tórax y el abdomen para obtener el intestino medio, del cual, se retiraron los tubulos de Malphigi como se muestra en la Figura 6.

Cada tejido diseccionado se agregó en 100 μ L de Trizol, para posteriormente realizar la extracción de RNA siguiendo el protocolo con Trizol como se mencionó anteriormente, con la diferencia de que en este caso se adicionaron 500 μ L de Trizol Reagent®.

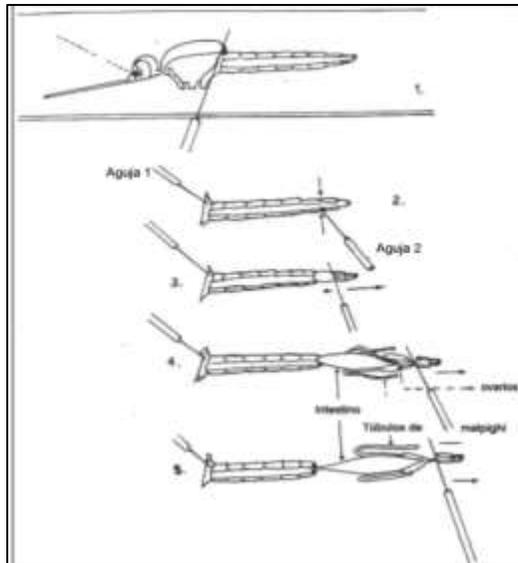


Figura 8. Disección de intestino de *Ae. aegypti* con pinzas entomológicas. (Caicedo, 2008)

8.2.4 Evaluación del fenotipo de *Aedes aegypti* a la infección por ZIKAV

Una vez extraído el RNA, se obtuvo cDNA como se mencionó para el sobrenadante del cultivo celular cambiando las cantidades de reactivos usadas. En este caso se analizaron 30 individuos de cada experimento y cepa; susceptible y Rockefeller. Se hizo PCR convencional, la cual determinó presencia o ausencia del virus, el protocolo para preparar un mix (una sola reacción) de 24.1 μL fue el siguiente: se añadió 17.5 μL de agua libre de RNasas, 1 μL de DNTPs, 1 μL de MgCl_2 , 1 μL del primer reverse, el cual es el mismo para la qPCR y 1 μL de primer forward, que también tiene la misma secuencia en la qPCR, se agrega solución buffer 10X 2.5 μL , 0.1 μL de Taq y 5 μL de muestra para la cual, se tendrá en cuenta los siguientes parámetros; 95°C 1 minuto, 30 ciclos a 94°C 45 segundos, 60°C a 45 segundos, 72°C a 1 minuto, finalmente 72°C 7 minutos, y 4°C infinito.

El resultado de la PCR se visualizó por medio de la técnica de electroforesis, en un gel de agarosa al 1% con GelRed Nucleic Acid Gel Stain® como revelador, un marcador de peso molecular de 100-1000 pares de bases, y se corrió a 80 V durante 40 minutos. Se usaron dos controles negativos, uno correspondiente a la síntesis de cDNA y otro a la reacción de PCR. Adicional a ello, se agrega un control positivo de sobrenadante de cultivo celular infectado, el cual, indica la banda esperada de 100 pares de bases que indica la presencia del virus. De acuerdo con los resultados que se obtuvieron, se calculó el porcentaje de infección para cada una de las cepas de *Aedes aegypti*. Los porcentajes de infección se calcularon a través de las ecuaciones 1 y 2.

$$\% \text{ refractaria} = \frac{\text{número de muestras refractarias}}{\text{total de muestras}} \times 100 \quad (1)$$

$$tasa\ susceptible = \frac{Número\ de\ muestras\ susceptibles}{número\ de\ muestras\ totales} \times 100 \quad (2)$$

El número de muestras tanto susceptibles como Rockefeller correspondieron al número de individuos que poseían el fenotipo a la infección en cada una de las cepas. Y posteriormente, se dividió sobre el número total de individuos usados, en este caso, 30 individuos de los diseccionados.

6.2.5 Determinación de fenotipos susceptibles y/o refractarios; Para determinar el fenotipo de las hembras alimentadas con sangre inoculada con el ZIKAV, se determinó el fenotipo de las hembras infectadas mediante los análisis de PCR convencional. Si los resultados de PCR de cabeza eran positivos (banda a los 100pb), esta lectura indicaba la presencia del ZIKAV por lo que las hembras se clasificaban como fenotipo susceptible. Si el resultado era negativo, se procedió a evaluar la presencia de las diferentes barreras de infección propias del mosquito como respuesta a la infección por ZIKAV por medio de la disección de intestino (Caicedo, 2008).

Por otro lado, si la PCR era positiva a nivel de intestino indicó la presencia de una Barrera de Escape de Intestino Medio (BEM), entonces las hembras se clasificaron como fenotipo refractario con BEM. Si, por el contrario, la PCR era negativa, el resultado indicó la presencia de una Barrera de Infección de Intestino Medio (BIM), por lo que las hembras se clasificaron como fenotipo refractario (Caicedo, 2008).

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Cinética de infección de ZIKAV

Los estudios de cinética a nivel celular respecto a cualquier sustrato, indican el aumento o disminución de alguna sustancia en algún tejido determinado (Chico, 2016). De esta manera, la intención de establecer la cinética del ZIKAV se basa en estipular el lapso de tiempo en el que existe la mayor cuantificación de copias virales posibles en los individuos posteriormente infectados. El objetivo de realizar la cinética de infección en cultivo celular, se basó en la falta de información que se tenía en nuestro laboratorio, lo cual permitiera desarrollar diferentes estudios en mosquitos y/o modelos celulares. De ello, los resultados correspondientes a la cuantificación de la concentración del RNA de ZIKAV en las muestras obtenidas a los 4, 7 y 10 días post-infección (dpi) de células de mosquitos *Aedes albopictus*, C6/36 HT en placa de cultivo celular, se muestran a continuación, en las tablas 2 y 3.

Tabla 1. Cuantificación de RNA total primera curva de ZIKAV en células C6/36 HT y relación de absorbancia.

	Replicas	Días post infección	Concentración ng/uL	Absorbancia	
				260/280	260/230
Primera curva	Replica 1	4	47.49	1.87	0.03
	Replica 1	7	91.16	1.75	0.03
	Replica 1	10	38.48	2.30	0.27
	Replica 2	4	20.00	1.78	0.97
	Replica 2	7	48.99	2.30	0.24
	Replica 2	10	34.71	2.17	0.11

Tabla 2. Cuantificación de RNA total segunda curva de ZIKAV en células c6/36HT y relación de absorbancia.

	Replicas	Días post infección	Concentración ng/uL	Absorbancia	
				260/280	260/230
Segunda curva	Replica 1	4	72.95	2.03	0.08
	Replica 1	7	39,48	2.21	0.05
	Replica 1	10	126,32	1.92	0.06
	Replica 2	4	33.00	2.30	0.27
	Replica 2	7	38,01	1.97	0.16
	Replica 2	10	53,20	1.99	0.08

Una vez cuantificada la cantidad de RNA total haciendo uso del equipo Nanodrop 2000, dos de los parámetros obtenidos en el mismo proceso de cuantificación presentados en las tablas 2 y 3, están relacionados con la concentración y pureza de las muestras, basado en la absorbancia propias de cada una de ellas. La relación

A260/280 y A260/230, son valores adimensionales que indican la calidad en términos de pureza del material genético.

El valor A260/280 indica que el RNA extraído es muy estable y se considera que es de pureza óptima de proteínas si tiene un valor entre 2.0 a 2.2. En el caso de la relación A260/230, que representa una medida secundaria de la pureza del material genético y está relacionada con la presencia de compuestos fenólicos en la solución, se considera que se sitúa en torno a 1.5 a 2.2 un material genético de óptima calidad (BancoADN, 2016). En las muestras analizadas, respecto a la relación A260/280, hay una proporción de 6/12 muestras que tienen un valor A260/280 respectivo entre el rango de 2.0 a 2.2, es decir, el 50% de las muestras tienen una calidad óptima para sintetizar cDNA.

Respecto a la relación A260/230, ninguna de las muestras en cuestión cuenta con un valor que pueda ser considerado como aceptable en términos de su respectiva calidad y pureza. Lo anterior se debe probablemente a que, aunque el método de extracción con trizol es útil para la obtención de un rendimiento más alto en cantidad del material genético no otorga alta pureza respecto a contaminantes proteicos (compuestos con absorbancia cercana a los 280nm), al ser comparado con otros métodos de extracción, como Kit de extracción de RNA o método fenol/cloroformo (Guzmán, 2013). El trizol es una solución fenólica que tiene una absorbancia cercana a los 230nm, lo que hace que exista una alta cantidad de contaminantes propios de compuestos fenólicos (BancoADN, 2016) y explica el resultado obtenido en la relación A260/230 presentado en las tablas 2 y 3. Es importante aclarar que a pesar que se observó contaminación por compuestos fenólicos en las muestras evaluadas, esto no impidió la síntesis de cDNA y la visualización por electroforesis de los productos de PCR convencional, así como también la estimación de cantidad de copias virales del ZIKAV de cada muestra por la técnica de RT-qPCR.

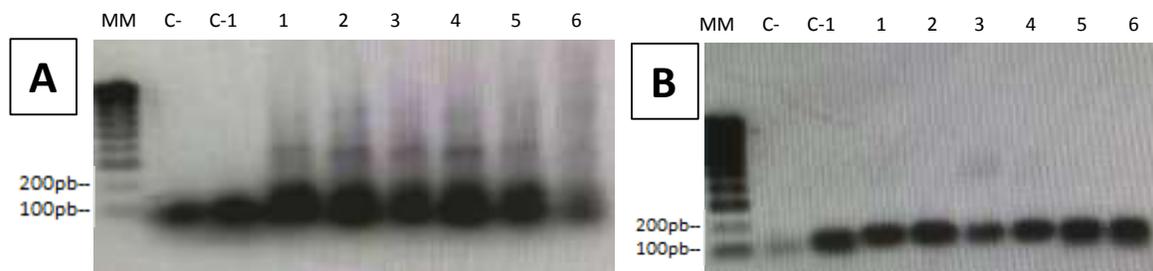


Figura 9. Identificación por PCR de ZIKAV en las muestras colectadas a los 4, 7 y 10 días post-infección en la primera (A) y segunda (B) réplica biológica de la cinética de infección en células C6/36HT. Marcador de peso molecular (MM), C-: controles negativos de cDNA y C-1 control negativo de la PCR, 1: sobrenadante 4dpi, 2: réplica biológica sobrenadante 4dpi, 3: sobrenadante 7dpi, 4: réplica biológica sobrenadante 7dpi, 5: sobrenadante 10 dpi y 6: réplica biológica 10 dpi.

Una vez obtenida y verificada la concentración y pureza del RNA colectado a partir de la infección de las células C6/36HT, se hizo la síntesis de cDNA y una PCR convencional agregando los respectivos controles, para determinar la presencia del

virus en los cultivos celulares, a partir de la presencia de 100pb, el tamaño de amplificación esperado para ZIKAV. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% y como buffer de corrida TBE 0.5X tal como se muestra en la figura 9.

La confirmación biológica de infecciones por ZIKAV se basa en la detección del RNA viral usando PCR convencionales o RT-qPCR. Este último, es un método rápido, sensible y específico durante la etapa inicial de la infección (CERTEST BIOTEC, 2018). El ZIKAV cuenta con un genoma cercano a los 11000 nucleótidos, los cuales, transcriben para 3 proteínas estructurales; capsido [C], precursor de membrana [prM], y envoltura [E] (Fontes et al, 2017). Los primers usados en la preparación del mix previamente descritos en la metodología, tienen como diana una región conservada del gen de cubierta (E), por lo tanto, es aquel que se amplifica en la reacción de PCR y que se espera verificar con la aparición de una banda a 100pb en las respectivas electroforesis. En la figura 9, se muestra la determinación, por medio de la presencia de la banda a los 100pb en las muestras, que la totalidad de los cultivos celulares inoculados con sobrenadante de ZIKAV tenían la presencia del ZIKAV, por lo que se pudo establecer una infección exitosa a nivel de laboratorio. Ahora bien, aunque las figuras anteriores solo comprueban la presencia del ZIKAV, no dan una estimación de la cantidad de virus por cada uno de los cultivos infectados, lo que representa el objetivo de realizar la cinética de infección. Por lo que a continuación en la figura 10, se presentan los resultados obtenidos por RT-qPCR de los anteriores cultivos celulares específicos para la cuantificación de ZIKAV.

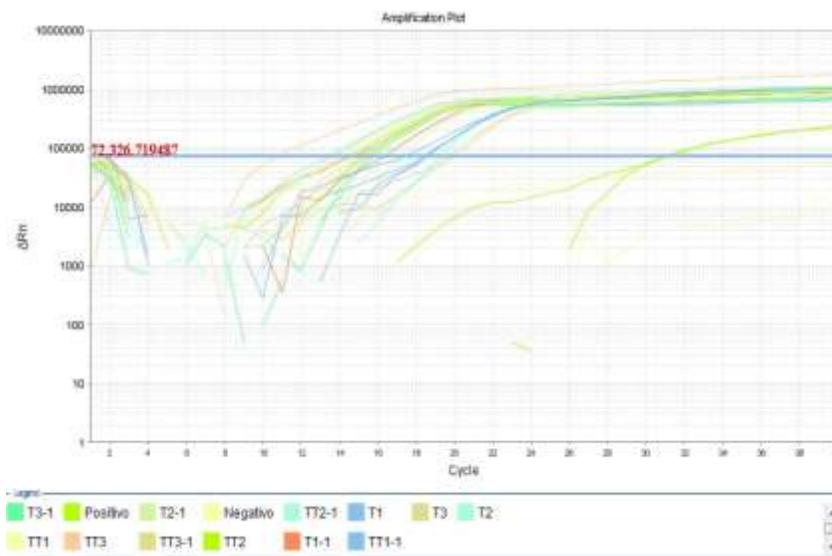


Figura 100. Ciclos de amplificación en la qPCR de las curvas cinéticas de infección del ZIKAV. En el eje horizontal se encuentra Ct (ciclos de amplificación) y en el eje vertical ΔRn (cantidad de copias generadas por cada ciclo de amplificación).

Es importante tener en cuenta que, las amplificaciones generadas de la RT-qPCR tienen muchas ventajas sobre la PCR convencional, ya que no requieren un análisis

post-PCR, es más rápido, permite la cuantificación de copias virales, y no genera gastos debido a un análisis electroforético o fotodocumentación, así como también facultan la identificación con una alta probabilidad los productos de PCR a partir de su temperatura de fusión (Vasco, 2013). Teniendo en cuenta lo anterior, en la figura 10 los valores de Ct representan los ciclos de amplificación de cada muestra, mientras que el ΔR_n indica la cantidad de copias que se generan por cada ciclo. Por lo tanto, entre menos Ct, mayor será la proporción de ZIKAV presente en la muestra. Esta técnica controla la amplificación del gen E en tiempo real a través de una señal fluorescente emitida durante la amplificación (CERTEST BIOTEC, 2018), que, a su vez es específica de la sonda o marcador fluorescente descrito en la metodología. Para mayor certeza de los resultados, se usó una réplica biológica por cada uno de los cDNA utilizados además de las réplicas técnicas. Según el CDC, Las muestras con un Ct mayor a 38, son negativas y menor a 38, positivas. A continuación, en la tabla 4 y 5 se muestran los Ct correspondientes a las amplificaciones analizadas por cada curva.

Tabla 3. Ciclos de amplificación obtenidos en los ensayos de RT-qPCR de las infecciones realizadas a nivel de cultivo celular de células C6/36HT de intestino medio de *Ae. albopictus* a los 4, 7 y 10 días post infección (dpi) de la primera replica biológica.

Días post infección (dpi)	Replicas técnicas (Rt-qPCR)	Replicas técnicas (curvas)	Ct	\bar{x} Ct
4	R1	T1	18,47	17,90
	R1		17,34	
	R2	T1-1	13,41	13,60
	R2		13,79	
7	R1	T2	15,19	15,07
	R1		14,95	
	R2	T2-1	15,05	14,55
	R2		14,06	
10	R1	T3	15,43	14,88
	R1		14,34	
	R2	T3-1	19,1	18,75
	R2		18,4	

Tabla 4. Ciclos de amplificación obtenidos en los ensayos de RT-qPCR de las infecciones realizadas a nivel de cultivo celular de células C6/36HT de intestino medio de *Ae. albopictus* a los 4, 7 y 10 días post infección (dpi) de la segunda replica biológica.

Días post infección (dpi)	Replicas técnicas (Rt-qPCR)	Replicas técnicas (curvas)	Ct	\bar{x} Ct
4	R1	TT1	14,64	15,45
	R1		16,27	
	R2	TT1-1	16,49	16,79
	R2		17,1	
7	R1	TT2	15,8	15,67
	R1		15,55	
	R2	TT2-1	18,38	18,44
	R2		18,51	
10	R1	TT3	19,5	19,36
	R1		19,22	
	R2	TT3-1	19,63	19,79
	R2		19,95	

En ese orden de ideas, respecto al promedio de Ct de las infecciones a nivel de cultivo a los 4, 7 y 10 dpi con ZIKAV de la primera (tabla 4) y segunda réplica (tabla 5), es posible afirmar que en las dos replicas biológicas, se obtiene una cantidad de copias del material genético viral entre los 4 y 10 días después de haber realizado la inoculación del virus con un promedio Ct de 17,90 a 18,75 para la primera curva y 15,45 a 19,79 para la segunda en las células C6/36 HT, por lo tanto, entre los 4 y 10 días se presenta mayor proporción del ZIKAV en ese intervalo de la post infección. El resultado anterior concuerda con lo reportado en la literatura respecto al periodo de inoculación del virus, el cual, desde la picadura del mosquito hasta que aparecen los síntomas en el humano suele ser de 3 a 10 días (OMS, Enfermedad por el virus zika, 2018). Del resultado de la RT-qPCR se tiene en cuenta únicamente aquellas amplificaciones que se pueden detectar por encima de la sensibilidad del equipo para la detección de ZIKAV como también que necesitan menor cantidad de ciclos para ser amplificados debido a que se siguen generando copias del gen, pero no son determinantes en la concentración del mismo (O, Faye, et al, 2008). Es necesario aclarar que el control positivo, que se tomó del sobrenadante de ZIKAV a nivel de cultivo celular no amplificó (Ct promedio 39.00), lo que puede estar asociado a errores sistemáticos durante el proceso de preparación de la muestra o de degradación del virus. El control negativo corresponde al mix preparado para la amplificación con agua libre de RNasas, que a su vez tuvo un Ct promedio de 40.00. Se recomienda la realización de una qPCR cuantitativa absoluta con el fin de determinar la cantidad de copias virales en cada uno de los días de post infección.

9.2 Evaluación del fenotipo de *Aedes aegypti* a la infección por ZIKAV

Una vez se identificó que el intervalo de 4 a 10 dpi es en el que se tiene mayor proporción del ZIKAV, se procedió a realizar la evaluación del fenotipo de infección en las cepas Cali-S y Rockefeller. Una vez se realizaron las infecciones artificiales con la sangre mezclada con virus Zika, los mosquitos se mantuvieron con vida y en constante alimentación con azúcar durante 10 días la totalidad de los individuos infectados, tiempo en el que probablemente se encuentra la mayor cantidad de ZIKAV posible. De este experimento se hicieron dos replicas biológicas: en la primera, se procesaron 30 individuos de la cepa Rockefeller (60 muestras; 30 intestinos y 30 cabezas) y 11 de Cali-S (22 muestras; 11 intestinos – 11 cabezas). Debido a la poca cantidad de individuos de la cepa Cali-S disponible para ser analizados, se tomó una muestra de 15 individuos de los 30 procesados en la cepa Rockefeller para ser evaluados en cuanto a su fenotipo de infección. Mientras que, para la segunda, se tomaron 30 individuos de la cepa Rockefeller (60 muestras; intestino y cabeza). No fue posible realizar la segunda replica para la cepa Cali-S debido a que se presentaron inconvenientes en el insectario y no fue posible obtener mosquitos para infectar artificialmente.

Primer experimento

Tal como se explicó en la cinética de infección, la técnica usada para evaluar la proporción de mosquitos susceptibles (infectados) o refractarios (no infectados) a la infección por ZIKAV se realizó por PCR convencional usando las ecuaciones 1 y 2. Como también se hizo la diferenciación de la naturaleza de las muestras, es decir, si corresponden a cabeza o a intestino de un mismo individuo, ello, con el fin de estudiar su competencia vectorial y las barreras de infección asociadas a la misma. Los resultados se muestran a continuación.

Cepa Rockefeller

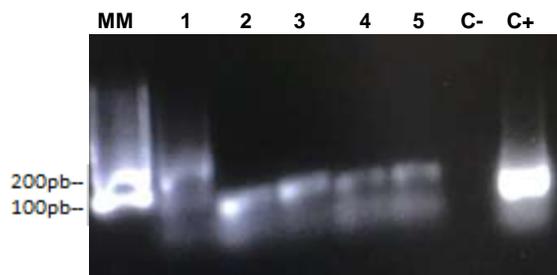


Figura 11. Muestras positivas de la cepa Rockefeller. 1: intestino de mosquito número 5, 2: cabeza de mosquito número 10, 3: intestino de individuo número 11, 4: cabeza de mosquito intestino número 11, 5: Intestino de mosquito número 12, C- : control negativo y C+: control positivo.

En la figura 12 se verificó la presencia del ZIKAV en 3 muestras de intestino y en 2 de cabeza de los 15 individuos evaluados. Los restantes fueron negativos a la infección. De lo anterior, La tasa de susceptibles indica la infección del ZIKAV en el mosquito, lo que permite el análisis en cuanto a la posible transmisión. No obstante, la evaluación por cabeza e intestino, se relaciona con la capacidad de diseminación del virus en el mosquito a través de las distintas barreras de infección (Caicedo, 2008). Las muestras que son detectables a nivel de intestino, indican que para la cepa Rockefeller, tienen la capacidad de atravesar la barrera de infección del intestino medio, lo que le permite no solo replicarse a dicho nivel, sino también, poder llegar a otros sitios de replicación como lo son cabezas, y órganos secundarios. En el caso de las muestras que tienen presencia del ZIKAV en cabeza (2), se debe a que la infección puede alcanzar las glándulas salivares donde probablemente puede ser transmitido al próximo hospedero vertebrado susceptible durante las continuas alimentaciones del mosquito (Caicedo, 2008, Crhistensen, 1989). Solo el 6,6% de los individuos de la cepa Rockefeller son susceptibles a la infección por el virus, pues, son aquellos en los que el virus ha logrado atravesar la barrera de transmisión que existe previo a la glándula salival y, por lo tanto, no solo replican el virus, sino también, tendrán la capacidad de transmitirlo en sus alimentaciones de hospedadores vertebrados.

Cepa Cali-S

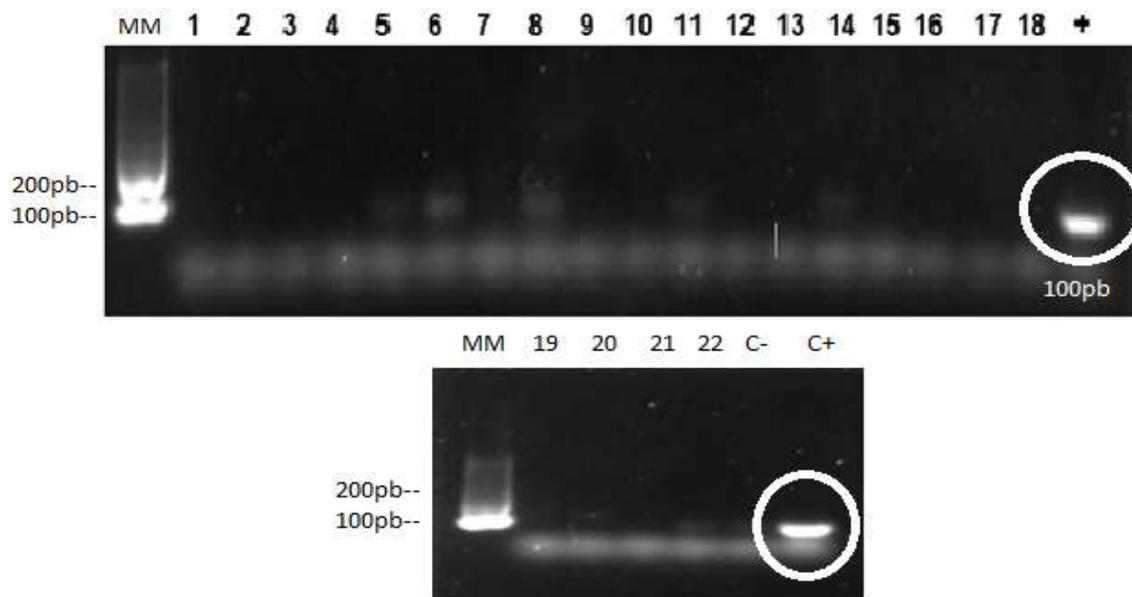


Figura 12. Muestras de cepa Cali-S en gel de agarosa al 1%. La banda en los 100pb, indican la presencia del ZIKAV. Las muestras impares corresponden a muestras de intestino, mientras que los números pares a las muestras de cabeza.

En la cepa Cali-S se verificó la presencia del ZIKAV en 7 individuos y la ausencia del mismo en 8, de los cuales 5 mosquitos, el virus migró hasta glándulas salivares, mientras que, en los restantes solo se detectó la presencia del ZIKAV a nivel del

intestino medio. Es decir, que solo en 5 de los 11 individuos analizados, se dio una diseminación del virus, atravesando la barrera de infección del intestino medio, donde se replica, y posteriormente, la barrera de transmisión que también debe ser atravesada para poder llegar hasta glándulas salivares y poder infectarlas (Caicedo, 2008). De esta manera, un 45,45% de los individuos son potenciales vectores eficientes del ZIKAV, por lo que, no solo tienen la capacidad de replicar el virus, sino también, transmitirlo en cada alimentación de hospedadores vertebrados posterior al tiempo de incubación donde se alcanza el mayor pico virémico (10 días).

Segundo experimento

Con la finalidad de tener mayor certeza a los resultados anteriormente analizados, se realizó una réplica biológica del experimento, para lo que se usaron únicamente mosquitos de la cepa Rockefeller y se simularon las mismas condiciones de infección artificial de los anteriores individuos, a excepción de la sangre con ZIKAV usada en el proceso de infección de los mosquitos, la cual fue lo único que varió. Los resultados se muestran a continuación en la figura 13.

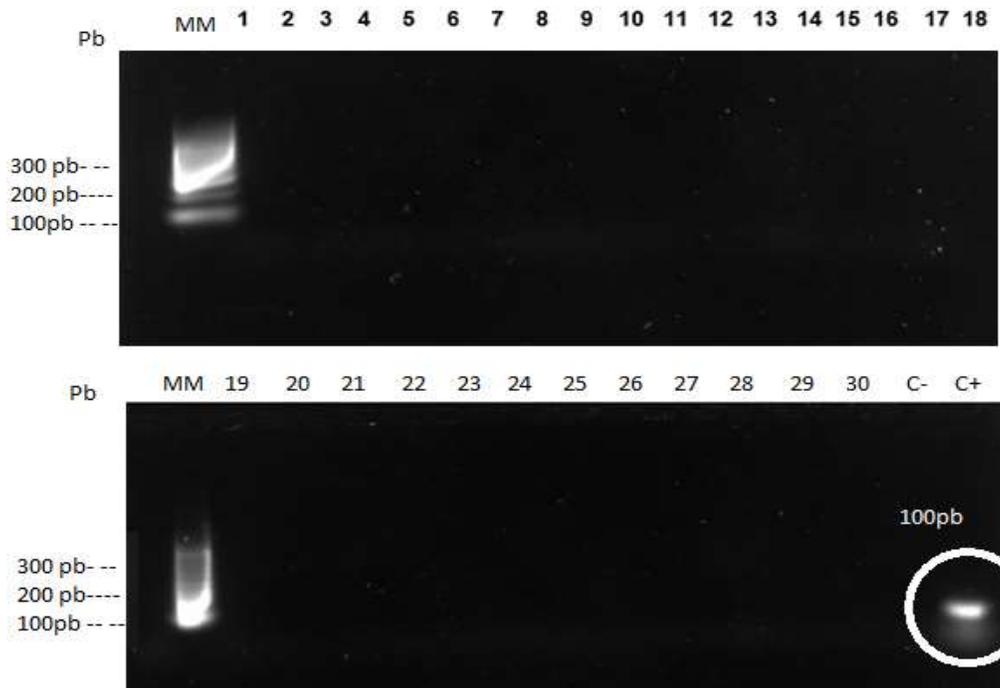


Figura 13. Muestras de cepa Rockefeller visualizadas en gel de agarosa al 1%. Ausencia total de bandas en las muestras. Control positivo señalado a los 100pb y ausencia de control negativo. Los pozos impares representan los intestinos y los pozos siguientes pares, las cabezas de los mismos individuos.

De acuerdo a los resultados presentados en la figura 13 del segundo experimento, en ninguno de los individuos analizados se detectó la presencia del ZIKAV tanto a nivel de intestino como a nivel de cabeza, sin embargo, se observa la amplificación del control positivo además de los resultados de la verificación de la presencia de

virus Zika en la sangre que se empleó para la alimentación de los mosquitos tal como se muestra en la figura 14. Para esto, se evaluaron las muestras a través de una PCR convencional, el resultado se muestra a continuación en la figura 14.

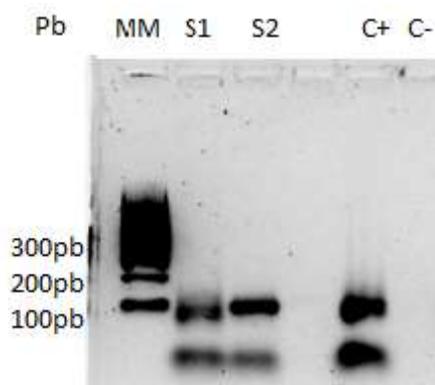


Figura 13. Productos de PCR convencional visualizados en gel de agarosa al 1% de sangres usadas en el primer (S1) y segundo experimento (S2) para la infección artificial de la totalidad de los individuos. Control positivo con banda a 100pb.

De acuerdo a la Figura 14, la sangre usada tanto en el primer experimento como en el segundo, se encontraban infectadas con ZIKAV. Es decir, que la no infección de los individuos de la cepa Rockefeller del segundo experimento se puede encontrar asociado a factores propios del mosquito, en otras palabras, si el virus no es capaz de infectar el mosquito, entonces el mosquito tiene una barrera de escape de intestino medio (BEM) (Caicedo, 2008; SHAHABUDDIN, 1998; GASS, 1977).

Ahora bien, teniendo todos los resultados ya descritos, en la tabla 9 se hace un resumen en cuanto a la cantidad de individuos utilizados por cada experimento, además, el número de mosquitos analizados, los resultados positivos de infección a nivel de intestino medio y glándula salival, como también la tasa de infección y trasmisión del total de mosquitos por experimento.

Tabla 5. Resultados correspondientes a la evaluación del fenotipo de infección a ZIKAV y competencia vectorial.

Cepa	Replica biológica	No mosquitos alimentados	No Mosquitos sobrevivientes	Positivos		Tasas	
				intestino	cabeza	Infección	Transmisión
Rock	1	50	15	3	2	4/15	1/15
Cali-S	1	45	22	5	5	7/11	5/11
Rock	2	50	15	0	0	0/15	0/15

Tabla 6. Relación de individuos infectados y no infectados con respectivas barreras de infección ante la infección con ZIKAV. S: susceptible; MIB: barrera de infección de intestino medio; MEB: Barrera de escape del intestino medio.

Cepa	Mosquitos infectados (n)	PCR cabeza (n)	PCR intestino (n)	% S	% MIB	%MEB
Cali-S	7	5	7	45,45%	36.36%	63.63%
Rockefeller	4	1	4	6.66%	73.33%	26.66%
Rockefeller	0	0	0	0	0.00%	0.00%

Respecto a la tabla 6 y 7, se detalla el comportamiento de infección a ZIKAV de los mosquitos infectados a escala de laboratorio, es posible afirmar que tanto la cepa Cali-S como Rockefeller difieren en su fenotipo de infección cuando son retados a la infección por virus dengue – 2 que cuando son retados a la infección por ZIKAV. Al tiempo, que la cepa Cali-S es un vector más eficiente al ser comparado con la cepa Rockefeller, pues, es aquella que no solo tiene un comportamiento susceptible mayor respecto a la anterior, sino también una tasa de transmisión más alta. En síntesis, primero, los resultados siguieron que teniendo en cuenta que la cepa Rockefeller es empleada como control positivo en ensayos de infección con dengue, en el caso del ZIKAV no aplicaría porque no es susceptible a la infección y segundo, los datos podrían ser aplicados a futuro en campo para el entendimiento de la dinámica de transmisión de estos virus, empleando mosquitos colectados en campo y virus circulantes en el momento de la transmisión.

10. CONCLUSIÓN

- La cinética de infección en cultivo de células C6/36HT, permitió determinar que se obtienen altas proporciones de ZIKAV entre los 4 y 10 días de post infección en células C6 /36 HT de *A. Albopictus*.
- La cepa Cali-S es susceptible a infección por ZIKAV en un 45.45% y refractaria en un 36.36%.
- La cepa Rockefeller es susceptible a la infección por ZIKAV en un 6.66% y refractaria en un 73.33%.
- La cepa Cali-S y Rockefeller difieren en fenotipo de infección para DENV-2 y ZIKAV.

11. RECOMENDACIONES

- Realizar la extracción de RNA usando un protocolo distinto al descrito en la metodología con el fin de asegurar una relación A260/280 y A260/230 entre los rangos óptimos.
- Incrementar el número de individuos evaluados de las respectivas cepas, como agregar una repetición experimental con el fin de tener mayor seguridad de los resultados obtenidos.
- Incluir en un próximo experimento Cali-MIB como cepa refractaria a virus dengue-2 para evaluar la diferencia entre una cepa refractaria del mismo virus al ser retada para ZIKAV.

12. BIBLIOGRAFÍA

- AFP/CIDEIM. (sf). *CIDEIM*. Recuperado el 06 de noviembre de 2017, de: <http://www.cideim.org.co/cideim/es/component/content/article/4-noticias/269-aedes.html>
- BancoADN. (2016). *Programa control de calidad de muestras*. Salamanca: Banco Nacional de ADN Carlos III; Universidad de Salamanca.
- Beerntsen, B., Anthony, J., & Christensen, B. (2000). Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and molecular biology review*, vol. 64, No. 1, p. 115–137.
- Black, W. & Al, e. (2002). Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research.*, 33, 379-388.
- Braks M., et al. (2003). Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *J Med Entomol.* 40:785-94
- Caicedo, P. (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. Santiago de Cali: Universidad del Cauca.
- Carvajal, R. (2015). Hospital Universitario Ramón Carvajal. Recuperado el 06 de noviembre de 2017, de: http://www.hrc.es/bioest/Medidas_frecuencia_3.html
- Certest Biotec, S. (2018). Zika Virus Real Time PCR Detection Kit. San Mateo de Gállego, Zaragoza; España: Pol. Ind
- CDC. (2016). Recuperado el 06 de noviembre de 2017, de: https://www.colorado.gov/pacific/sites/default/files/OEPR4_ZTK_MosquitoLifeCycle_Spanish_1.pdf
- Chico, N. D. (2016). Cinética Celular Y Supervivencia Celular A La Radiación. *Biocancer Research Journal*.
- Chusri, S. (2014). Kinetics of Chikungunya Infections during an Outbreak in Southern Thailand, 2008–2009. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1.
- Dengue, T. (2016). *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Recuperado el 4 de septiembre del 2018, de: http://www.ceip.edu.uy/documentos/galerias/prensa/1243/pre_aedes_aegypti.pdf

Fontes, C., Shan, C., Lu, H., & Wang, T. (2017). *Functional analysis of glycosylation of Zika virus envelope protein*. University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA: CELLPRESS.

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

Gil, D., Benítez, J., & Gutiérrez, M. (2010). Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue. Medellín: Iatreia Revista Médica Universidad de Antioquia.

Johnson, B., Russell, B., & Goodman, C. H. (2017). Commercial Sources for Diagnostic Assays, 214. Recuperado el 10 del 2018 noviembre de: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw274>. Laboratory

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

Métode. (2015). ¿Por qué solo pican los mosquitos hembra?. Universidad de Valencia. Recuperado el 07 de noviembre de 2017, de: <https://metode.es/los-porques-de-metode/por-que-solo-pican-los-mosquitos-hembra.html>

MinSalud. (2016). Rendición de cuentas del 2015. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social.

Ocampo, C. (2017). CIDEIM. Recuperado el 06 de noviembre de 2017, de: <http://www.cideim.org.co/cideim/es/component/content/article/4noticias/269aedes.html>

Ortiz, M. (2017). Evaluación de la transmisión vertical del virus dengue-2 en cepas de *Aedes aegypti* que difieren en su susceptibilidad hacia la infección por el virus. Cali: Icesi.

O, F., Faye, O., Dupressoir, A., & Weidmann, M. (2008). One-step RT-PCR for detection of Zika virus. *EL SEVIER*.

Quintero, D. Osorio, J., & Martínez-Gutiérrez, M. (2010). Competencia vectorial: Consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del dengue. *Iatreia*, 23(2), 146–156.

Shahabuddin, M., Cociancich, S. & Zieler, H. (1998). The search for novel malaria transmission blocking targets in the mosquito midgut. *Parasitology. Today*, Vol. 14, p. 493–497.

Sourisseau. (2007). Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog*, 89.

Tandale. (Oct de 2009). Systemic involvements and fatalities during Chikungunya epidemic in India. *J Clin Virol*, 145-9.

Tardieux, I. (1991). Analysis of inheritance of oral susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to Dengue-2 virus using isofemale lines. *The Journal of Medical Entomology*, 28(4), 518-521.

Wallis, G. (1985). Selection for susceptibility and refractoriness of *Aedes aegypti* to oral infection with yellow fever virus. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.*, 34(6), 1128-1231.

Zuluaga, M., & Vanegas, D. (2016). El virus Chikungunya en Colombia: aspectos clínicos y epidemiológicos y revisión de la literatura. *Iatreia*, 29(1), 65–74. Recuperado el 10 de octubre, de: <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v29n1a06.65>

Vasco, K. (2013). Standardization of melting curve analysis for the detection of *Babesia* in ticks using nucleotide polymorphisms. Michigan; USA.

13. ANEXOS

A continuación, se presentan los resultados de la cuantificación de RNA viral de Zika en muestras de mosquito *Aedes aegypti* correspondientes a las cepas Rockefeller y susceptible de un mismo individuo infectado con virus Zika. Los números impares corresponden a los intestinos, mientras que los números pares a las cabezas respectivamente de cada individuo. Por lo tanto 1 y 2 corresponden al intestino y a la cabeza del individuo 1. En total, se tuvieron 48 individuos de la cepa Rockefeller

Tabla 7. Cuantificación de RNA viral Zika en *Aedes aegypti* Rockefeller

Rokefeller			
RNA	260/230	260/280	(ng/μL)
1	0,094	1,588	77,45
2	0,038	1,133	11,019
3	0,076	1,056	12,247
4	0,194	1,596	155,8
5	0,07	1,078	14,682
6	0,068	1,494	170,673
7	0,06	1,185	72,69
8	0,088	1,497	83,26
9	0,082	1,432	115,87
10	0,146	1,062	19,384
11	0,051	0,815	13,22
12	0,143	1,573	188,062
13	1,185	0,091	255,714
14	0,075	1,532	143,067
15	0,034	0,89	16,881
16	0,115	1,367	58,09
17	0,101	1,2	69,586
18	0,118	1,82	94,44
19	0,089	1,608	69,25
20	0,105	1,346	230,769
21	0,163	1,54	210,309
22	0,089	1,312	80,033
23	0,075	0,886	72,387
24	0,115	1,3	219,077
25	0,108	1,572	197,696
26	0,052	1,245	34,727
27	0,081	1,341	55,306
28	0,124	1,466	209,029
29	0,177	1,361	121,655

30	0,04	1,027	89,152
31	0,056	1,418	82,141
32	0,124	2,275	16,84
33	0,044	1,645	32,397
34	0,061	1,141	13,788
35	0,008	0,467	2,237
36	0,046	1,439	24,711
37	0,042	2,086	29,603
38	0,12	1,479	145,707
39	0,055	3,214	26,672
40	0,141	2,018	89,069
41	0,063	1,838	14,737
42	0,221	1,429	7,99
43	0,029	-28,833	13,823
44	0,07	1,078	14,682
45	0,065	1,804	6,751
46	0,36	2,601	58,445
47	0,03	-44,333	10,787
48	0,035	-7,474	11,415
49	-0,003	0,4	-0,972
50	0,123	1,415	10,776
51	0,065	1,297	40,72
52	0,114	1,361	13,376
53	0,052	1,402	21,673
54	0,021	2,333	3,904
55	0,066	1,574	82,977
56	0,055	2,214	22,672
57	0,141	1,018	40,069
58	0,063	0,838	12,737
59	0,221	2,429	8,99
60	0,122	1,547	270,156
61	0,091	1,842	95,749
62	0,115	1,297	47,716
63	0,091	1,557	251,445
64	0,057	3,205	10,221
65	0,118	1,726	93,674
65	0,188	1,632	126,474
67	0,118	1,211	284,858
68	0,112	1,785	13,463
69	0,085	1,542	136,648
70	0,098	1,635	123,233

71	0,084	1,632	109,003
72	0,083	1,137	70,427
73	0,077	1,51	103,586
74	0,111	1,324	212,944
75	0,074	1,791	106,033
76	0,092	1,511	132,113
77	0,099	2,084	63,051
78	0,073	1,178	46,235
79	0,129	1,147	190,76
80	0,105	1,382	105,596
81	0,077	1,521	83,855
82	0,09	1,579	118,381
83	0,097	1,714	77,291
84	0,133	1,468	24,338
85	0,092	1,458	198,663
86	0,139	1,183	160,37
87	0,148	1,151	202,417
88	0,118	1,54	141,116
89	0,113	1,634	56,013
90	0,214	1,829	169,956
91	0,475	8,949	28,391
92	0,215	1,172	182,79
93	0,25	1,567	115,914
94	0,151	1,363	91,251
95	0,247	0,725	5,353
96	0,164	2,176	66,206

Por otro lado, las muestras evaluadas y cuantificadas de RNA total en la cepa susceptible se muestran a continuación, donde los números impares representan las muestras con intestino mientras que los números pares las muestras con cabeza de los mosquitos infectados con virus Zika. Los valores 1 y 2, corresponden a RNA de intestino y cabeza del individuo 1. Se tuvieron 11 individuos.

Tabla 8. Cuantificación de RNA viral Zika en *Aedes aegypti* susceptible

Susceptible			
	260/230	260/280	intestino
1	0,026	1,063	38,034
2	0,081	1,947	50,681
3	0,038	1,386	48,613
4	0,019	0,928	28,409

5	0,037	1,168	30,662
6	0,038	0,724	29,927
7	0,07	0,258	2,765
8	0,036	1,673	21,134
9	0,073	0,904	20,519
10	0,047	0,585	15,525
11	0,036	0,673	28,843
12	0,046	0,444	9,566
13	0,045	0,747	43,755
14	0,109	1,502	79,203
15	0,147	1,129	43,468
16	1,129	1,034	71,426
17	1,034	0,628	16,558
18	0,628	0,816	18,803
19	0,816	0,891	27,473
20	0,891	1,329	44,526
21	1,329	0,803	58,56
22	0,803	1,715	85,668

Segunda repetición

Con la intención de confirmar los datos del primer experimento, se realizó una réplica únicamente para la cepa Rokefeller. De la que se obtuvieron 50 individuos. Los números impares corresponden a las muestras de intestino, mientras que los números pares a las muestras de cabeza.

Tabla 9. Cuantificación de RNA de cepa Rokefeller segundo experimento.

Rokefeller			
RNA	260/230	260/280	(ng/μL)
1	0,045	1,636	15,421
2	0,026	0,887	4,395
3	0,161	1,436	103,478
4	0,029	0,971	8,298
5	0,055	1,687	128,14
6	0,013	0,897	4,976
7	0,177	1,93	79,039
8	0,085	1,171	125,438
9	0,068	0,958	20,36
10	0,053	1,401	49,714
11	0,218	1,446	19,465
12	0,112	1,363	145,012

13	0,22	1,321	60,919
14	0,106	1,326	250,264
15	0,136	1,265	77,652
16	0,141	1,194	46,316
17	0,232	1,694	163,179
18	0,043	0,834	19,627
19	0,069	1,331	46,169
20	0,023	1,019	29,917
21	0,05	1,251	37,918
22	0,041	0,812	23,82
23	0,103	1,369	57,235
24	0,11	1,776	120,096
25	0,064	1,463	45,044
26	0,128	1,192	39,968
27	0,033	1,43	25,179
28	0,087	1,572	85,657
29	0,165	1,585	72,313
30	0,141	1,291	110,827
31	0,112	1,686	122,573
32	0,034	0,611	9,668
33	0,045	1,28	70,205
34	-0,012	-0,353	-1,952
35	0,025	0,855	8,157
36	0,032	0,741	8,646
37	0,052	0,986	22,385
38	0,087	1,319	116,158
39	0,019	1,375	35,405
40	0,054	1,104	17,416
41	0,101	1,193	11,03
42	0,014	0,86	9,976
43	0,072	0,962	38,715
44	0,081	1,401	49,451
45	0,03	0,935	9,393
46	0,061	1,41	30,931
47	0,045	1,525	125,629
48	0,054	1,369	39,984
49	0,104	1,296	97,756
50	0,04	1,255	16,333
51	0,178	1,387	116,67
52	0,051	0,83	19,364
53	0,172	1,564	79,984

54	0,102	0,852	23,553
55	0,386	1,423	71,878
56	0,092	1,611	98,63
57	0,147	1,54	362,629
58	0,013	0,764	15,777
59	0,05	0,91	9,748
60	0,043	1,706	63,923
61	0,113	1,482	81,103
62	0,029	1,05	18,458
63	0,079	2,681	107,952
64	0,044	1,007	22,697
65	0,362	1,362	74,551
65	0,035	1,017	44,698
67	0,179	1,228	60,399
68	0,015	1,177	29,223
69	0,056	1,424	18,397
70	0,024	0,95	20,278
71	0,289	1,384	137,307
72	0,016	1,188	15,41
73	0,044	1,181	21,797
74	0,02	1,179	24,156
75	0,041	1,502	26,64
76	0,033	1,307	23,077
77	0,094	1,805	41,281
78	0,271	1,265	46,878
79	0,097	1,817	170,608
80	0,025	1,164	28,057
81	0,106	1,718	38,971
82	0,058	1,379	6,482
83	0,066	1,25	22,508
84	0,019	0,627	7,556
85	0,5	1,393	66,801
86	0,035	0,992	28,928
87	0,116	1,66	46,295
88	0,075	1,319	19,761
89	0,043	1,053	55,134
90	0,02	0,915	22,293
91	0,113	1,482	81,103
92	0,108	1,587	113,464
93	0,113	1,482	81,103
94	0,061	1,089	15,863

95	0,362	1,362	74,551
96	0,087	1,103	66,476
97	0,179	1,228	60,399
98	0,084	1,726	34,839
99	0,056	1,424	18,397
100	0,086	1,322	35,568

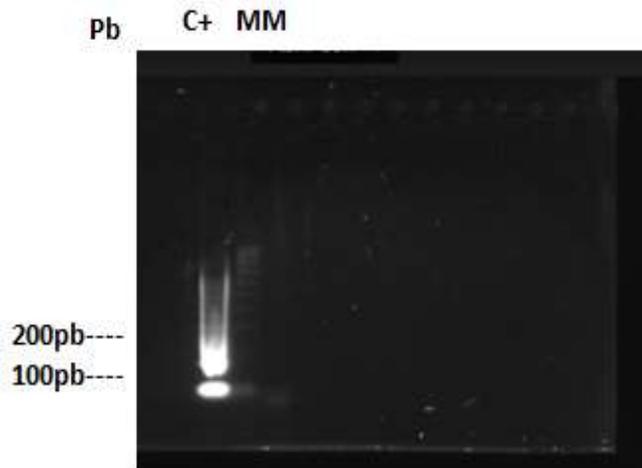


Figura 14. PCR de cDNA utilizado para servir de control positivo en las PCR convencionales de las cepas Cali-S y Rockefeller en gel de agarosa al 1%.

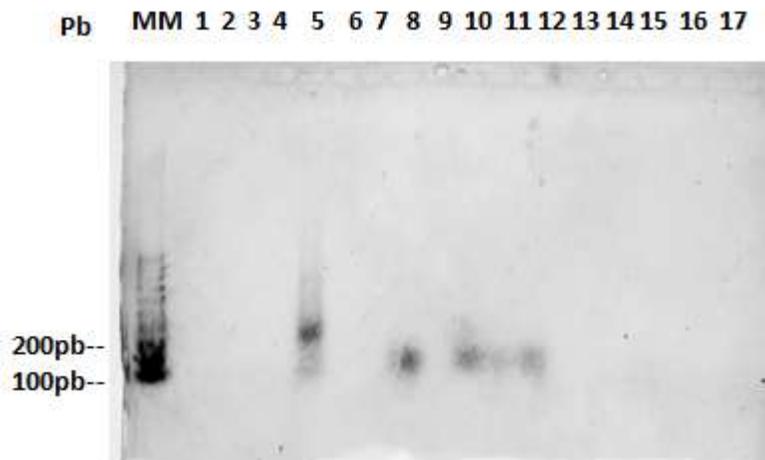


Figura 15. Electroforesis de PCR correspondiente a cepa Rockefeller primer experimento en gel de agarosa al 1%.