

**FONDO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN (FAIN)
UPAO 2019****FORMATO DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN****SECCION A: DATOS GENERALES****1. Título o nombre del proyecto**

Tipificación de virus DENv en estadios biológicos de *Aedes aegypti* infectados naturalmente.

2. Línea de investigación de la Facultad/Área

Biomedicina molecular y Salud comunitaria/
Área de Microbiología

3. Unidad académica (Facultad/Escuela profesional/otra)

Escuela de Medicina
Departamento de Ciencias

4. Equipo investigador

- (Investigador principal)
Microbióloga Dra. Ofelia Magdalena Córdova Paz Soldán
- Co – investigador
- Estudiante

5. Institución y/o lugar donde se ejecutará el proyecto

Laboratorio de Biotecnología y Microbiología molecular (J-307)

6. Duración (Fecha de Inicio y término)

12 meses
Fecha de inicio: 06/07/2019
Fecha de término: 30/06/2020

SECCIÓN B: PLAN DE INVESTIGACIÓN

1. Planteamiento y formulación del problema

La prevención y el control de brotes epidémicos de dengue, una infección viral reemergente, se sustenta principalmente en la vigilancia del mosquito transmisor *Aedes aegypti* con un sistema de vigilancia que **nstante** permite la implementación de medidas de acción directa como la destrucción de los ecotopos naturales como artificiales de la población larvaria de Aedes como el uso de insecticidas [1]. Sin embargo, el monitoreo de poblaciones de mosquitos adultos y larvas con densidad poblacional baja no es un indicador sensible para la prevención de brotes epidémicos. Se estima 100 millones aproximadamente de nuevas infecciones en más de cien países endémicos (2) En el Perú el número de casos reportados hasta la semana 3 del año 2019 llegaron a 848 y de 1586 en la semana 5(3)

El virus del dengue (DENV) constituye un grupo de cuatro virus antigénicamente diferentes pero estrechamente relacionados: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4. En el país se han detectado circulando los cuatro tipos. Por ello, la detección de la presencia de del virus del dengue en poblaciones del vector constituye un complemento valioso a la vigilancia activa y alerta temprana de potenciales brotes [4].

La presencia de los diferentes serotipos de virus dengue circulando en la diversas poblaciones de *Aedes aegypti* en nuestra región, motiva estudiar ¿cuáles son los tipos de virus DENV que infecta naturalmente los estadios de larvas, pupa y adulto de *Aedes aegypti* en la provincia de Trujillo?

2. Antecedentes

Kliks y colaboradores (5) diseñaron un sistema de vigilancia molecular y evaluaron 8 pares de primers para detectar 44 diferentes virus del género Bunyavirus (causantes de encefalitis) aplicando RT-PCR, los autores señalan que son capaces de detectar un mosquito infectado en 99 mosquitos no infectados; por lo tanto, RT-PCR es una técnica con 100% de sensibilidad y muy específico

3. Justificación (importancia, resultados esperados, impacto: social, económico, ambiental u otro).

En las últimas cinco décadas, la incidencia de dengue se ha incrementado 30 veces documentándose casos en áreas previamente no afectadas. Cada año surgen cientos de miles de casos de dengue grave, con aproximadamente 20 000 muertes La circulación simultánea de los diferentes serotipos de virus DENV incrementa el riesgo de aparición de casos de dengue con manifestaciones graves, por lo que investigar la infección natural de *Aedes aegypti* y el índice aedico permitira tener alternativas de control que reduzcan la densidad poblacional del mosquito infectados naturalmente asi como contribuir a reducir el impacto de la enfermedad.

4. Objetivos

Objetivo General (Propósito del proyecto)	Resultados Finales	Medios de Verificación
Detectar el tipo de virus DENV que infecta naturalmente los estadios de larvas, pupa y adulto de <i>Aedes aegypti</i> en la provincia de Trujillo	R1 PCR y RT-PCR del ARN viral aislado en larvas, pupas y adultos de <i>Aedes aegypti</i>	MV1 Electroforesis y curvas de melting de los amplificados obtenidos
Objetivos Específicos (Componentes)	Resultados Intermedios:	Medios de Verificación
1. Tipificar el serotipo DENV que infecta naturalmente los estadios larvarios de <i>Aedes aegypti</i> en la provincia de Trujillo	PCR, RT-PCR y qPCR del ARN extraído de formas larvarias de <i>Aedes aegypti</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación por PCR y RT-PCR • curvas de melting de los amplificados obtenidos por qPCR
2. Tipificar el serotipo DENV que infecta naturalmente los estadios pupal de <i>Aedes aegypti</i> en la provincia de Trujillo	PCR, RT-PCR y qPCR del ARN extraído de formas pupales de <i>Aedes aegypti</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación por PCR y RT-PCR • curvas de melting de los amplificados obtenidos por qPCR
3. Tipificar el serotipo DENV que infecta naturalmente los estadios de adulto de <i>Aedes aegypti</i> en la provincia de Trujillo	PCR, RT-PCR y qPCR del ARN extraído de formas adultas de <i>Aedes aegypti</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación por PCR y RT-PCR • curvas de melting de los amplificados obtenidos por qPCR

5. Marco teórico

El dengue es una infección viral transmitida por mosquitos del genero *Aedes*, un vector antropofílico que mantiene el ciclo replicativo del virus en humanos. Se estima 100 millones aproximadamente de nuevas infecciones en más de cien países endémicos (1) En el Perú el número de casos reportados hasta la semana 3 del año 2019 llegaron a 848 y de 1586 en la semana 5(2) En La Libertad se han detectado 892 casos confirmados, de los cuales en el distrito El Porvenir con 280 casos y 145 probables y con 3 casos fatales (6)

El dengue es una de las patologías infecciosas que mayor carga social y económica impone a la población en riesgo. (7) Constituye un evento con múltiples factores que interaccionan entre ellos, el ambiente, el agente, la población de huéspedes y el vector, los que coexisten en un hábitat específico. La magnitud e intensidad de tales interacciones definirán la transmisión del dengue en una comunidad. (2) la mayor frecuencia de brotes de dengue, por la aparición de ciclos epidémicos cada vez más cortos; El virus dengue (DENV) es un virus envueltos de estructura icosaédrica con genoma ARN de cadena sencilla y polaridad positiva (ssARN+) perteneciente al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae* (3).

Existen 4 serotipos de DENV: DENV -1, -2, -3 y -4, que ocasionan diversos grados de severidad de la enfermedad (5, 6), haciendo necesaria su identificación para el éxito de los programas de vigilancia epidemiológica. El DENV es el agente causal del dengue clásico (DF), así como de las manifestaciones severas: el dengue hemorrágico (DHF) y el síndrome de choque por dengue (DSS) (6), ahora consideradas dengue grave (7).

Teniendo en cuenta la potenciación de infecciones secundarias con serotipos heterólogos (8 - 10), es de gran relevancia el reforzar programas de vigilancia epidemiológica que permitan conocer la dinámica de circulación de los distintos serotipos y de los efectos adversos ante el ingreso de un nuevo serotipo

Desafortunadamente, el aislamiento viral y las pruebas serológicas no son muy específicas por lo que limita su relevancia a la vigilancia epidemiológica y estudios virológicos posteriores. Motivando el diseñar métodos de diagnóstico molecular, técnicas moleculares que se convierte en una alternativa para la detección y tipificación del DENV, el diagnóstico temprano de la enfermedad y el análisis evolutivos y epidemiológicos (8), tales como las técnicas de RT-PCR y PCR convencional y en tiempo real, permiten obtener resultados en pocas horas, (9).

6. Hipótesis

El serotipo DENV 1, es el tipo de virus dengue más frecuente en las poblaciones de *Aedes aegypti* procedentes de áreas de riesgo de dengue en la provincia de Trujillo

7. Metodología (Diseño experimental en detalle)

Área de estudio

El área de estudio comprenderá tres zonas, con el mayor número de casos de Dengue reportados hasta la primera semana del 2018 en la Región La Libertad. Las zonas consideradas son El Porvenir, La Esperanza y Trujillo.

Recolección y establecimiento de las colonias

Se procederá a realizar la colecta larval y transferirlas en envases de plásticos para su almacenamiento y transporte a los Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología (UPAO)

Las larvas serán distribuidas en bandejas plásticas debidamente rotuladas y conteniendo alimento balanceado (purina), hasta que alcancen el estadio de pupa; las mismas que serán transferidas a envases plásticos con agua dentro de jaulas entomológicas de cría (30 X 30 cm) para la emergencia a adultos. Asimismo, a obtener especímenes adultos de *Aedes aegypti* capturados en campo [10].

Extracción y purificación de ARN viral

Para la extracción de ARN viral se procederá a macerar las estructuras cefálicas de los *Aedes aegypti* en icromortero con 100 µl de *buffer* de lisis a pH 5,5-6,0), homogeneizándolo por inversión durante 10 minutos. El sobrenadante de interés será separado de la quitina cefálica del vector mediante centrifugación (11)

La purificación del ARN viral se realizara siguiendo una doble extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1. Para la extracción del mismo se dispensará 5 µl de partículas de sílica con tratamiento ácido a la fase acuosa de cada muestra, incubándose la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de sílica fue lavado posteriormente con 200 µl de *buffer* compuesto por 50% de etanol, Tris-ClH 10 mM pH 7,4 y 50 mM CINA. Finalmente, cada sedimento será resuspendido en 15 µl de agua libre de nucleasas, e incubado durante 5 minutos a 50°C±1°C, empleándose una alícuota de 2,5 µl del sobrenadante para la reacción de RT-PCR. El ARN viral de las cepas de DENV-1 a -4. Será almacenado a -20C hasta su posterior utilización.

RT-PCR y PCR anidada

Para la detección de ARN viral se seguirá el protocolo de la PCR anidada de Chien, *et al.* (12).

Transcripción reversa

Se seguirá el método RT-PCR modificada por Lanciotti *et al.* (13) y Harris *et al.* (14), empleándose en este caso como única enzima la *rTth pol* (Promega) de *Thermus thermophilus* para la síntesis de la primera y segunda cadena de ADN, como también para la PCR genérica posterior.

La mezcla de reacción para la RT será para un volumen final de 10 µl, 10 mM Tris-ClH pH 8,3, 90 mM ClK, 1 mM Cl₂Mn, 200 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos, 5 mM DTT, 2 U/µl RNaseOUT™, 1 pmol/µl del cebador MD1: -5´TCAATATGCTGAAACGCGC GAGAAACCG3´ y 0,25 U/µl de *rTth pol* (concentración final de 0,05 U/µl en la PCR genérica).

La reacción de RT se llevó a cabo en un termociclador a 60°C durante 30 minutos.

Posteriormente, a cada tubo se agregó la mezcla de reacción de PCR genérica: *buffer* quelante (10 mM Tris-ClH pH 8,3, 0,1 M ClK, 0,75 mM EGTA, 0,05% Tween®20, 5 % glicerol), 1 mM Cl₂Mg, 200 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos, 1 pmol/µl del cebador D2: -5´TTGCACCAACAGTCAA TGTCTTCAGGTTTC3´-, y 1 pmol/µl del cebador D1, (TCA ATA TGC TGA AAC GCG CCA GAA ACC G) para un volumen final de 50 µl.

Para la amplificación se realizara una transcripción inversa a 50 °C durante 15 minutos, seguida de una desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos y a 94 °C durante 2 minutos. Con 40 ciclos de temperaturas de desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos; anillamiento a 55 °C durante 45 segundos, extensión a 72 °C durante 60 segundos, y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

PCR "seminested" tipoespecífica

Se tomaron 10 µl de la reacción de PCR genérica y se agregaron a un volumen de reacción final de 50 µl, 50 mM ClK, 10 mM Tris-ClH pH 8,4, 0,01% Triton® X-100, 4,5 mM Cl₂Mg, 200 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos, 1 pmol/µl de los cebadores D1 y TS2 (CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG). Luego de un inicio *hot start* a 80°C durante 3 minutos, se dispensaron 1,5 U/µl de la enzima *Taq pol* de *Thermus aquaticus* y se sometió la reacción a 35 ciclos de 94°C 30 seg., 68°C 45 seg., 72°C 45 seg., con una extensión final a 72°C durante 5 Minutos

En caso de tener amplificados, se procederá a una segunda PCR para la tipificación utilizando como cebadores de las secuencias D1, los iniciadores específicos de serotipo:

DENV-1: TS1 -5´CGTCTCCGTGATCCGGGGG3´-
DENV-2: TS2 -5´CGCCACAAGGGCCATGAACAG3´-
DENV-3: TS3 -5´TAACATCATCATGACACAGAGC3´-
DENV-4: TS4 -5´CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA3´-.

El programa de amplificación de esta segunda PCR, será: una desnaturalización a 94 °C durante dos minutos, con 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos; anillamiento a 60 °C durante 30 segundos; una extensión a 72 °C durante 30 segundos y una extensión final a 72 °C durante cinco minutos. El producto de la RT-PCR será diluido (1/100) con agua libre de nucleasas, con el fin de disminuir las amplificaciones inespecíficas por exceso de ADN durante la PCR anidada. El volumen final de la reacción fue 25 L, conteniendo 2.5 uL de tampón *Taq* DNA polimerasa 10x, 1 mM de MgCl₂, 0.4 mM de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleótido y 1.25 unidades de la enzima *Taq* DNA polimerasa

Análisis de los productos amplificados

Para la visualización del producto de amplificación del DENV (detección - RT-PCR) y los productos correspondientes a cada uno de sus serotipos (tipificación - PCR anidada) se prepararan geles de agarosa al 1.5% en tampón TAE, utilizando 10 uL del producto obtenido de la RT-PCR y/o PCR anidada y bromuro de etidio para la visualización. Para diferenciar las bandas obtenidas en la RT-PCR (509 pb) y PCR anidada: DENV-1: 208 pb; DENV-2: 119 pb; DENV-3: 288 pb y DENV-4: 260 pb, se utilizara un marcador de peso molecular de 100 pb.

Confirmación de la especificidad de reacción

Para validar que el producto del amplificado corresponde inequívocamente al esperado de la amplificación de la región 5' no codificante (5'NC) del genoma del virus dengue se realizará dos experimentos adicionales independientes: como control positivo a) una restricción enzimática con la enzima *Hinc II* cuya acción sobre el amplicón específico produce dos fragmentos de restricción de 85 pb y 35 pb respectivamente; y como control negativo b) una PCR multiplex empleando 1 pmol/µl del primer TS1 (CGT CTC AGT GAT CCG GGG G) que genera un producto de 482 pb específico para el virus DENV serotipo 1.

Análisis estadísticos.

Para la elaboración de la base y el procesamiento de datos, se utilizará el programa estadístico SPSS. Para comparar el promedio, el porcentajes, y el análisis de varianza de la frecuencia de tipo de virus DENv se utilizara la t de student, con un $p < 0,05$ para ser considerado estadísticamente significativo

Para el procesamiento de los datos se utilizarán la correlación de Spearman, Prueba t-student para muestras independientes y correlacionadas.

8. Bibliografía

1. Shi Q-M, et al. (2017) The genetic diversity and population structure of domestic *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Yunnan Province, southwestern China. *Parasit Vectors* 10. doi:10.1186/s13071-017-2213-6.
2. Alves de Sousa A, Fraga E, Sampaio I, Schneider H, Barros MC (2017) Genetic differentiation in populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) dengue vector from the Brazilian state of Maranhão. *Revista Brasileira de Entomologia* 61(1):51–59.
3. Cabezas L, et al. (2017) Spatial distribution of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the rural area of two municipalities of Cundinamarca, Colombia. *Biomédica* 37:41–49.
4. Ruiz-López F, et al. (2016) Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus del dengue en alturas no registradas para Colombia. *Biomédica* 36(2):303–308.
5. Ballesteros Z, Daniela M (2015) Estudio piloto de la variación genética del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Ecuador, vector principal del virus del dengue y del virus del chikungunya. Available at: <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/5651> [Accessed January 6, 2019].
6. Velandia-Romero ML, et al. (2017) Dengue virus detection in *Aedes aegypti* larvae and pupae collected in rural areas of Anapoima, Cundinamarca, Colombia. *Biomédica* 37:193–200.
7. Murillo Torres EM (2016) Variabilidad genética de poblaciones de *Aedes aegypti* en El Salvador. diploma (Facultad de Ciencias Naturales y Matemática). Available at: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/11720/> [Accessed January 6, 2019].
8. Jaimes-Dueñez J, Arboleda S, Triana-Chávez O, Gómez-Palacio A (2015) Spatio-Temporal Distribution of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Mitochondrial Lineages in Cities with Distinct Dengue Incidence Rates Suggests Complex Population Dynamics of the Dengue Vector in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis* 9(4). doi:10.1371/journal.pntd.0003553.
9. Instituto Nacional de Salud (2018) Boletín epidemiológico semanal. *Semana epidemiológica 28 de 2018*. Available at: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> [Accessed August 16, 2018].
10. Kumar S, Stecher G, Li M, Niyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35(6):1547–1549.
11. Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes* 7(3):355–364.
12. Rozas J, et al. (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol Biol Evol* 34(12):3299–3302.
13. Atencia MC, Pérez M de J, Caldera SM, Jaramillo MC, Bejarano EE (2018) Variabilidad genética de *Aedes aegypti* en el departamento de Sucre, Colombia, mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos del gen mitocondrial ND4. *Biomédica* 38(2):267–276.

SECCIÓN D: PRESUPUESTO DEL PROYECTO

Partida presupuestaria	Monto (S/.)
1. Equipos y bienes duraderos (hasta un 25% del presupuesto)	0.00
2. Recursos humanos (hasta un 25% del presupuesto)	0.00
3. Materiales e insumos	19632.00
4. Pasajes y viáticos	360.00
5. Servicios tecnológicos	0.00
TOTAL	19992.00

CUADRO Nº 1: Equipos y bienes duraderos (adjuntar proformas)

Equipos y bienes duraderos	Especificaciones técnicas	Proforma (fecha)	Costo unitario	Cantidad	Costo total S/.

CUADRO Nº 2: Recursos Humanos - Valorización del equipo Técnico

Nombre	Escuela o Unidad a la que pertenece	% de dedicación	Honorario mensual	Nº de meses	Costo total S/.
Estadístico					
Tesista					

CUADRO Nº 3: Material e insumos (adjuntar proformas)

Descripción	Costo unitario	Cantidad	Costo total S/.

Descripción	Costo unitario	Cantidad	Costo total S/.
Acido acético glacial ACS 2.5l jt	850	01	850.00
Agarosa	600	01	600.00
Agua destilada libre de RNAasa	28	20	560.00
Alcohol isoamílico	450	01	450.00
Bandeja de plástico	30	10	300.00
Cajas criogenica	80	02	160.00
Cajas de Criviales de 2 m	85	02	170.00
Citrato de sodio	135	01	135.00
Cloruro de sodio ACS1 kg	125	01	125.00
Cloroformo acs 4 l jt baker / macron	690	01	690.00
Cucharones de metal	25	02	50.00
Ditiotreitol (DTT)	600	01	600.00
dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP)	500	01	500.00
Envases de plástico	10	20	200.00
Enzima rTth pol	850	01	850.00
Enzima Taq DNA pol	850	01	850.00
Enzimas de restricción (<i>hincii</i>)	850	01	850.00
Etanol absoluto grado biología molecular 2.5 lt. acs, iso	95	02	190.00
Etilendiaminotetracetico (EDTA)	95	01	95.00
Fenol cristales acs 500gr jt baker / macron	100	01	100.00
Generuler™ 100 bp Plus DNA Ladder 50 g	950	01	950.00
Guantes látex de nitrilo x caja	30	05	150.00
isotiocianato de guanidinio	150	01	150.00
KCl x 1 kg -	132	01	132.00
Metanol absoluto grado biología molecular Fco. x 2.5 Lt.	75	02	150.00
MgCl ₂	100	01	100.00
Microtubos de 1.5ml boil-proof caja por 500 u	150	01	150.00
MnCl ₂	100	01	100.00
Oligocebadores para PCR DENV-1: TS1 CGTCTCCGTGATCCGGGGG DENV-2: TS2 CGCCACAAGGGCCATGAACAG	445	04	1780.00

DENV-3: TS3 TAACATCATCATGACACAGAGC DENV-4: TS4 CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA			
Oligocebadores para RT-PCR MD1:TCAATATGCTGAAACGCGC GAGAAACCG D2:TTGCACCAACAGTCAA TGTCTTCAGGTTC, D1:TCAATATGC TGA AAC GCG CCA GAA ACCG TS2: CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG	445	04	1780.00
Pipetas pasteur PE 3.5 ml x 500 U	90	01	90.00
Proteinasa k sol. Rna 5 ml (100 mg) invitrogen	1600	01	1600.00
Rnase A Solution 1.0 ml; 10 mg/ml	420	01	420.00
Silica gel	155	01	155.00
SYBR green	1350	01	1350.00
Tampon Acetato EDTA (TAE) 50X 1 lt	600	01	600.00
Tips con filtro 1000ul, racked & pre-sterilized; rack x96 tips	60	02	120.00
Tips con filtro 10ul, racked & pre-sterilized; 96 tips por rack	70	02	140.00
Tips con filtro 200ul racked & pre-sterilized; 96 tips por rack	60	02	120.00
Trisma Base1kg	485	01	485.00
Triton X	250	01	250.00
Tubos de centrifuga de 15 ml. Bolsa de 50	50	02	100.00
Tubos PCR 0.2ml thin wall flat cap; caja por 1000 u	280	01	280.00
Tween	155	01	155.00

CUADRO N° 4: Pasajes y viáticos

Descripción	Costo unitario	Cantidad	Costo total S/.

Descripción	Costo unitario	Cantidad	Costo total S/.
Traslado a la zona de estudio (en 12 viajes ida y vuelta)	10	24	240.00
Refrigerios en la comunidad (12 salidas)	10	12	120.00

CUADRO N° 5: Servicios tecnológicos

Descripción	Costo unitario	Cantidad	Costo total S/.
Análisis especializado			



Vicerrectorado de Investigación
Oficina de Investigación

FORMATO 2

DECLARACION JURADA DE COMPROMISO Y AUTENTICIDAD DEL PROYECTO (SOLO PARA EL INVESTIGADOR PRINCIPAL)

Trujillo, 30 de abril del 2019

Señor Doctor
Luis Cerna Bazán
Vicerrector de Investigación
Presente.-

De mi consideración:

El suscrito docente de la Facultad de Ciencias de la Salud, Departamento Académico de Ciencias, identificado con DNI N° 18030344 y domicilio en Rafael Zancio 415. Urbanización El Bosque. DECLARO BAJO JURAMENTO mi compromiso de participar como Investigador Principal y responsable del proyecto de investigación titulado Tipificación de virus DENV en estadios biológicos de *Aedes aegypti* infectados naturalmente.; el cual es ORIGINAL Y AUTENTICO y está enmarcado en las áreas académicas y líneas de investigación priorizadas por la Universidad Privada Antenor Orrego (UPAO).

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente,

----- (FIRMA)
NOMBRES Y APELLIDOS DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL
DNI N° 18030344
Ofelia Magdalena Córdova Paz Soldán