



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

**Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y
Aplicadas**

**Centro de Investigación en Dinámica Celular
Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular**

**Comparación In silico de la diversidad y evolución
del viroma de los mosquitos vectores *Aedes
aegypti* y *Culex pipens***

T E S I S

QUE PRESENTA:

LUIS DONALDO RAMÍREZ CORONA

**Para obtener el Grado de:
LICENCIADO EN CIENCIAS**

**Director de la Tesis:
Sonia Dávila Ramos**

CUERNAVACA, MORELOS

Enero, 2023

COMITÉ TUTELAR QUE PARTICIPÓ EN EL DESARROLLO DE ESTE

PROYECTO:

Dr. Armando Hernández Mendoza – CIDC, UAEM (Presidente)

Dr. Agustín Reyes Pérez – CIDC, UAEM (Secretario)

Dra. Sonia Dávila Ramos – CIDC, UAEM (Vocal)

Dr. Hugo Gildardo Castelán Sánchez – CONACyT (Suplente)

Dr. Enrique Merino Pérez – IBT, UNAM (Suplente)

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	7
1.1 Mosquitos como vectores	9
1.2 Arbovirus	11
1.2.1 <i>Diversidad y variabilidad genética</i>	12
1.2.2 <i>Transmisión de Arbovirus</i>	16
1.2.3 <i>Mecanismos antivirales</i>	16
1.2.4 <i>Ciclos de transmisión de arbovirus</i>	18
1.2.5 <i>Factores implicados en la transmisión de arbovirus</i>	21
1.3 Virus específico de insectos	23
1.3.1 <i>¿Qué son?</i>	23
1.3.2 <i>Clasificación</i>	24
1.3.3 <i>Relación con arbovirus</i>	26
1.4 Importancia en la salud pública	26
1.5 <i>Aedes aegypti</i>	30
1.5.1 <i>Taxonomía</i>	30
1.5.2 <i>Morfología</i>	31
1.5.3 <i>Distribución geográfica</i>	32
1.6 <i>Culex pipiens</i>	33
1.6.1 <i>Taxonomía</i>	34
1.6.2 <i>Morfología</i>	35
1.6.3 <i>Distribución geográfica</i>	35
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	38
2.1 Viroma de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Culex pipiens</i>	38
2.2 Evolución de los virus de ARN	43
2.2.1 <i>Mecanismos de variabilidad genética más frecuentes</i>	44
2.2.2 <i>Selección y deriva</i>	45
2.3 RNA-seq.....	46
2.3.1 <i>Tecnología RNA-seq</i>	47

2.3.2 Plataformas y estrategias de secuenciación para RNA-seq	48
2.4 Bioinformática	50
JUSTIFICACIÓN	53
HIPÓTESIS	54
OBJETIVO GENERAL	55
Objetivos específicos	55
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	56
3.1. Recopilación de datos de RNA-seq	56
3.2. Análisis bioinformático	56
3.3. Identificación de virus	57
3.4 Caracterización de la abundancia y diversidad viral	58
3.5 Análisis evolutivo de virus de ARN	59
3.5.1 Análisis filogenético	60
3.5.2 Análisis estructural	61
3.6 Diagrama metodológico	62
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
4.1 Distribución global de los datos seleccionados	63
4.2 Descripción general del viroma <i>Ae. aegypti</i> y <i>Cx. pipiens</i>	65
4.3 Diversidad del viroma por especie huésped, sitio de recolección y clima	69
4.4 Evolución y filogenia de virus de ARN asociados a mosquitos	75
4.4.1 Filogenia de <i>Aedes anphevirus</i> (AeAV), <i>Culex phasma-like virus</i> (CPLV) y <i>Chikungunya</i> (CHIKV)	75
4.4.2 Evolución neutral en virus AeAV, CPLV y CHKV	81
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	88
REFERENCIAS	90

ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
Ae.	Aedes
AeAV	Aedes anphevirus
ARNm	ARN mensajero
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CFAV	Cell fusing agent virus
CHIKV	Virus de Chikungunya
CPLV	Culex Phasma-like virus
Cx.	Culex
CxFV	Culex Flavivirus
DENV	Virus Dengue
DOME	Receptor de transmembrana Domeless
DPCoA	Doble análisis de coordenadas principales
dsRNA	Doble string RNA
FEL	Probabilidad de efectos fijos
FVRV	Virus del valle del Rift
Hop	Homólogo de JAK
ISV	Virus específico de insecto
JAK	Quinasa Janus
JEV	Virus de la encefalitis Japonesa
LCA	Ancastro común más bajo
NSG	Secuenciación de próxima generación
PCoA	Análisis de coordenadas principales
RISC	Complejo silenciador inducido por ARN
RNA-seq	Secuenciación de ARN total de alto rendimiento
siRNA	Small interfering RNA
SLEV	Virus de la encefalitis de St. Louis
Spp.	Especies
ssRNA	Simple string RNA
STAT	Transducción de señalización y la activación de las vías de transcripciones
VEEV	Virus de la encefalitis equina Venezolana
WNV	Virus del Nilo Occidental
YFV	Virus de la Fiebre Amarilla
ZIKV	Virus del Zika

RESUMEN

El mosquito *Aedes aegypti* y *Culex pipiens*, son uno de los vectores virales de invertebrados más importantes y albergan una alta diversidad de virus. Los recientes avances en la tecnología han contribuido a la detección y descripción de nuevos virus para ambas especies, sin embargo estos estudios se han centrado específicamente en alguna región en particular. En este estudio, se realizó un análisis metatranscriptómico de 16 muestras disponibles en la base de datos NCBI, recolectadas originalmente de 9 países distintos en cinco continentes durante los últimos años. Proporcionamos una visión general del perfil de viroma para *Aedes aegypti* y *Culex pipiens*, que integró la perspectiva de la especie del mosquito, las ubicaciones y los climas del sitio de recolección en función de la escala global. Además se analizó la evolución y las presiones selectivas ejercidas sobre las proteínas de superficie de los virus predominantes. Los resultados implican un viroma diverso para ambas especies de mosquitos, con una estrecha relación asociada a la especie del mosquito y zona climática. *Aedes anphevirus* (AeAV), *Culex phasma-like virus* y *Chikungunya* (CHIKV) fueron los virus de ARN más abundantes en al menos 2 países diferentes, el análisis evolutivo de AeAV y CPLV sugiere que han evolucionado en linajes Africanos, Asia-Pacífico y América, mientras que el CHIKV se encuentra ampliamente distribuido con variantes filogenéticamente relacionadas. Las presiones selectivas ejercidas sobre estas proteínas de superficie, indica que se encuentran bajo un proceso evolutivo neutral y menos por selección natural purificadora.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Desde el punto de vista inmunológico, un vector es aquel organismo que funciona como portador de uno o varios agentes infecciosos entre organismos. Los artrópodos, como los mosquitos, se consideran uno de los principales vectores de agentes infecciosos, ya que transmiten una alta diversidad de patógenos médicamente importantes, en particular virus (Cholleti et al., 2018; Schulz & Becker, 2018). En las últimas décadas, la expansión de estos importantes vectores ha ido en aumento conjunto con la carga de enfermedades virales (Bueno-Marí & Jiménez-Peydró, 2013; Esser et al., 2019), por ejemplo, brotes anuales del virus del dengue (DENV) en las Américas (Messina et al., 2014), la aparición del virus Chikungunya (CHIKV) (J. Erin Staples, M.D., Ph.D., and Marc Fischer, M.D., 2014), brotes del virus de la fiebre amarilla (YFV) en América del Sur (Romano et al., 2014), virus del Nilo Occidental (WNV) endémicos en Europa (Rizzoli et al., 2015) y recientemente el virus del Zika (ZIKV) (Anthony S. Fauci, M.D., and David M. Morens, 2016). Es evidente que cada vez las enfermedades virales emergentes y reemergentes son más frecuentes en los últimos años (Louten, 2020).

El mosquito *Aedes aegypti* y mosquitos del complejo *Culex pipiens* representan una amenaza para la salud pública a nivel mundial, son vectores competentes de una alta diversidad virus transmitidos por artrópodos (arbovirus), virus específicos de insectos (ISV) y virus transitorios dependientes del entorno circundante. Por lo tanto, la presencia de una variedad de virus puede impulsar a

la recombinación o reordenamiento entre especies dentro de los mosquitos y así promover la aparición de nuevos virus mutantes con potencial patógeno (Thannesberger et al., 2020). Por ello es importante mantener en un marco de vigilancia a los vectores artrópodos e investigar los virus que circulan en ellos.

Aunque los ISV no infectan a los vertebrados, son una parte importante del microbioma de los mosquitos (Bolling et al., 2015), ya que pueden modular la susceptibilidad de los mosquitos a la infección por arbovirus. La estrecha relación entre los ISV y los arbovirus plantea preguntas sobre el papel potencial que puede desempeñar en la regulación de la transmisión de patógenos de importancia médica, con el fin de ser utilizados para el control de arbovirus. Sin embargo, se sabe poco sobre su ecología o su efecto en el huésped mosquito.

El descubrimiento de virus generalmente adopta un enfoque dependiente o independiente del cultivo. En métodos independientes del cultivo, las muestras se someten a secuenciación de ARN total de alto rendimiento (RNA-Seq), lo que permite una amplia resolución de la ecología y la incidencia de virus. El objetivo de este trabajo es analizar la diversidad y evolución que comprende el viroma de *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens* a partir de datos de secuenciación de ARN publicados anteriormente. En términos generales, nuestro estudio destaca aún más cómo se puede utilizar la metatranscriptómica para revelar la diversidad del viroma de estos mosquitos recolectados en distintas ubicaciones geográficas, proporcionando un recurso para evaluar más a fondo su ecología y la evolución de los ISV y los arbovirus que transmiten.

1.1 Mosquitos como vectores

Un vector se define ampliamente como cualquier organismo, vertebrado o invertebrado, capaz de transmitir patógenos al ser humano y a otros animales (Fermin, 2018). Esta transmisión puede ocurrir de manera biológica, donde la participación del vector es una condición necesaria para que el agente infeccioso complete su ciclo biológico; o mecánica, cuando el patógeno no requiere del vector para completar su ciclo de vida. Los vectores comprenden un conjunto diverso de especies, que incluyen artrópodos como pulgas, flebótomos, garrapatas y mosquitos (Anosike et al., 2007). Los mosquitos son los principales vectores portadores de enfermedades infecciosas. Existen alrededor de 3500 especies, pero no todas están involucradas en la transmisión de patógenos. Entre ellos, *Aedes*, *Culex* y *Anopheles* son los principales géneros asociados con la transmisión de patógenos al ser humano (Rajagopalan & Ilboudo, 2017), ya que actualmente se encuentran ampliamente distribuidos alrededor del mundo (**Figura 1A**). Estos tres géneros representan una amenaza significativa para la salud pública. En especial, el género *Aedes* y *Culex* que transmiten constantemente una alta diversidad de arbovirus que afectan periódicamente a las poblaciones humanas a nivel mundial (**Figura 1B**), mientras que *Anopheles* destaca más en la transmisión de parásitos, como *Plasmodium*, causante del paludismo en humanos.

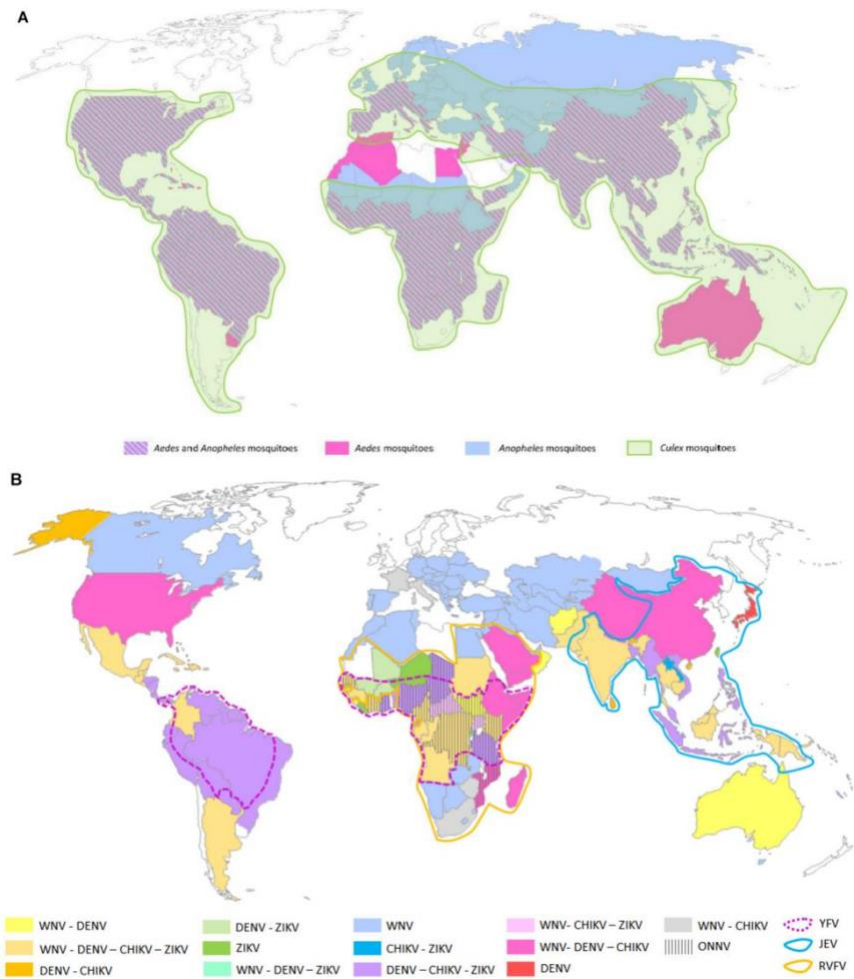


Figura 1. Distribución global de géneros de mosquitos de importancia médica (A) y arbovirus transmitidos por los tres géneros principales de mosquitos (B).

(A) Principales vectores de arbovirus (*Aedes spp.* y *Culex spp.*) y parásitos (*Anopheles spp.*) de importancia para la salud humana. Las áreas rosa, azul y verde representan la presencia respectiva de mosquitos *Aedes spp.*, *Anopheles spp.* y *Culex spp.* Las áreas eclosionadas representan la distribución de los mosquitos *Aedes spp.* y *Anopheles spp.* en los mismos países. (B) Mapa de los principales arbovirus transmitidos por *Aedes spp.*, *Culex spp.* y *Anopheles spp.* Tomada de (Viglietta et al., 2021).

1.2 Arbovirus

Los arbovirus (un término derivado del descriptor, virus transmitidos por artrópodos), son un grupo asombrosamente diverso de virus que se mantienen en la naturaleza a través de la transmisión biológica por huéspedes vertebrados susceptibles a una variedad de vectores artrópodos hematófagos. Sin embargo, algunos se agrupan dentro de los arbovirus a pesar de que no existe una asociación aparente con un vector artrópodo, sino por su estrecha relación genética. La denominación de arbovirus individuales ha tenido una historia un tanto ecléctica sin que se haya establecido un enfoque taxonómico formal. Algunos se refieren a los nombres de los dialectos por la enfermedad que provocan (chikungunya, o'nyong nyong, dengue), otros reconocen el nombre del lugar donde fueron descubiertos por primera vez (West Nile, Bwamba, Ross River, Zika) y algunos reflejan una presentación clínica característica (encefalitis equina occidental, fiebre amarilla) (Young, 2018).

En el catálogo de arbovirus mantenido por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, enumera 538 virus registrados con potencial patógeno (Gyawali et al., 2017). Dentro de ellos, más de 100 arbovirus causan enfermedades humanas (Viglietta et al., 2021). Algunos infectan a los humanos solo ocasionalmente o causan una enfermedad leve, mientras que otros representan una importancia médica significativa y con posibles amenazas epidémicas.

1.2.1 Diversidad y variabilidad genética

Los virus transmitidos por vectores comprenden un grupo genéticamente diverso de virus que difieren en la estructura, composición y organización de sus genomas. Esta diversidad generalmente no solo es evidente entre las familias virales, sino también entre las especies virales individuales, que pueden tener mecanismos moleculares distintivos para la replicación, transmisión, patogénesis y evolución (Gray & Banerjee, 1999). Con solo unas pocas excepciones, los arbovirus son virus de ARN (**Figura 2**). Los principales arbovirus patógenos para el ser humano pertenecen a las familias y géneros de *Togaviridae* (*Alphavirus*), *Flaviviridae* (*Flavivirus*), *Peribunyaviridae* (*Orthobunyavirus*), *Phenuiviridae* (*Phlebovirus*) y *Reoviridae* (*Orbivirus*) (Lequime et al., 2016).

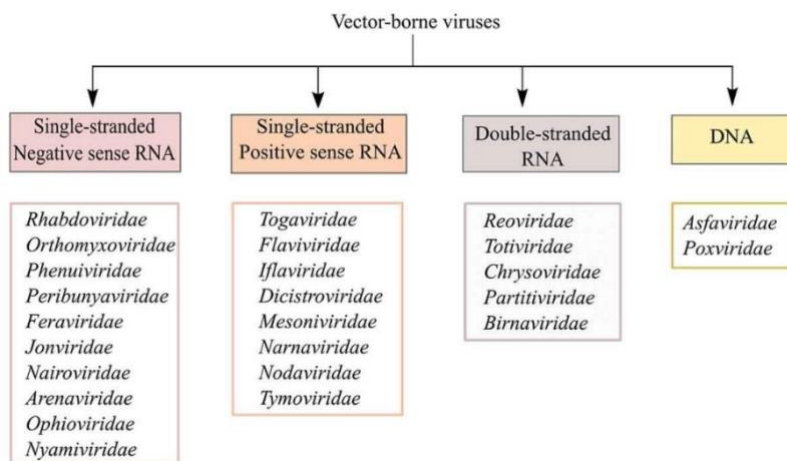


Figura 2. Clasificación de los virus transmitidos por vectores en función de sus características genómicas. Tomada de (Cholleti et al., 2018).

Los *Flavivirus* y los *Alphavirus* son virus de ARN monocatenarios de polaridad positiva de un genoma de 11 a 12 kb, lineales y envueltos. Presentan una forma esférica con una cápside subyacente y miden de 50 a 70 nm de diámetro (**Figura 3**). Los *Orthobunyavirus* y los *Phlebovirus* son virus con genomas lineales de ARN de cadena negativa segmentados, para *Orthobunyavirus*, el segmento llamado “L” es de aproximadamente 6,9 kb, el segmento “M” de aproximadamente 4,5 kb y el segmento “S” de aproximadamente 1 kb. Mientras que para *Phlebovirus* el segmento L es de aproximadamente 6,4kb, el segmento “M” de aproximadamente 3,2 kb y el segmento “S” de aproximadamente 1,7 kb. Ambos son envueltos y esféricos con un diámetro de 80 a 120 nm (**Figura 3**). Los *Orbivirus* presentan un genoma de ARN de doble cadena, lineal y segmentado. Contiene 10 segmentos que oscilan entre 822 y 3954 pb. El tamaño total del genoma es de 19.200 pb (**Figura 3**).

El género más importante de arbovirus, al menos desde la perspectiva de las enfermedades humanas, son los *Flavivirus* y varios virus que comprenden este grupo son motivo de preocupación para la salud mundial; DENV, WNV, ZIKV y YFV (Mayer et al., 2017). También se incluye: Virus de la encefalitis Japonesa (JEV), Virus de la encefalitis equina Venezolana (VEEV) y Virus de la encefalitis de St. Louis (SLEV), sin embargo estos virus suelen estar restringidos a regiones específicas por lo que su impacto es menor pero no menos importante.

Por lo tanto, los virus de ARN son la causa más común de enfermedades emergentes en humanos, atribuibles a la alta tasa de mutación en los virus de

ARN en comparación con los virus de ADN. A diferencia de las ADN polimerasas, las ARN (incluidas las transcriptasas inversas) no poseen capacidad de corrección. Esto conduce a una disminución en la fidelidad de la enzima, insertando un nucleótido incorrecto cada 105 bases (en comparación con 1 error por 109 bases para ADN polimerasas) (Gortazar et al., 2014). Como resultado, los virus de ARN tienen algunas de las tasas de mutación más altas de todas las entidades biológicas. Esto asegura un rango de diversidad genética que mantiene la virulencia y promueve la transmisión potencial a nuevos huéspedes (Louten, 2020).

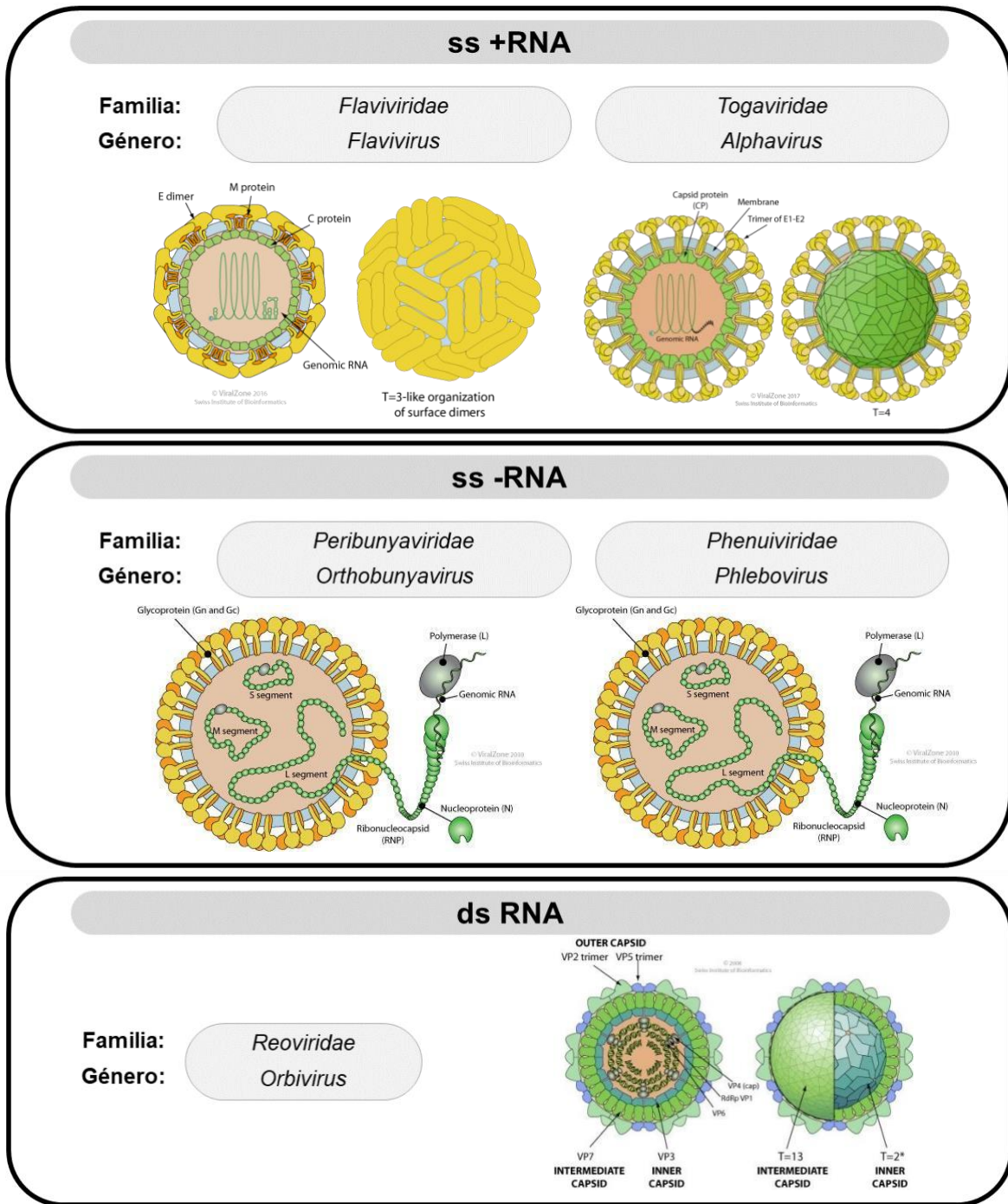


Figura 3. Principales Arbovirus patógenos para el ser humano. Los virus se agrupan según la composición del genoma: ARN monocatenario de polaridad positiva, ss +RNA; ARN monocatenario de polaridad negativa, ss -ARN; ARN de doble cadena, ds RNA.

1.2.2 Transmisión de Arbovirus

El ciclo de transmisión comienza cuando un artrópodo se alimenta de sangre infecciosa. Después de la alimentación con sangre por parte del mosquito hembra a un huésped infectado, los virus se multiplican en el intestino medio del insecto y luego invaden los tejidos subyacentes para causar una infección que se propaga (denominada colectivamente como el período de incubación extrínseco) que finalmente da como resultado una infección de alta carga viral, particularmente en las glándulas salivales (Tabachnick, 2016). Luego se transmiten a los humanos u otros vertebrados durante las picaduras de insectos. Para que un arbovirus se transmita con éxito a un nuevo huésped, debe de superar las barreras y mecanismos antivirales específicos por parte del mosquito (Weaver & Barrett, 2004).

1.2.3 Mecanismos antivirales

La primera barrera son las células epiteliales del intestino medio. El virus necesita entrar y escapar de estas células antes de propagarse a la hemolinfa desde donde puede propagarse sistémicamente al resto del cuerpo, incluidas las glándulas salivales a través de la circulación de hemolinfas (Romoser et al., 2004; Salazar et al., 2007) (**Figura 4A**).

Cada una de estas barreras tiene respuestas inmunes antivirales específicas del tejido, incluyendo Toll, el factor de inmunodeficiencia, la quinasa Janus (JAK), transducción de señalización y la activación de las vías de transcripciones (STAT), así como la interferencia de ARN (RNAi) (Cheng et al.,

2016). Estas vías permiten al mosquito montar una defensa contra los microorganismos invasores, incluidos los virus. Alguno de los mecanismos antivirales por parte del mosquito como la vía JAK-STAT, se activa principalmente cuando el receptor transmembrana Domeless (DOME) reconoce ligandos extracelulares no apareados (Upd) que conducen a un cambio conformacional que inicia la autofosforilación de Hop, que a su vez fosforila DOME. Esto conduce a la fosforilación y dimerización de STAT, lo que resulta en una translocación de dímeros STAT al núcleo que activa la transcripción de genes antivirales específicos (**Figura 4B**).

Una infección viral primaria puede bloquear una infección secundaria de un virus similar a través de mecanismos que implican la competencia o la modificación de los recursos celulares que reducen la unión al receptor, la entrada viral, la replicación del ARN y la traducción del virus secundario (**Figura 4C**).

Los dsRNA virales, ya sea como intermediarios de replicación o como parte de los genomas virales, son procesados por el complejo Dcr-2-R2D2 para generar siRNAs de aproximadamente 21-23 pb de longitud. Los siRNA se incorporan al complejo silenciador inducido por ARN (RISC) para reconocer el ARN viral para su degradación. dsRNA puede ser detectado por el dominio de helicasa Dicer-2 DEcD/H-box y a través de una vía desconocida activar la expresión y secreción de Vago, que puede activar la vía JAK-STAT a través de un receptor desconocido en células cercanas (**Figura 4D**). Comprender estos mecanismos antivirales y el control de la infección viral en tejidos específicos es crucial y la columna vertebral

de las nuevas estrategias de control que se dirigen a la transmisión de arbovirus en la naturaleza (Öhlund et al., 2019).

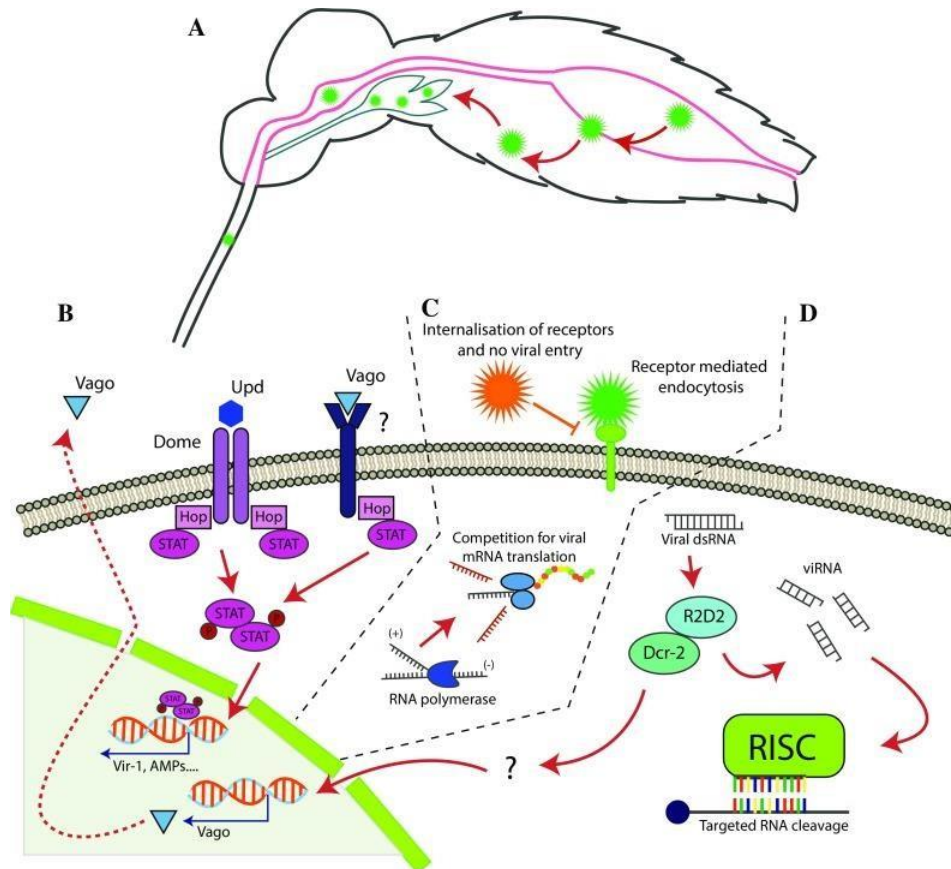


Figura 4. Descripción general esquemática de algunos de los mecanismos antivirales contra mosquitos. Tomada de (Öhlund et al., 2019).

1.2.4 Ciclos de transmisión de arbovirus

Los ciclos epidemiológicos de arbovirus a menudo consisten en redes de transmisión complejas que involucran una variedad de huéspedes vertebrados, el

cual garantiza la amplificación del virus, y a un vector artrópodo (mosquito), que asegura su diseminación. Diferentes especies de mosquitos pueden actuar como vectores para el mismo virus en diferentes hospederos vertebrados, dependiendo de la ubicación geográfica y la ecología.

Con la excepción del virus del dengue, la mayoría de los arbovirus se mantienen a través de un ciclo enzoótico, también conocido como ciclo selvático o ciclo silvático (*sylvatic* significa "que ocurre en animales salvajes"), donde las aves, roedores o primates no humanos sirven como huéspedes reservorios y la transmisión del virus ocurre por insectos vectores primarios. Este ciclo selvático se interrumpe cuando los humanos se entrometen accidental o intencionalmente en los hábitats naturales y se infectan por vectores antropozoo-fílicos (también llamados vector puente), que son aquellos mosquitos que se alimentan con sangre de algún animal y también con sangre humana. Posteriormente, puede ocurrir un brote, ya que el virus se introduce en un ambiente permisivo donde coexisten vectores antropofílicos competentes y poblaciones humanas susceptibles (Pando et al., 2020). Los virus también pueden transmitirse entre vectores y animales domésticos, como cerdos y equinos (ciclo epizootico/rural), así como a humanos (ciclo epidémico/urbano) (Weaver & Barrett, 2004) (**Figura 5**). Si el ser humano/animal no desarrolla viremia, se consideran huéspedes sin salida (por ejemplo, caballos y humanos en el caso del WNV), ya que la amplificación del virus es insuficiente para permitir que los vectores artrópodos se infecten y puedan transmitir el virus aún más (Gubler, 2006). Algunos arbovirus, como DENV, CHIKV

y YFV alteran su rango de huéspedes desde primates no humanos hasta humanos, donde se amplifica y se vuelve capaz de ser transmitido a la siguiente persona por mosquitos, lo que lleva a brotes sin el uso de un reservorio animal (Weaver & Reisen, 2010).

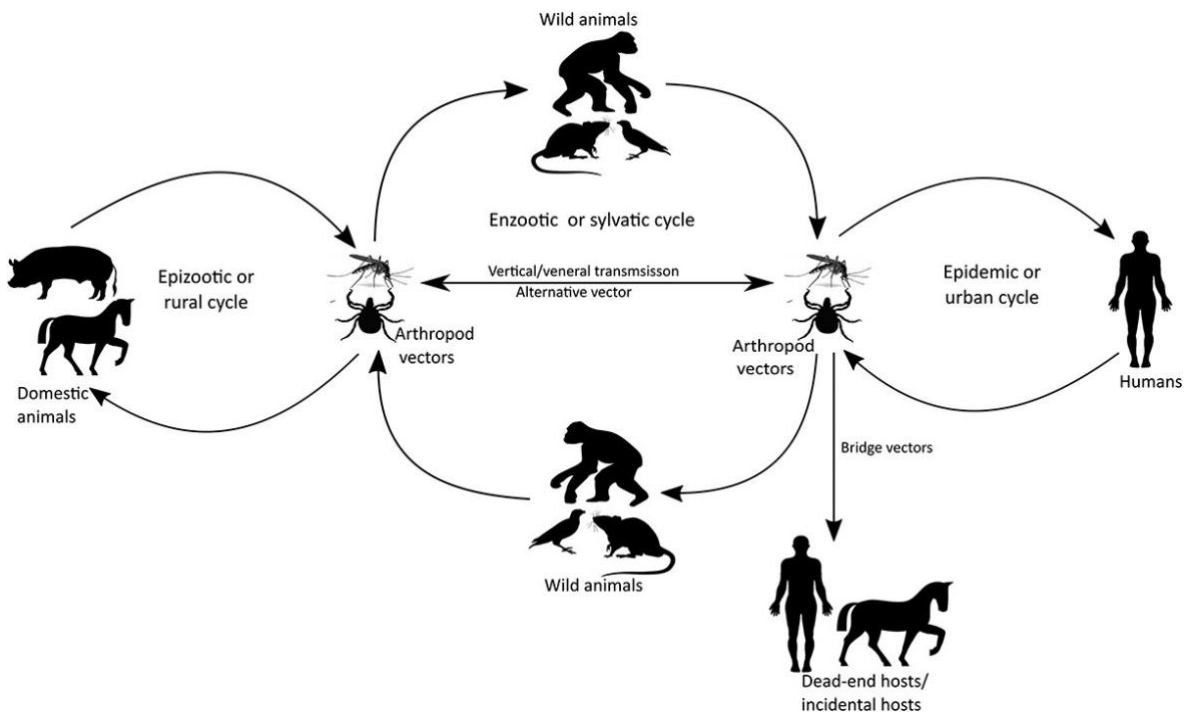


Figura 5. Ciclos de transmisión y mantenimiento de virus transmitidos por artrópodos. Los arbovirus pueden circular y mantenerse a través del ciclo silvático/enzoótico, el ciclo epidémico/urbano, así como a través del ciclo epizootico/rural. Tomada de (Cholleti et al., 2018).

Otro factor importante que se debe tener en cuenta es que algunos virus se transmiten verticalmente, es decir, de mosquitos hembra infectados a su progenie (transovarialmente). Se ha reportado transmisión vertical para el virus de la fiebre del Valle del Rift (FVRV), Virus LaCrosse (LACV), el virus de la encefalitis del Valle de Murray (MVEV), JEV, Virus de la encefalitis equina del este (EEEV), ZIKV, DENV y CHIKV. Aunque la transmisión vertical en *A. aegypti* se ha reportado solo para ZIKV, DENV y CHIKV.

1.2.5 Factores implicados en la transmisión de arbovirus

Los factores implicados en la transmisión de los arbovirus se caracterizan por ser dinámicos, interdependientes y complejos, de los cuales destacan (con algunos ejemplos): los factores demográficos (incremento de la población humana), factores sociales (globalización), factores ecológicos (cambio climático), factores virales (evolución de los virus), factores vectoriales (susceptibilidad a la infección o competencia vectorial) y factores de salud pública (control vectorial). El entendimiento de esta compleja dinámica nos permitirá prever la emergencia de un nuevo patógeno (Tabachnick, 2016).

1.2.5.1 Capacidad y competencia vectorial

La dinámica de transmisión de los arbovirus es compleja, está determinada por las interacciones entre el virus, el vector y el hospedero en un ecosistema particular y aún no se conocen todos los factores que la gobiernan. Existe evidencia de que la susceptibilidad a la infección con ZIKV, DENV u otros arbovirus varía entre poblaciones de mosquitos *Ae. aegypti* de distintos orígenes

geográficos, ya que las diferencias genéticas y ecológicas entre poblaciones pueden ser responsables de las diferentes susceptibilidades. La eficiencia de la transmisión de enfermedades transmitidas por mosquitos en condiciones naturales se conoce como la capacidad vectorial, el cual está determinada por múltiples factores: los intrínsecos o propios del vector y los extrínsecos o ajenos al vector (**Figura 6**). Los factores propios del vector que le confieren la capacidad de infectarse con un patógeno, diseminarse en su organismo y transmitirlo mediante la saliva se conocen como “competencia vectorial”. Esta característica es particular de la relación patógeno-vector; esto es, la susceptibilidad a la infección es diferente para cada virus. Para que un mosquito sea considerado un vector efectivo, debe tener una alta competencia vectorial y una elevada capacidad vectorial (Pando et al., 2020).

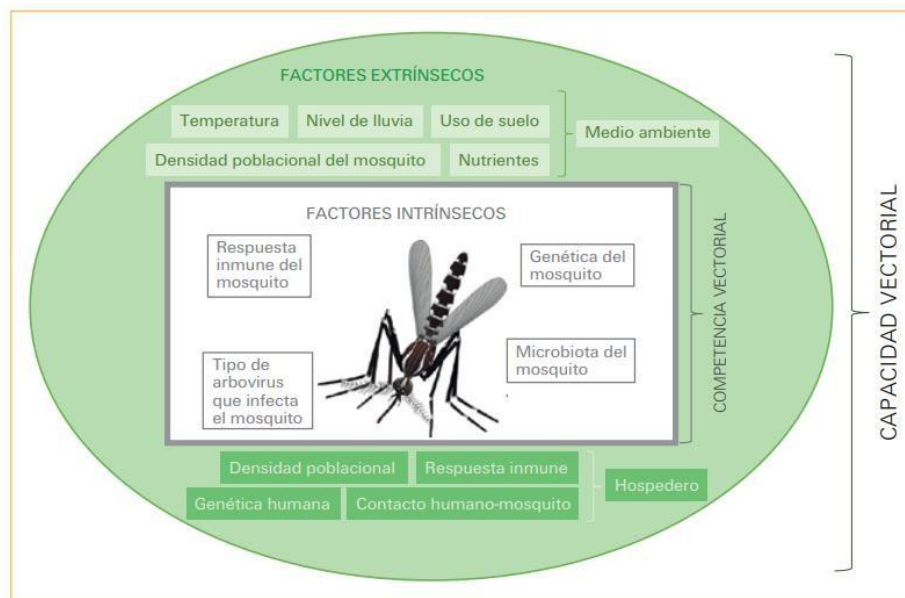


Figura 6. Capacidad y competencia vectorial. Tomada de (Pando et al., 2020).

1.3 Virus específico de insectos

Durante la última década, la investigación de arbovirus se centró principalmente en virus médicamente importantes debido a su patogenicidad para los huéspedes susceptibles. Los programas de vigilancia de vectores se han orientado principalmente a monitorear arbovirus circulantes de importancia clínica y veterinaria. Por lo tanto, estos programas superaron a un nuevo grupo de virus conocidos como virus específicos de insectos que se han identificado como un componente del microbioma de insectos (Bolling et al., 2015).

El primer ISV identificado fue el *Cell fusing agent virus* (CFAV), que se aisló de un cultivo celular de *Ae. aegypti* en 1975 (Stollar & Thomas, 1975). Cuando se inoculó en diferentes líneas celulares de vertebrados, no se pudo observar ningún efecto citopático y el virus no se pudo volver a aislar, lo que sugiere que el virus es un ISV (Stollar & Thomas, 1975). Se necesitaron casi 25 años para que se descubriera el segundo ISV; el virus del río Kamiti (KRV), y siete años más para el tercero; *Culex Flavivirus* (CxFV).

Con los avances en la secuenciación metagenómica están acelerando constantemente la tasa de detección de nuevos ISV, la gran diversidad de ISV aún no se ha explorado y entendido completamente (Bolling et al., 2015).

1.3.1 ¿Qué son?

Los ISV a menudo se caracterizan por su especificidad para replicarse en artrópodos, como los mosquitos, y su incapacidad para replicarse en células de

vertebrados, a diferencia de los arbovirus (Nasar et al., 2015). A pesar de que este grupo de virus se llama "virus específicos de insectos", la mayoría se han descubierto en mosquitos y se puede argumentar que para estos virus el término "virus específicos de mosquitos" sería más apropiado (Öhlund et al., 2019).

1.3.2 Clasificación

Los ISV se han clasificado dentro de múltiples taxones diferentes, casi todos los arbovirus y virus específicos de insectos pertenecen al orden de virus de ARN *Bunyvirales* (ssRNA de sentido negativo (-)), o a las familias virales *Flaviviridae* (sentido positivo (+), ssRNA), *Reoviridae* (dsRNA), *Rhabdoviridae* (-ssRNA) y *Togaviridae* (+ssRNA) (**Tabla 1**). Los virus de ARN carecen del mismo mecanismo de corrección que los virus de ADN, lo que resulta en una mayor plasticidad y mayores tasas de mutación (Louten, 2020). Junto con la afinidad de los insectos por vivir en grandes poblaciones densas, esta podría ser una de las explicaciones a la gran diversidad de huéspedes arbovirus. Las adaptaciones que proporcionan a un virus la posibilidad de infectar nuevos huéspedes le dan al virus la posibilidad de propagarse geográficamente. En conjunto, esto sugiere que los ISV son una fuente potencial de nuevos arbovirus (Elrefaey et al., 2020).

Taxa	Genus	ISV	Host ¹
Flaviviridae	Flavivirus	Aedes flavivirus	Aedes spp.
		Binjari virus	Aedes normanensis
		Cell fusing agent virus	Aedes spp.
		Cháoyáng virus	Aedes spp. Culex pipiens Armigeres subalbatus
		Culex flavivirus	Culex spp.
		Kamiti River virus	Aedes macintoshi
		Niénokoué virus	Culex spp.
		Nhumirim virus	Culex chidesteri
		Nouané virus	Uranotaenia mashaensis
		Palm Creek virus	Coquillettidia xanthogaster
Bunyavirales	Phasivirus	Badu phasivirus	Culex spp.
		Phasi Charoen-like phasivirus	Aedes aegypti
	Orthoferavirus	Ferak orthoferavirus	Culex decens
	Goukovirus	Gouléako goukovirus	Anopheles spp. Culex spp. Uranotaenia spp.
		Herbevirus	Herbert herbevirus
	Orthojonvirus	Jonchet orthojonvirus	Culex spp.
Birnaviridae	Entomobirnavirus	Espírito Santo virus	N/A
Mesoniviridae	Alphamesonivirus 1	Cavally virus	Aedes spp. Anopheles spp. Culex spp. Uranotaenia spp.
			Nam Dinh virus
		Dianke virus	Aedes spp. Anopheles spp.
			Culex spp. Mansonia spp. Uranotaenia spp. ceratopogonids
Reoviridae	Dinovernavirus	Fako virus	Aedes spp. Eretmapodites spp.
Rhabdoviridae	Almendravirus	Arboretum almendavirus	Ochlerotatus fulvus
	Mousrhavirus	Puerto Almendras almendavirus	Psorophora albigena
Togaviridae	Alphavirus	Moussa Mousrhavirus	Culex decens
		Agua Salud alphavirus	Culex declarator
		Eilat virus	Anopheles coustani
		Tai Forest alphavirus	Culex decens
		Yada yada virus	N/A

Tabla 1. Clasificación de los virus específicos de insectos más relevantes con especies de mosquitos vectores confirmadas. N/A = Especies vectoriales de ISV no determinadas. Modificada de (Elrefaey et al., 2020).

1.3.3 Relación con arbovirus

Los ISV y los arbovirus infectan y se replican en insectos vectores y muestran una relación evolutiva. Este hecho sugiere que los arbovirus podrían haber sido ISV que a través de la evolución adquirieron la capacidad de expandir su rango de huéspedes para incluir también a los vertebrados. De hecho, la investigación sobre la reconstrucción de rasgos ancestrales en ISV del orden *Bunyavirales* se ha relacionado con el origen de *Bunyavirus* de doble huésped en progenitores específicos de artrópodos (Nasar et al., 2012).

1.4 Importancia en la salud pública

Más del 90% de todos los arbovirus que causan enfermedades en los humanos son vectorizados por mosquitos (Öhlund et al., 2019). El panorama del riesgo de enfermedades virales transmitidas por mosquitos ha cambiado drásticamente en los últimos años, el número de casos de dichas enfermedades han estado en continuo aumento y se han extendido gradualmente hacia áreas previamente no afectadas (Alonso-Palomares et al., 2019). Los mosquitos transmiten una variedad de agentes virales causante de una tasa significativamente alta de morbilidad, mortalidad y sufrimientos humanos sustanciales. Los virus más importantes transmitidos por mosquitos incluyen *Flavivirus* (*Flaviviridae*) como el DENV, YFV, WNV; *Alphavirus* (*Togaviridae*) como el CHIKV, el *virus del bosque semliki* (SFV), el *virus Sindbis* (SINV); y *Bunyavirus* (*Bunyaviridae*) como FVRV (Kean et al., 2015). Todos estos arbovirus son transmitidos principalmente por especies de *Culex*, *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*,

aunque el mosquito *Ae. albopictus* parece mucho menos significativo epidemiológicamente que *Ae. aegypti* (Lambrechts et al., 2010). El mosquito de la fiebre amarilla *Ae. aegypti*, es el principal transmisor de los cuatro virus que han tenido el mayor impacto en la salud humana, estos virus incluyen DENV, YFV, CHIKV y ZIKV (Souza-Neto et al., 2019). Mientras que los mosquitos del género *Culex* son responsables de transmitir WNV, JEV, el virus de la encefalitis de St. Louis (SLEV), VEEV, entre otros arbovirus (Couret, 2013).

El DENV actualmente es la enfermedad arboviral más común en el mundo. Comenzó con una expansión repentina y dramática a principios de la década de 1940 durante la segunda guerra mundial. Después de programas exitosos de erradicación del vector en la primera mitad del siglo XX, el DENV se reintrodujo en las Américas, primero en Cuba en 1977 y luego se propagó por toda América del Sur en 1994 (**Figura 6**). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de 2.500 millones de personas, están en riesgo solo por el DENV (Kean et al., 2015). La cifra aumenta si tenemos en cuenta otros arbovirus con un amplio rango de expansión geográfica como el CHIKV que salió de África en las islas del suroeste del Océano Índico hasta el sudeste de Asia. Una única mutación en la proteína de la superficie del virión facilitó el contagio a un nuevo mosquito huésped, *Ae. albopictus*, y una mayor propagación mundial, llegando a las Américas en 2014 (**Figura 6**). El WNV se extendió desde el Medio Oriente a las Américas en el año 2000, y recientemente el ZIKV que se esparció de África al sudeste de Asia, las islas de Polinesia y luego a Brasil en una epidemia explosiva

en 2015-2016 (**Figura 6**) (Young, 2018). La propagación de arbovirus en varias regiones ha generado importantes problemas de salud a nivel internacional. Entre los factores que han favorecido la aparición o reaparición de estos agentes virales se encuentran el aumento de las temperaturas, la urbanización, el crecimiento de la población en áreas de alto riesgo, a los viajes extensos, el comercio, la globalización de los vectores, y por supuesto la alta tasa de mutación de los virus que permite su rápida evolución (Bueno-Marí & Jiménez-Peydró, 2013).

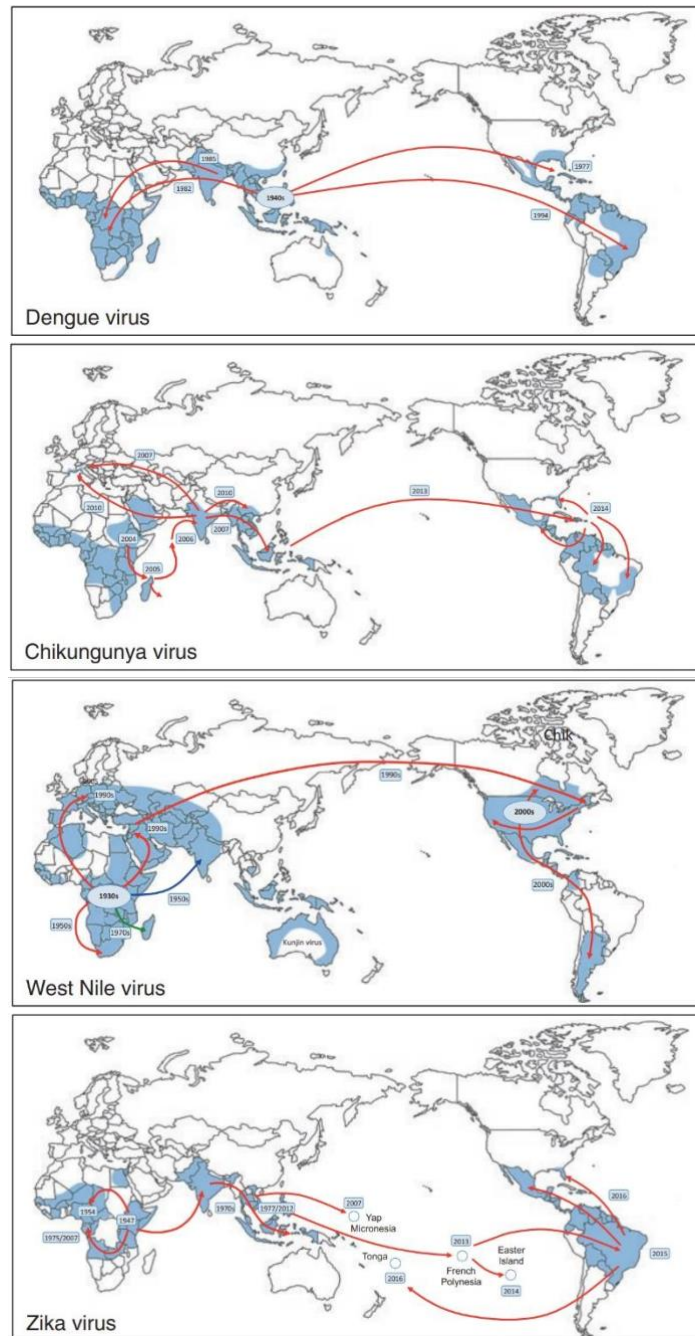


Figura 6. Epidemiología de arbovirus. Cuatro ejemplos de arbovirus (DENV, CHIKV, WNV y ZIKV) que han surgido como amenazas distribuidas globalmente para la salud humana en los últimos años. Tomada de (Young, 2018).

1.5 *Aedes aegypti*

El mosquito *Aedes aegypti* o también conocido como el mosquito de la fiebre amarilla, representa una amenaza para la salud pública, ya que es considerado como el vector biológico de *Flavivirus* más importante en todo el mundo. Es una especie termófila originaria de África que actualmente se encuentra distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del planeta (Powellet al., 2018).

1.5.1 Taxonomía

El género *Aedes* está constituido por más de 950 especies distribuidas en un rango global extenso. Dentro de estas especies, el mosquito artrópodo *Ae. aegypti*, es el principal transmisor de agentes virales y a menudo se encuentra dentro y alrededor de nuestros hogares. La taxonomía de esta especie se muestra en la **tabla 2**.

Tabla 2. Taxonomía de *Ae. aegypti*

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Arthropoda</i>
Clase	<i>Insecta</i>
Orden	<i>Diptera</i>
Suborden	<i>Nematocera</i>
Familia	<i>Culicidae</i>
Género	<i>Aedes</i>
Subgénero	<i>Aedes (Stegomyia)</i>
Especie	<i>Aegypti</i>

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=126240#null

1.5.2 Morfología

El mosquito *Ae. aegypti* en etapa adulta presenta un tamaño pequeño-mediano de aproximadamente 4-7 milímetros. A simple vista, *Ae. aegypti* presenta similitudes morfológicas con el mosquito *Ae. albopictus*, con una ligera diferencia en el tamaño y los patrones del tórax (Mukhtar et al., 2016). El adulto de *Ae. aegypti* tiene un dorso con bandas de color plateado o amarillo blanquecino sobre un fondo color marrón oscuro a negro y presenta un patrón característico en la superficie dorsal del tórax que tiene la forma de un violín o una lira. Las patas están conspicuamente bandeadas y el último artejo de las patas posteriores es blanco. Las hembras son más grandes que los machos y se pueden distinguir por pequeños palpos con escamas plateadas o blancas en la punta (**Figura 7**). Los machos tienen antenas plumosas, mientras que las hembras tienen pelos cortos y escasos. La probóscide de ambos sexos y la punta del abdomen llegan a un punto, que es característico de todas las especies de *Aedes* (Cutwa & O'Meara, 2007).

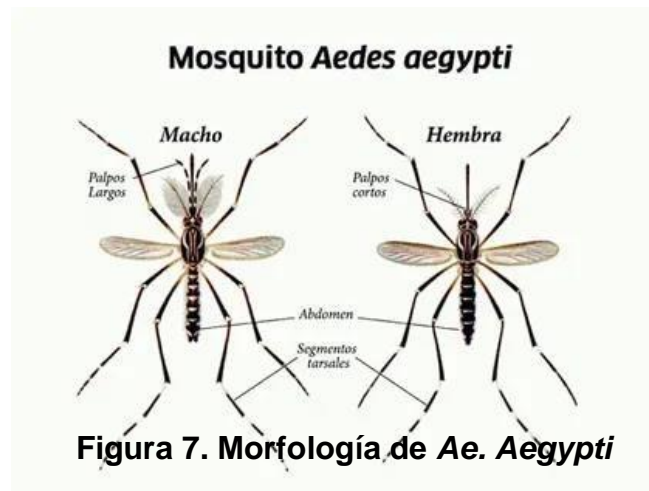


Figura 7. Morfología de *Ae. Aegypti*

<https://www.tri-tro.com/enfermedades-parasitarias-en-gallinas/mosquitos/>

1.5.3 Distribución geográfica

Durante mucho tiempo los mosquitos de la especie *Ae. aegypti* estuvieron geográficamente restringidos sobre el continente africano (Brown et al., 2014). La expansión comenzó con la primera incursión de *Ae. aegypti* de África a las Américas durante el comercio de esclavos en el siglo XVI, posteriormente se propagó sobre Europa, Asia y Australia durante el siglo XX. Actualmente con el aumento de la globalización y los cambios en el medio ambiente, estos mosquitos se encuentran colonizando regiones subtropicales y templadas de casi todos los continentes (Lwande et al., 2020) (**Figura 8**). El mosquito está estrechamente asociado con el entorno humano y prevalece en áreas pobladas de los subtrópicos y trópicos del planeta, con un clima adecuadamente cálido (superior a los 10 °C) y húmedo (60-70%), donde se puede encontrar en entornos que van desde pequeños poblados rurales hasta ciudades extensas (Eisen & Moore, 2013).

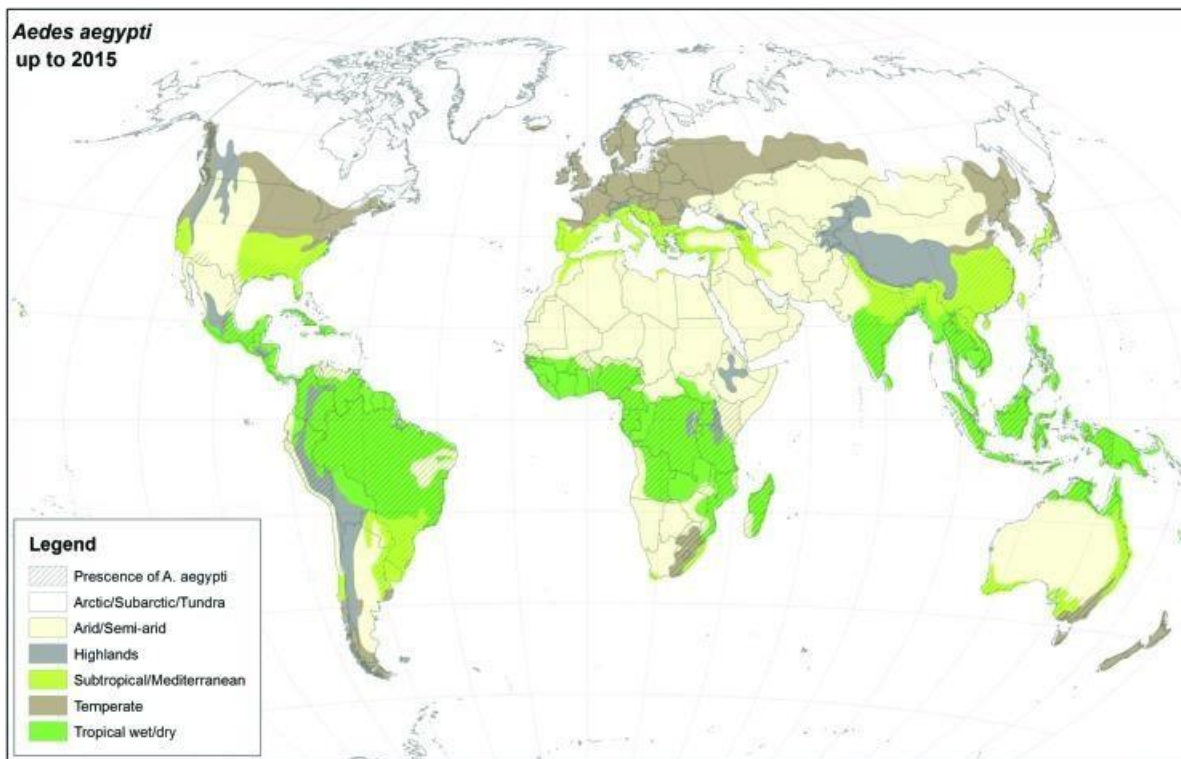


Figura 8. Distribución global de *Ae. aegypti* utilizando datos climáticos y de vigilancia recopilados hasta el 2015. Tomada de (Lwande et al., 2020).

1.6 *Culex pipiens*

Por otro lado, los mosquitos del complejo *Cx. pipiens*, también forman parte de los vectores de algunos virus que afectan al ser humano y a los animales. Los miembros de este grupo se distribuyen por todo el mundo, principalmente en dos especies: *Cx. pipiens*, presente por todo el hemisferio norte templado, en las latitudes más altas del norte de Europa, Asia y América del Norte; y *Cx. quinquefasciatus*, que habita en regiones tropicales y subtropicales (Haba & McBride, 2022).

1.6.1 Taxonomía

Estos mosquitos son *artrópodos* pertenecientes a la clase *Insecta*, orden *Diptera*, familia *Culicidae* y subfamilia *Culicinae*, el género *Culex* comprende alrededor de 1000 especies en el que incluye el complejo *Cx. pipiens*. Un complejo de especies generalmente se define como un grupo de especies evolutivamente estrechamente relacionadas que, en consecuencia, a menudo son difíciles de separar morfológicamente.

Durante varios años el complejo *Cx. pipiens* ha mantenido una controversia taxonómica debido a la divergencia morfológica y genética limitada que dificulta los mecanismos de diferenciación genética. Dentro de este grupo existen seis taxones reconocidos contemporáneamente: *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. australicus* y *Cx. globocoxitus*. Para *Cx. pipiens*, se han descrito dos biotipos; *Cx. pipiens pipiens* y *Cx. molestus*, basado en diferencias fisiológicas y ecológicas, incluyendo la elección de las especies huésped, la actividad estacional, el comportamiento de apareamiento y el hábitat preferido (Kang et al., 2021). Además se ha identificado *Cx. pipiens pallens*, un taxón que probablemente surgió de la hibridación pasada entre *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. pipiens pipiens/Cx. pipiens molestus*. Pero aún no existe una determinación concreta (Aardema et al., 2020).

1.6.2 Morfología

La identificación morfológica de las especies de *Culex* es dificultosa, principalmente en larvas y hembras, ya que los caracteres anatómicos resultan polimórficos y se superponen entre especies, limitando la correcta identificación a unos pocos caracteres de la genitalia masculina. Además, incluye complejos grupos de especies que no son distinguibles por caracteres morfológicos.

1.6.3 Distribución geográfica

En general, las especies del complejo *Cx. pipiens* se distribuyen globalmente en América, Europa, África, Asia y Australia. Sin embargo, varios miembros del complejo tienen distribuciones geográficas limitadas. Entre estas especies, *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* se extendieron por todo el mundo en regiones templadas y tropicales/subtropicales, respectivamente (**Figura 9**). La distribución de *Cx. australicus* y *Cx. globocoxitus* se encuentra restringida en Australia. Mientras que la especie *Cx. pallens*, es endémica en Japón y el Lejano Oriente de Eurasia (Yurchenko et al., 2020).

Principalmente, el mosquito *Cx. pipiens* es uno de los mosquitos vectores de enfermedades más importantes en las zonas templadas de todo el hemisferio norte. Sus biotipos *Cx. pipiens pipiens* y *Cx. molestus*; cada uno tiene estrategias de vida únicas específicamente adaptadas a su nicho ecológico (Las diferencias incluyen la capacidad de invernar la diapausa, la preferencia de alimentarse de sangre, los comportamientos de apareamiento y la dependencia de ingesta de sangre para producir huevos). Aunque ambos mosquitos se encuentran en áreas

urbanas, los mosquitos *Cx. pipiens pipiens* residen sobre el suelo a diferencia de *Cx. molestus* que habita en infraestructuras subterráneas hechas por el hombre, como alcantarillas y túneles. *Cx. quinquefasciatus* prospera en regiones tropicales y subtropicales del planeta y a menudo lo encontramos dentro y alrededor de nuestros hogares. Juntos, *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* se encuentran en la mayoría de las áreas habitadas a nivel mundial y a menudo están estrechamente asociados con los humanos, ambos son los principales vectores de enfermedades virales (Farajollahi et al., 2011).

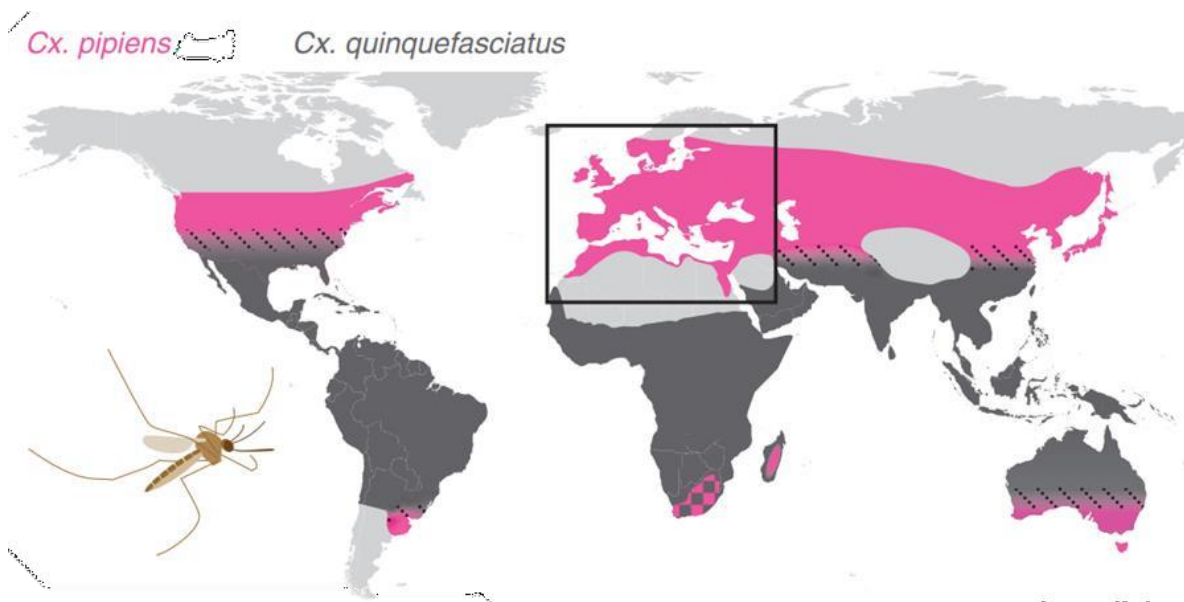


Figura 9. Distribución global de *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus*. Las áreas sombreadas muestran la distribución mundial del mosquito vector *Cx. pipiens* (rosa) y *Cx. quinquefasciatus* (gris oscuro). Las dos especies hibridan donde entran en contacto (líneas negras punteadas), excepto en Sudáfrica (damas rosa- grisáceas), donde los '*Cx. pipiens*' locales no se cruzan con *Cx. quinquefasciatus* coexistentes y pueden representar una tercera especie. La diversidad ecológica dentro de *Cx. pipiens* se centra a través del Paleártico occidental (rectángulo negro), donde esta diversidad es más alta y probablemente fue el lugar de origen. Las poblaciones de *Cx. pipiens* en el este de Asia se reconocen como una subespecie distinta (*Cx. pallens*), mientras que se cree que las de las Américas y Australia se establecieron relativamente recientemente. *Cx. pipiens* también puede ocurrir esporádicamente en elevaciones altas en África tropical. Modificada de (Haba and McBride, 2022).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Viroma de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens*

Los mosquitos del género *Aedes aegypti* y complejos *Culex pipiens* se han expandido desde nichos forestales ancestrales hasta los entornos peridomésticos, ambas especies han demostrado ser vectores competentes de numerosos virus transmitidos por artrópodos.

Los arbovirus son aquellos virus que se transmiten biológicamente al ser humano u otros vertebrados por ciertas especies de artrópodos hematófagos. Estos arbovirus incluyen una amplia variedad de virus de ARN pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, *Togaviridae* y el orden *Bunyvirales* (Schulz & Becker, 2018), algunos de los cuales son causantes de millones de muertes humanas y animales cada año, convirtiéndolos en una amenaza grave y significativa para la salud humana y animal (Elrefaey et al., 2020).

La cantidad de virus identificados en mosquitos ha aumentado dramáticamente en la última década, estudios metagenómicos a gran escala han ayudado a proporcionar una visión general más amplia de los virus que circulan en estos vectores, y han establecido que albergan un viroma rico y diverso compuesto principalmente por arbovirus e ISV (**Figura 10A, B**) (de Almeida et al., 2021). Los arbovirus y los ISV en mosquitos pertenecen a diversas familias de virus compuestas en gran parte por virus de ARN (**Figura 10C**). Los estudios en mosquitos *Ae. aegypti* de diferentes partes del mundo muestran que algunos ISV están muy extendidos, como *Phasi Charoen-like virus*, *Humaita-Tubiacanga virus*,

Aedes anphevirus y CFAV, aunque carece de estudios más amplios que comparen directamente los mosquitos de diferentes lugares. También carece de una comparación sistemática entre especies, pero algunos estudios han analizado el viroma de diferentes mosquitos como *Culex spp.*, *Aedes spp.* y *Anopheles spp.*, mostrando variaciones en la diversidad y abundancia de virus entre especies, pero no observaron patrones consistentes asociados con mosquitos específicos (Sadeghi et al., 2017).

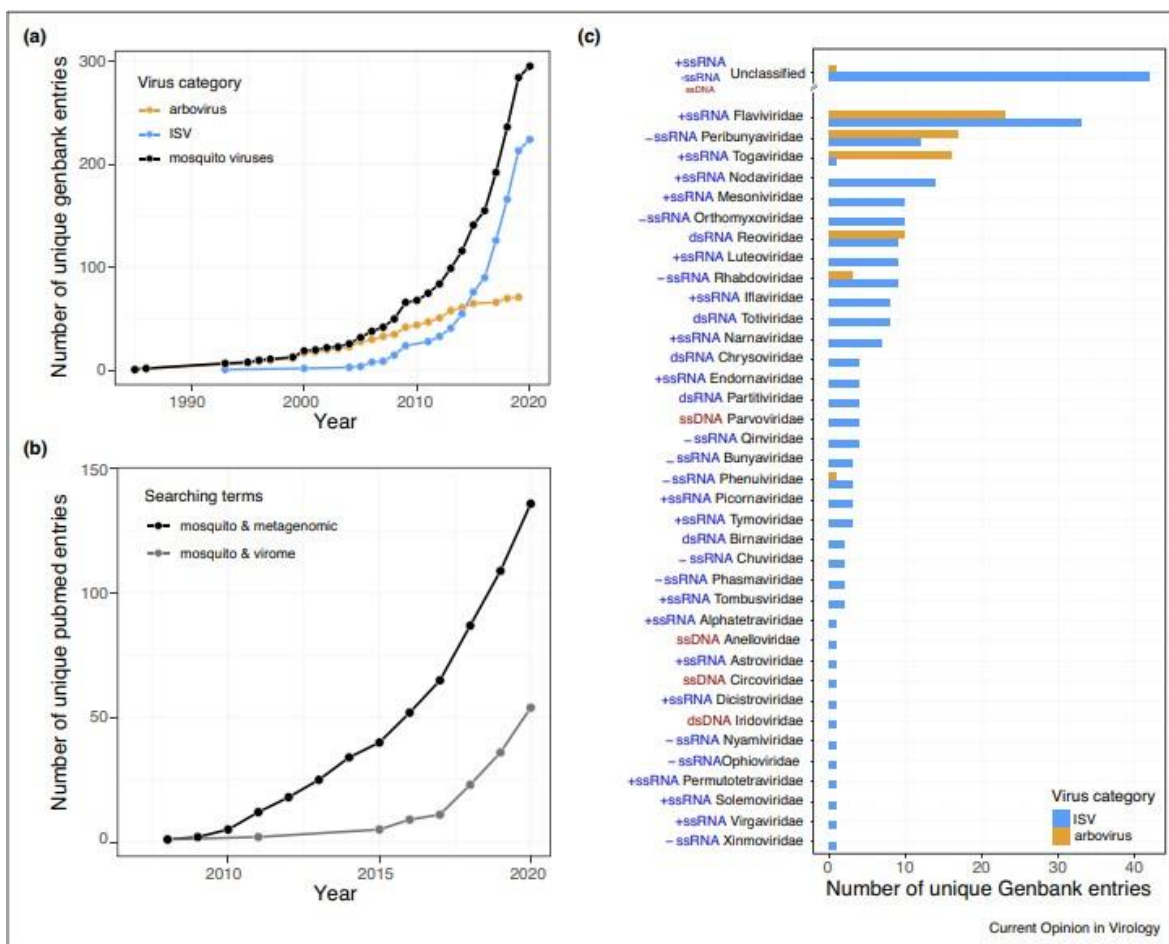


Figura 10. Descripción de los virus que circulan en los mosquitos. (A) Números acumulados de entradas únicas en Genbank para virus asociados con mosquitos. Los números para arbovirus e ISV también se indican por separado. **(B)** Número acumulado de artículos en Pubmed que contienen los términos "metagenómica de mosquitos" o "viroma de mosquitos". **(C)** Diversidad de familias virales de arbovirus e ISV en la lista de virus de mosquitos en Genbank. Tomada de (Almeida et al., 2021).

Se han identificado una variedad de ISV que se replican sólo en células de artrópodos a diferencia de los arbovirus (Thannesberger et al., 2020). La mayoría de los ISV de ARN se clasifican en las familias de *Flaviviridae*, *Togaviridae*, el orden de *Bunyvirales* y, recientemente, *Mesoniviridae* (Bolling et al., 2015). Múltiples estudios filogenéticos han revelado que la mayoría de los ISV están estrechamente relacionados con los arbovirus en términos de estructura del genoma, orden de los genes y secuencia de nucleótidos (Öhlund et al., 2019). Es posible que los ISV adquirieron la capacidad de infectar a huéspedes secundarios (vertebrados) evolucionando a lo que hoy conocemos como arbovirus. Estudios han demostrado que los ISV pueden modular la susceptibilidad de los mosquitos a la infección por arbovirus tanto en modelos de coinfección in vivo como in vitro (Parry et al., 2021).

El interés por la detección de arbovirus ha llevado al descubrimiento de una diversidad extensa de virus. Los arbovirus e ISV no son los únicos virus que circulan en estos vectores. En general, la diversidad del viroma del mosquito se encuentra en constante flujo, que dependerá del entorno donde se desarrollen (Shiet al., 2019).

Un estudio reciente sobre el viroma de *Ae. aegypti* y el complejo *Cx. pipiens*, analizaron los impactos del virus para sus especies huésped asociadas anotadas en la base de datos del NCBI. Identificaron virus en una amplia gama de huéspedes en mosquitos *Ae. aegypti* y el complejo *Cx. pipiens*. Además de los virus de huéspedes vertebrados, como los virus humanos, de murciélagos y otros virus de mamíferos, detectamos virus asociados con huéspedes invertebrados, virus de plantas, virus ambientales y bacteriófagos. Cuando los taxones virales se agruparon según los grupos huéspedes relacionados, observaron que la riqueza taxonómica era más alta para los virus y bacteriófagos asociados a mosquitos (**Figura 11A**). Dentro del grupo de huéspedes vertebrados, los virus asociados con mamíferos y, en particular, con murciélagos prevalecieron en alta diversidad. Estos dos grupos se encontraban entre los más abundantes en las cuatro muestras (**Figura 11B**). Sin embargo, este hallazgo puede estar sesgado por el hecho de que el microbioma viral de los murciélagos ha sido muestreado más extensamente que el de otras especies de mamíferos silvestres (Thannesberger et al., 2020).

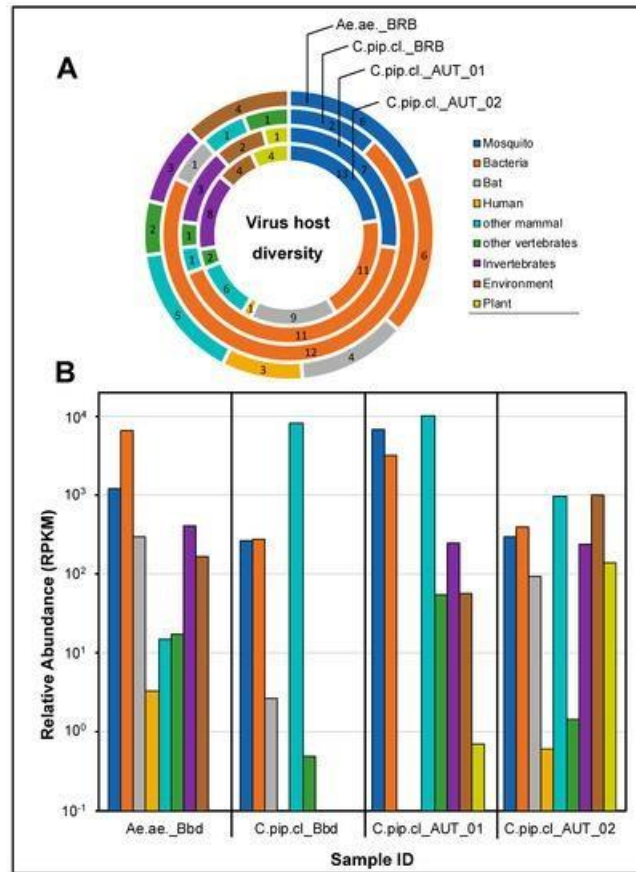


Figura 11. Taxones virales agrupados por el organismo huésped asociado (NCBI). Para la muestra de *Ae. aegypti*; Ae.ae._BRB, para muestras del complejo *Cx. pipiens*; C.pip.cl._BRB, C.pip.cl._AUT_01 y C.pip.cl._AUT_02. Tomada de (Thannesberger et al., 2020).

Otro estudio relacionado con el viroma de los mosquitos vectores *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en un rango global extenso, han identificado tres nuevos *Mononegavirus* de cadena negativa. El primero, el virus *Formosus*, un *Rhabdovirus* de una colonia de laboratorio de *Ae. aegypti formosus*, *San Gabriel Virus* y *Longgang virus* (**Figura 12**). Al igual que otros virus con genomas, en su mayoría de ARN.

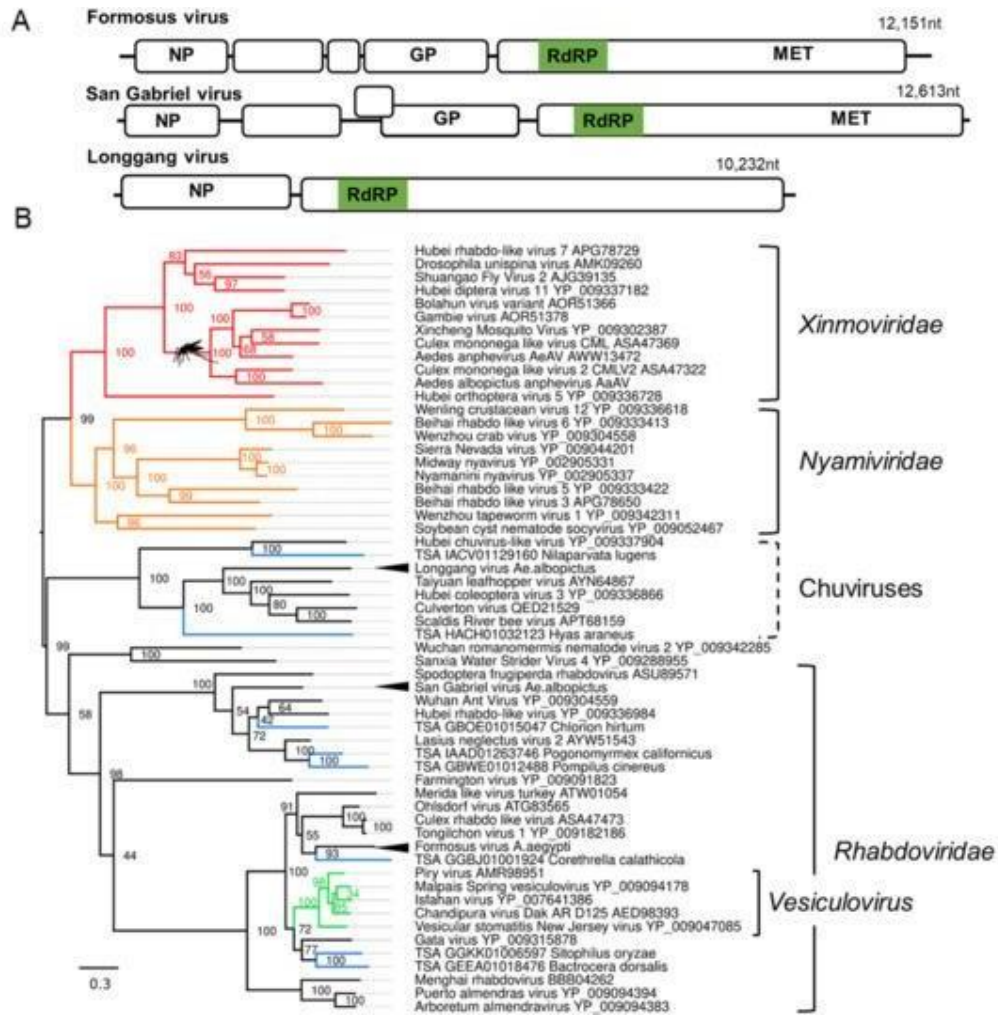


Figura 12. Nuevos virus de ARN de sentido negativo de los mosquitos *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. (A) Estructura del genoma y organización de nuevos *Mononegavirus* (B) Colocación filogenética de nuevos *Mononegavirus* construidos en base a una alineación de la secuencia de la proteína L. Tomada de (Parry et al., 2021).

2.2 Evolución de los virus de ARN

Las poblaciones virales evolucionan por la acción de la mutación y la recombinación y están sujetas a las mismas fuerzas evolutivas que todos los

organismos, incluida la deriva genética aleatoria y la selección natural (Holmes, 2011). Sin embargo, debido a sus altas tasas de mutación y profundas fluctuaciones del tamaño de la población, los virus de ARN se encuentran con estas fuerzas de maneras fundamentalmente diferentes a las de los organismos celulares (Dolan et al., 2018). El historial de los virus se caracteriza por episodios de fuerte selección purificadora que impulsan una rápida evolución adaptativa y frecuentes cuellos de botella poblacionales (reducción del tamaño de población viral) repetidos que resultan en una deriva genética (Dolan et al., 2018). Las influencias relativas de estas fuerzas en la trayectoria evolutiva de las poblaciones virales, y las escalas en las que se observan las poblaciones, varían espacial y temporalmente.

2.2.1 Mecanismos de variabilidad genética más frecuentes

1. **Mutaciones:** Una mutación se refiere a la síntesis molecular o modificación de uno o varios cambios nucleotídicos en un gen que lo diferencia de su parental (Holmes, 2011). El ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) de los virus de ARN son especialmente propensos a errores, exhibiendo las tasas de mutación más altas (mutaciones por sitio por generación) en la naturaleza (Sanjuán, 2012). Como resultado, muchos virus de ARN evolucionan muy rápidamente.

2. **Recombinaciones:** Las recombinaciones pueden ser definidas como un proceso mediante el cual el material genético es intercambiado, resultando en la formación de un ácido nucleico compuesto de 2 ácidos nucleicos parentales o

más. Las recombinaciones pueden ocurrir entre genomas virales diferentes o entre un genoma viral y otro genoma no viral (genoma del hospedero, genoma de algún otro parásito que coinfecta el mismo hospedero o de un plásmido) (Valdés et al., 2006).

3. **Intercambio de genes:** Este proceso ocurre cuando 2 virus de genoma segmentado o más coinfectan una célula y la progenie resultante tendrá genomas segmentados de ambos parentales. Este mecanismo en condiciones naturales brinda la posibilidad de un gran número de combinaciones que ocurren entre virus con genoma segmentado (*Orthomyxovirus*, *Reovirus*, *Arenavirus*, *Birnavirus*, *Bunyavirus*, *Nodavirus*, *Geminivirus* y *Ribovirus*) (Valdés et al., 2006).

2.2.2 Selección y deriva

Cada mutación tiene un efecto característico sobre el éxito replicativo, o aptitud, del virus, conocido como efecto de aptitud mutacional. En los virus de ARN, el efecto de aptitud (ω) de la mayoría de las mutaciones es perjudicial ($\omega < 1$) o letal ($\omega = 0$) (Singh & Yi, 2021). Las mutaciones que no ejercen ningún efecto, o tienen poco, sobre la aptitud de la población viral se denominan neutrales o casi neutrales ($\omega \approx 1$) (Jensen et al., 2019). Las mutaciones beneficiosas, aquellas mutaciones que confieren una ventaja adaptativa al virus ($\omega > 1$), son comparativamente raras. En conjunto, las mutaciones presentes en un genoma, sugenotipo, determinan la aptitud o fenotipo del genoma.

La selección natural actúa sobre la diversidad fenotípica de los genomas mutantes en la población para conducir a las poblaciones hacia una mayor aptitud.

Las mutaciones beneficiosas, si no se ven obstaculizadas, aumentarán a la fijación impulsada por la selección positiva. Los mutantes deletéreos, que resultan en una aptitud reducida, se eliminan de la población por selección negativa o purificadora (Singh & Yi, 2021). Como tal, la selección natural tiene una influencia determinista en la evolución de las poblaciones virales. La probabilidad de que un alelo adaptativo vaya a la fijación y reemplace la secuencia maestra dentro de la población es una función de su frecuencia, su efecto de aptitud y el tamaño efectivo de la población (Jensen et al., 2019).

En poblaciones finitas, el proceso evolutivo es impulsado no sólo por la influencia determinista de la selección, sino también por la influencia estocástica de la deriva genética aleatoria (Dolan et al., 2018). La deriva genética, la fluctuación estocástica de las frecuencias alélicas en la población, ocurre en todas las poblaciones finitas como resultado del error de muestreo de generación en generación (Valdés et al., 2006). La deriva sola puede conducir a la fijación de mutaciones neutras y perjudiciales en la población. El error de muestreo y, por lo tanto, la influencia de la deriva genética en las trayectorias evolutivas es mayor en poblaciones pequeñas.

2.3 RNA-seq

Actualmente, y gracias a los avances en las técnicas de secuenciación del ADN, a través de tecnologías de nueva generación, NGS (del inglés Next Generation Sequencing), se han revolucionado campos como los de la genómica y la transcriptómica. Estas tecnologías han permitido no solo generar información

con altos rendimientos y a bajo costo, sino también abrir nuevos horizontes para el entendimiento detallado y global de procesos de expresión génica (Ward et al., 2012).

La caracterización completa y el análisis global de la expresión génica en una célula o tejido, aun sin ninguna información genómica previa, es ahora posible a través de la implementación de la secuenciación de ADNc (determinación del orden de los nucleótidos del ADN complementario), o más recientemente de la secuenciación directa de ARN, tecnología conocida como RNA-seq (Egan et al., 2012; Ward et al., 2012).

2.3.1 Tecnología RNA-seq

El RNA-seq es una herramienta transcriptómica actual que está fundamentada en la secuenciación de ADNc basada en los desarrollos NGS. En esta tecnología se captura el ARN total o ARNm, el cual se fragmenta y convierte en una librería de ADNc. Uno de los pasos fundamentales es la obtención de un ARN de buena calidad que represente todos los transcritos que se producen en la condición y tejido de estudio. Para el aislamiento del ARN con frecuencia se emplean kits de extracción de ARNm, que aplican la captura a partir de la cola poli-A (Egan et al., 2012). La fragmentación del ARN o del cDNA se realiza o bien por nebulización, por digestión con enzimas de restricción o a través del uso de cationes divalentes bajo condiciones de presiones elevadas. Generalmente el fraccionamiento se realiza posteriormente a la síntesis de ADNc (Marguerat & Bähler, 2010).

Una vez obtenido el ADNc se ligan adaptadores de tal forma que cada fragmento generado contendrá un adaptador ligado en sus extremos 3' y 5' (Marguerat & Bähler, 2010). Las secuencias de estos adaptadores se conocen y serán necesarias para que cada fragmento pueda ser secuenciado, y en algunos casos pueden emplearse para diferenciar otros grupos de fragmentos obtenidos a partir de muestras de ADNc diferentes; sin embargo, no en todos los casos se requiere la ligación de adaptadores, lo cual dependerá de la plataforma de secuenciación a emplear (Marguerat & Bähler, 2010).

2.3.2 Plataformas y estrategias de secuenciación para RNA-seq

La tecnología RNA-seq actualmente está disponible comercialmente en las compañías Roche/454, Solexa/Illumina, SOLiD/Life Technologies y Helicos/BioSciences (Sedano & Carrascal, 2012); sin embargo, de las tecnologías de NGS disponibles las más aplicadas son Roche/454 y Solexa/Illumina (Wang et al., 2011), también se encuentra Ion Torrent y PacBio. Cada una de estas tecnologías emplea diferentes métodos de preparación de la muestra, separación y secuenciación de moléculas, el resumen de cada una de estas tecnologías se muestra en la **Tabla 3**.

Method	Adapter type	Amplification?	Separation	Sequencing chemistry	Approximate read length (bases)†	Approximate maximum amount of data per run†
Roche 454*	Adapters	Emulsion PCR	Microbeads and 'picotitre' plate	Pyrosequencing	400–700	700 Mb
SOLiD	Adapters	Emulsion PCR	Beads on glass slide	Ligation	50–75	20 Gb
Illumina*	Adapters	Bridge amplification <i>in situ</i>	Glass slide hybridization	Reversible terminators	25–500	600 Gb
Helicos	Poly(A) adapter	No amplification	Flow-cell hybridization	Reversible terminators	25–55	35 Gb
PacBio	Hairpin adapters	Linear amplification	Captured by DNA polymerase in microcell	Fluorescently labelled dNTPs	1000	Not available
Ion Torrent*	Adapters	Emulsion PCR	Ion Spheres and high-density array	Detection of released H ⁺	35–400	1 Gb

Tabla 3. Resumen de las tecnologías actuales de próxima generación: métodos utilizados en la preparación de muestras, separación y secuenciación de moléculas, y resultados anunciados. Tomada de (Radford et al., 2012).

Esta herramienta ahora está cambiando la forma en que entendemos a los virus, particularmente en las áreas de secuenciación del genoma, evolución, ecología y el descubrimiento de virus nuevos. La metatranscriptómica tiene varias ventajas sobre enfoques como el cultivo celular, la PCR de consenso y los métodos metagenómicos basados en la purificación de partículas virales (Radford et al., 2012) y ha demostrado ser exitosa en la caracterización de los viromas de diversos invertebrados. Específicamente, (I) revela todo el viroma de ARN, con cobertura suficiente para reconstruir genomas virales completos, incluidos los de parásitos coinfectantes; II) proporciona una cuantificación y evaluación fiables de los ARN tanto virales como del huésped; y (III) es relativamente simple, requiriendo un procesamiento mínimo de muestras. La preparación de la biblioteca para los estudios de metatranscriptómica generalmente implica la eliminación o el agotamiento del ARN ribosómico y no está enriquecida para las transcripciones de ARNm poli-A, un paso de preparación de la biblioteca que generalmente se usa para el análisis diferencial de expresión génica. Si bien el paso de enriquecimiento poli-A sesga la población de virus identificados, con suficiente profundidad, muchos virus no enriquecidos con poli-A también se pueden ensamblar e

identificar a partir de estos datos (Parry et al., 2021). Lo más importante es que la metatranscriptómica proporciona más información que la que proporciona la secuencia del genoma sola, lo que permite una caracterización directa de la diversidad viral y la ecología (Shi et al., 2017).

2.4 Bioinformática

La bioinformática es la aplicación de herramientas y análisis computacionales para comprender e interpretar datos biológicos. La bioinformática es un campo interdisciplinario que se ha aplicado ampliamente en la biología y la medicina modernas para la gestión de datos. El análisis de los datos de secuenciación masiva generados a partir de plataformas de secuenciación de alto rendimiento generalmente incluye la verificación de calidad, el ensamblaje y la clasificación taxonómica de las lecturas y / o contigs producidas por el ensamblaje (**Figura 13**).

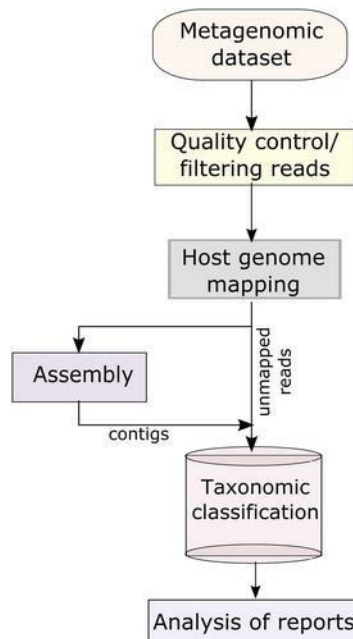


Figura 13. Flujo de trabajo bioinformático para metagenómica viral. Los principales pasos bioinformáticos utilizados para analizar los conjuntos de datos de secuenciación de alto rendimiento. Tomada de (Cholleti et al., 2018).

La verificación de calidad implica el recorte de secuencias de acuerdo con las puntuaciones de calidad de Phred, que están relacionadas con las probabilidades de error en el llamado de las bases (Ewing & Green, 1998). También incluye, identificar y eliminar duplicados de secuencia que son producidos por la plataforma de secuenciación de alto rendimiento como resultado de la amplificación de PCR, errores de PCR o errores de secuenciación y es necesario para reducir el tiempo computacional, calcular con precisión una abundancia estimada de especies y mejorar el ensamblaje. Todas estas condiciones de filtrado de calidad se pueden especificar en función de los análisis posteriores requeridos (Patel & Jain, 2012). Además, las secuencias que no son un objetivo del estudio se pueden filtrar para eliminar los ensamblajes erróneos y acelerar el análisis. Por ejemplo, las secuencias del host se pueden eliminar de una muestra si las secuencias objetivo son lecturas relacionadas con el virus (Bzhalava et al., 2013). Las posibles secuencias contaminantes o las secuencias que no son relevantes también se pueden eliminar alineándose con secuencias de referencia, que se pueden realizar utilizando varias herramientas de alineación de lecturas cortas como BWA, SOAP2 y Bowtie2 (Li & Durbin, 2010).

El ensamblaje de secuencias más cortas que tienen superposiciones coincidentes genera secuencias más largas llamadas secuencias contiguas (contigs), un método conocido como ensamblaje *de novo*. Estos contigs se pueden extender aún más mediante la fusión de contigs más cortos. Hay dos tipos principales de programas de ensamblaje *de novo*, ensambladores de superposición/diseño/consenso, que se utilizan ampliamente para lecturas más largas y ensambladores de grafos de Bruijn. Sin embargo, el proceso de ensamblaje podría generar secuencias "quiméricas" que impliquen el ensamblaje de secuencias de diferentes organismos o especies, lo que puede ser un problema en los estudios metagenómicos virales, ya que la muestra biológica puede contener secuencias virales estrechamente relacionadas (Berthet et al., 2016).

La clasificación taxonómica es el paso final en el análisis metagenómico, donde cada secuencia se asigna a un grupo taxonómico. La clasificación basada en la similitud más utilizada es Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), donde las secuencias se comparan con genomas conocidos. Se pueden utilizar diferentes versiones de BLAST, como BLASTx y tBLASTx. Teniendo en cuenta el lapso de tiempo para la clasificación de secuencias, se han desarrollado varias herramientas diferentes que pueden reducir el tiempo requerido de semanas a días, por ejemplo, RAPsearch2, Diamond, Kaiju y Kraken.

JUSTIFICACIÓN

Los ISV son un grupo relativamente nuevo de virus con muchas propiedades interesantes que tienen el potencial de ser utilizados para comprender mejor la evolución de los virus en general y posiblemente ayudar a la prevención de la transmisión de arbovirus. Sin embargo, se tiene una comprensión limitada de la composición y diversidad del viroma de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens*. Con los avances en las herramientas moleculares para la detección viral como la metatranscriptómica, actualmente se han descrito y detectado nuevos virus específicos de insectos de manera aislada geográficamente. La integración global y comparación de metadatos proporcionará nuevos conocimientos sobre la diversidad y evolución viral, incluyendo a los arbovirus.

HIPÓTESIS

El estudio del viroma en mosquitos vectores médicamente importantes proporcionará recursos clave para evaluar la relación y evolución de los virus específicos de insectos entre los mosquitos y los arbovirus que transmiten.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad de virus presentes en mosquitos *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens*; y determinar los procesos evolutivos en las proteínas de envoltura de los virus con mayor abundancia a partir de datos metatranscriptómicos disponibles en bases de datos públicas.

Objetivos específicos

- Recopilar viomas de *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens* recolectados en distintas partes del mundo en los últimos años.
- Realizar una asignación taxonómica de las secuencias virales obtenidas a partir de los viomas de *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens*.
- Analizar la diversidad de los genomas virales en los viomas de *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens*.
- Comparar la diversidad y abundancia del vioma de *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens*.
- Determinar las presiones de selección sobre las proteínas de envoltura de los ISV y arbovirus con mayor abundancia en los viomas para determinar su evolución.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1. Recopilación de datos de RNA-seq

Para identificar publicaciones que utilizan secuenciación de ARN (RNA-seq) en mosquitos *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens*, se realizó una búsqueda bibliográfica en PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>; (Consultado el día 25 de Agosto de 2022)) y Google Academic (<https://scholar.google.es/schhp?hl=es>; (Consultado el día 27 de Agosto de 2022)) utilizando los siguientes términos de búsqueda: (“*Aedes aegypti*” O “*Culex pipiens*” y “RNA-seq” o “Metatranscriptómic” o “Viromic” o “Virome”). A partir de estas publicaciones se obtuvieron datos crudos (Archivos SRA; Sequence Read Archive) depositados en la base de datos GenBank. Se recuperaron todos los artículos de revistas relevantes publicados a partir del año 2011 y se excluyeron todas aquellas publicaciones en el que los datos no eran accesibles o entraban en conflicto con los intereses de los autores de la publicación.

La ubicación de captura original de los mosquitos para cada muestra se aproximó a partir de la bibliografía correspondiente utilizando los paquetes “sf”, “tidyverse” y “rworldxtra” en el entorno RStudio (versión 4.1.2).

3.2. Análisis bioinformático

Los archivos Fastq de los números de acceso de SRA asociados se descargaron utilizando el software de NCBI *SRA Toolkit* (versión 3.0.0) con la herramienta *Fastq-dump*. Una vez descargado los archivos fastq de los SRA, se utilizó la herramienta *FastQC* (versión 0.11.4) para evaluar la calidad de los datos

crudos. Los adaptadores y las regiones de secuenciación de baja calidad se removieron utilizando el software *Trimmomatic* (versión 0.39) bajo las siguientes condiciones; LEADING = 3, TRAILING = 3 y SLIDINGWINDOW = 4:15. Los parámetros MINLEN y HEADCROP variaban dependiendo la calidad de cada muestra. Posteriormente se realizó un alineamiento y mapeo de las secuencias cortas de ARN con el genoma de referencia para *Ae. aegypti* (AaegL5.0; PRJNA318737) y *Cx. pipiens* (VPISU_Cqui_1.0_pri_paternal; PRJNA644878 y TS_CPP_V2; PRJNA668557) utilizando el programa *Hisat2* (Versión 2.2.1). Finalmente los archivos SAM (Sequences Alignment MAP) generados por *Hisat2* se comprimieron a archivos fasta utilizando la herramienta *Samtools* (versión 0.1.19) para análisis posteriores.

3.3. Identificación de virus

Como primer enfoque se realizó un análisis *BLASTn* (versión 2.2.31) de los contigs alineados contra la base de datos de genomas virales completos previamente descargados de la base de datos GenBank (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/>; (Consultado el día 18 de Octubre de 2022)), empleando un umbral mínimo de e-value de 1×10^{-4} para retener una alta sensibilidad a una tasa baja de falsos positivos. La anotación taxonómica de contigs se resolvió importando los resultados de BLAST a *MEGAN* (versión 6.24.11). Todos los parámetros de *MEGAN*, incluida la asignación del ancestro común más bajo (LCA), se mantuvieron en valores predeterminados, excepto la opción “Min Percent Identity” (que establece un porcentaje mínimo de identidad

para las alineaciones), que se estableció a un valor de 60 para cada muestra. Un análisis recíproco en *VirusTaxo* (versión 0.2.5) (<https://omics-lab.com/virustaxo>; (Consultado el día 28 de Octubre de 2022)), se utilizó como segundo enfoque para predecir la clasificación taxonómica a nivel de género. *VirusTaxo* asigna una taxonomía de fracción mayor de contigs metagenómicos en comparación con otros métodos de clasificadores taxonómicos existentes. Presenta una precisión promedio del 93% en la predicción de virus de ADN y ARN, realiza una clasificación taxonómica del genoma del virus utilizando clasificación jerárquica multiclase por enriquecimiento k-mer (Raju et al., 2022). El rango de huéspedes de los virus identificados se buscó en NCBI según el nombre de la especie o familia viral, así como también se tomaron en cuenta los datos provenientes de la página web de *ViralZone* (<https://viralzone.expasy.org>; (Consultado el día 30 de Octubre de 2022)).

3.4 Caracterización de la abundancia y diversidad viral

Para determinar la abundancia de virus, primero se filtraron y ordenaron los datos obtenidos anteriormente utilizando el paquete “tidyverse” en *RStudio*, así como el uso de la herramienta *Microsoft Excel*, respectivamente. A continuación, se calculó y visualizó la abundancia relativa de todos los virus a nivel de especie, género y familia para cada una de las muestras utilizando los paquetes “ggplot2” y “reshape” en el entorno *RStudio*, los resultados de los 25 virus principales con la mayor abundancia se conservaron y agruparon por especie de mosquito.

Para cada muestra, la diversidad alfa, que refleja la riqueza observada (número de taxones) o la uniformidad (la abundancia relativa de esos taxones) de una muestra promedio, se estimó utilizando el índice de diversidad de Shannon y Simpson a nivel de género de virus. Se utilizó un modelo lineal generalizado para investigar el efecto de la especie del mosquito, año de recolección, país de recolección de origen y zona climática del país con respecto a la diversidad alfa.

En adición, se calculó la diversidad beta mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en una matriz de disimilitud de Bray- Curtis calculada a nivel de género entre muestras en correlación con la especie del mosquito, año de recolección, país de recolección de origen y zona climática del país. El clima del sitio de muestreo se consultó desde el sitio web “*Weather and Climate*” (<https://tcktcktck.org>; (Consultado el día 4 de Noviembre de 2022)). Todos estos análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete “vegan”, y los gráficos utilizando los paquetes “phyloseq” y “ggplot2” implementados en el entorno *RStudio*.

3.5 Análisis evolutivo de virus de ARN

Las especies virales de ARN expresados en gran abundancia (*Aedes anphevirus*, *Culex orthophasmavirus* y *Chikungunya*), fueron utilizados como virus candidatos para inferir su historia evolutiva. Para ello, las lecturas cortas de ARN se alinearon nuevamente contra la secuencia de referencia codificadora de proteínas estructurales del virus (glicoproteína para *Aedes anphevirus* (MH237595.1); segmento M para *Culex orthophasmavirus* (NC_055213.1); y una

poliproteína para CHKV (MF773560.1)) mediante el uso de la herramienta *Bowtie2* (versión 2.2.6). A partir de los contigs alineados se obtuvieron las secuencias consenso de nucleótidos mediante el programa *UGENE* (versión 45.0). Se realizó un BLASTn a las secuencias de referencia (MH237595.1, NC_055213.1 y MF773560.1) bajo parámetros predeterminados en el software NCBI *Web BLAST+* (versión 2.13.0) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; (Consultado el día 3 de Diciembre de 2022)) y se descargaron todas las secuencias alineadas en formato fasta.

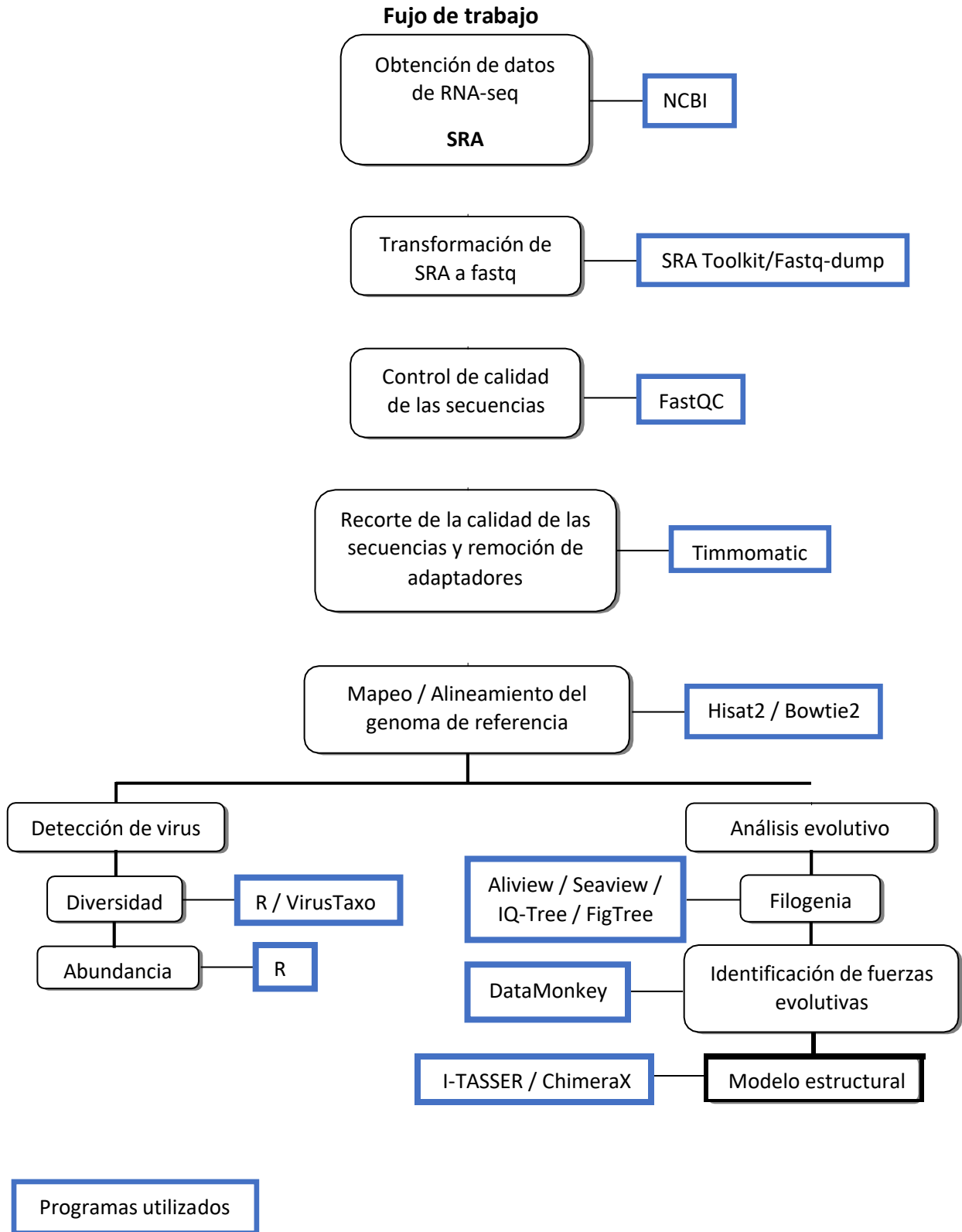
3.5.1 Análisis filogenético

Las secuencias alineadas obtenidas del BLASTn, junto con las secuencias consenso fueron alineadas utilizando la opción MUSCLE desde el programa *SEAVIEW* (versión 5.0.5), mientras que los codones de término fueron removidos por el programa *ALIVIEW* (versión 1.28). Para inferir la relación filogenética de las secuencias alineadas, se produjeron árboles consenso de máxima verosimilitud utilizando *IQ-TREE* (versión 1.6.10) y visualizados desde el programa *FigTree* (versión 1.4.4). Por otro lado, la identificación de sitios mutacionales bajo presión selectiva de las secuencias alineadas se realizó utilizando el método FEL (Fixed EffectsLikelihood) (que utiliza un enfoque de máxima verosimilitud para inferir tasas de sustitución no sinónimas y sinónimas sitio por sitio) en el servidor web *Datamonkey* (<https://www.datamonkey.org>; (Consultado el día 7 de Diciembre de 2022)).

3.5.2 Análisis estructural

Finalmente se creó un modelado de listones y superficie de las proteínas estructurales de los virus analizados. Se utilizó *I-TASSER* (versión 5.1) (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>; (Consultado el día 15 de Diciembre de 2022)), un servidor en línea que implementa algoritmos basados en I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) para generar predicciones de modelos de alta calidad de estructura 3D y función biológica de las moléculas de proteínas a partir de sus secuencias de aminoácidos. Para ello, se utilizó una predicción basada en las proteínas estructurales de superficie (MH237595.1, NC_055213.1 y MF773560.1) y se visualizaron utilizando el programa *ChimeraX* (versión 1.5).

3.6 Diagrama metodológico



CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Distribución global de los datos seleccionados

Para proporcionar una visión más amplia del viroma de *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens*, se realizó un análisis metatranscriptómico a partir de bibliotecas de RNA-Seq de alto rendimiento depositadas en la base de datos NCBI. Se seleccionaron 16 muestras (**Tabla 4**) que provenían de tejidos de colonias de laboratorio, mosquitos capturados de manera silvestre o líneas celulares producidas a partir de ambas especies. Las muestras fueron recolectadas originalmente de distintas ubicaciones geográficas, involucrando a 9 países diferentes distribuidos en los cinco continentes entre el año 2011 al 2019 (**Figura 14A**).

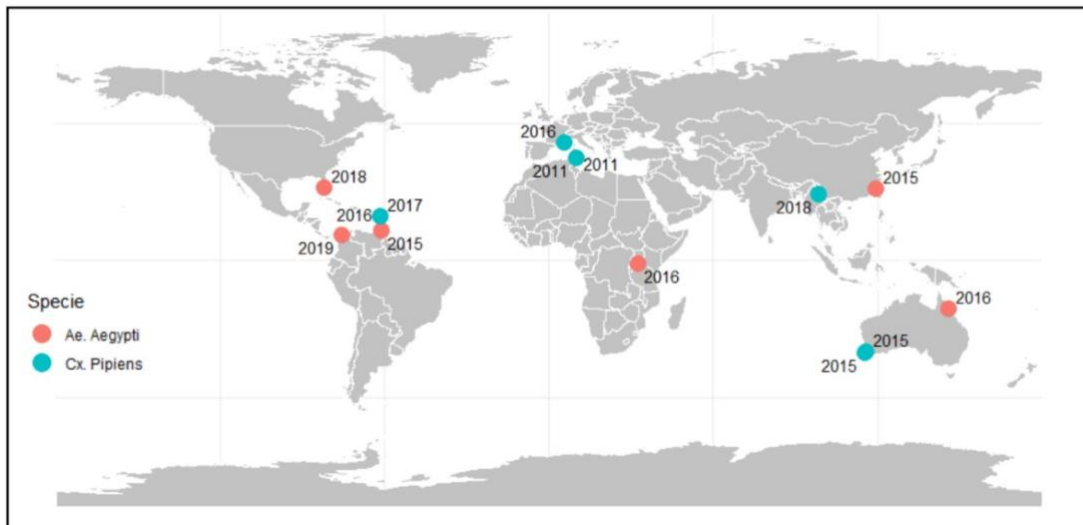
ID	Especie	Recolección de fecha	Mosquitos analizados en este estudio			Coordenadas
			Pool	País		
SRX12322831	<i>Ae. Aegypti</i>	Jul 16 –Aug 6, 2018	28 (Adult female)	Manatee County, Florida, Estados Unidos	27°32'53.4"N 82°33'33.0"W	
SRX15159949	<i>Ae. Aegypti</i>	Jan–Jun, 2019	31 (Mix)	Medellin, Colombia	6°13'55.0"N 75°34'05.0"W	
SRX4229308	<i>Ae. Aegypti</i>	Nov, 2015	5 (Adult female)	Curepe, Trinidad y Tobago	10°38'25.2"N 61°24'28.2"W	
SRX6587189	<i>Ae. Aegypti</i>	2016	15 (Mix)	Wakiso, Uganda	0°23'58.7"N 32°28'47.5"E	
SRX8275142	<i>Ae. Aegypti</i>	2016	1 (Femala)	Innisfail, North Queensland, Australia	17°31'22.0"S 146°01'43.4"E	
SRX8275135	<i>Ae. Aegypti</i>	2016	1 (Femala)	Innisfail, North Queensland, Australia	17°31'22.0"S 146°01'43.4"E	
SRX8275108	<i>Ae. Aegypti</i>	2016	1 (Femala)	Innisfail, North Queensland, Australia	17°31'22.0"S 146°01'43.4"E	
SRX4263277	<i>Ae. Aegypti</i>	2015	5 (Adult female)	Fuzhou, Fujian province, China	26°04'52.2"N 119°18'14.0"E	
SRX5261903	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Aug-Sep, 2016	30 (Adult female)	Les Abymes, Guadalupe	16°16'19.4"N 61°30'22.5"W	
SRX5261892	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	May-Jun, 2017	5 (Adult female)	Petit-Bourg, Guadalupe	16°10'19.7"N 61°39'05.4"W	
SRX10646159	<i>Cx. Pipiens</i>	Apr–Nov, 2016	100 (Adult female)	Cuges-les-Pins, Francia	43°16'38.0"N 5°42'05.0"E	
SRX1457500	<i>Cx. Pipiens</i>	2011	1 (Adult female)	Útica, Túnez	37°00'52.9"N 9°56'46.0"E	
SRX1457498	<i>Cx. Pipiens</i>	2011	1 (Adult female)	Azib, Túnez	37°12'07.5"N 9°57'02.7"E	
SRX13097711	<i>Cx. Pipiens</i>	Jan-Dic, 2018	~50 (Mix)	Xiangyun, China	25°27'08.1"N 100°32'53.8"E	
SRX2901195	<i>Culex australicus</i>	2015	~10 (Adult female)	Siesta Park, Australia	33°39'32.9"S 115°13'41.5"E	
SRX2901194	<i>Culex globocoxitus</i>	2015	~10 (Adult female)	Point Douro, Australia	33°18'21.1"S 115°41'50.6"E	

Tabla 4. Número de acceso de muestras analizadas en este estudio.

En este conjunto de datos, se analizaron un total aproximado de 294 mosquitos (87 pertenecían a la especie *Ae. aegypti*, y 207 a *Cx. pipiens*) distribuidos en dieciséis muestras que fueron agrupadas según la especie del

mosquito (*Ae. aegypti* o *Cx. pipiens*, 8 muestras por cada especie), el género (es decir, hembras o mix (hembras y machos)), el año y sitio de recolección (**Figura 14B**). Para algunos muestreos, en al menos 3 países fueron asignados como réplicas, y 2 países coincidían en el sitio de recolección de datos para ambas especies (**Figura 14B**). Estos grupos formaron la base para comparaciones posteriores de la diversidad y abundancia de viomas de mosquitos.

A)



B)

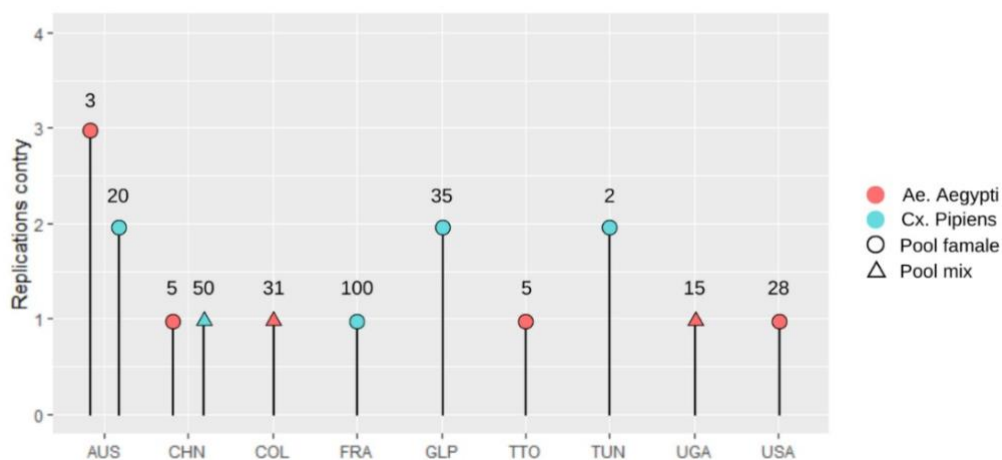


Figura 14. Información de muestreo de datos de RNA-seq. (A) Ubicación y año original de captura de los mosquitos *Ae. aegypti* (rojo) y *Cx. pipiens* (azul). **(B)** Organización de las muestras seleccionadas: cada línea representa una muestra con el total de mosquitos analizados, país de recolección (AUS = Australia, CHN = China, COL = Colombia, FRA = Francia, GLP = Guadalupe, TTO = Trinidad y Tobago, TUN = Túnez, UGA = Uganda y USA = Estados Unidos) y género del mosquito. La altura de la línea representa réplicas de muestreo en ese país. A lo largo de la figura, el color rojo representa *Ae. aegypti* y el azul *Cx. pipiens*. Los círculos denotan pools de mosquitos hembra, mientras que los triángulos denotan pools de machos y hembras.

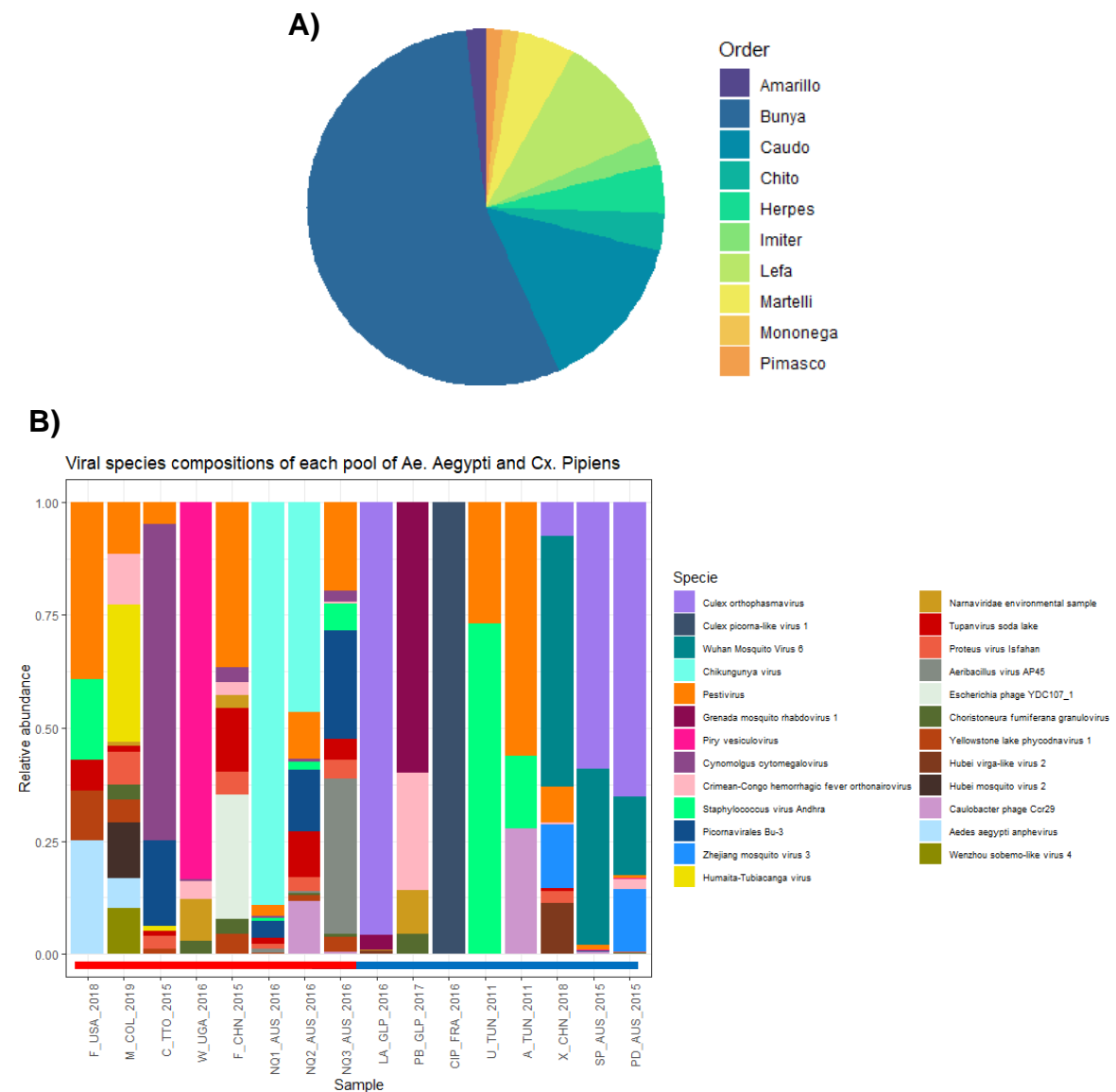
4.2 Descripción general del viroma *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens*

La secuenciación metatranscriptómica de 16 muestras seleccionadas presentaban un promedio de 21,787,977 lecturas (rango 680,542 – 58,798,435) por muestra, estas fueron alineadas y mapeadas en contigs para la identificación de especies virales. Estos datos revelaron una alta diversidad de virus, con un viroma que comprende de 27 supergrupos principales de virus de ARN y 25 de ADN, entre los cuales 10 de ellos tuvieron un mayor impacto de abundancia en la mayoría de las muestras (**Figura 15A**). Aunque el análisis variaba en la cantidad de mosquitos que comprendía la muestra, se documentó un viroma muy diverso y abundante, identificando un total de 112 taxones virales diferentes a nivel de especie. Además, se evaluó la diversidad del viroma a nivel de género,

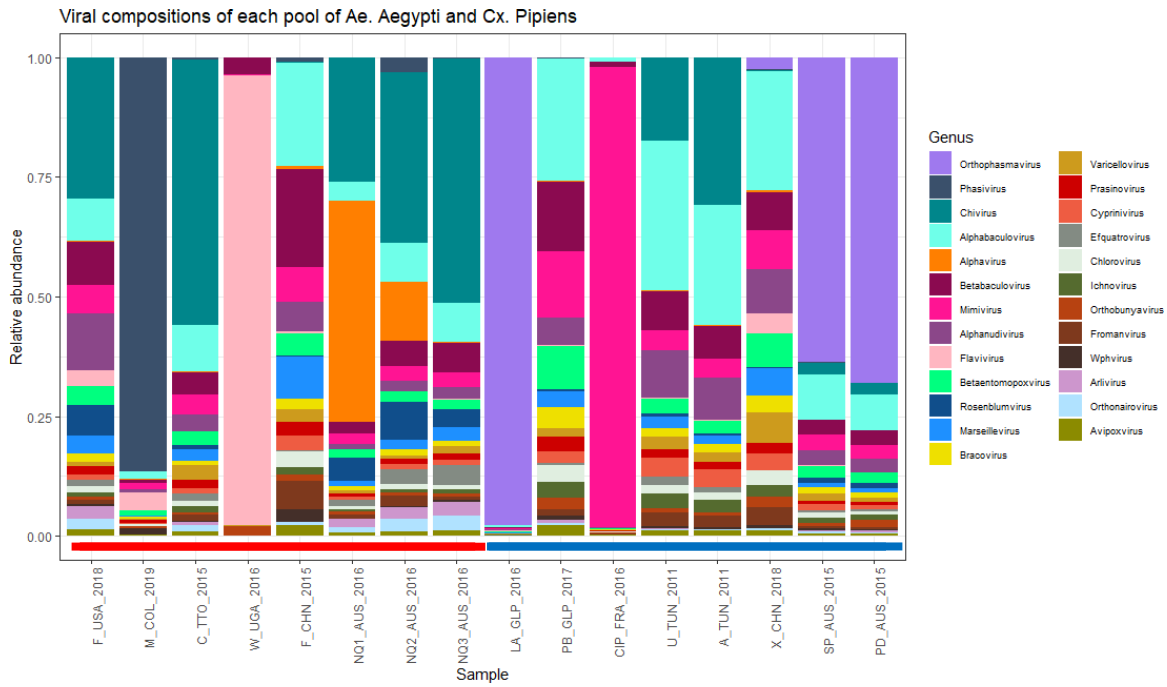
identificando 682 géneros (**Figura 15C**) perteneciente a 132 familias virales diferentes (**Figura 15D**), de los cuales 2 muestras (X_CHN_2018 y SP_AUS_2015) de *Cx. pipiens* presentaban la totalidad de géneros identificados en este estudio. Se tomaron en cuenta los 25 virus más abundantes de cada nivel taxonómico (especie, género y familia) para la comparación del viroma entre las 2 especies de mosquito (**Figura 15B, C y D**).

Es importante destacar que las composiciones de diversidad fueron muy variables según la especie del mosquito y el lugar de recolección. Por ejemplo, *Culex orthopasmavirus*, un ISV para *Culex spp.*, tuvo presencia en 4 muestras de 3 países distintos (Guadalupe, China y Australia) (**Figura 15B**). Al igual que *Aedes anphevirus*, otro ISV para *Aedes spp.*, que fue identificado en 2 muestras recolectadas en Estados Unidos y Colombia (**Figura 15B**). Otros virus fueron identificados en regiones específicas como *Culex picorna-like virus 1* aislado en muestras de *Cx. pipiens* en Francia, y *Hubei mosquito virus 2* para *Ae. aegypti* aislado en Colombia (**Figura 15B**). Por el contrario, el virus *Bovine diarrhea virus 1* perteneciente al género *Pestivirus*, fue identificado en 12 muestras de 6 países distintos incluyendo ambas especies de mosquito (**Figura 15B**). En cuanto al género, *Orthopasmavirus* y *Alphabaculovirus* eran muy abundantes en las muestras de mosquitos *Cx. pipiens*, pero no en muestras de *Ae. aegypti* (**Figura 15C**). Del mismo modo, el género *Flavivirus* solo apareció en muestras de *Ae. aegypti* recolectadas en Estados Unidos, Colombia, Trinidad y Tobago, y en gran abundancia en el país de Uganda (**Figura 15C**). Dentro de las 25 familias virales

más abundantes, solo había 3 géneros virales clasificados como virus transmitidos por mosquitos, y se distribuyeron principalmente en las familias *Togaviridae*, *Flaviridae* y *Peribunyaviridae* (**Figura 15D**). Mientras que *Phenuiviridae*, *Flaviridae* y *Peribunyaviridae* contenían géneros de virus específicos de mosquitos (**Figura 15D**). Aunque de todos los virus asociados a mosquitos conocidos, la mayoría de ellos aún no se han caracterizado y no se han aislado o identificado.



C)



D)

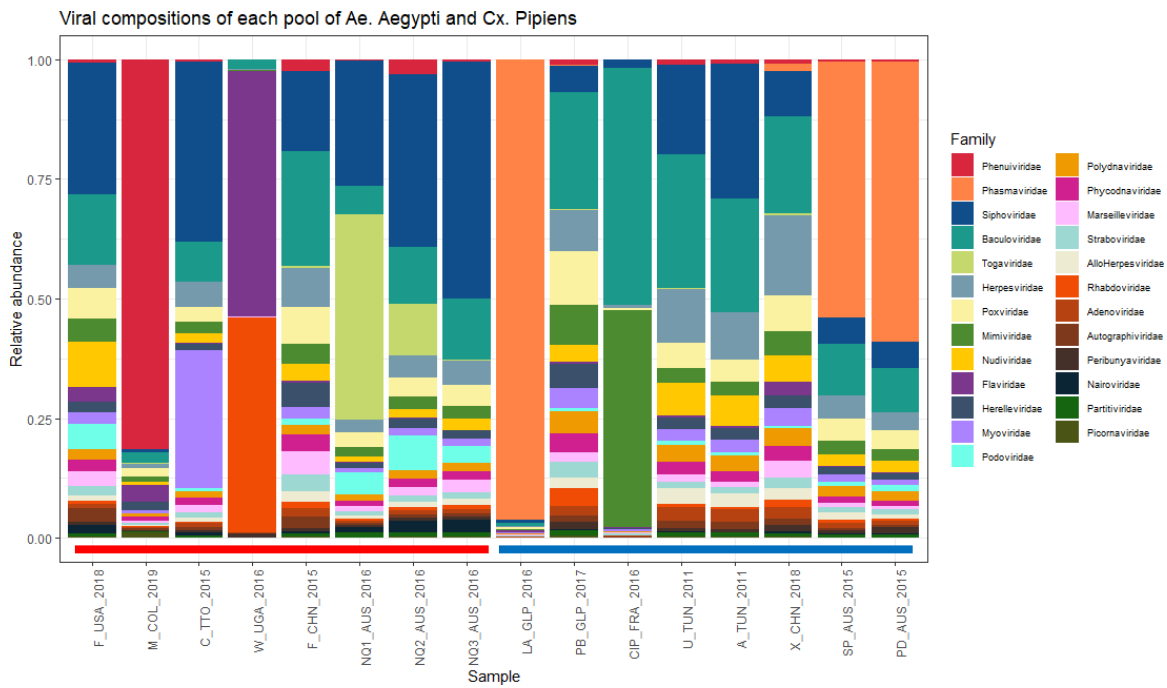


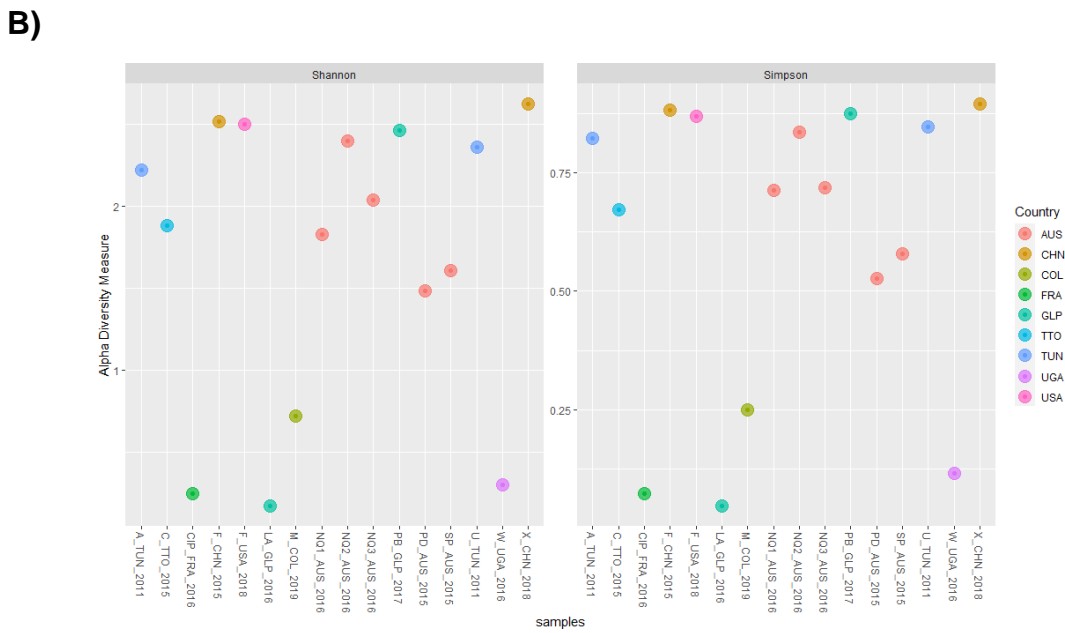
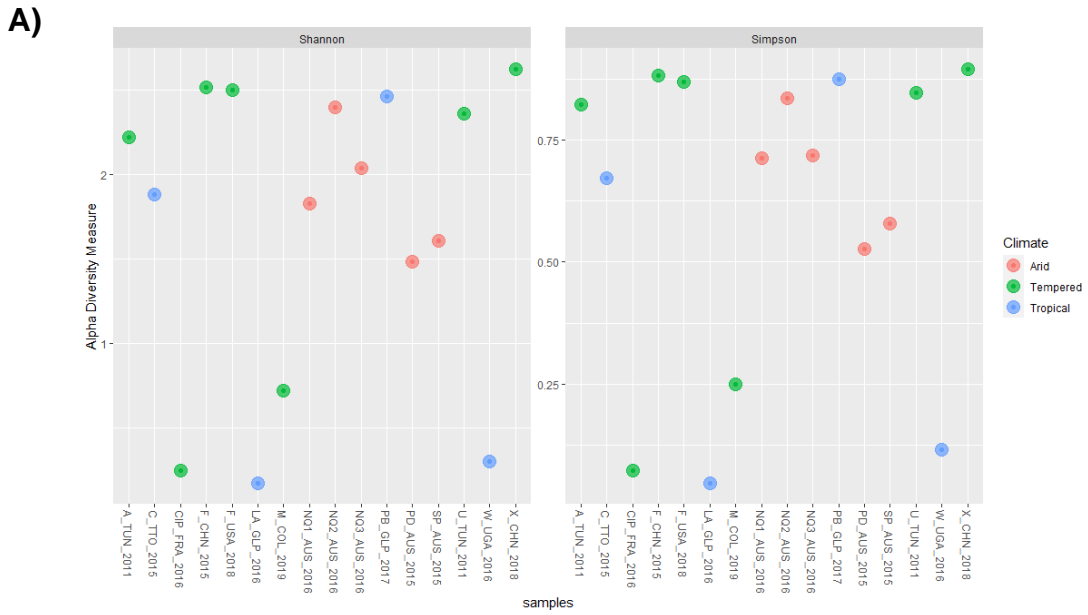
Figura 15. Descripción general del viroma de *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens* analizados en este estudio. (A) Proporción viral más abundante a nivel de orden. **(B)** Abundancia relativa de los 25 virus más abundantes de cada muestra a nivel taxonómico de especie. **(C)** Abundancia relativa de los 25 virus más abundantes de cada muestra a nivel taxonómico de género. **(D)** Abundancia relativa de los 25 virus más abundantes de cada muestra a nivel taxonómico de familia. La información de cada pool, como el lugar y año de recolección, se muestra en la parte inferior de cada barra, así como también la especie del mosquito al que pertenece (agrupados por la barra roja para *Ae. aegypti* y azul para *Cx. pipiens*). En el eje de la Y se muestra la abundancia relativa para cada análisis.

4.3 Diversidad del viroma por especie huésped, sitio de recolección y clima

A partir de la abundancia relativa y los metadatos obtenidos de cada muestra, primero se comparó la diversidad alfa utilizando el índice de diversidad de Shannon y Simpson a nivel de género entre especies de mosquitos (*Ae. aegypti* y *Cx. pipiens*), lugar de recolección (USA, COL, TTO, UGA, CHN, AUS, GLP, FRA y TUN) y zona climática del sitio de recolección (árido, tropical y templado). En general, la mayoría de las muestras presentaron un índice de diversidad alfa regular (si consideramos valores inferiores a 2 como diversidad baja y valores superiores a 3 como altas en el índice de Shannon; y valores cercanos a 1 como diversidad alta en el índice de Simpson).

Con respecto a las comparaciones entre zona climática del sitio de recolección de la muestra, la zona templada reveló una diversidad ligeramente mayor, en comparación con la zona árida y tropical (**Figura 16A**). Esta zona incluyó a 3 países distintos (Estados Unidos, Túnez y China), a diferencia de la zona tropical y árida, que solo incluyeron a uno, Guadalupe y Australia, respectivamente (**Figura 16B**). La muestra recolectada en Uganda (W_UGA_2016) y Colombia (M_COL_2019) pertenecientes a la especie *Ae. aegypti*, presentaron un nivel bajo de diversidad al igual que la muestra CIP_FRA_2016 (recolectada en Francia) de *Cx. pipiens*, siendo el pool con mayor presencia de mosquitos (100 mosquitos hembra adultos) utilizados para el análisis transcriptómico. En el caso de la muestra LA_GLP_2016 y PB_GLP_2017, ambas pertenecientes a la especie *Cx. pipiens*, presentaron un índice de diversidad alfa significativamente diferente a pesar de ser recolectadas en el mismo país pero en diferente año (2016 y 2017). Las muestras recolectadas en el mismo país que incluyen ambas especies de mosquito, como F_CHN_2015 y X_CHN_2018 recolectadas en China, mostraron resultados similares con un alto índice de diversidad, al igual que las muestras recolectadas en Australia (NQ1_AUS_2016, NQ2_AUS_2016, NQ3_AUS_2016, PD_AUS_2015 y SP_AUS_2015). No se encontraron diferencias significativas de diversidad alfa entre las comparaciones de *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens*, ambas especies de mosquito muestran un viroma muy diverso y abundante. *Cx. pipiens* presentó muestras con un nivel de diversidad más alto que *Ae. aegypti*, sin embargo, hubo mayor presencia de

muestras de *Ae. aegypti* con un valor superior a 1.75 en el índice de diversidad Shannon o 0.625 al índice de diversidad Simpson.



C)

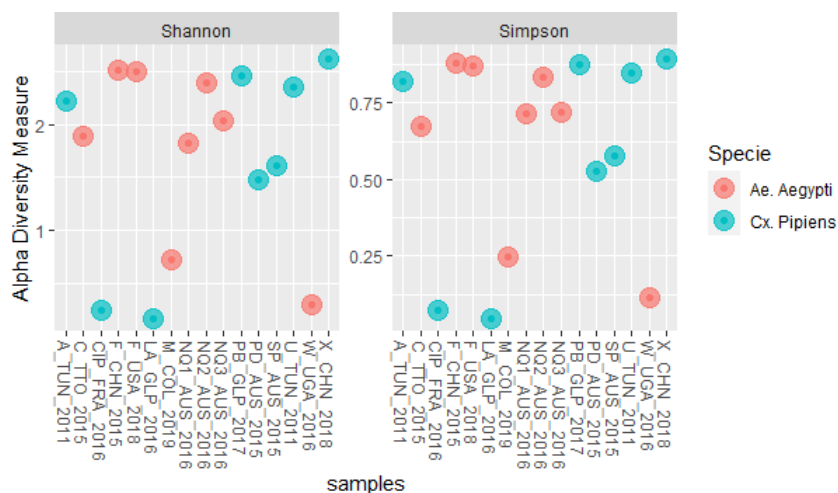


Figura 16. Comparaciones de la diversidad alfa entre especie huésped, sitio y clima entre muestras. Se realizó un análisis de diversidad alfa con el índice de Shannon y Simpson entre la zona climática del sitio de recolección **(A)**, lugar de recolección **(B)** y especie de mosquito **(C)**. Los colores corresponden a los diferentes metadatos ecológicos analizados.

Luego realizamos una escala multidimensional para examinar el efecto de la especie de mosquito, sitio de recolección y clima en relación con la composición del viroma de los mosquitos, esto mediante un análisis de coordenadas principales. Al relacionar las muestras por zona climática del sitio de recolección, los resultados mostraron una ligera agrupación por clima (**Figura 17A**), en el que la zona templada y la tropical presentaron una mayor relación a diferencia de la zona árida (**Figura 17A**). Esto sugirió que el viroma de los mosquitos podría estar relacionado con el sitio de recolección de la muestra. Posteriormente se analizó la

relación por el sitio de recolección de la muestra, en el que mostró agrupaciones para algunos países como Estados Unidos, Trinidad y Tobago, Túnez, Guadalupe y China. Otros países como Colombia, Uganda y Francia estuvieron más aislados en comparación con los demás países (**Figura 17B**). Sorprendentemente, se observaron muestras pertenecientes al mismo país de recolección pero no mostraron relación alguna. Adicionalmente se empleó el método de doble análisis de coordenadas principales o (DPCoA), que fue apropiado para analizar conjuntamente dos tipos de datos, en este caso analizamos el sitio de recolección de la muestra y especie del mosquito (**Figura 17C**). Con este método podemos observar que la composición del viroma del mosquito se inclina más hacia la especie del mosquito, si observamos las muestras recolectadas en China y Australia (estas muestras incluyen ambas especies de mosquito), podemos observar el agrupamiento entre muestra de la misma especie de mosquito, pero no hay una relación entre ambas especies (**Figura 17C**).

Aunque los datos seleccionados para este estudio no proporcionan una idea concreta debido a la limitación de datos, los resultados inducen a que el viroma de los mosquitos de la especie *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens* presentan una alta diversidad y abundancia viral, que se encuentra estructurada principalmente por especie de mosquito y menos por el lugar de recolección, sin embargo también se observó una cierta estructuración por zona climática, lo que se debe esperar por las condiciones de hábitat del mosquito.

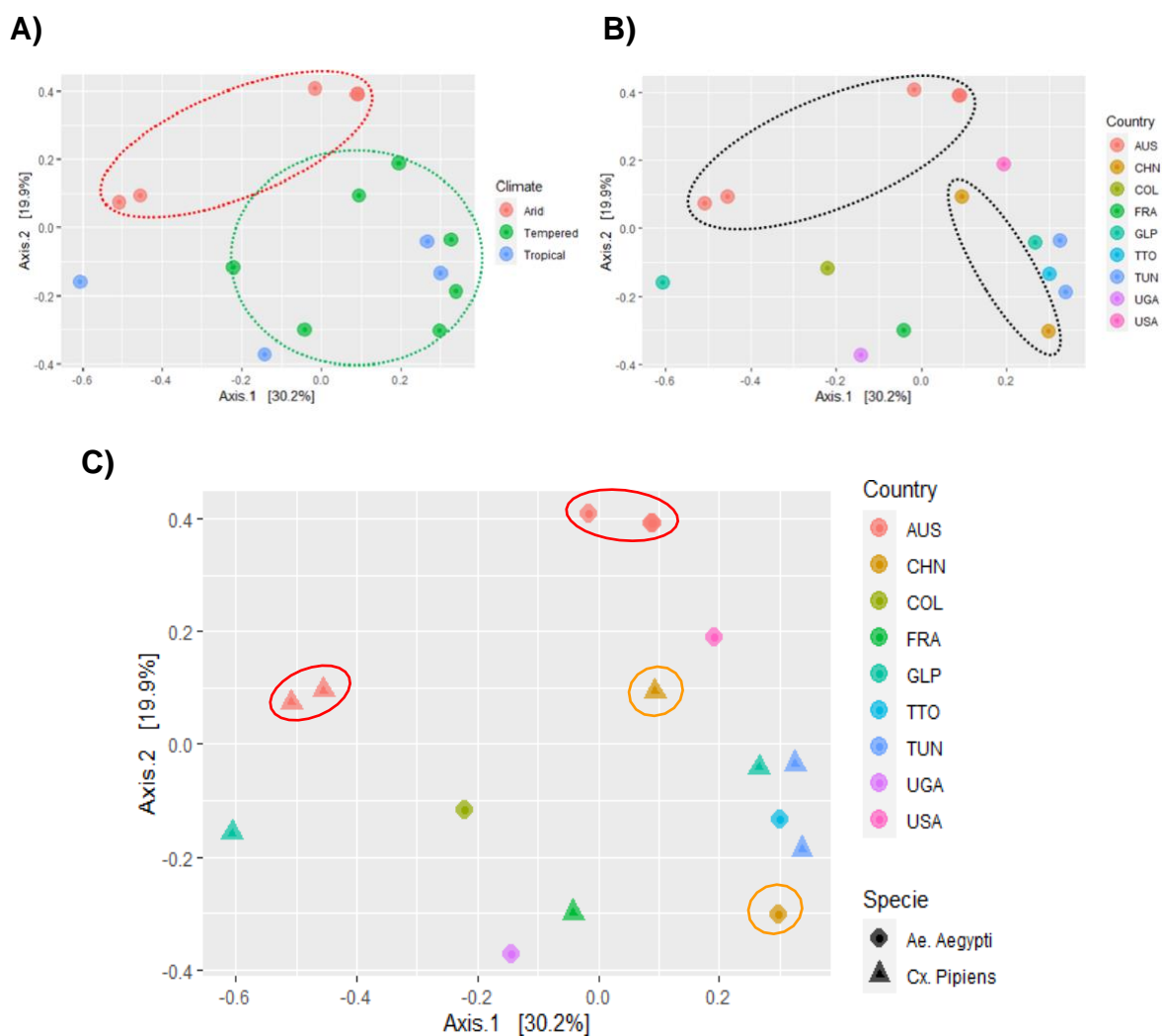


Figura 17. Efecto de la especie del mosquito, sitio de recolección y clima en la composición del viroma del mosquito. Análisis de coordenadas principales (PCoA) sobre el efecto de la zona climática **(A)** y sitio de recolección de la muestra **(B)**. **(C)** DPCoA para medir el efecto del lugar de recolección de la muestra y especie del mosquito. Diagramas de escala multidimensional (aplicando la matriz de distancia euclidiana) donde los colores reflejan diferentes grupos ecológicos.

4.4 Evolución y filogenia de virus de ARN asociados a mosquitos

Los virus, al tener genomas típicamente pequeños y en gran parte codificantes, experimentan fuerzas selectivas altas. Principalmente los virus de ARN carecen de mecanismo de corrección (a diferencia de los virus de ADN), lo que resulta en una mayor plasticidad y mayores tasas de mutación. Muchas de estas adaptaciones virales involucran cambios en la superficie exterior del virus. Aquí, realizamos un análisis estructural y genómico de proteínas estructurales de superficie para comprender la evolución de tres virus de ARN.

4.4.1 Filogenia de *Aedes anphevirus* (AeAV), *Culex phasma-like virus* (CPLV) y *Chikungunya* (CHIKV)

Tomando en cuenta la abundancia y diversidad viral obtenida de cada una de las muestras, como primera parte se realizó un análisis filogenético de los siguientes virus: I) *Aedes anphevirus* (AeAV), un ISV (virus de ARN de sentido negativo del orden *Mononegavirales*) distribuido en todo el mundo en mosquitos *Ae. aegypti*. Este virus presentó una alta abundancia en muestras de *Ae. aegypti* recolectadas en Estados Unidos y Colombia (**Figura 15B**); II) *Culex orthophasmavirus* similar a *Culex phasma-like virus* (CPLV), presente en 3 muestras con mayor abundancia recolectados en 2 países diferentes (Guadalupé y Australia) (**Figura 15B**); y III) El virus *Chikungunya* (CHIKV), un arbovirus del género *Alphavirus* altamente abundante en muestras de *Ae. aegypti* recolectadas en Australia (**Figura 15B**). Se utilizaron secuencias codificantes de proteínas

estructurales de AeAV (Glicoproteína; MH237595.1), CPLV (Segmento M; NC_055213.1) y CHIKV (Poliproteína; MF773560.1) como genomas de referencia para el alineamiento de contigs y comparaciones filogenéticas. Los árboles filogenéticos se construyeron a partir de secuencias consenso de cada componente viral obtenidas a partir de los contigs alineados en cada muestra, y secuencias obtenidas previamente de un análisis BLASTn de cada genoma de referencia (MH237595.1, NC_055213.1 y MF773560.1).

Para la filogenia de AeAV, se identificó el alineamiento de la secuencia codificante completa de la glicoproteína de AeAV (MH237595.1) en la muestra M_COL_2019 de *Ae. aegypti*, con un porcentaje de alineamiento de lecturas del 0.03% (17640 / 58798435). La secuencia consenso resultante fue de una longitud de 1,941 nt. Se descargaron alrededor de 30 secuencias alineadas en formato fasta del resultado del análisis BLASTn de la secuencia codificante de la glicoproteína de AeAV, con un porcentaje de identidad variando del 98.15% al 99.23%. El resultado del árbol filogenético agrupó la secuencia de la proteína de AeAV obtenida en este estudio (RSX15159949, visualizada de color rojo, **Figura 18**) en un clado de AeAV recolectados en Colombia y Estados Unidos entre el 2017 y 2019. Las similitudes de nucleótidos entre los genomas de los AeAV fueron muy altas, variando del 96% al 99%. Se observó que las variantes de la proteína de AeAV se agrupaban muy estrechamente por zonas geográficas (Color rojo, azul y amarillo, **Figura 18**), aunque algunas variantes se encuentran incluidas dentro de una zona a pesar de no estar cerca de mismo continente como por

ejemplo los AeAV recolectados en Australia y Polinesia Francesa (MH237595.1 y MH430649.1, respectivamente), lo que indica posible expansión migratoria por parte del mosquito vector. Además se identificaron variantes de AeAV aisladas del *Ae. albopictus* (MH430663.1 y MH037149.1, visualizadas de color azul, **Figura 18**), otro importante mosquito vector perteneciente al género *Aedes*, implicado en la transmisión de arbovirus.

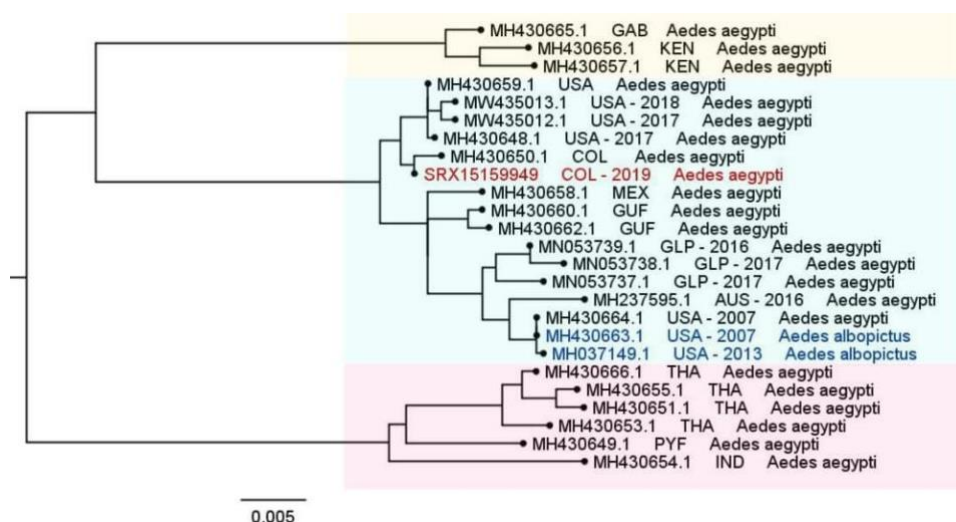


Figura 18. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el nivel de nucleótidos de la región codificante completa de la glicoproteína del virus *Aedes anphevirus* (AeAV). La información de las variantes de AeAV muestran el siguiente orden: Número de acceso de GenBank; lugar y año de recolección; hospedero. La secuencia identificada en este estudio se visualiza en color rojo. Los AeAV aislados del mosquito *Ae. albopictus* se visualizan de color azul. El color de los cuadros representa la agrupación por continente (Rojo: Asia, Azul: América y Amarillo: África)

Para la región codificante completa del segmento M de CPLV (NC_055213.1), esta presentó alineamiento en 3 muestras de *Cx. pipiens* recolectadas en Guadalupe (LA_GLP_2016) y Australia (SP_AUS_2015 y PD_AUS_2015) con un porcentaje de lecturas alineadas del 32.33% (680717 / 2105526), 1.12% (237305 / 21187981) y 1.58% (329981 / 20884830), respectivamente. El resultado de las tres secuencias consenso presentaron un tamaño de longitud de 1,941 nt, y se obtuvieron 9 secuencias alineadas del análisis BLASTn de la secuencia completa codificante del segmento M de CPLV con un porcentaje de alineamiento mayor al 99.15%. Las secuencias consenso identificadas en muestras recolectadas en Australia (SRX2901194 y SRX2901195, visualizadas de color rojo, **Figura 19**) se agruparon junto con los virus aislados de mosquitos *Cx. australicus* y *Cx. globocoxitus*, estos mosquitos pertenecen al complejo *Cx. pipiens* predominando sobre todo en el país de Australia, justo como se observa las variantes agrupadas en ese país (Cuadro color rojo, **Figura 19**). Estos virus forman un clado junto con el virus aislado del mosquito *Cx. pipiens* recolectado en Egipto (Cuadro Azul) con un porcentaje de identidad de 99.53%. Por otro lado, la secuencia consenso obtenida a partir de la muestra recolectada de Guadalupe (SRX5261903, visualizada de color rojo, cuadro amarillo), su relación filogenética más cercana se identificó en mosquitos *Cx. australicus* recolectados en Australia en 2015. Del mismo modo, el genoma de CPLV recolectado de Colombia en mosquitos *Cx. pipiens* (Cuadro morado) se distanció filogenéticamente presentando un alto porcentaje de identidad del 98.78% (**Figura 19**).

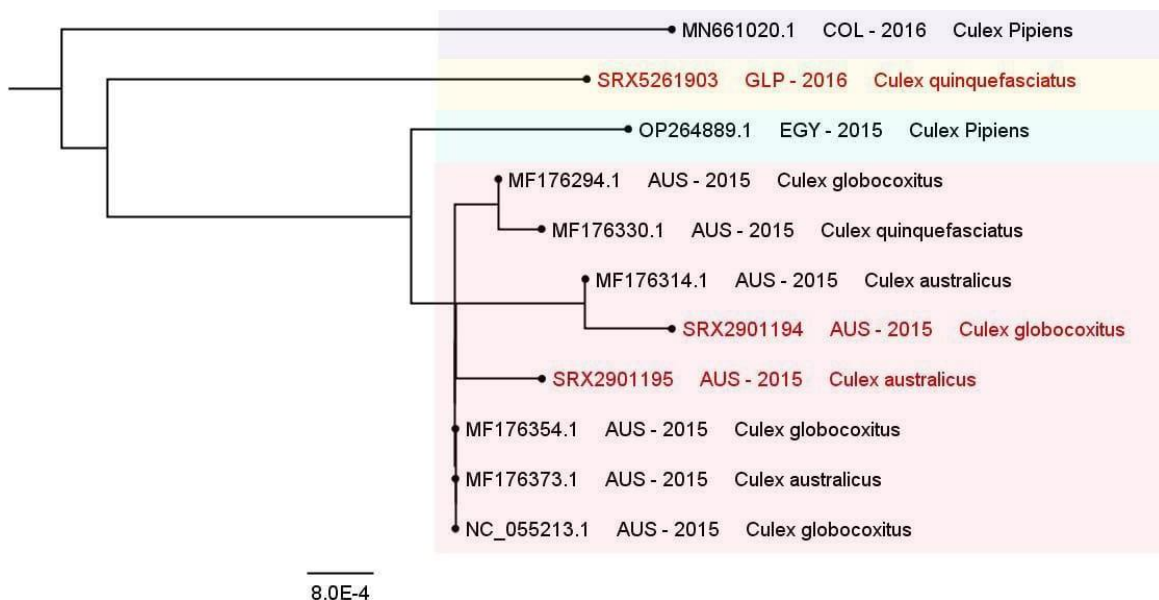


Figura 19. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el nivel de nucleótidos de la región codificante completa del segmento M de *Culex phasma-like virus* (CPLV). La información de las variantes de CPLV muestran el siguiente orden: Número de acceso de GenBank; lugar y año de recolección; hospedero. La secuencia identificada en este estudio se visualiza en color rojo. El color de los cuadros representa la agrupación de los diferentes CPLV.

Por último la secuencia codificante completa de la poliproteína estructural de CHIKV (MF773560.1) tuvo alineamiento en la muestra NQ1_AUS_2016 con un 0.44% (135895 / 30885126) de lecturas alineadas y 0.31% (95756 / 30888781) de lecturas alineadas en la muestra NQ2_AUS_2016, ambas pertenecientes a la especie de *Ae. aegypti*. Se obtuvieron 2 secuencias consenso de 3,744 y 3,742 nt de longitud, y alrededor de 100 secuencias alineadas y descargadas del análisis BLASTn de la poliproteína de CHIKV para la construcción del árbol filogenético. El

análisis reveló que todos los CHIKV recolectados en ubicaciones geográficas distantes y en diferentes años, se agruparon muy estrechamente, lo que indica que el CHIKV se encuentra ampliamente distribuido (**Figura 20**). En la figura podemos observar como las dos muestras recolectadas de mosquitos *Ae. aegypti* en Australia (cuadro rojo, **Figura 20**) analizadas en este estudio, se distancian filogenéticamente de las demás (cuadro azul, **Figura 20**) a pesar de mantener un alto porcentaje de identidad con las secuencias obtenidas del BLASTn. Esto sugiere que son secuencias de la proteína de envoltura diferentes, que han evolucionado acumulando un mayor número de cambios con respecto a las otras secuencias y por lo tanto no logran agruparse.

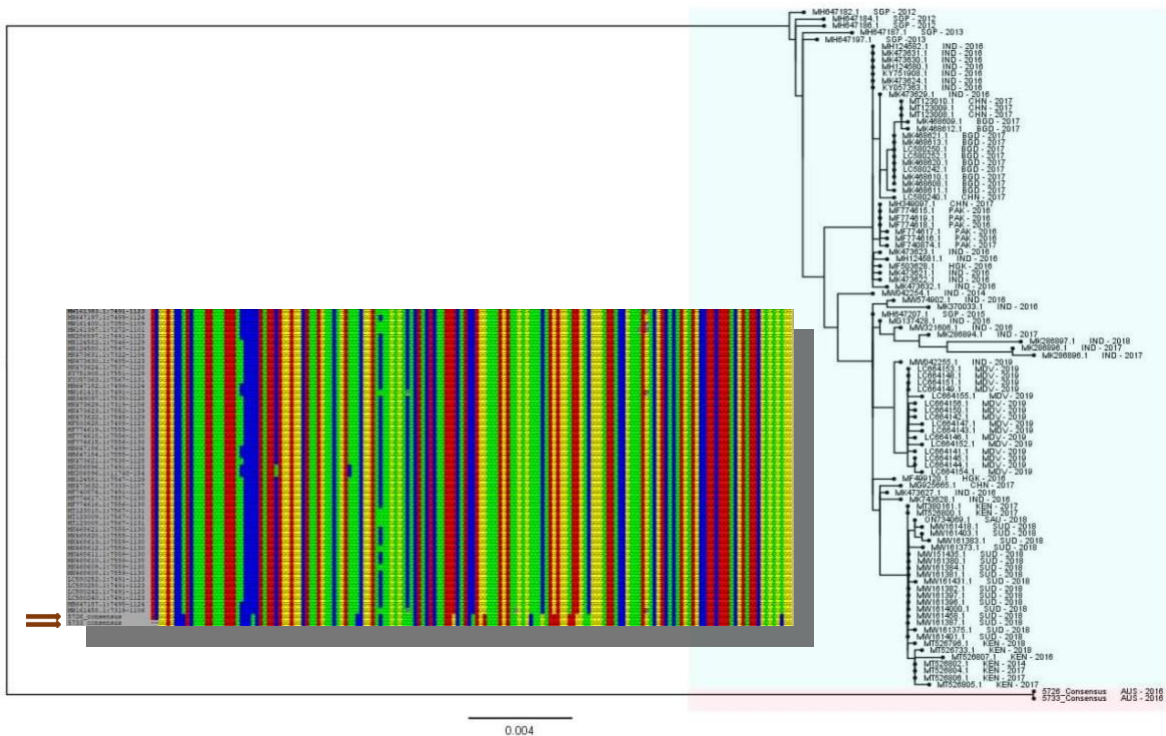


Figura 20. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el nivel de nucleótidos de la región codificante de la poliproteína de *Chikungunya* (CHIKV). La información de las variantes de CHIKV muestran el siguiente orden: Número de acceso de GenBank; lugar y año de recolección. Las secuencias identificadas en este estudio se visualizan en el cuadro rojo. El color de los cuadros representa la agrupación de los diferentes CHIKV. En adición se muestra el alineamiento bajo la opción MUSCLE de las secuencias de aminoácidos de la poliproteína de CHIKV.

4.4.2 Evolución neutral en virus AeAV, CPLV y CHKV

La teoría neutralista de la evolución molecular establece que la mayor parte de los cambios evolutivos a nivel molecular son causados por la deriva genética de mutantes neutros en cuanto a la selección natural. Aquí se aplicó una prueba de neutralidad de aminoácidos sobre las proteínas estructurales de AeAV, CPLV y CHIKV analizadas en este estudio, para ajustarse mejor a un modelo de evolución que explique las preferencias de aminoácidos que se han seleccionado para una mayor afinidad de unión al receptor del huésped. Además, se demostró mediante un modelo estructural las diferentes presiones selectivas ejercidas sobre las distintas variantes del virus.

Para la identificación de sitios mutacionales bajo presión selectiva, se utilizó la herramienta DataMonkey empleando el método FEL sobre las secuencias

analizadas en este estudio. En general, el resultado mostró un porcentaje bajo en la presión natural tanto positiva, como negativa en la evolución de las proteínas estructurales de AeAV, CPLV y CHIKV. Para el CHIKV, solo se obtuvo un solo sitio (codón) bajo selección natural positiva, a diferencia de las proteínas de AeAV y CPLV que no mostraron ningún sitio bajo esta presión. De las 24 secuencias analizadas para la poliproteína de AeAV, 111 de los 647 codones alineados presentaron una evolución bajo presión natural negativa o purificadora, con un porcentaje del 17.15% (**Tabla 5**), mientras que para las proteínas de CPLV y CHIKV, estas mostraron un porcentaje más bajo de codones alineados cerca del 2.48% (16 / 643 codones) y 6.57% (82 / 1248), respectivamente (**Tabla 5**). Sin embargo, los tres virus presentaron en mayor proporción que los procesos evolutivos de selección natural (**Tabla 5**), alineamientos bajo evolución neutral, esto quiere decir que las mutaciones en las secuencias de ácidos nucleicos son aleatorias, y éstas pueden ser fijadas por deriva genética y/o selección natural.

Proceso evolutivo	AeAV		CPLV		CHIKV	
	24 secuencias alineadas	647 codones	9 secuencias alineadas	643 codones	78 secuencias alineadas	1248 codones
	Codones alineados	%	Codones alineados	%	Codones alineados	%
S. Positiva	0	0%	0	0%	1	0.08%
S. Negativa	111	17.15%	16	2.48%	82	6.57%
Neutral	155	23.95%	24	3.73%	252	20.19%
Invariable	381	58.88%	603	93.77%	913	73.15%

Tabla 5. Evolución de la proteína estructural de AeAV, CPLV y CHIKV basado en el método de FEL (estableciendo un valor de umbral de $P \leq 0.1$)

Se realizó un modelo estructural de las proteínas para cada uno de los virus analizados, mapeando los sitios bajo evolución neutral basado en el método de FEL (valor de umbral de $P \leq 0.1$). Para el AeAV se utilizó una predicción basada en la glicoproteína de AeAV (MH237595.1) (**Figura 21**). La **figura 21A** muestra los sitios que caen bajo evolución neutral en un modelo estructural de listones. Se puede observar que la distribución de los sitios a lo largo de la secuencia de aminoácidos es uniforme, sin embargo presenta 2 regiones de 6 y 4 sitios consecutivos bajo evolución neutral (**Figura 21B**), en la posición del codón 5 y 284. Los sitios bajo presión natural negativa, del mismo se encontraron dispersos uniformemente a lo largo de la secuencia.

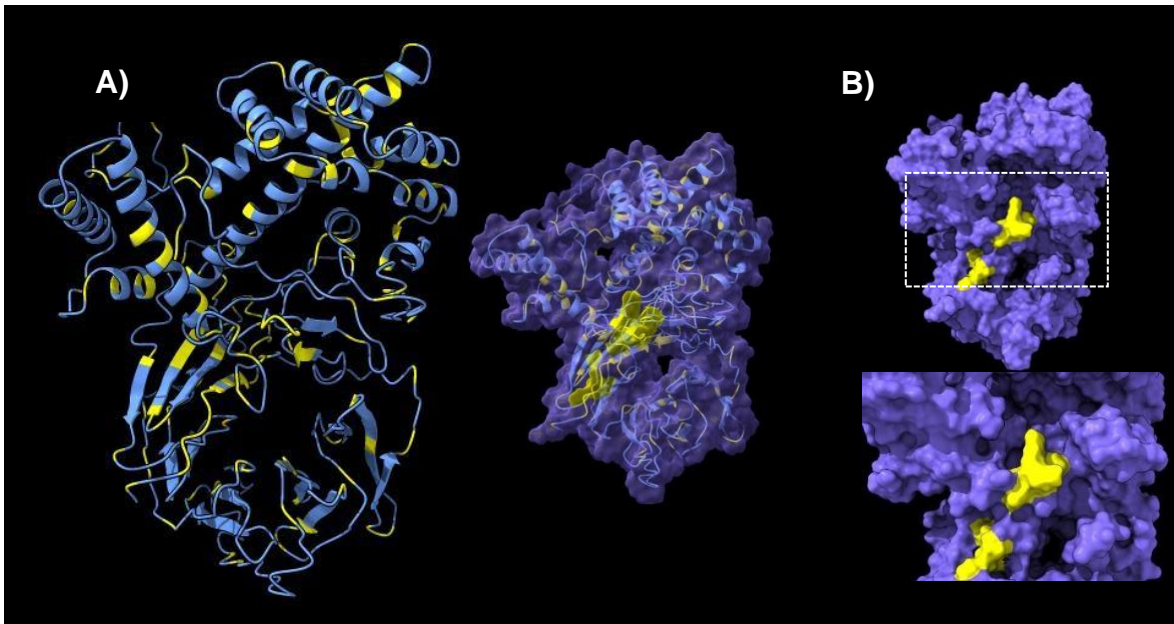


Figura 21. Estructura 3D de la glicoproteína de AeAV. (A) Estructura de listones. Muestra la posición de los codones bajo evolución neutral (color amarillo). **(B)** Estructura de superficie. Muestra las posiciones de codones consecutivos bajo evolución neutral en color amarillo.

Para el modelo estructural de la proteína del CPLV, se creó basado en la secuencia del segmento M codificante de la proteína estructural de CPLV (MF176243.1). Al igual que la glicoproteína de AeAV, esta presentó una distribución de codones bajo evolución neutra uniformemente, sin embargo la distancia entre los codones bajo este proceso evolutivo se encuentra más distante (**Figura 22A**). Solo se identificó una región con 2 sitios consecutivos bajo evolución neutral en la posición 197-198 (**Figura 22B**). Esta proteína en gran parte mostró mayor conservación a lo largo de toda la secuencia. Los codones que se encontraban bajo presión natural purificadora fueron muy escasos y distribuidos distantes uno del otro a lo largo de la secuencia.

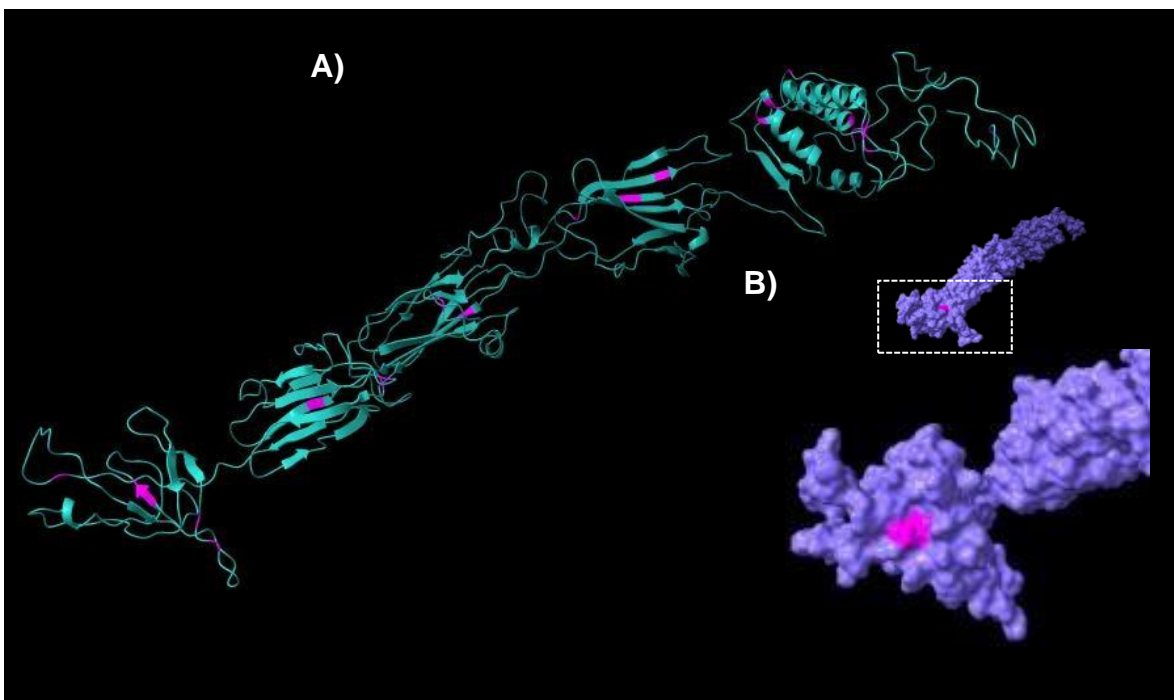


Figura 22. Estructura 3D de la proteína estructural de CPLV. (A) Estructura de listones. Muestra la posición de los codones bajo evolución neutral (color rosa). **(B)** Estructura de superficie. Muestra las posiciones de codones consecutivos bajo evolución neutral en color rosa.

Por último, el modelo estructural de CHIKV se creó basado en la poliproteína estructural de CHIKV (MT526807.1). En este análisis se identificó 1 codón en la posición 311 bajo presión natural positiva (**Figura 23C**), 82 codones bajo presión natural purificadora y 252 codones con evolución neutra distribuidos a lo largo de la secuencia de la poliproteína (**Figura 23A**). Esta poliproteína de CHIKV presentó múltiples regiones con sitios de evolución neutra consecutivamente, alguna de ellas se muestra en la **Figura 23B**, la región con mayor presencia de sitios bajo evolución neutra se encuentra en la posición 61, 78, 641 y 1142.

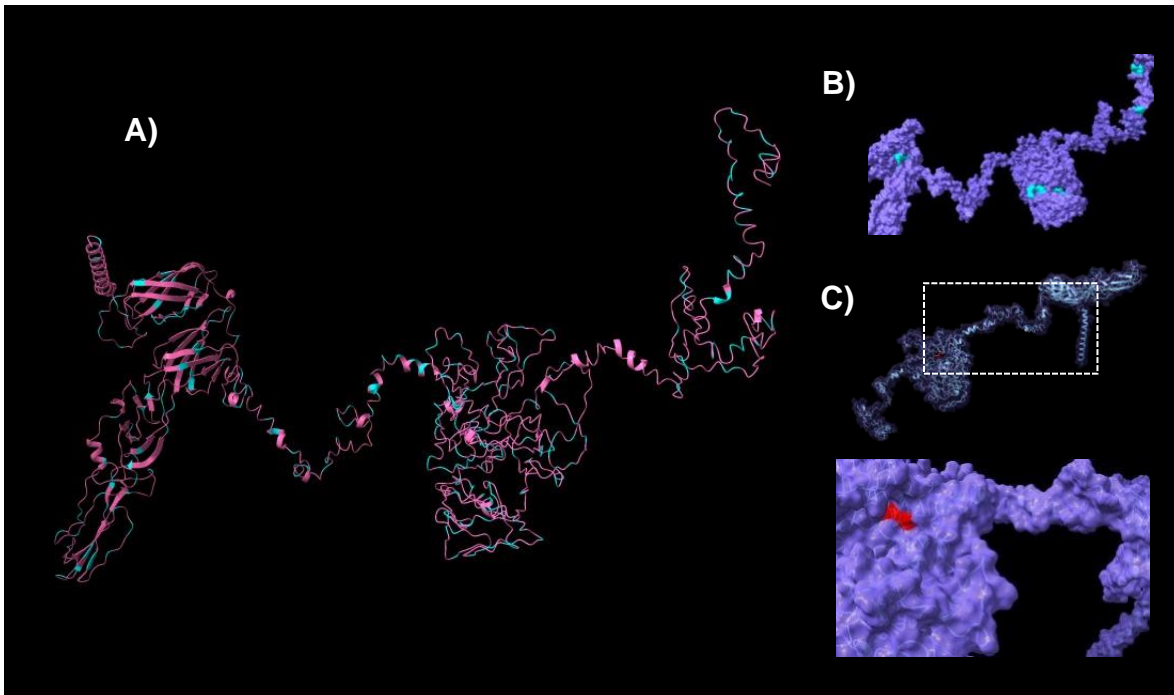


Figura 23. Estructura 3D de la poliproteína de CHIKV. (A) Estructura de listones. Muestra la posición de los codones bajo evolución neutral (color azul). **(B)**Estructura de superficie. Muestra las posiciones de codones consecutivos bajo evolución neutral en color azul. **(C)** Posición del codón bajo selección natural positiva (color rojo).

Estos resultados indican que en la mayor parte de las proteínas de estos virus se han mantenido estables o conservadas, en su mayoría no se encuentran sobre una presión de selección natural o caen bajo un proceso evolutivo neutro, aunque se encuentran en proporción baja sobre presión natural negativa. Estas mutaciones bajo presiones selectivas negativas podrían mantenerse debido a que son ventajosas para el virus al contribuir a la estabilidad de la proteína o aumentar la afinidad por su receptor.

Por otra parte, debemos retomar que a lo largo del genoma se encontraban distribuidos los codones que presentaban un proceso evolución neutro, en algunos estos se agrupaban en regiones específicas que podía observarse en la estructura de la proteína, esto podría indicar la interacción con el huésped o algún otro factor involucrado, un estudio enfocado en la región específica de interacción con el receptor huésped podría ampliar el conocimiento de estos procesos evolutivos.

En general, el resultado del análisis bajo el método de FEL, mostró un porcentaje muy bajo en la presión natural tanto positiva, como negativa sobre las proteínas de envoltura de AeAV, CPLV y CHIKV. Sin embargo, la mayoría de los

sitios que son variables caen bajo un proceso evolutivo neutral. Comparando las secuencias a nivel de aminoácidos, estas presentaron muchos cambios no sinónimos en las secuencias, por lo que se esperaría observar una evolución bajo selección natural positiva, sin embargo los resultados indican que están evolucionando bajo neutralidad, por lo tanto los cambios que se observan en las secuencias de los aminoácidos probablemente se deban a la deriva genética. La estructura de las proteínas se encuentra relativamente conservadas a pesar de los sitios variables observados, lo que parece indicar limitaciones en la variabilidad de las secuencias. Este análisis nos permite entender cómo es que las proteínas virales que interactúan con el receptor huésped están sometidas a presiones selectivas, que no son necesariamente las mismas para todos los virus o para el mismo genoma del virus. Las diferentes proteínas virales están influenciadas por distintos factores que modifican la probabilidad de aparición de sus propios aminoácidos.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Este estudio contribuye al conocimiento de la diversidad del viroma de los mosquitos vectores *Aedes aegypti* y *Culex pipiens*, así como el estudio evolutivo de los virus que predominaron en estos mosquitos a partir de datos de acceso público que utilizan secuenciación de ARN. En conjunto, los datos revelaron:

- I. Existe una alta diversidad de virus para ambas especies en los distintos sitios de recolección. A pesar de presentar un viroma muy diverso, esta parecía estar estrechamente relacionada con la especie del mosquito y zona climática, pero no diferencias sustanciales por el sitio de recolección. En particular, en el lugar donde ambas especies de mosquito fueron recolectadas, como China y Australia, el viroma mostró una fuerte estructura hacia el huésped entre los mosquitos muestreados.
- II. Los virus de ARN fueron los más abundantes, en especial, el virus *Aedes anphevirus* (AeAV), *Culex phasma-like virus* (CPLV) y *Chikungunya* (CHIKV).
- III. En los alineamientos de las secuencias de las proteínas de envoltura se observa una alta variabilidad de sitios no sinónimos.
- IV. Los árboles filogenéticos de AeAV y CPLV sugieren que han evolucionado en linajes Africanos, Asia-Pacífico y América, mientras que el CHIKV se encuentra ampliamente distribuido en diferentes regiones.

- V. El análisis de presiones selectivas de las proteínas estructurales de estos virus, indica que se encuentran bajo un proceso evolutivo neutral y en menor proporción bajo selección natural purificadora. Es decir, los cambios no sinónimos observados en los alineamientos son por efecto de un proceso neutral por deriva genética, más que la selección natural diversificadora o positiva.
- VI. Los virus *Aedes anphevirus* (AeAV), *Culex phasma-like virus* (CPLV) y *Chikungunya* (CHIKV), presentan proteínas relativamente conservadas a pesar de los sitios variables observados, lo que puede indicar que posiblemente estos virus tienen constricciones evolutivas (limitación en la variabilidad) por tener biciclos de replicación.

REFERENCIAS

- Aardema, M. L., Vonholdt, B. M., Fritz, M. L., & Davis, S. R. (2020). Global evaluation of taxonomic relationships and admixture within the *Culex pipiens* complex of mosquitoes. *Parasites and Vectors*, *13*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3879-8>
- Alonso-Palomares, L. A., Moreno-García, M., Lanz-Mendoza, H., & Salazar, M. I. (2019). Molecular Basis for Arbovirus Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Intervirology*, *61*(6), 255–264. <https://doi.org/10.1159/000499128>
- Anosike, J., Nwoke, B., Okere, A., Oku, E., Asor, J., Emmy-Egbe, I., & Adimike, D. (2007). Epidemiology of intrathoracic petechial hemorrhages in sudden infant death syndrome. *Ann Agric Environ Med*, *14*, 31–38. <https://doi.org/10.1007/s100249900027>
- Anthony S. Fauci, M.D., and David M. Morens, M. D. (2016). *Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat*. 601–604.
- Berthet, N., Declère, S. D., Andy, A., Meyong, N., Nakouné, E., Gessain, A., Manuguerra, J. C., & Kazanji, M. (2016). Improved assembly procedure of viral RNA genomes amplified with Phi29 polymerase from new generation sequencing data. *Biological Research*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40659-016-0099-y>
- Bolling, B. G., Weaver, S. C., Tesh, R. B., & Vasilakis, N. (2015). Insect-specific virus discovery: Significance for the arbovirus community. *Viruses*, *7*(9), 4911–4928. <https://doi.org/10.3390/v7092851>
- Brown, J. E., Evans, B. R., Zheng, W., Obas, V., Barrera Martinez, L., Egizi, A., Zhao, H., Caccone, A., & Powell, J. R. (2014). Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution*, *68*(2), 514–525. <https://doi.org/10.1111/evo.12281>. Human
- Bueno-Marí, R., & Jiménez-Peydró, R. (2013). Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Frontiers in Physiology*, *4* JUN(1), 136–173. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00158>
- Bzhalava, D., Johansson, H., Ekström, J., Faust, H., Möller, B., Eklund, C., Nordin, P., Stenquist, B., Paoli, J., Persson, B., Forslund, O., & Dillner, J. (2013). Unbiased Approach for Virus Detection in Skin Lesions. *PLoS ONE*, *8*(6), 33–36. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065953>
- Cheng, G., Liu, Y., Wang, P., & Xiao, X. (2016). Mosquito defense strategies against viral infection. *Physiology & Behavior*, *32*(3), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.09.009>. Mosquito
- Cholleti, H., Berg, M., Hayer, J., & Blomström, A. L. (2018). Vector-borne viruses and their

- detection by viral metagenomics. *Infection Ecology and Epidemiology*, 8(1).
<https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1553465>
- Couret, J. (2013). Meta-analysis of factors affecting ontogenetic development rate in the *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) complex. *Environmental Entomology*, 42(4), 614–626. <https://doi.org/10.1603/EN12248>
- Cutwa, M. M., & O'Meara, G. F. (2007). *PHOTOGRAPHIC GUIDE TO COMMON MOSQUITOES OF FLORIDA QUICK GUIDE TO MOSQUITO GENERA — larvae*.
- de Almeida, J. P., Aguiar, E. R., Armache, J. N., Olmo, R. P., & Marques, J. T. (2021). The virome of vector mosquitoes. *Current Opinion in Virology*, 49, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.04.002>
- Dolan, P. T., Whitfield, Z. J., & Andino, R. (2018). Mechanisms and concepts in RNA virus population dynamics and evolution. *Annual Review of Virology*, 5, 69–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041718>
- Egan, A. N., Schlueter, J., & Spooner, D. M. (2012). Applications of next-generation sequencing in plant biology. *American Journal of Botany*, 99(2), 175–185. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200020>
- Eisen, L., & Moore, C. G. (2013). *Aedes (stegomyia) aegypti* in the continental united states: A vector at the cool margin of its geographic range. *Journal of Medical Entomology*, 50(3), 467–478. <https://doi.org/10.1603/ME12245>
- Elrefaey, A. M., Abdelnabi, R., Rosas, A. L. R., Wang, L., Basu, S., & Delang, L. (2020). Understanding the Mechanisms Underlying Host Restriction of Insect-Specific Viruses. *Viruses*, 12(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/v12090964>
- Esser, H. J., Mögling, R., Cleton, N. B., Van Der Jeugd, H., Sprong, H., Stroo, A., Koopmans, M. P. G., De Boer, W. F., & Reusken, C. B. E. M. (2019). Risk factors associated with sustained circulation of six zoonotic arboviruses: A systematic review for selection of surveillance sites in non-endemic areas. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3515-7>
- Ewing, B., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, 8(3), 186–194. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.186>
- Farajollahi, A., Fonseca, D. M., Kramer, L. D., & Marm Kilpatrick, A. (2011). “Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1577–1585. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.013>
- Fermin, G. (2018). Host Range, Host-Virus Interactions, and Virus Transmission. In *Viruses: Molecular Biology, Host Interactions, and Applications to Biotechnology*

(Issue January). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811257-1.00005-X>

- Gortazar, C., Reperant, L. A., Kuiken, T., de la Fuente, J., Boadella, M., Martínez-Lopez, B., Ruiz-Fons, F., Estrada-Peña, A., Drosten, C., Medley, G., Ostfeld, R., Peterson, T., VerCauteren, K. C., Menge, C., Artois, M., Schultsz, C., Delahay, R., Serra-Cobo, J., Poulin, R., ... Mysterud, A. (2014). Crossing the Interspecies Barrier: Opening the Door to Zoonotic Pathogens. *PLoS Pathogens*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004129>
- Gray, S. M., & Banerjee, N. (1999). Mechanisms of Arthropod Transmission of Plant and Animal Viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 128–148. <https://doi.org/10.1128/membr.63.1.128-148.1999>
- Gubler, D. J. (2006). Human arbovirus infections worldwide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 951, 13–24. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02681.x>
- Gyawali, N., Bradbury, R. S., Aaskov, J. G., & Taylor-Robinson, A. W. (2017). Neglected Australian arboviruses: quam gravis? *Microbes and Infection*, 19(7–8), 388–401. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.05.002>
- Haba, Y., & McBride, L. (2022). Origin and status of *Culex pipiens* mosquito ecotypes. *Current Biology*, 32(5), R237–R246. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.01.062>
- Holmes, E. C. (2011). What Does Virus Evolution Tell Us about Virus Origins? *Journal of Virology*, 85(11), 5247–5251. <https://doi.org/10.1128/jvi.02203-10>
- J. Erin Staples, M.D., Ph.D., and Marc Fischer, M.D., M. P. . (2014). Chikungunya Virus in the Americas — What a Vectorborne Pathogen Can Do. *New England Journal of Medicine*, 371(10), 887–889. <https://doi.org/10.1056/nejmp1408509>
- Jensen, J. D., Payseur, B. A., Stephan, W., Aquadro, C. F., Lynch, M., Charlesworth, D., & Charlesworth, B. (2019). The importance of the Neutral Theory in 1968 and 50 years on: A response to Kern and Hahn 2018. *Evolution*, 73(1), 111–114. <https://doi.org/10.1111/evo.13650>
- Kang, D. S., Kim, S., Cotten, M. A., & Sim, C. (2021). Transcript assembly and quantification by rna-seq reveals significant differences in gene expression and genetic variants in mosquitoes of the *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) complex. *Journal of Medical Entomology*, 58(1), 139–145. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa167>
- Kean, J., Rainey, S. M., McFarlane, M., Donald, C. L., Schnettler, E., Kohl, A., & Pondeville, E. (2015). Fighting arbovirus transmission: Natural and engineered control of vector competence in *Aedes* mosquitoes. *Insects*, 6(1), 236–278. <https://doi.org/10.3390/insects6010236>
- Lambrechts, L., Scott, T. W., & Gubler, D. J. (2010). Consequences of the expanding

- global distribution of *aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000646>
- Lequime, S., Paul, R. E., & Lambrechts, L. (2016). Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. *PLoS Pathogens*, 12(5), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005548>
- Li, H., & Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 26(5), 589–595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>
- Louten, J. (2020). Emerging and Reemerging Viral Diseases. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 21(1), 1–9.
- Lwande, O. W., Obanda, V., Lindström, A., Ahlm, C., Evander, M., Näslund, J., & Bucht, G. (2020). Globe-Trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Risk Factors for Arbovirus Pandemics. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(2), 71–81. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2486>
- Marguerat, S., & Bähler, J. (2010). RNA-seq: From technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(4), 569–579. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0180-6>
- Mayer, S. V., Tesh, R. B., & Vasilakis, N. (2017). The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Tropica*, 166, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020>
- Messina, J. P., Brady, O. J., Scott, T. W., Zou, C., Pigott, D. M., Duda, K. A., Bhatt, S., Katzelnick, L., Howes, R. E., Battle, K. E., Simmons, C. P., & Hay, S. I. (2014). Global spread of dengue virus types: Mapping the 70 year history. *Trends in Microbiology*, 22(3), 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.011>
- Muktar, Y., Tamerat, N., & Shewafera, A. (2016). *Aedes aegypti* as a Vector of Flavivirus. *Journal of Tropical Diseases*, 04(05). <https://doi.org/10.4172/2329-891x.1000223>
- Nasar, F., Gorchakov, R. V., Tesh, R. B., & Weaver, S. C. (2015). Eilat Virus Host Range Restriction Is Present at Multiple Levels of the Virus Life Cycle. *Journal of Virology*, 89(2), 1404–1418. <https://doi.org/10.1128/jvi.01856-14>
- Nasar, F., Palacios, G., Gorchakov, R. V., Guzman, H., Travassos Da Rosa, A. P., Savji, N., Popov, V. L., Sherman, M. B., Lipkin, W. I., Tesh, R. B., & Weaver, S. C. (2012). Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(36), 14622–14627. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204787109>
- Öhlund, P., Lundén, H., & Blomström, A. L. (2019). Insect-specific virus evolution and potential effects on vector competence. *Virus Genes*, 55(2), 127–137. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-01629-9>

- Pando, V., Ortega, A., & Huerta, H. (2020). Mosquitos vectores de arbovirus. *Ciencia*, 71(1), 24–33.
- Parry, R., James, M. E., & Asgari, S. (2021). Uncovering the worldwide diversity and evolution of the virome of the mosquitoes *aedes aegypti* and *aedes albopictus*. *Microorganisms*, 9(8), 1–28. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081653>
- Patel, R. K., & Jain, M. (2012). NGS QC toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030619>
- Powell, J. R., Gloria-Soria, A., & Kotsakiozi, P. (2018). Recent history of *Aedes aegypti*: Vector genomics and epidemiology records. *BioScience*, 68(11), 854–860. <https://doi.org/10.1093/biosci/biy119>
- Radford, A. D., Chapman, D., Dixon, L., Chantrey, J., Darby, A. C., & Hall, N. (2012). Application of next-generation sequencing technologies in virology. *Journal of General Virology*, 93(PART 9), 1853–1868. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043182-0>
- Rajagopalan, A., & Ilboudo, C. M. (2017). Mosquito-borne Infections. *Pediatrics*, 38(7), 340–342. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-0621>
- Raju, R. S., Al Nahid, A., Chondrow Dev, P., & Islam, R. (2022). VirusTaxo: Taxonomic classification of viruses from the genome sequence using k-mer enrichment. *Genomics*, 114(4), 110414. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110414>
- Rizzoli, A., Jiménez-Clavero, M. A., Barzon, L., Cordioli, P., Figuerola, J., Koraka, P., Martina, B., Moreno, A., Nowotny, N., Pardigon, N., Sanders, N., Ulbert, S., & Tenorio, A. (2015). The challenge of west nile virus in Europe: Knowledge gaps and research priorities. *Eurosurveillance*, 20(20), 21135. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.20.21135>
- Romano, A. P. M., Costa, Z. G. A., Ramos, D. G., Andrade, M. A., de Jayme, V. S., de Almeida, M. A. B., Vettorello, K. C., Mascheretti, M., & Flannery, B. (2014). Yellow Fever Outbreaks in Unvaccinated Populations, Brazil, 2008-2009. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(3), 18–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002740>
- Romoser, W. S., Wasieloski, L. P., Pushko, P., Kondig, J. P., Lerdthusnee, K., Neira, M., & Ludwig, G. V. (2004). Evidence for arbovirus dissemination conduits from the mosquito (Diptera: Culicidae) midgut. *Journal of Medical Entomology*, 41(3), 467– 475. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.467>
- Sadeghi, M., Popov, V., Guzman, H., Phan, T. G., Vasilakis, N., Tesh, R., & Delwart, E. (2017). Genomes of viral isolates derived from different mosquitos species. *Virus Research*, 242, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.012>
- Salazar, M. I., Richardson, J. H., Sánchez-Vargas, I., Olson, K. E., & Beaty, B. J. (2007).

- Dengue virus type 2: Replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology*, 7(9), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-9>
- Sanjuán, R. (2012). From molecular genetics to phylodynamics: Evolutionary relevance of mutation rates across viruses. *PLoS Pathogens*, 8(5), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002685>
- Schulz, C., & Becker, S. C. (2018). *Mosquitoes as Arbovirus Vectors: From Species Identification to Vector Competence*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-94075-5_9
- Sedano, J. C. S., & Carrascal, C. E. L. (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*, 16(2), 101–113. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(80\)90268-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(80)90268-0)
- Shi, M., Neville, P., Nicholson, J., Eden, J.-S., Imrie, A., & Holmes, E. C. (2017). High-Resolution Metatranscriptomics Reveals the Ecological Dynamics of Mosquito-Associated RNA Viruses in Western Australia. *Journal of Virology*, 91(17). <https://doi.org/10.1128/jvi.00680-17>
- Singh, D., & Yi, S. V. (2021). On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Experimental and Molecular Medicine*, 53(4), 537–547. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00604-z>
- Souza-Neto, J. A., Powell, J. R., & Bonizzoni, M. (2019). *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infection, Genetics and Evolution*, 67(November 2018), 191–209. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009>
- Stollar, V., & Thomas, V. L. (1975). An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology*, 64(2), 367–377. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90113-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90113-0)
- Tabachnick, W. J. (2016). Ecological effects on arbovirus-mosquito cycles of transmission. *Current Opinion in Virology*, 21, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.09.008>
- Thannesberger, J., Rascovan, N., Eisenmann, A., Klymiuk, I., Zित्रa, C., Fuehrer, H. P., Scantlebury-Manning, T., Gittens-St.hilaire, M., Austin, S., Landis, R. C., & Steininger, C. (2020). Highly sensitive virome characterization of *aedes aegypti* and *culex pipiens* complex from central europe and the caribbean reveals potential for interspecies viral transmission. *Pathogens*, 9(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090686>
- Valdés, L. A., Romero, Á. V., García, M. M., Brey, L. T., & López, G. C. (2006). Algunos aspectos básicos de evolución de virus ARN: importancia médica. *Rev Cubana Invest Bioméd*, 25(3), 257–257.
- Viglietta, M., Bellone, R., Blisnick, A. A., & Failloux, A. B. (2021). Vector Specificity of Arbovirus Transmission. *Frontiers in Microbiology*, 12(December), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.773211>
- Wang, L., Si, Y., Dedow, L. K., Shao, Y., Liu, P., & Brutnell, T. P. (2011). A low-cost library

- construction protocol and data analysis pipeline for illumina-based strand-specific multiplex RNA-seq. *PLoS ONE*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026426>
- Ward, J. A., Ponnala, L., & Weber, C. A. (2012). Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *American Journal of Botany*, 99(2), 267–276. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100334>
- Weaver, S. C., & Barrett, A. D. T. (2004). Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10), 789–801. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1006>
- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85(2), 328–345. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>
- Young, P. R. (2018). Arboviruses: A Family on the Move. In *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies* (Vol. 1062). <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1>
- Yurchenko, A. A., Masri, R. A., Khrabrova, N. V., Sibataev, A. K., Fritz, M. L., & Sharakhova, M. V. (2020). Genomic differentiation and intercontinental population structure of mosquito vectors *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens molestus*. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63305-z>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Presente.

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **RAMÍREZ CORONA LUIS DONALDO** con número de matrícula **10018636** cuyo título es:

Comparación In silico de la diversidad y evolución del viroma de los mosquitos vectores Aedes aegypti y Culex pipens

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS CON AREA TERMINAL BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**.

Cuernavaca, Mor a 22 de junio del 2023

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA	(PRESIDENTE).
DR. AGUSTÍN REYES PÉREZ	(SECRETARIO).
DRA. SONIA DÁVILA RAMOS	(VOCAL).
DR. HUGO GILDARDO CASTELÁN SÁNCHEZ	(SUPLENTE).
DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ	(SUPLENTE).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

HUGO GILDARDO CASTELÁN SÁNCHEZ | Fecha:2023-06-22 10:53:50 | Firmante

jXFLqMhN48u/Hf6xlv0y5BgzlnJrFC2f5vL61TBD0z+HkYS2t8AcQ/qQfgaMq7VAlzj5PNYLq9pl5/Zm3LdMt1pkguEUw8DmwW6Kbq5imxZApidEPw/2tmY8mVnSl+nEgBg8WacFtqUdNWytQxc5oi6gxMxa1Efu8/F2dX8MIYi4Wrwr9ujUn1iOmx9j2jwgK0eijx69UavQfUCaz6UkWVsvsQ35TLB2Zolsqp44qgheOF9a/ZdhbM/Nfb3RrYqU2Di/EO+r5aJSZn29mgpyQO0s5yOD+fiXealYigeBj096iV3xqybe8I9J2BEsol9KAyvGUvPfdmR3JS06LEg==

AGUSTIN REYES PEREZ | Fecha:2023-06-22 11:00:45 | Firmante

ul01aqaJLryUfDCb3cfhlgQ0NJSMSsj91IEKcuayqDpwQcONHkRSvKqvdK1wC1JUxqgr6OgKkfhZQtmsUL1UtJVUW2QU8sezx6cwxS0j5ZvYNdtDLt0PHOpdpbduci2s/kntD6R.Jr uAlN0aBbTktKSEzLSMoiVKB+9xP0wfk0cDyQY8c5kou9AiYwGvZzBtanc+VdqwemkqTTa9OrSwCgQdkSV/OJSGm3q0oKhWu4Xv1YTNfGSwgXEvNziu4UU8/5Hnl11fmiLLJcc11JidXSfdmDJulzrPTPVZ36gVFNlxZ4WSCOhJfU2wR6MOc8RCgvuVajRGycP25+lzQ==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2023-06-23 15:42:16 | Firmante

wRGoscnixl8Tdo+fNArItk56K9ufbv0huMhu6n+XmdpobFI7GFUW1WAwUq+Zj9u4mCHUP365qcZPLW2KTGZppf3iLD4Kro6cYW+noBSsS3oe6UZHFt0jNDmiauoDEhe6j+X9W MWaH72c91OqCXezw3rmEwiWPK1Nz5xrJy6DMUlaLNU/71+cWiMANxSADpO+TcuJEmHPT/Op+fyM1cJ2qMmvpHliG4ouyFRMKnjilXqwxEVZkoNeBetskl/NupdMM/UMKHiWAU KR5UKG2Gr0uzgISGNOYxmc8bzRpn9DO3hnGxH+Bdjzh3FNK4JtDVuQEznlTnsVSEDAMrEfgGw==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2023-06-24 08:24:36 | Firmante

hraieg7sBX9brQCDr4oP42Xf/whzXIMahs1AsoeBNGi37I013/nff0rMYhIKSD+LEWXqshxzExeeovMHlgSv7mt9vtSUuApTg+UiHPPCz7IpE2Vv09BZgDdaWRuJhEg/EpdfZpnCwaQ+kI70flpt9KwK0gDuX+eVuMwiSc1/kX7AokU9EtPZEOSJUJyWuiRiKcZYfSKBoKooS1NUxMjyh5oV4AnxiOy1oFvBTF5Y1gnvI8/kpErBEGwqtUgHaddWfa5DUZGSu6zb0WpD89 2Nu6NKRswzRVLiqtVhJ6h8zmZ8G7cPMwl7iGSq5tZHpBCaAdowjKQ0KS/jvXDbILA==

ENRIQUE MERINO PÉREZ | Fecha:2023-07-04 17:24:23 | Firmante

CVldLIZTf5aD2op8YPf4o6lP6/K3b2987nFwZjfiUrpwmpD97Rg1a3bsgE3Kb3RtYMjxqW97cIPW5ZswtawYQAQ+9OIAE/7++4xSY84A6k+0uw36RRolvygve5criXrOGsAYGembpEZAajfzZoGCsPPaf12JrXXi1XdmWi9dQgqEOZfZ45+PIAjlH9+KqwkGuGEjqWnM/0iY+951VeFcp+J20tD3T/ZdXcz72KnlYzLsvHS3ma8u7gt3NkVwmJS2KlxvsF8XLlx52W3LfUa/dB/wtt5a5GzAWOzt3TdpkMW52hn2/GoysMhonJxRnE7YEEYjKTMnMgUk/It433/A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



LhImad8Fn

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/5QvuqAZKpDq7akIHzcQauxv4cyv8qVXN>

