



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Competencia vectorial para transmitir virus dengue y virus Zika
en los mosquitos *Aedes aegypti* colectados en Puente de Ixtla,
Morelos.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
IVONNE FRANCO QUITERIO

DIRECTOR DE TESIS
Dra. Rosa Victoria Pando Robles

Co-Directora
Biol. María Elizabeth Santana Román

CUERNAVACA, MORELOS A SEPTIEMBRE, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad *Acreditado* por el 

Cuernavaca, Morelos a 15 de mayo de 2021

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **IVONNE FRANCO QUITERIO**, con el título del trabajo: **Competencia vectorial para transmitir virus Dengue y virus Zika en los mosquitos *Aedes aegypti* colectados en Puente de Ixtla, Morelos.** En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis como lo marca el artículo 4° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ

SECRETARIO: DRA. VERÓNICA OBREGÓN BARBOZA

VOCAL: DRA. ROSA VICTORIA PANDO ROBLES

SUPLENTE: DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA

SUPLENTE: BIÓL. ELIZABETH SANTANA ROMÁN



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

MARÍA ELIZABETH SANTANA ROMÁN | Fecha:2021-09-10 21:18:10 | Firmante

A5dmLL8dTphdAvzjFQhCfoniGLoXpJ2WES0IpYMUuxyJJtbtGtCt4wPtc62jz7ChY5T8OdZXisrWeQdxYd+RUWtYSx8IXvrhEGAEaXIaHWhzsd2yohLAWQDmB9QSKYJM+KpYQBeMDKc4Y/1D/zWHICLmSWF4x32c7M9xfYX2uDI31457G2KdvqyE51HaKcqGEbcjBrUw6ijhgO0bH4ORgZyH3X0e4NVA5Z315fSx1QBFaMhliueNOuRppqZbAPDcZYkyXcgBUEGpXsOZ9q/lj33pMDpEz2cX11cLC1QTxvSGb9X9PerK0TgOYQkVxyz6vvBVtwETptvH/5GL0QUKIA==

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



CzrEQO

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hleHI54ZZDD0CesS3MbsQwL7oiHcbHle>





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

VERONICA OBREGON BARBOZA | Fecha:2021-10-20 14:56:45 | Firmante
MY+GSqGDJ3Qu0clstVHA+3F51PkniArDbiCJwDx8thLQkoD1Eu3mZoXntHbFJIg8uwgpgT89+M7HnH380OQ+0Q3B826CWx41uo2N5L8
fzhobkR+mpd08efx8gL8Etpm5yvwNQ
9929Xs6iQOtu7jt7kXJF5ZaCSRC9CoKrHXAnqkZ7GYLkApgANVFAAsATJlajzLd27xfqri4vJ8W/UrrRhi4ck2IU0UUVd+QrFHowYESj9Au
TxDJgvt4s+hc15PkptH7gQ3G+ZR2EGB ZGVJWkAfWQ+gOzdUCIbThIV6gvOsMXFTsWgzml+HnxE+tXdsQ2kA/s+rPJFZTiaMjmIPA==

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

XoK5Nt7sn

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/qNReKQHj0ZcDEF9rYvQIANSyVH9PsTkZ>



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

CUAUHTEMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA | Fecha:2021-08-30 16:17:50 | Firmante
IxdmKPODXD6v8RuAqpkADlqvGldToG90IYQxgsWhMepb76kmJGTAlqeMVAkCXBTBFxzVNzqaXhaZ862VdVlaTnED8W5Fvz7dRUhgP3IT0sz80m/BV8UoJgKR2OXwag1+gAxl7
GMmG6JHPLWmVg+bFUtgBUBZcE5YjqKh3tSRxUvplLb5e+6U7ofUOJ9+Ull5hVZKtwyafVjn7KwkiMitqDSDGjmSxK2K8qypNpiSGJM6o/P71aA5xH0BbeUv080DwOgicBwHwM
2JFwpjXl8YBsZyZfNCSiJfp5+bRDndBX70Lmco+ld3yfWw5pNbvq743V4bz3OhzrNXPlQ--

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



ez8C4K

<https://efirma.uaem.mx/noReputio/hp8HbqQk9zkiCaA7pa2ubd5ZW1NK9Nlw>



INDICE

Lista de abreviaturas.....	I
Índice de figuras.....	II
Índice de tablas.....	II
RESUMEN.....	III
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Epidemiología de DENV y ZIKV.....	1
1.2.- Generalidades de DENV y ZIKV.....	5
1.3.- Ciclo de replicación de DENV y ZIKV.....	7
1.4.- Ciclo de transmisión de los arbovirus.....	9
1.5.- Biología del mosquito vector.....	11
1.6.- Interacción de los arbovirus con el mosquito vector.....	15
1.6.1.- Sistema inmune del mosquito.....	18
1.7.- Capacidad vectorial y Competencia vectorial.....	21
2.- ANTECEDENTES.....	23
3.- JUSTIFICACIÓN.....	25
4.- HIPÓTESIS.....	25
5.- OBJETIVO.....	26
5.1- Objetivos específicos.....	26
6.- MATERIALES Y METODOS.....	27
6.1.- Propagación de DENV y ZIKV.....	27
6.2.- Titulación viral de DENV y ZIKV.....	27
6.3.- Crecimiento y mantenimiento de la población de mosquitos <i>Ae aegypti</i> Puente de Ixtla.....	28
6.4.- Infección de los mosquitos hembra con DENV y ZIKV.....	29
6.5.- Extracción del intestino medio y la glándula salival.....	30
6.6.- Extracción del RNA viral.....	31
6.7.- Reacción de reto-transcriptasa (RT).....	31
6.8.- Detección de DENV y ZIKV mediante RT-PCR.....	32
6.9.- Curva estándar para la cuantificación de DENV y ZIKV.....	33
6.10.- Análisis estadístico.....	34

7.- RESULTADOS.....	35
7.1.- Los mosquitos <i>Ae aegypti</i> de Puente de Ixtla, Morelos presentan infecciones con DENV y ZIKV a partir de los 4 dpi	35
7.2.- Los mosquitos <i>Ae aegypti</i> de Puente de Ixtla presentan una mayor competencia vectorial para DENV.....	37
7.3.- En <i>Ae aegypti</i> de Puente de Ixtla, DENV presenta mayor infección en el IM y la GS comparado con ZIKV	38
8.- DISCUSIÓN.....	39
9.- CONCLUSIÓN.....	42
9.1.- PERSPECTIVAS.....	42
10.- BIBLIOGRAFIA.....	43

Lista de abreviaturas

Ácido ribonucleico.....	ARN
<i>Aedes aegypti</i>	<i>Ae aegypti</i>
Barrera de escape de la glándula salival.....	BEGS
Barrera de escape del intestino medio.....	BEIM
Barrera de infección del intestino medio.....	BIM
Barrera de infección en la glándula salival.....	BIGS
Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades....	CENAPRECE
Competencia Vectorial.....	CV
Dióxido de carbono.....	CO ₂
Días post infección.....	dpi
Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Medium.....	DMEM
Glándula salival.....	GS
Inmunodeficiencia.....	IMD
Intestino anterior.....	IA
Intestino medio.....	IM
Intestino posterior.....	IP
Lamina basal.....	LB
Matriz peri trófica.....	MP
Pares de bases.....	pb
Periodo de Incubación Extrínseca.....	PIE
Retículo endoplasmático rugoso.....	RER
Retro transcriptasa-Reacción en la cadena de Polimerasa.....	RT-PCR
Suero fetal Bovino.....	SFB
Tampón de Fosfato Salino.....	PBS
Virus Chikungunya.....	CHIKV
Virus dengue.....	DENV
Virus Zika.....	ZIKV

Índice de figuras

1.- Distribución de los serotipos de DENV en México y el número de casos reportados por estado (2021).....	2
2.- Distribución de ZIKV en el continente americano entre los año 2015-2016.....	3
3.- Genoma viral de DENV y ZIKV.....	6
4.- Ciclo de replicación de DENV y ZIKV	8
5.- Ciclos de transmisión de los arbovirus y factores asociados a su emergencia.....	10
6.- Morfología de la larva y pupa del mosquito <i>Ae aegypti</i>	14
7.- Ciclo biológico del mosquito <i>Ae aegypti</i>	14
8.- Estructura del Intestino medio y glándula salival del mosquito adulto <i>Ae aegypti</i>	16
9.- Interacción virus-vector y las barreras tisulares del mosquito.....	17
10.- Sistema inmune del mosquito.....	20
11.- Factores que influyen en la competencia vectorial de los mosquitos <i>Aedes</i>	22
12.-Crecimiento de la colonia <i>Ae aegypti</i> (F1) de Puente de Ixtla.....	29
13.- Infección de los mosquitos hembra con DENV y ZIKV.....	30
14.- Disección de tejidos de mosquitos <i>Ae aegypti</i>	31
15.- Ciclos de amplificación en la qPCR (S7).....	33
16.- Curva estándar S7.....	34
17.- DENV presenta infecciones a partir de los 4 dpi.....	35
18.- ZIKV en los mosquitos de Puente de Ixtla presenta su pico máximo de infección a los 7 dpi.....	36
19.- <i>Ae aegypti</i> de Puente de Ixtla infectados con DENV es más competente comparado con ZIKV.....	38

Índice de tablas

Tabla 1.- Oligonucleótidos específicos para S7, DENV y ZIKV.....	32
Tabla 2.- Condiciones para RT PCR de S7, DENV y ZIKV.....	32
Tabla 3.- DENV presenta una CV superior comparada con ZIKV.....	37

RESUMEN

Los arbovirus son un grupo de virus que se transmiten al hombre y a otros vertebrados por medio de artrópodos hematófagos. Los arbovirus más importantes para la salud humana son el virus Dengue, virus Zika y virus Chikungunya, los cuales tienen como vector principal al mosquito *Ae aegypti*. Las arbovirosis representan un problema importante de salud pública, principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, donde 2/3 de la población mundial viven en riesgo de padecer estas enfermedades. En México, el 60% del territorio presenta las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo del mosquito, por lo que la mayoría de los estados reportan casos de estas arbovirosis.

La propagación de los arbovirus está determinada por la distribución de sus vectores (mosquitos) y por la capacidad vectorial. La capacidad vectorial involucra factores extrínsecos al mosquito como la temperatura y la humedad; y factores intrínsecos del mosquito como la genética, la respuesta inmune y la microbiota, a este último componente se le conoce como competencia vectorial (CV). La CV se define como la capacidad del mosquito de adquirir, replicar y transmitir un patógeno.

El ciclo de transmisión de los arbovirus empieza cuando el mosquito hembra adquiere el virus de una persona febril infectada, durante su alimentación hematófaga. Posteriormente, el arbovirus ingresa al intestino medio del mosquito donde se replica y, atraviesa las barreras de escape del intestino medio hasta llegar a la hemolinfa, donde infecta tejidos secundarios para aumentar el número de partículas virales. Finalmente, las partículas virales llegan a las glándulas salivales del mosquito, donde se replican y son secretadas en la saliva durante la siguiente alimentación hematófaga. Por lo anterior, comprender la interacción mosquito-virus es fundamental para establecer estrategias novedosas para combatir la transmisión viral.

Morelos es un estado endémico para dengue, en el 2019 se reportó un aumento en el número de casos para dengue y Zika, los municipios más afectados fueron: Cuernavaca, Cuautla, Jojutla, Puente de Ixtla, Zacatepec y Ayala, mientras en el 2020 se redujo la incidencia en un 56%, respecto al año anterior. En el presente estudio se evaluó la competencia vectorial para los virus dengue y virus Zika en los mosquitos *Ae aegypti* provenientes de Puente de Ixtla, Morelos. La infección viral se determinó en el intestino medio y la transmisión se evaluó en las glándulas salivales de los mosquitos mediante la técnica de RT PCR. Los resultados mostraron una diferencia en la competencia vectorial entre los virus dengue y Zika. El virus dengue presenta una CV mayor (100%) comparado con ZIKV (73%), demostrando que los mosquitos de Puente de Ixtla son altamente competentes para transmitir ambos virus.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, arbovirus y competencia vectorial.

1.- INTRODUCCIÓN

Las infecciones por arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) representan uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, debido a su rápida diseminación y a su potencial de causar brotes epidémicos. Las infecciones más frecuentes son causadas por el virus Dengue (DENV), el virus Chikungunya (CHIKV) y el virus Zika (ZIKV); sin embargo, existen brotes esporádicos de otros arbovirus en diferentes regiones del planeta.

1.1.- Epidemiología de DENV y ZIKV

El DENV causa la enfermedad de dengue y es considerado una de las arbovirosis más importantes actualmente, ya que es endémica en más de 125 países y se ha estimado que se producen alrededor de 350 millones de infecciones cada año, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Arredondo et al., 2016; Laureti et al., 2018).

En 1957 se realizó una campaña dirigida por la Organización Panamericana de la salud con el objetivo de eliminar al mosquito vector de DENV, logrando su erradicación en 1963 (Arredondo et al., 2016). Por lo cual, antes de 1970, solo nueve países habían sufrido epidemias por dengue (Mateo et al., 2017). Sin embargo, esta situación solo pudo ser mantenida por dos décadas, hasta su reemergencia en 1978, aumentando el número de casos por dengue y la presencia de los serotipos. En 1981 se reporta una epidemia en Cuba y en otros países de las Américas (Torres et al., 2014).

México es un país endémico para dengue, sus condiciones ambientales benefician la amplia distribución del mosquito vector. En el año 2019 se registró un total de 22,175 casos confirmados, en el 2020 se reportó un total de 24,313 casos (SINAVE/DGE/SALUD) y hasta el mes de agosto del 2021 se han reportado 1,462 casos por dengue (SINAVE/DGE/SALUD/Sem.30de2021).

En el territorio nacional Mexicano circulan los 4 serotipos de DENV (DENV 1 a DENV 4) y en el estado de Morelos se ha reportado la presencia de los serotipos 1 y 2 (SINAVE/DGE/SALUD), como se muestra en la figura 1. Además, hasta agosto del 2021, Morelos es el estado que reporta mayor incidencia de DENV.

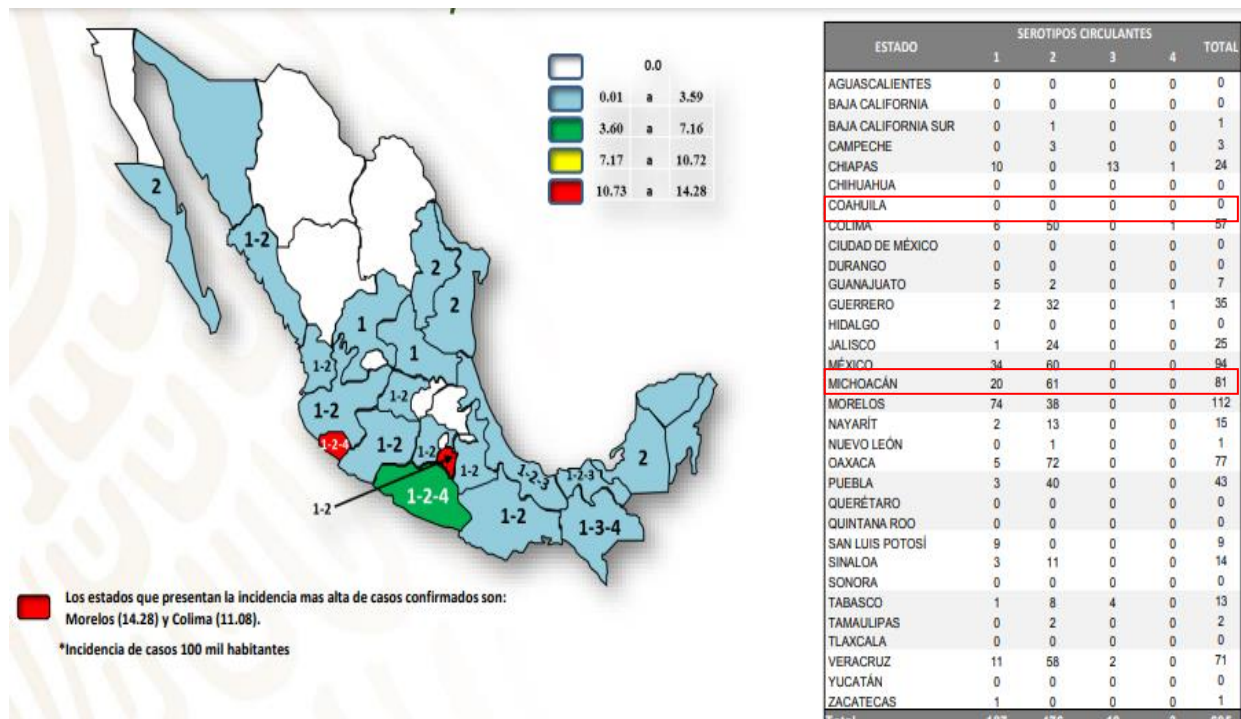


Figura 1. **Distribución de los serotipos circulantes de DENV en México y el número de casos reportados por estado (2021).** El 67% de los casos confirmados para DENV se han reportado en los estados de: Veracruz, México, Michoacán y Oaxaca. Los estados que presentan la incidencia más alta son: Morelos (con 112 casos) y Colima, mientras que, los estados que se encuentran en color blanco no presentan reportes de infecciones por DENV. El mapa indica la incidencia de casos de DENV por cada 100 mil habitantes (SINAVEDGE/SALUD/2021).

El ZIKV es un arbovirus emergente que fue aislado del mono *Rhesus* en el bosque de Zika, Uganda en el año de 1947 (Arredondo et al., 2016). En 1948 se asocia el ZIKV con el mosquito *Aedes africanus* y en 1954 se detecta por primera vez la infección en humanos en el estado de Nigeria (Sirohi et al., 2016). Para el 2007, se registra una epidemia de ZIKV en la isla de Yap (Estados Federales en Micronesia), en el 2013 se registran brotes en la Polinesia Francesa y el Pacífico (Calvez et al., 2018). Después en el 2014 se registran brotes en Chile, Nueva Caledonia y las Islas Cook (Grillet et al., 2016).

Finalmente, en marzo del 2015 el ZIKV entra al continente americano, llegando a Brasil y posteriormente a México (Coronel et al., 2016). En México, se reportaron los primeros casos de infección con ZIKV a finales del 2015, hasta la actualidad se han registrado un total de 12,980 casos (SINAVE/DGE/SS, Semana epidemiológica 29, agosto 2021).



Figura 2. **Distribución de ZIKV en el continente americano entre los años 2015- 2016.** En el 2015 se reportan los primeros casos de ZIKV en Brasil (Feb 2015) posteriormente se fue expandiendo a los estados del sur y del norte, para finales de ese año se expande hasta llegar a México (Dic 2015). En el 2016 la OMS declaró al ZIKV como una emergencia de salud pública a nivel mundial debido a la asociación de la infección con anomalías congénitas. Actualmente se han registrado un total de 12,964 casos confirmados para ZIKV (Secretaría de Salud 2021)

Durante la infección por DENV y ZIKV en el ser humano, del 60-80% de los casos pueden ser asintomáticos (Frantchez et al., 2016 y OMS, 2020). No obstante, las personas infectadas pueden presentar síntomas clínicos a partir de los 3 a 14 días posterior a la picadura de un mosquito infectado. La infección por DENV se ha clasificado como dengue no grave, dengue con signos de alarma y dengue grave (OMS, 2021). El dengue no grave se caracteriza por presentar síntomas similares a la gripe

mientras que el dengue con signos de alarma y dengue grave causa complicaciones como hemorragias, falla orgánica y en casos extremos la muerte (OMS, 2021).

La infección con ZIKV presenta síntomas similares a dengue; sin embargo, en las formas graves de la infección se presenta el síndrome de Guillain- Barré en adultos y la microcefalia en neonatos (OMS, 2021).

El SGB es una enfermedad que afecta el sistema nervioso periférico, donde el sistema inmune ataca a los nervios provocando la desmielinización de estos, por lo cual se presenta debilidad muscular en las extremidades, hormigueo, parálisis y dificultad para respirar, este síndrome puede ser reversible si es tratado a tiempo (Torres et al., 2003; Espinoza, 2017).

En cambio, la microcefalia congénita asociada con ZIKV se caracteriza por una reducción en el tamaño del perímetro cefálico (OMS, 2019), debido a que ZIKV afecta a células progenitoras neurales de los fetos en desarrollo, específicamente durante el primer trimestre de desarrollo que es el momento en el cual el sistema nervioso central está en formación (Ocaña et al., 2019). Las CPN infectadas van a entrar en procesos de inhibición celular y apoptosis, conduciendo a una reducción en la formación de las capas de la corteza cerebral y por consiguiente a la microcefalia (Coronel et al., 2016; Ocaña et al., 2019).

El diagnóstico clínico de DENV o ZIKV no es específico, se conoce que la mayoría de los arbovirus presentan síntomas similares durante la primera semana de la infección. Por ello, el caso clínico de probable dengue, se deba confirmar por técnicas moleculares. En México, se sigue el algoritmo de diagnóstico de la Secretaría de Salud, que indica que el diagnóstico clínico de un paciente catalogado como un probable caso de dengue debe ser confirmado en el laboratorio mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ARN viral. La muestra de suero debe ser de la etapa de viremia, es decir durante los primeros 5 días de la aparición de la fase febril (Arredondo et al., 2016).

También, existen los ensayos serológicos que se basan en detectar anticuerpos IgM y la presencia de la proteína NS1 en muestras de sangre, estas técnicas son de las más utilizadas por ser de bajo costo y rápidas. Lamentablemente, el tratamiento del paciente

es de soporte, y hasta la fecha no se conoce un tratamiento específico o una vacuna efectiva para tratar estas arbovirosis (Lin et al., 2018).

1.2.- Generalidades de DENV y ZIKV

El DENV y ZIKV pertenecen a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus*. DENV presenta 4 serotipos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, la variación entre cada serotipo se debe a un fragmento de 240 pb en la región del gen E/NS1 (Holmes and Twiddy., 2003). Se conoce que la infección por un serotipo confiere inmunidad permanente contra la infección por ese serotipo, pero no protege contra un serotipo heterólogo, por lo que la infección con dos serotipos diferentes es un factor de riesgo para desarrollar las formas graves de la enfermedad (Benette et al., 2002). Por otro lado, el ZIKV circula en la naturaleza como un solo serotipo con dos genotipos principales, el africano y el asiático (Cabezas et al., 2017).

La partícula viral de DENV y ZIKV es icosaédrica y tienen un tamaño aproximado de 40-60 nm de diámetro (Martínez et al., 2008). Presentan un genoma de ARN con polaridad positiva (5´-3´) con aproximadamente 11,000 nucleótidos (Laredo et al., 2012). Además, el genoma viral contiene dos regiones no traducidas (UTR) en los extremos 5´y 3´y un marco de lectura abierto único (ORF) (Baz et al., 2019; Musso y Gubler., 2016). El ARN viral codifica para una poliproteína (3400 aminoácidos) que es procesada por proteasas virales y celulares (Javed et al., 2017), dando lugar a tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales.

Las 3 proteínas estructurales son: la cápside (C), pre-membrana (prM) y de envoltura (E), las cuales forman la partícula viral y están involucradas en la entrada, el ensamblaje y la liberación de nuevos viriones de la célula huésped (Martínez et al., 2008). Las siete proteínas no estructurales son: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, las cuales intervienen durante el proceso de replicación del ARN viral, el ensamblaje y la evasión de la respuesta inmune (Raquin et al., 2017; Fernández et al., 2009) (Figura 3).

La proteína E interacciona con los receptores de la membrana de una célula blanco y está involucrada en el reconocimiento, la unión y fusión de la partícula viral a una célula huésped (Lin et al., 2018). La proteína C presenta una estructura secundaria con cuatro

hélices alfa sé que se une al ARN de DENV y ZIKV formando la nucleocapside icosaedrica de la partícula viral. La proteína prM se ancla en la membrana del retículo endoplasmático rugoso (RER) durante el ensamblaje viral, posteriormente se enciende el péptido pr de la proteína M (Zhang et al., 2020), para formar un virón maduro (Velandia et al., 2011).

La proteína NS1 es importante durante la replicación del ARN viral y además, participa en el ensamblaje y la maduración de los virones (Neufeldt et al., 2018). La proteína NS2A actúa como cofactor de la proteína NS3 que tienen actividad de serina proteasa y en conjunto se encargan de procesar a la poliproteína viral (Javed et al., 2017; Luo et al., 2015). Además, la proteína NS3 presenta actividad de NTPasa y helicasa, que son importantes en la síntesis del ARN junto con la proteína NS5. La proteína NS5 consta de un dominio N-terminal y un dominio C-terminal con actividad polimerasa dependiente de ARN responsable de la síntesis de ARN viral (Neufeldt et al., 2018; Yadar, 2003). Las proteínas NS4A y NS4B son proteínas integrales de membrana que forman invaginaciones en el RER para formar vesículas que en conjunto se conocen como fábricas de replicación, donde se lleva a cabo la síntesis de ARN para la generación de partículas virales (Perera and Kuhn., 2008).

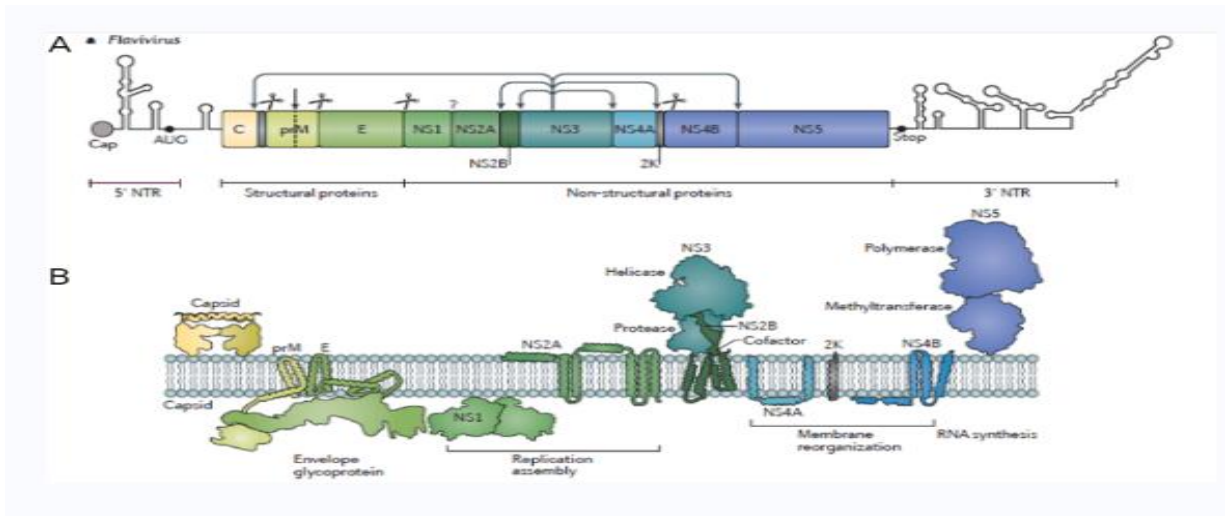


Figura 3. **Genoma viral de DENV y ZIKV.** A) DENV y ZIKV presentan un genoma viral similar, con un ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, la cual codifica a una poliproteína constituida por 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales, además, el genoma viral contiene dos regiones no traducidas (NTR) en los extremos 5' y 3'. B) Las proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, participan en la replicación del ARN viral, el ensamblaje y la evasión de la respuesta inmune (Neufeldt et al., 2018; Fernández et al., 2009).

Una característica que define a los virus es que depende la maquinaria de traducción celular para la síntesis de sus proteínas virales del patógeno.

1.3.- Ciclo de replicación de DENV y ZIKV

Los DENV y ZIKV interactúan por medio de la proteína E con los receptores de la membrana celular e ingresan por endocitosis mediada por clatrina (Raquin, et al., 2017). La clatrina es una proteína cuya función es recubrir las vesículas para su ingreso al interior de la célula (Mosso et al., 2008). Los receptores de unión que se han identificado para DENV y ZIKV es la lectina CD209 de tipo C (DC- SIGN), el receptor de manosa, el receptor de laminina descrito como un receptor para DENV y el sulfato de heparina las cuales son indispensables para la infección en células huésped (Neufeldt et al., 2018).

El virus, una vez que es reconocido por un receptor en la superficie celular es endocitado y en el interior de la célula del mosquito el endosoma se acidifica debido a la presencia de una bomba vacuolar de tipo ATPasa, la acidificación del endosoma permite la fusión de la membrana viral y celular, lo que conlleva a la liberación del genoma viral (García et al., 2019; Fernández et al., 2009). El ARN viral es liberado en el citoplasma de la célula blanco, posteriormente llega a los ribosomas asociados al RER iniciándose la traducción para dar lugar a la poliproteína (Fernández et al., 2009; Javed et al., 2017). Una vez dentro de la célula hospedera, DENV y ZIKV inducen el rearrreglo de membranas mediante la proteína NS4A e inducen la formación de fábricas de replicación (Neufeldt et al., 2018). Dentro de estas estructuras membranosas ocurre la replicación del ARN viral, debido a que se ha observado la presencia del intermediario replicativo de ARN de doble cadena (dcRNA) y el complejo de replicación formando las proteínas NS3 y NS5 (Perera and Kuhn, 2008). La replicación del material genético dentro de estas fábricas de replicación confiere protección al ARN viral contra las RNAasas celulares y actúan como una barrera física para evitar el reconocimiento por el sistema inmune (Chatel-Chaix and Bartenschlager., 2014). El ARN viral recién sintetizado sale de las vesículas y es ensamblado en la proximidad del RER, o bien puede traducirse a una poliproteína (Luo et al., 2015). El ensamblado de los virones comienza cuando la proteína C se une con el ARN viral para dar lugar a la

núcleocapside. Las proteínas prM y E se ensamblan en la membrana del RER formando heterodímeros y una vez que el virión adquiere la membrana de este orgánulo es transportado mediante vesículas secretoras al aparato de Golgi donde terminarán de madurar las partículas virales (Kostyuchenko et al., 2016; Gómez et al., 2017). Durante su paso por el trans-Golgi, la proteína prM es procesada por la proteasa celular furina originando el péptido pr y la proteína M, el péptido pr protege de una asociación temprana entre la proteína E y M (Perera and Kuhn., 2008). Cuando los viriones son liberados al medio extracelular, el pH alcalino promueve que pr se disocie y que las proteínas E y M se asocien formando viriones maduros (Zhang et al., 2003). Finalmente, las partículas virales salen de la célula por medio de exocitosis (Garcia et al., 2019).

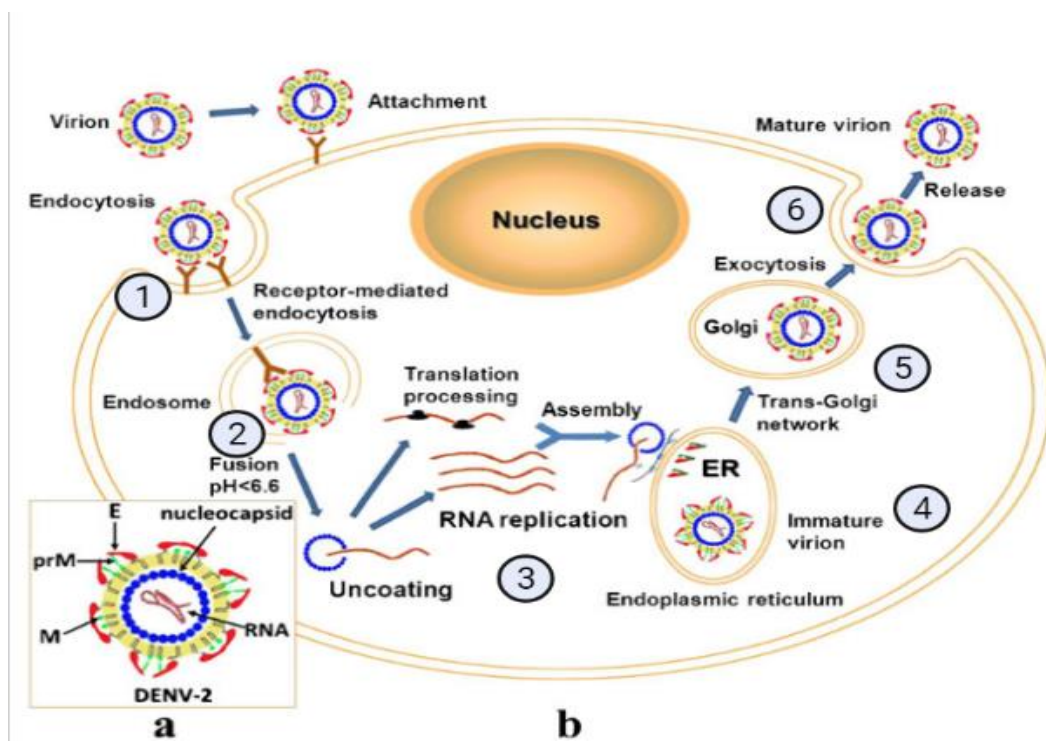


Figura 4. **Ciclo de replicación de DENV y ZIKV.** A) Estructura del DENV y ZIKV. B) Ciclo de replicación. 1) Interacción del virus con la proteína E y los receptores de la célula huésped, el virus ingresa a la célula por medio de endocitosis mediada por clatrina. 2) La partícula viral se fusiona con el pH ácido del endosoma, de esta manera liberando el genoma viral. 3) La replicación del ARN viral se lleva a cabo en el RER. 4) El virus ya sintetizado inicia el proceso de ensamblaje en el RER, la proteína C encapsula el ARN viral formando la nucleocápside, formando un virus inmaduro. 5) El virus inmaduro es transportado por medio de vesículas al Aparato de Golgi, la proteína prM es procesada por la furina celular, esta proteína prM se une al virus inmaduro dando la maduración del virus. 6) El virus maduro es expulsado por medio de exocitosis. (Perera and Kuhn, 2008; Fernández et al., 2009)

El ciclo de replicación de DENV y ZIKV es similar en el hospedero vertebrado e invertebrado, mucho de lo que se conoce al respecto se ha estudiado en células de mamífero y mosquito del género *Aedes*, no obstante comprender la interacción entre el mosquito y los virus podría ser la clave para el control de los vectores y la transmisión de estos arbovirus.

1.4.- Ciclo de transmisión de los arbovirus

Las enfermedades transmitidas por mosquitos vectores representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas, causando más de un millón de muertes al año a nivel mundial (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017). Existen cientos de virus transmitidos por artrópodos de los cuales se conocen 30 que causan enfermedades en humanos, a pesar de esa diversidad solo cuatro arbovirus han causado un mayor impacto en la salud humana, estos son los virus que causan las enfermedades de fiebre amarilla, dengue, chikungunya y Zika (Souza-Neto et al., 2019).

Los arbovirus se mantienen en la naturaleza en tres ciclos de transmisión: 1) Ciclo selvático, 2) ciclo epizootico y 3) ciclo urbano, a los que también podemos considerar como estado de preemergencia, emergencia localizada y emergencia, respectivamente (Figura 5) (Palomares et al., 2018).

En el ciclo selvático (estado de preemergencia) el virus circula entre primates no humanos y especies de mosquitos silvestres como *Ae. africanus*, *Ae. furcifer* y *Culex spp.* (Rückert and Ebel., 2018) teniendo otros huéspedes vertebrados como caballos, aves, roedores y otros mamíferos pequeños, algunas de estas especies pueden ser “huéspedes accidentales”, lo que significa que no amplifica el virus y por lo tanto no pueden transmitirlo a un nuevo mosquito vector, aunque la infección en estas especies podría ser mortal (Palomares et al., 2018).

En el ciclo epizootico, los arbovirus están circulando entre vectores zoofílicos como los mosquitos del género *Aedes spp.*, *Culex spp.*, *Sabethes spp.* y *Haemagogus spp.* La expansión de estos arbovirus a zonas urbanas se asocia a factores como: el cambio climático, la globalización, deforestaciones, incremento de la población humana, factores virales (evolución de los virus), la resistencia de los vectores a insecticidas y la

propagación del vector a nuevas regiones geográficas (Palomares et al., 2018; Musso y Gubler., 2016).

Por último, en el ciclo urbano los arbovirus circulan principalmente en *Ae aegypti* y *Ae albopictus*, siendo las especies más cercanas a la población humana (vectores antropofílicos). Las enfermedades por vectores requieren la coexistencia entre el huésped humano, el mosquito vector y el virus tanto en espacio como en tiempo (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017).

Otro factor importante en la dinámica de transmisión es la transmisión vertical, es decir un mosquito hembra transmite el virus a su descendencia; sin embargo se conoce que la transmisión vertical en *Ae aegypti* es poco frecuente (Palomares et al., 2018) de 1000 huevos, 1 está infectado (Herón Huerta et al., Rev. Ciencia 2000).

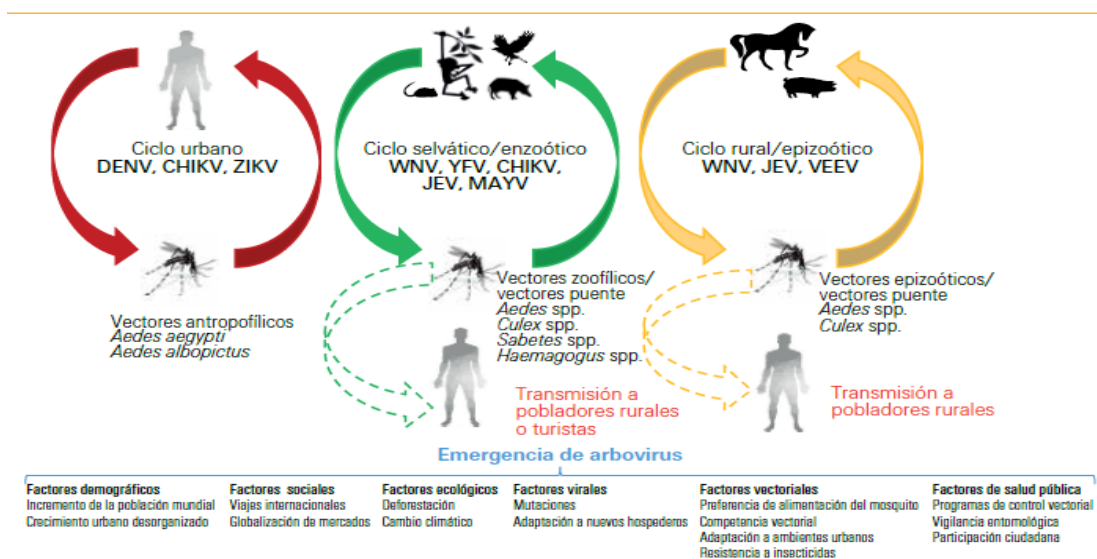


Figura 5. **Ciclo de transmisión de los arbovirus y factores asociados a su emergencia.** Se muestra el ciclo urbano donde el mosquito interactúa directamente con el ser humano y los arbovirus son transmitidos por las especies *Ae aegypti* y *Ae albopictus*. En el ciclo selvático participan mosquitos *Aedes spp* zoofílicos, infectan huéspedes no humanos como caballos, aves y otros mamíferos pequeños. En el ciclo rural, el vector son mosquitos epizoóticos y el hospedero vertebrado son animales de granja. En estos dos últimos ciclos el humano puede ser un hospedero accidental (Pando Robles et al., Rev. Ciencia 2020).

Además de la transmisión vertical, el mosquito *Aedes* presenta una capacidad de adaptación rápida a diferentes tipos de hábitat, al igual que a diversas altitudes y climas,

por lo cual es un vector importante en la transmisión de DENV y ZIKV (Márquez et al., 2018). Los factores asociados a la emergencia de los arbovirus son varios (Figura 5), siendo los más importantes los factores: demográficos, sociales, ecológicos, virales, vectoriales y de salud pública (Pando-Robles et al., Rev. Ciencia 2020).

1.5.- Biología del mosquito vector

El DENV y ZIKV son transmitidos por los mosquitos del género *Aedes* (Familia: *Culicidae*), principalmente por las especies de *Ae aegypti* y *Ae albopictus*. El mosquito *Ae albopictus* es nativo del sudeste de Asia y es un vector secundario para DENV y ZIKV (Laredo et al., 2012) en América. *Ae albopictus* se caracteriza por tolerar temperaturas menores a 25°C (Kraemer et al., 2015), por lo cual su distribución se ha ampliado hasta América del norte y Europa, donde *Ae aegypti* no se encuentra presente y es considerado una especie invasora a nivel mundial (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017).

Ae aegypti (Linneus, 1762) es nativo de África y su propagación hacia diferentes regiones geográficas se debe principalmente a la actividad humana (viajes, comercio, urbanización, cambio climático, etc.). Actualmente su distribución es en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, se encuentra entre los 45° latitud norte y los 35° altitud sur, sobre los 1200 msnm. *Aedes* se caracteriza por su preferencia a climas cálidos entre los 25°C a 40°C y con niveles de precipitación moderada (Neufeldt et al., 2018; Kraemer et al., 2015). En México se encuentra ampliamente distribuido y se estima que el 60% del territorio mexicano presenta condiciones favorables para el desarrollo del mosquito (Kraemer et al., 2015).

Los mosquitos *Ae aegypti* adultos presentan un tamaño entre 3 a 6 mm de largo, presentan grandes cantidades de escamas planas en las alas y el cuerpo, además se caracterizan por tener una coloración oscura y franjas plateadas en las patas y el abdomen (Nelson., 1983). Los mosquitos adultos presentan dimorfismo sexual, es decir, el mosquito macho es de un tamaño menor que la hembra. Las hembras presentan antenas con pelos cortos y escasos en comparación con los machos que presenta antenas con pelos abundantes (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017). Los *Ae aegypti* son insectos de desarrollo holometábolo o también llamada metamorfosis

completa ya que pasan por las etapas de huevo, larva (L1, L2, L3, L4 y L5), pupa y adulto desarrollándose tanto en ambientes acuáticos como terrestres (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017; William., 2000).

Los mosquitos machos se alimentan de néctar de fruta y savia de flores y frecuentemente se encuentran cercanos a las hembras para el apareamiento. En cambio, los mosquitos hembras presentan una alimentación hematófaga y poseen una probóscide que les permite succionar sangre de mamíferos (Dahar and Kumar., 2003). La sangre de los mamíferos tiene un alto contenido de proteínas, principalmente albumina, la cual favorece el desarrollo y maduración de sus huevos (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017). Las hembras presentan diversas estrategias para la búsqueda de alimento, una de ellas son las señales olfativas, como la presencia de CO₂ que es un importante componente de la respiración en los humanos y el olor corporal (sudor) que es otra señal detectada por los mosquitos (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017; Liu et al., 2019). Los patrones de alimentación de las hembras *Ae aegypti* son durante el amanecer y el atardecer (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017).

El ciclo biológico de *Ae aegypti* (Figura 7) puede durar entre 7 y 14 días dependiendo de las condiciones ambientales como la temperatura y la humedad. El ciclo empieza cuando las hembras depositan sus huevos de manera individual en las paredes internas de cualquier recipiente con agua limpia o semi limpia (llantas, floreros, lagos, tambos o barriles, troncos huecos, o cualquier depósito de agua estancada). En promedio, los mosquitos hembra de *Ae aegypti* llegan a depositar entre 100 a 200 huevos dependiendo de la cantidad de sangre que ingieren (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017).

Los huevos de los mosquitos tienen un tamaño aproximado de un milímetro de largo, son inicialmente de color blanco al momento de la puesta, aunque se oscurecen después de algunos minutos. Una vez que los huevos entran en un ambiente acuoso la eclosión ocurre dentro de las primeras 4 horas o hasta 4 días después de la puesta. La eclosión puede variar dependiendo de la temperatura del ambiente, en climas cálidos los huevos pueden desarrollarse en las primeras horas, mientras que en climas fríos puede extenderse hasta una semana (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017; Nelson., 1983). Es importante recalcar que los huevos tienen la capacidad de sobrevivir hasta un

año durante periodos largos de desecación (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017). Posteriormente, los huevos eclosionan dando lugar a formas larvianas que son exclusivamente acuáticas y de respiración aérea.

Las larvas están divididas en tres regiones: cabeza, tórax y el abdomen (Figura 6-A). El abdomen está conformado por 9 segmentos y presentan un par de espiráculos (orificios respiratorios) que están situados en el extremo del sifón dorsal (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017). Las larvas se alimentan principalmente de materia orgánica y microorganismos protistas presentes en el agua por medio de estructuras bucales modificadas conocidas como cepillos bucales (Nelson., 1983). La posición de reposo de las larvas en el medio acuático es casi vertical, poseen un movimiento característico de modo serpenteante, son muy sensibles a la luz y al movimiento por lo que se desplazan al fondo del agua cuando son perturbadas (Nelson., 1986; Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017).

Las larvas pasan por cuatro estadios (L1 a L4) que, se distinguen por el tamaño que van alcanzando, el cual puede variar de 1 mm a 7 mm. El primer estadio larval es la forma que emerge del huevo, luego de uno a dos días de alimentarse, ocurre la muda del exoesqueleto y surge el segundo estadio presentando una coloración más oscura, los primeros tres estadios de larva se desarrollan en un periodo de 3 a 4 días, mientras que el cuarto estadio puede llegar a tardar más tiempo dependiendo de la temperatura y la disposición de alimento (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017). El tiempo aproximado de duración del estadio larval es de entre 5 a 7 días (Nelson., 1986).

Posteriormente, las larvas mudan al estadio de pupa, en este periodo ocurre la mayor transformación que lleva a la formación del adulto y al cambio del hábitat acuoso por el terrestre. El estadio de pupa suele durar entre 2 o 3 días, dependiendo de la temperatura (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017).

En las pupas la cabeza y el tórax constituyen una estructura llamada cefalotórax (Figura 6-B) en la que se destacan las trompetas respiratorias (estructuras tubulares para la respiración) que son colocadas en la superficie del agua para respirar (Carneiro et al., 2017; Rossi et al 2004). Además, las pupas no se alimentan y son sensibles a estímulos externos tales como vibraciones (Rossi et al., 2004).

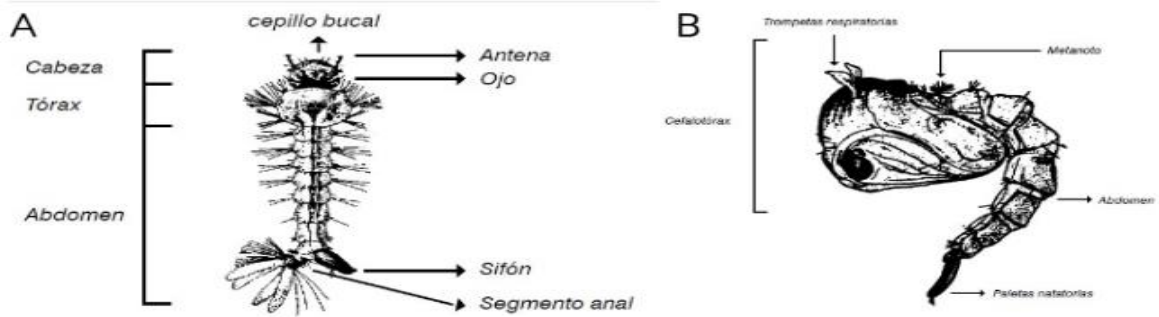


Figura 6. **Morfología de la larva y pupa del mosquito *Ae. aegypti*.** A) El cuerpo de la larva se encuentra dividido en tres regiones: cabeza, tórax y abdomen. El sifón es un orificio que le permite respirar en la superficie del agua. B) La estructura de la pupa se encuentra dividida en la cabeza y el abdomen, las cuales constituyen una estructura llamada cefalotórax. Este es el último estadio acuático y permanece en el agua hasta la emergencia del mosquito adulto (Chouin-Carneiro and dos Santos., 2017).

Al final del estadio de pupa, el adulto emerge lentamente a través de una abertura longitudinal y permanece en reposo sobre la superficie del agua (tensión superficial), tiempo en el cual ocurre el endurecimiento del exoesqueleto y de las alas. En este último estadio ocurren eventos como la reproducción y el desplazamiento (Nelson., 1986; Rossi et al., 2004).

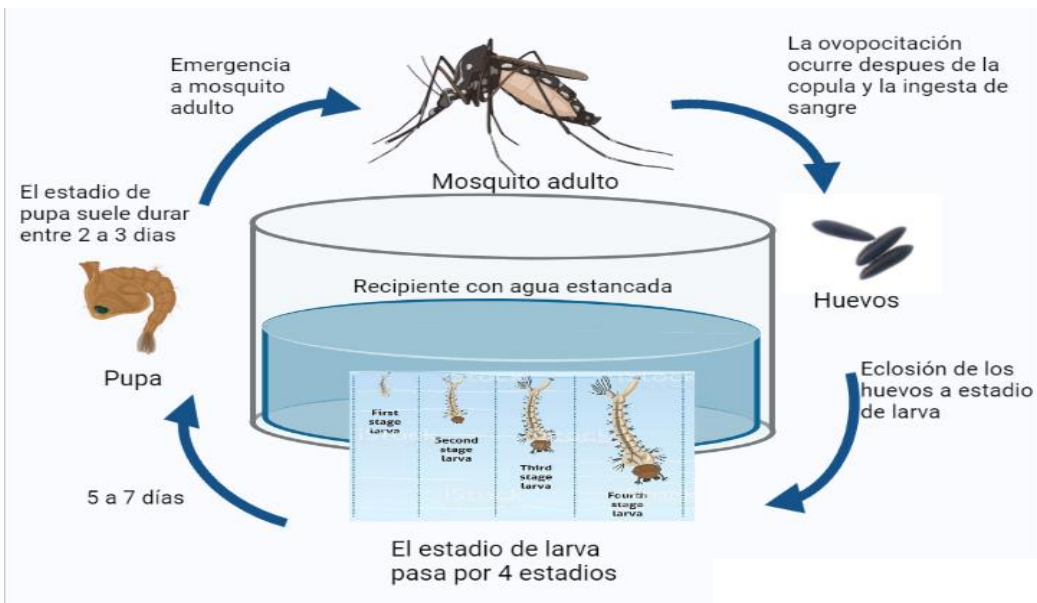


Figura 7.- **Ciclo biológico del mosquito *Ae. aegypti*.** Las hembras depositan sus huevos en las paredes de algún recipiente con agua estancada. Las larvas se desarrollan en el agua donde se alimentan de materia orgánica y microorganismos. En estado de pupa dura entre 2-3 días, hasta emerger a mosquito adulto. Las características biológicas de *Ae. aegypti*, lo hacen un buen vector de DENV y ZIKV.

Los mosquitos adultos pueden llegar a vivir hasta un mes en su hábitat natural y en condiciones favorables para su alimentación.

1.6.- Interacción de los arbovirus con el mosquito vector

Los mosquitos hembra adquieren a los arbovirus durante su alimentación hematófaga de un huésped vertebrado infectado (Cheng et al., 2015). Los arbovirus que van en la sangre succionada ingresan por medio de la probóscide del mosquito hasta llegar al tubo digestivo, donde tiene que atravesar diversas barreras tisulares para transmitirse por medio de la saliva en su siguiente alimentación hematófaga (Franz et al., 2015). Las principales barreras tisulares son: la barrera de infección del intestino medio (BIM), la barrera de escape del intestino medio (BEIM), la barrera de infección de la glándula salival (BIGS) y la barrera de escape de la glándula salival (BEGS), estas barreras pueden variar entre las especies de mosquito e incluso entre las poblaciones (Benette et al., 2002; Franz et al., 2015) (Figura 9).

El intestino medio o tubo digestivo se divide en tres regiones principales: el intestino anterior (IA), el intestino medio (IM) y el intestino posterior (IP) que se extiende hasta el ano. El IM es una región importante para la replicación de DENV y ZIKV, esta región está constituida por una monocapa de células epiteliales, las cuales están rodeadas en el lado apical por una matriz peri trófica (MP) y el lado basal por la lámina basal (Dong et al., 2017) como se muestra en la figura 8. La MP separa las células epiteliales del IM, está formada por una red de fibrillas de quitina, glicoproteínas, mucopolisacáridos y es producida por células de la región anterior del IM. La MP forma poros de 20 nm, es permeable a algunas enzimas digestivas y a los productos de la digestión, tanto DENV como ZIKV ingresan a las células epiteliales a través de las microvellosidades antes de que la MP rodee el bolo alimenticio (Carneiro et al., 2017). El virus llega a la superficie de las células epiteliales del IM e ingresa por endocitosis mediada por receptor, con lo cual los arbovirus escapan de la barrera de infección del intestino medio. La lamina basal (LB) es una estructura delgada que es secretada por las células epiteliales de la superficie basolateral del IM y separa el epitelio intestinal del hemocele. La LB está formada principalmente por colágeno tipo IV, laminina, perlecano y entactina lo que hace que tenga una composición porosa (15 nm de diámetro) que sirve como filtro,

permitiendo el paso de moléculas y evitando el paso de los arbovirus (Passarelli., 2011; Dong et al., 2017). Sin embargo, estas láminas son estructuras dinámicas que se forman y degradan, esto puede crear espacios que permiten la diseminación del virus a la hemolinfa (Franz et al., 2015). La primera barrera de escape del IM está determinada por la LB (Passarelli., 2011), no obstante, existe una ruta alternativa a través de la tráquea (Kraemer et al., 2015).

Después de que el virus atraviesa la BEIM se disemina por la hemolinfa infectando tejidos secundarios como el cuerpo graso, los hemocitos, tejido nervioso, tejido muscular y la GS (Franz et al., 2015). Los hemocitos son las principales células del mosquito que facilitan la amplificación de los arbovirus fuera del intestino (Cheng et al., 2015). Una vez que DENV y ZIKV se han diseminado por los tejidos secundarios del vector, estos llegan a la GS (Franz et al., 2015; Cheng et al., 2015).

Las GSs se ubican en el tórax y se presentan en pares, cada GS consta de tres lóbulos, 2 lóbulos laterales que están unidos al lóbulo medio por un conducto medio conocido como lóbulo medio (Carneiro et al 2017; Franz et al., 2015) (Figura 8). Las GS al igual que el IM están formados por células epiteliales que están rodeadas por la LB y constituye la principal BIGS. Tras la infección de la GS, el virus se replica y se deposita en las cavidades apicales de las células acinares (epiteliales) para ser liberado en la saliva (Palomares et al., 2018), sin embargo no todos los mosquitos podrán transmitir el virus por lo tanto, tendrá que pasar la BEGS.

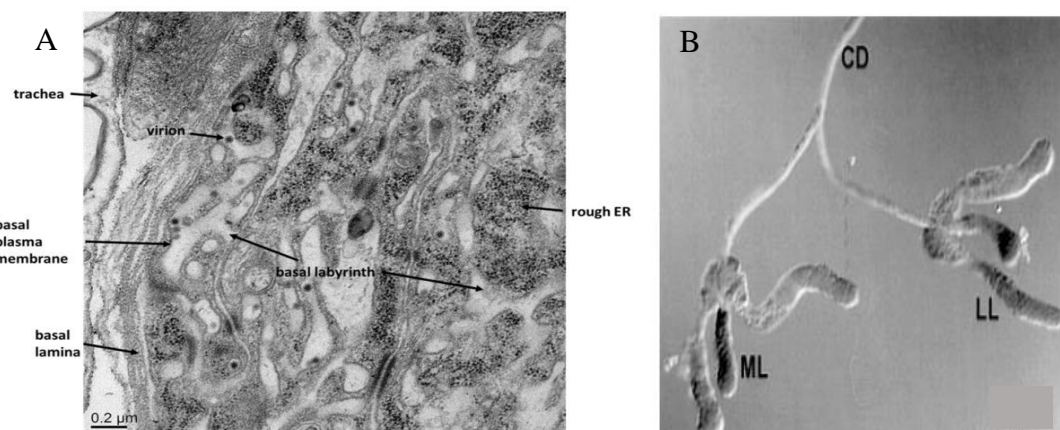


Figura 8. **Estructura del intestino medio y glándula salival del mosquito adulto *Ae aegypti*.** A) El intestino medio está constituido por células epiteliales y una lámina basal, junto al intestino medio se encuentra la tráquea. B) La glándula salival consta de tres lóbulos; 2 lóbulos laterales derecho e izquierdo (ML y LL) y un lóbulo medio, conectados a conducto medio conocido como lóbulo medio (CD).

La saliva producida por las GSs contienen numerosas moléculas anti-hemostáticas que facilitan la adquisición de la sangre, que incluye vasodilatadores como la taquiquininas, anticoagulantes como la trombina e inmunomoduladores (Chisenhall et al., 2014; Dahar et al., 2003). En *Ae aegypti*, se encuentra la proteína Aegyptina (30-kD) que es secretada desde las GSs a la saliva y su principal función es inducir la respuesta inmune en el sitio de la picadura (Chisenhall et al., 2014). Se ha demostrado que la Aegyptina se une al colágeno e inhibe la agregación plaquetaria, lo que facilita obtención de sangre debido a su acción anti-coagulante (Calvo et al., 2007; Cheng et al., 2015).

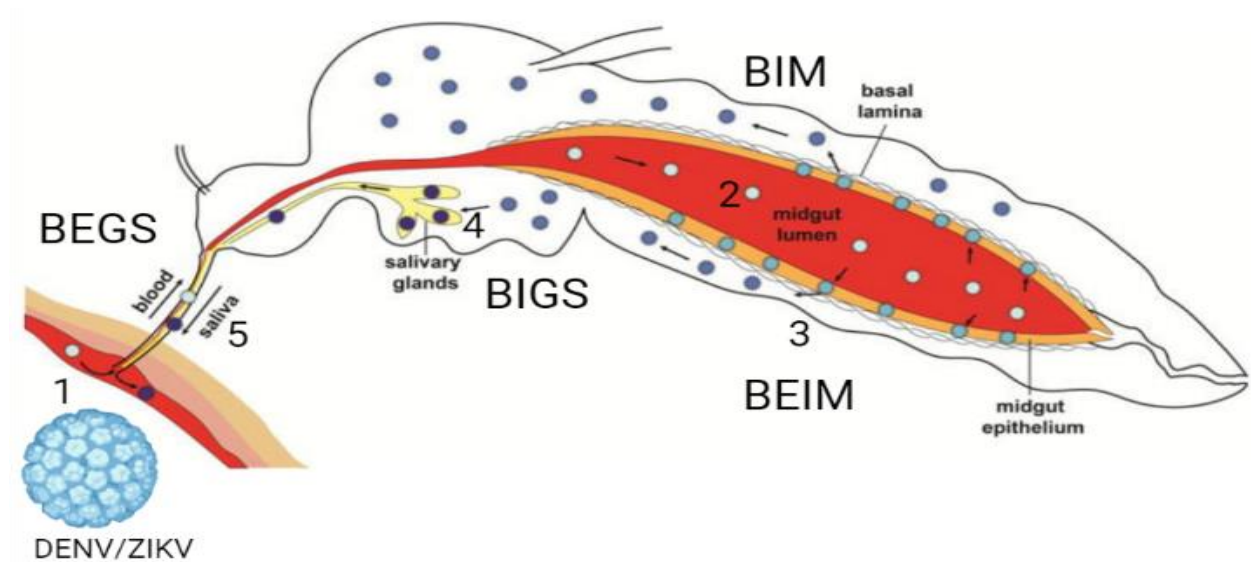


Figura 9.- **Interacción virus-vector y las barreras tisulares del mosquito.** 1) Los mosquitos hembra adquieren el virus durante su alimentación hematofaga, 2) el virus es ingerido junto a la sangre al intestino medio donde se replica en las células epiteliales. 3) Se disemina a la hemolinfa e infecta tejidos secundarios, 4) hasta llegar a la glándula salival donde se replica 5) y es expulsado con la saliva durante su siguiente alimentación hematofaga. El virus enfrenta barreras tisulares que son: la barrera de infección en el intestino medio (BIM), la barrera de escape del intestino medio (BEM), la barrera de infección en la glándula salival (BIGS) y finalmente la barrera de escape de la glándula salival (BEGS). Adaptado de Ruckert et al., 2019.

El tiempo que transcurre desde la alimentación hematofaga hasta la posible transmisión de un arbovirus se conoce como periodo de incubación extrínseca (PIE) y dura aproximadamente entre 3 a 14 días (Quintero et al., 2010; Espinoza et al., 2017). La

duración del PIE varía significativamente entre arbovirus y/o especie del mosquito (Cheng et al., 2015). Además, la temperatura ambiental es otro factor que modula el PIE: en este sentido los mosquitos *Ae aegypti* infectados con DENV a una temperatura de 35°C, presentan un PIE más corto en comparación con una temperatura de 21°C (Palomares et al., 2018).

Durante los procesos de replicación y diseminación en el IM y la GS, el virus pasa por estas barreras tisulares que impiden la replicación del patógeno infectante y el virus sufre varios cuellos de botella, que son reducciones estocásticas en el tamaño de la población viral lo cual ocasiona una reducción en la diversidad genética del virus (Raquin et al., 2017 y Cheng et al., 2015). Estas barreras están formadas por la respuesta inmune del mosquito y son activadas al ser infectados por bacterias, hongos y virus.

1.6.1.- Sistema inmune del mosquito

Cuando un mosquito se infecta con un virus se activa la respuesta inmune humoral y celular, que están reguladas por la activación de cuatro vías de señalización: la vía de Toll, la vía de inmunodeficiencia (IMD), la vía de ARN de interferencia (ARNi), la vía JAK-STAT (Shuzhen et al., 2014), que se encargan de limitar la propagación viral (Figura 10).

En la vía de Toll es importante en la defensa contra bacterias, hongos y virus (Cheng G et al., 2015). La vía inicia con el reconocimiento de ligandos moleculares asociados a patógenos, se da por receptores de reconocimiento de patrones (RRP) como PGRP-SA y SD, que activan a la citosina Saetzle, la cual se une al receptor de Toll y se desencadena la señalización intracelular a través de las proteínas Myd88, Tube y Pelle, que resulta en la fosforilación y degradación de Cactus, un regulador negativo del FT-Rello Relish, que activan la transcripción de genes regulados por la vía de Toll (Palomares et al., 2018; Sim et al., 2014).

La vía de IMD se activa mediante la unión de los ligandos PGRP-LC y -LE, esto desencadena la señalización a través de IMD- FADD, lo que conduce a la división de esta vía. Una parte desencadena la señalización de JNK para activar el factor de transcripción AP1, mientras que la otra da como resultado la fosforilación del factor

Rel2 y su translocación al núcleo (Sim et al., 2014) e induce la transcripción péptidos antimicrobianos que son efectores de la respuesta inmune (Cheng et al., 2015). En mosquitos, la vía de IMD es importante en la defensa contra bacterias y parásitos como *Plasmodium*, además de ser eficiente en las infecciones con DENV (Sim et al., 2014).

La vía JAK-STAT se activa por la unión del ligando no emparejada (Upd) al receptor (Dome), un receptor de citosinas tipo I en vertebrados, que activa las quinasas Hop Janus (JAK) asociadas al receptor que se autofosforilan, posteriormente reclutan y fosforilan el factor de transcripción STAT. Los STAT fosforilados dimerizan y se translocan al núcleo para activar la transcripción regulada por JAK-STAT. Su activación conduce a la generación de diversos péptidos antimicrobianos como gambicina, cecropina y defensina. Además, durante las infecciones por arbovirus en las células Aag-2 derivadas de *Ae aegypti*, se ha observado que aumenta la expresión del factor de transcripción STAT, con lo cual se inhibe la replicación de arbovirus como DENV y el virus del Nilo occidental (Palomares et al., 2018). Por otro lado se conoce que la cooperación entre la vía de Toll y la vía de JAK- STAT mejoran la resistencia a la infección de ZIKV en *Ae aegypti* (Palomares et al., 2018).

Finalmente, la vía de los ARN pequeños no codificantes que comprenden a los de interferencia (ARNi), micro ARN (miARN) y ARN que interactúa con piwi (ARNpi), son importantes en la respuesta contra virus. Principalmente, la vía de ARNi limita la replicación viral en el IM de *Aedes* (Cheng et al., 2015), en la célula del mosquito los ARNip virales, se generan desde un ARNdc, que es el intermediario replicativo en virus de RNA. Posteriormente, Dicer-2 y R2D2 reconocen ARNdc, quienes se encargan del procesamiento del ARNdc para originar los ARNip de cadena sencilla de un tamaño entre 20 y 23nt. Después, los ARNi se incorporan al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) que los dirige a su ARN blanco viral, induciendo la inhibición de la traducción o la degradación del ARN viral, con lo cual se limita la replicación viral (Cheng et al., 2015).

Además de las vías de respuesta inmune a patógenos antes mencionados, la microbiota intestinal que está constituida por bacterias, hongos y protozoos, puede modular la respuesta inmune del mosquito e influir en la CV ante patógenos (Dennison et al., 2014; Hegde et al., 2015). Sin embargo, la composición de la microbiota intestinal

de los mosquitos varía ampliamente según la especie del mosquito, el origen geográfico, el nicho ecológico y la fuente de alimento (Dennison et al., 2014; Hegde et al., 2015). Por ejemplo, *Wolbachia* una bacteria (Familia *Rickettsiaceae*) intracelular Gram negativa presente en los mosquitos *Ae aegypti*, confiere resistencia a las infecciones por algunos arbovirus como el DENV, CHIKV y virus de fiebre amarilla (Cheng et al., 2015; Hegde et al., 2015). La microbiota llega a controlar las infecciones por patógenos mediante la activación de las vías de Toll e IMD (Dennison et al., 2014).

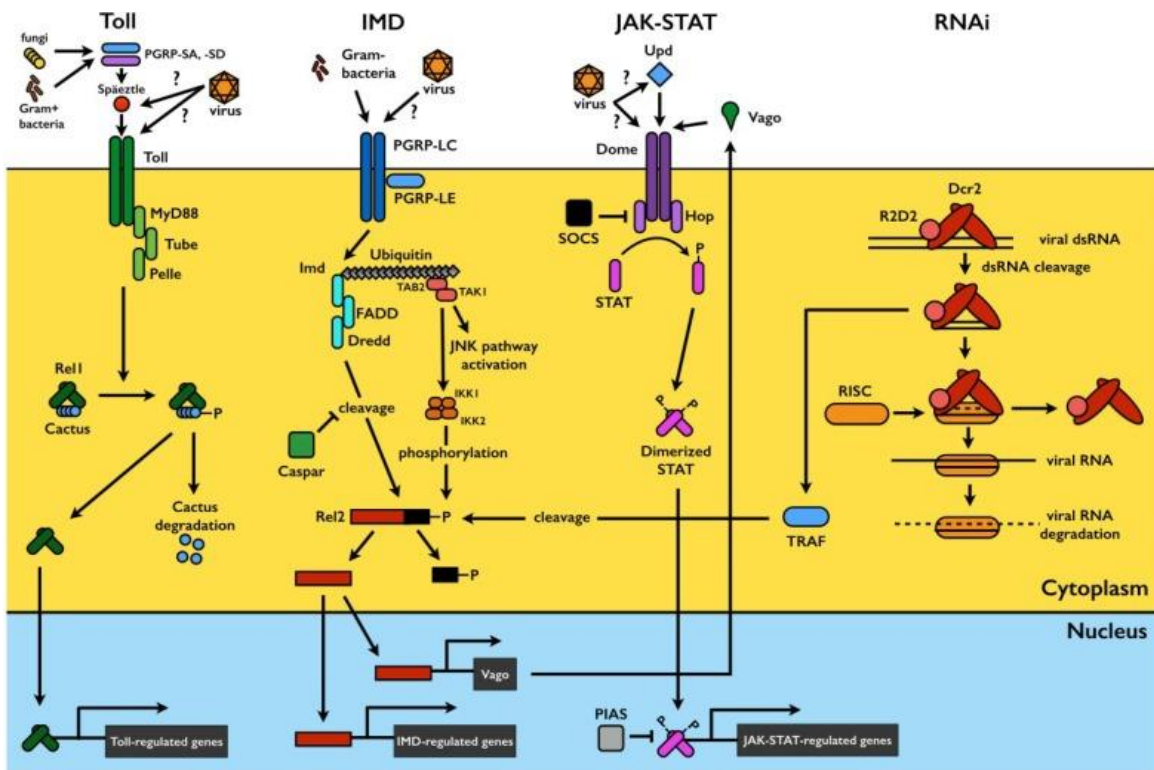


Figura 10.- **Sistema inmune del mosquito.** Los mosquitos han desarrollado estrategias antivirales para restringir la replicación viral. Los mecanismos antivirales como la ARNi, la vía de Toll, IMD y JAK-STAT trabajan en conjunto para evitar la replicación viral e incluso degradarlo. La microbiota intestinal del mosquito, está implicada en conjunto a estas vías de señalización para restringir las infecciones virales.

Una vez que un mosquito se infecta con un arbovirus, el mosquito permanece infectado y puede transmitir el virus durante toda su vida (Cheng et al., 2015). Además de la respuesta inmune que activa el mosquito frente a la infección, la temperatura y la

humedad son variables que influyen en el ciclo de vida del mosquito e incluso en la infección con virus, lo que hace que sea un factor fundamental en la transmisión de algún patógeno, en una región determinada (Helmerson et al., 2014; Márquez et al., 2018).

Sin embargo, las infecciones por arbovirus pueden producir cambios a nivel fisiológico y de comportamiento en el mosquito vector (Palomares et al., 2018). Por ejemplo, *Ae aegypti* infectados con DENV-2 muestran cambios en su comportamiento, como es el aumento en la frecuencia de ingesta sanguínea (Neufeldt et al., 2018).

1.7.- Capacidad vectorial y competencia vectorial

La transmisión de los arbovirus es compleja, está determinada por las interacciones entre el virus, vector y el huésped. La capacidad vectorial está definida como la capacidad de una población de mosquitos para transmitir un patógeno a un hospedero (Lozano et al., 2019) y está determinada por factores: intrínsecos y extrínsecos (Figura 11). Los factores extrínsecos más importantes son la temperatura, la humedad, el desarrollo del mosquito, la transmisión del patógeno, así como la interacción con el huésped vertebrado (Anderson and Rico-Hesse., 2006).

Los factores intrínsecos al mosquito se conocen como la competencia vectorial (CV) y representa la capacidad del mosquito para infectarse, replicar y transmitir un patógeno (interacción virus-vector) (Quintero et al., 2010). La CV de los arbovirus se ve afectada por factores genéticos, la respuesta inmune del vector, las barreras tisulares, así como la interacción con el patógeno y la microbiota (Franz et al., 2015; Souza- Neto et al 2019) (Figura 11). Es importante mencionar que la CV hace parte de la capacidad vectorial del mosquito para transmitir un patógeno.

Los factores genéticos pueden variar ampliamente entre especie y poblaciones de mosquitos, además los arbovirus se adaptan constantemente para superar las barreras de infección y de escape en los tejidos del mosquito vector, con lo cual se mantienen en constante co-evolucionando (Franz et al., 2015). Para que un mosquito sea considerado un vector efectivo, debe tener una alta competencia vectorial y una elevada capacidad vectorial (Quintero et al., 2010).

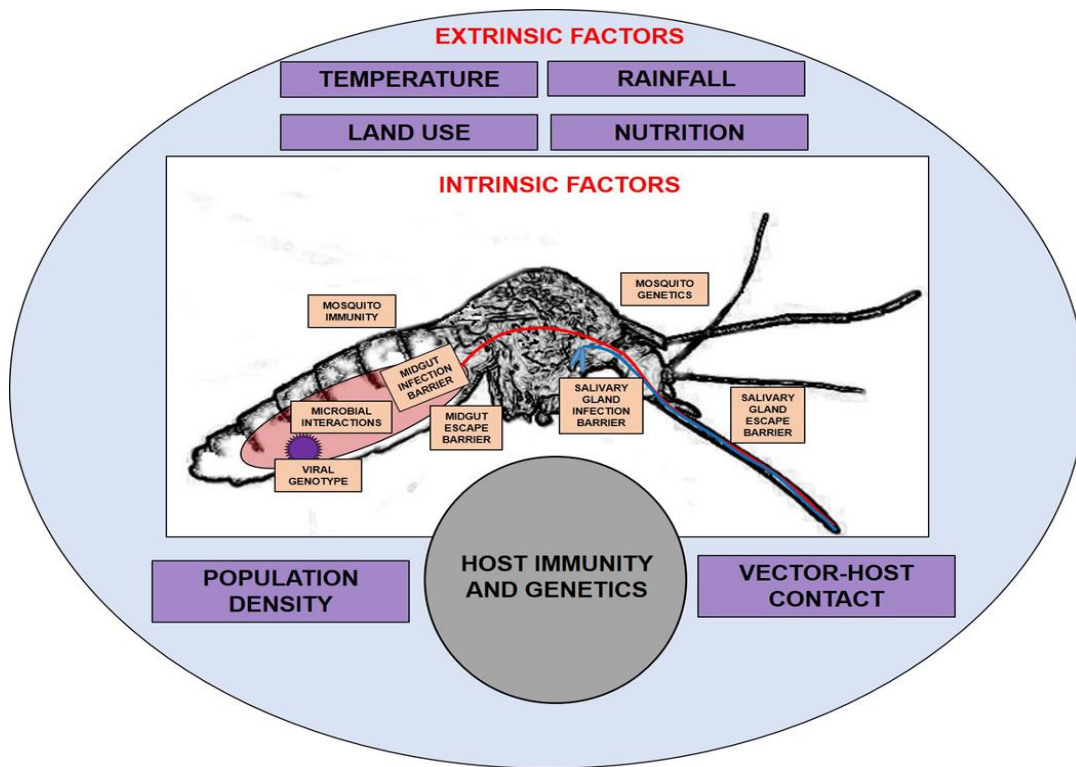


Figura 11.- **Factores que influyen en la competencia vectorial de los mosquitos Aedes.** La competencia vectorial comprende la interacción entre el virus y el vector, sin embargo, está determinada ampliamente por factores extrínsecos e intrínsecos. Entre los factores extrínsecos, la temperatura, la humedad y la alimentación, influye en la capacidad de adquirir y transmitir algún patógeno, mientras que en los factores intrínsecos se encuentran las barreras inmunes y tisulares, los cuales podrían impedir la replicación y diseminación del virus.

2.- Antecedentes

Existen pocos estudios donde se ha evaluado la CV de los mosquitos *Ae aegypti* y *Ae albopictus* en México. Recientemente, se ha reportado que los mosquitos *Ae aegypti* provenientes de distintas regiones de nuestro país presentan una CV mayor para transmitir ZIKV que los *Ae albopictus* de las mismas regiones, debido a que se han observado diferencias en el porcentaje de infección a nivel de la GS (BIGS) (Lozano et al., 2018; Garcia-Luna et al., 2018). También, se ha demostrado que la CV para DENV varía dependiendo del area geográfica, se ha observado que los mosquitos *Ae aegypti* de México infectados con DENV presentan mayor CV en comparación con los *Aedes* de EUA (Benette et al., 2002). En este sentido, se ha publicado que existe una mayor CV en los mosquitos *Aedes* colectados en el sur de México comparados con las regiones del norte del país (Garcia-Luna et al., 2018).

La variación en la CV de las diferentes poblaciones de mosquitos, pone en evidencia que la CV tiene un comportamiento complejo, debido a que depende de la interacción con el vector, el patógeno y las barreras de infección (Souza-Neto et al., 2019).

Por ejemplo, los mosquitos *Ae aegypti* de Poza Rica, son capaces de transmitir las cepas Americana, Africana y Asiática de ZIKV, aunque mostraron una mayor CV para el linaje Africano (Weger-Lucarelli et al., 2016). Existe evidencia de que *Ae aegypti* es capaz de adquirir simultáneamente CHIKV y ZIKV, al realizar dos alimentaciones en un mosquito, la primera con CHIKV y después con ZIKV se observa que mejora la infección y transmisión de ZIKV (Magalhaes et al. 2018). La co infección en un mosquito podría causar algún cambio en la infección y la transmisión de alguno de los virus (Souza-Neto et al., 2019).

En nuestro laboratorio, estandarizamos las condiciones de infección para realizar estudios de CV en *Ae aegypti* (F1) de Acapulco, Guerrero con el virus ZIKV y usando como control a una población *Ae aegypti* cepa *Rockefeller* (cepa de mosquitos adaptados a condiciones de laboratorio). Encontramos que la cepa Rockefeller tiene una CV de 96.2% similar a la reportada por otros autores y que la cepa Acapulco presenta una CV de 92% (Sánchez et al., 2019). Además, en *Ae aegypti* de Guadalajara, Jalisco infectados con ZIKV presenta una CV del 93.1% (Elizondo et al., 2019).

En resumen, hace falta mayor investigación sobre la CV en los mosquitos del género *Aedes* provenientes de distintas regiones de México, esto es importante para contar con un mapa de riesgo entomológico de transmisión de los diferentes arbovirus a nivel nacional y posteriormente establecer medidas de control de la población del mosquito vector y por lo tanto disminuir la transmisión de estos arbovirus.

3.- Justificación

México es considerado un país endémico para DENV, ZIKV y CHIKV. Sin embargo, en el estado de Morelos, la secretaria de salud (DGE, 2019) reportó un aumento en el número de casos por DENV (con 1,344) y ZIKV (con 544) en el 2019. Los municipios más afectados son Cuernavaca, Cuautla, Yautepec, Puente de Ixtla, Jojutla y Zacatepec.

Dado que la competencia vectorial para cada arbovirus no es específica y además varía de acuerdo al origen geográfico del mosquito, en este trabajo, se propone el estudio de la competencia vectorial para transmitir DENV y ZIKV en el mosquito *Ae aegypti* proveniente de Puente de Ixtla, Morelos.

Al comparar la CV de DENV y ZIKV en un estado donde no se ha evaluado la CV, podría proporcionar información sobre la capacidad de los mosquitos de Morelos para transmitir estos virus.

4.- Hipótesis

La competencia vectorial de los mosquitos *Ae aegypti* de Puente de Ixtla, Morelos, es diferente para DENV y ZIKV.

5.- Objetivo

Evaluar la competencia vectorial de los mosquitos *Ae aegypti* provenientes de Puente de Ixtla para transmitir DENV y ZIKV de manera individual.

5.1.- Objetivos específicos

- Determinar la carga viral en el intestino medio y la glándula salival de los mosquitos infectados con DENV.
- Determinar la carga viral en el intestino medio y la glándula salival de los mosquitos infectados con ZIKV.
- Comparar la competencia vectorial del mosquito *Ae aegypti* de Puente de Ixtla para la transmisión del DENV y ZIKV.

6.- Materiales y métodos

6.1.- Propagación de DENV y ZIKV

El DENV serotipo 2 se propagó en células C6/36 (células del intestino de *Ae albopictus*), las cuales se mantuvieron en medio L-15 suplementado con 10% de triptosa, 8% de SFB y 20 µg/µl de ciprofloxacino. La propagación se realizó en un cultivo de C6/36 al 80% de confluencia en cajas de cultivo 25 cm² y se mantuvieron en incubación a 28°C por 5 días. Posteriormente se colectó el cultivo de células infectadas y se centrifugó a 1000 rpm, para clarificar el sobrenadante. En el caso de ZIKV, se utilizaron sueros de pacientes infectados con el virus en México de los cuales se aisló ZIKV en cultivos de células VERO.

6.2.- Titulación viral de DENV y ZIKV

La titulación de DENV y ZIKV se realizó en la línea celular VERO (células epiteliales del riñón de un mono verde africano *Chlorocebus aethiops*), se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, 20 µg/µl de ciprofloxacino y 2 mM de L-Glutamina. Se mantuvieron a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂.

La titulación viral se realizó por el método de placas líticas, para eso se sembraron 80,000 células VERO por pozo en una placa de 24 pozos y se incubaron a una temperatura de 37°C con un 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente se realizaron diluciones del virus en base 10⁻ usando medio DMEM sin suplementos (450 µl de medio DMEM y 50 µl de ZIKV).

Para iniciar la infección de las células se retiró el medio de crecimiento en el que se encontraban las células, se realizaron dos lavados con PBS y en cada pozo de la placa se agregó 250 µl de las diluciones realizadas con el virus, se incubó la placa infectada con ZIKV/DENV durante 90 minutos a una temperatura de 37°C, tiempo donde se lleva a cabo la absorción viral, se retiró el inoculo viral, se realizaron dos lavados con PBS y se agregaron 500 µl de DMEM con 3% de carboximetil-celulosa y se incubaron a una temperatura de 37°C por 6 días.

Después de los 6 días de incubación, se retiró la carboximetil-celulosa y se realizaron varios lavados con PBS para retirar la carboximetil-celulosa de cada pozo. Después, se fijaron las células con 100% de metanol por 60 min en agitación. Se realizaron dos

lavados con PBS y se tiñeron con 1% de cristal violeta por 60 min. Finalmente, se retiró el exceso de cristal violeta con agua y se contaron las placas para conocer el título viral. El resultado se expresa como unidades formadoras de placa (UFP) por mililitro.

$$\text{UFP} = \frac{\text{Número de placas observadas}}{\text{Factor de dilución}}$$

6.3.- Crecimiento y mantenimiento de los mosquitos *Ae aegypti* de Puente de Ixtla

Los huevos de los mosquitos *Ae aegypti* provenientes de Puente de Ixtla, Morelos fueron proporcionados por el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades del municipio de Jojutla, Morelos (CENAPRECE), los cuales fueron obtenidos por medio de ovitrampas.

Se inició la colonia de *Ae aegypti* (Puente de Ixtla) en el insectario del CISEI-INSP. La eclosión de los huevecillos se realizó con agua corriente, previamente calentada por 5 minutos a una temperatura de 27°C, se colocaron las tiras con los huevos de los mosquitos y después de las 24 horas aproximadamente, se obtuvieron las primeras larvas.

Las larvas se mantuvieron en tinas con agua corriente a una temperatura de 27° C y se alimentaron con una combinación de 100 gr de extracto de levadura, 100 gr de albumina y 100 gr de croqueta para conejo, mezclada con 100 ml de H₂O y posteriormente esterilizada. El agua donde se encontraban las larvas se cambió todos los días y se agregó de 1 a 2 ml de alimento dependiendo del tamaño de las larvas. Al obtener las pupas, estas fueron colectadas y colocadas en recipientes con mosquitero para la emergencia de los adultos.

Los mosquitos adultos son alimentados con una solución estéril de sacarosa al 10% y se mantuvieron con un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad a una temperatura de 27°C y 60% de humedad (Figura 12), hasta la alimentación con sangre.

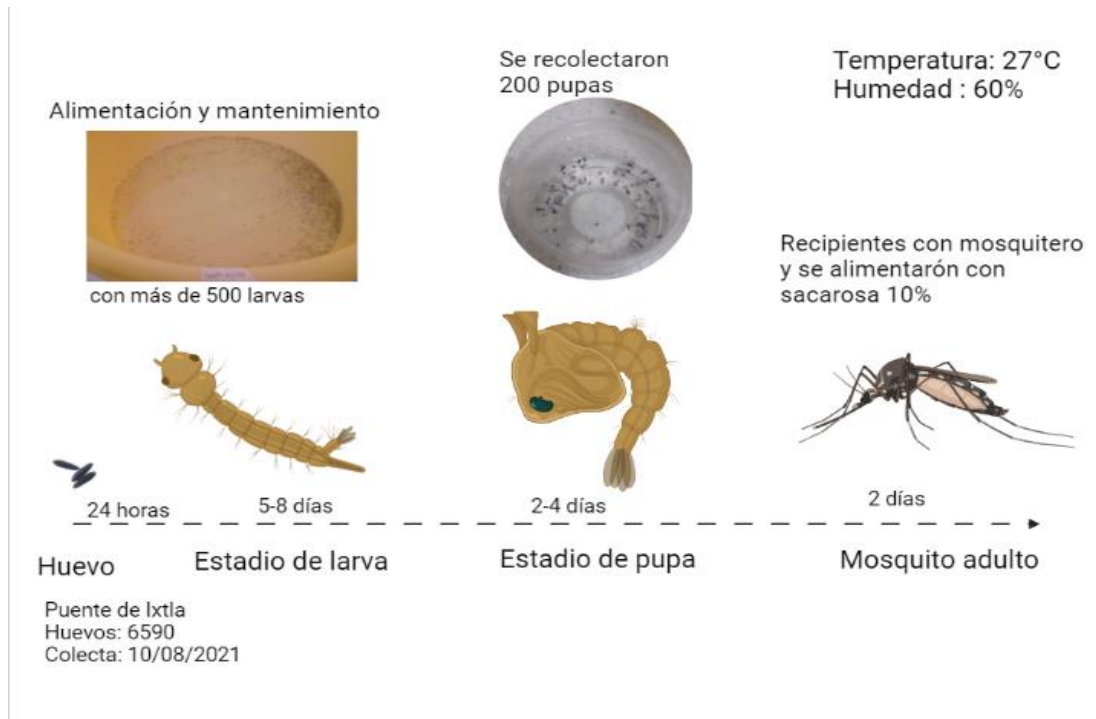


Figura 12.- **Crecimiento de la colonia *Ae aegypti* (F1) de Puente de Ixtla.** La eclosión de huevos se realizó con agua a una temperatura de 27°C. Las larvas se mantuvieron en tinas con agua y se alimentaron con 1 a 1.5 ml según el tamaño de la larva. Las pupas se colectaron y fueron colocadas en recipiente con mosquitero hasta su emergencia a adulto.

A partir de las papeletas con aproximadamente 6590 huevos, se obtuvieron 500 ejemplares, de los cuales se obtuvieron los mosquitos adultos y posteriormente se realizaron las infecciones con los virus.

6.4.- Infección de mosquitos hembras con DENV y ZIKV

La infección de los mosquitos adultos con el virus DENV y ZIKV se realizó por medio de la alimentación con sangre (Figura 13). La alimentación de las hembras se realizó a los 7 y 8 días pos-emergencia, se realizó una mezcla de 1:1 con sangre y virus (1×10^6) con un alimentador artificial de vidrio estéril y cubierto con parafilm, se conectó por medio de mangueras a un alimentador artificial, el cual cuenta con un circuito de agua que mantiene la sangre a una temperatura de 37°C, la alimentación duro entre 45 a 50 minutos. Una vez terminada la alimentación y contando con un gran número de

mosquitos alimentados, se dividió en dos grupos diferenciando los alimentados con DENV y con ZIKV. Se dejaron con un algodón con sacarosa al 10%.

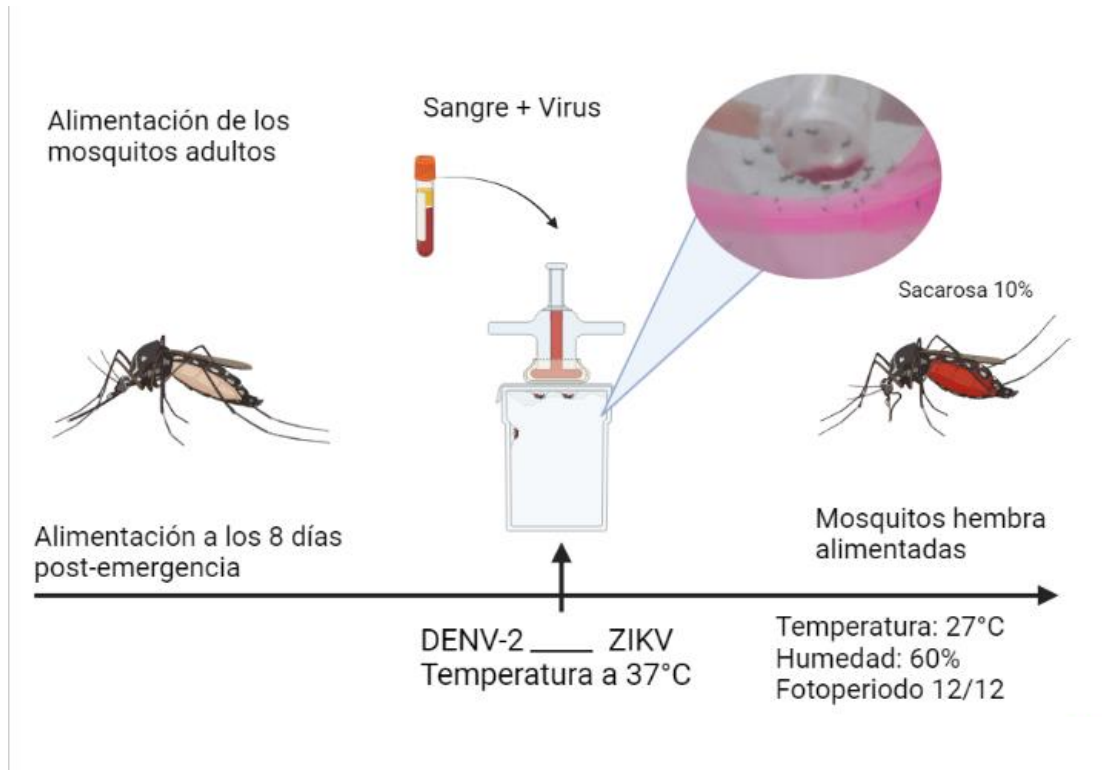


Figura 13.- **Infección de los mosquitos hembra con DENV y ZIKV.** Las infecciones se realizaron a los 7 a 8 días después de la emergencia a adultos. Se utilizó un alimentador de vidrio (estéril), se colocó parafilm en la parte de abajo y se agregó la sangre con el virus. El alimentador artificial mantuvo la sangre a 37°C por medio de la circulación de agua a esa temperatura. Las hembras que se alimentaron se mantuvieron con sacarosa al 10% hasta su uso experimental.

6.5.- Extracción del intestino medio y la glándula salival.

A las hembras alimentadas con DENV y ZIKV, se les realizó las disecciones del IM y la GS a los 4, 7 y 14 días post-infección (dpi). Los mosquitos fueron anestesiados a una temperatura de 4°C y posteriormente se extrajo el IM y la GS con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Los tejidos se colocaron en tubos eppendorf (de 0.6 µl) con 150 µl de ADN/RNA lysis buffer y fueron almacenados a una temperatura de 4°C hasta su análisis. En la figura 14, se muestran el IM y la GS que se extrajeron de los mosquitos infectados.

De las disecciones, se obtuvo un aproximado de 85 mosquitos hembra que se alimentaron con sangre mezclada con el virus de los cuales, se obtuvieron 30 mosquitos infectados con DENV y 55 mosquitos con ZIKV. Posteriormente los tejidos fueron homogeneizados de manera individual con un Bio-vortex (Daigger) y se realizó la extracción del ARN viral.

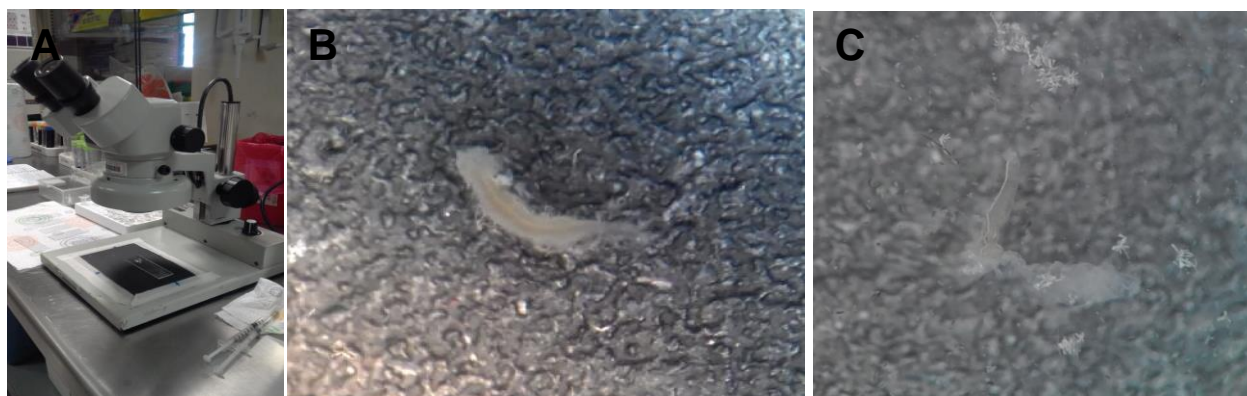


Figura 14.- **Disección de tejidos de los mosquitos *Ae aegypti* infectados con DENV y ZIKV.** A) Se observa el Microscopio estereoscópico con el cual se realizaron las disecciones de IM y GS de *Ae aegypti* infectados con DENV y ZIKV. B) Intestino medio. C) Glándula salivales, obtenidos a los 4 dpi, 7 dpi y 14 dpi.

6.6.- Extracción de ARN viral

La extracción del ARN viral se realizó con el kit de QIAamp Viral RNA Mini Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y pureza del ARN se determinó usando el NanoDrop 1000 (Thermo Scientific NanoDrop Lite). Para analizar la CV en los tejidos de los mosquitos se realizaron pools con el ARN extraído. Los pools se realizaron con 2 muestras para DENV y 3 muestras para ZIKV, de esta manera se optimizaron los reactivos y se disminuyó el número de muestras a analizar.

6.7.- Reacción de retro-transcriptasa (RT)

La síntesis de cDNA se realizó con el kit de *Thermo Scientific* Revert Aid H Minus First strand cDNA Synthesis Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de RT se llevó a cabo con 2 μ l de RNA, 0.5 μ l de Random hexamer primer (100 μ M), ajustando a un volumen final de 12 μ l con H₂O libre de nucleasas. Después se realizaron

incubaciones a diferentes temperaturas con ayuda de un Thermo-block. Las incubaciones fueron 5 min a 65°C, 60 min a 42°C y a 70°C por 5 min para detener la reacción de RT. Las muestras se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta su uso.

6.8.- Detección de DENV y ZIKV mediante RT-PCR

La reacción de qPCR para la detección de DENV y ZIKV se realizó en el termociclador Rotor- Gene Q (QIAGEN), utilizando SYBR Green Supermix de la marca Bio-Rad iTaq Universal y oligonucleótidos específicos para DENV y ZIKV (Tabla 1) y el cDNA de cada muestra a analizar en un volumen final de reacción de 20 µl.

Tabla 1. **Oligonucleótidos específicos para S7, DENV y ZIKV.** Para realizar el RT PCR se utilizaron oligos específicos para S7, DENV y ZIKV para detectar la presencia de estos virus en los tejidos de los mosquitos a analizar.

Nombre	Secuencia 5'- 3' (10 p/mol)	longitud	Región
S7	Rv- TCG TGG ACG CTT CTG CT-	17 pb	S7
	Rw – ACA AAT CGG CCA G-	13 pb	
DENV	Rv- TGC TGT TGG TGG GAT TGT TA	20 pb	NS5
	Fw- CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AA	23 pb	
ZIKV	F- CAG CTG GCA TCA TGA AGA AYG	21 pb	NS4B
	R- CAC YTG TCC CAT CTT YTT CTC C	22 pb	

Tabla 2. **Condiciones para RT-PCR de S7, DENV y ZIKV.** Se utilizaron diferentes condiciones para realizar el qPCR, según el virus.

S7	DENV	ZIKV
Hold: 95°C x 10 min. Cycling: 95°C x 10 seg. 70°C x 40 seg 72°C x 50 seg.	Hold: 95°C x 10 min Cycling: 95°C x 15 seg 61°C x 30 seg 72°C x 30 seg	Hold: 95°C x 10 min Cycling: 95°C x 15 seg 55°C x 30 seg 72°C x 30 seg
	Melt: 62°C x 90 seg. 95°C x 5 seg.	Melt: 72°C x 90 seg 95°C x 5 seg
40 ciclos	45 ciclos	45 ciclos

6.9.- Curva estándar para la cuantificación de DENV y ZIKV

Se realizó una curva estándar con el gen endógeno S7, ya que no presenta cambio en su expresión a lo largo del tiempo de la infección (Figura 15). La cuantificación de DENV y ZIKV se realizó de manera relativa con respecto a S7 de *Aedes*, para ello, se realizó una curva estándar utilizando diluciones 1:4 con cDNA para los 4, 7 y 14 días. En la corrida de estandarización se incluyó un control de no templado (NTC) y un control positivo. El mix de reacción consistió en SYBR Green, oligonucleótidos de S7 y H₂O. El RT-PCR se corrió por duplicado con las condiciones antes mencionadas (Tabla 2) en un volumen final de 20 µl por muestra. En la figura 15 se observa que se recorre el CT de las muestras de manera dependiente de la dilución y la curva Melt nos permite observar que tenemos un solo producto de amplificación.

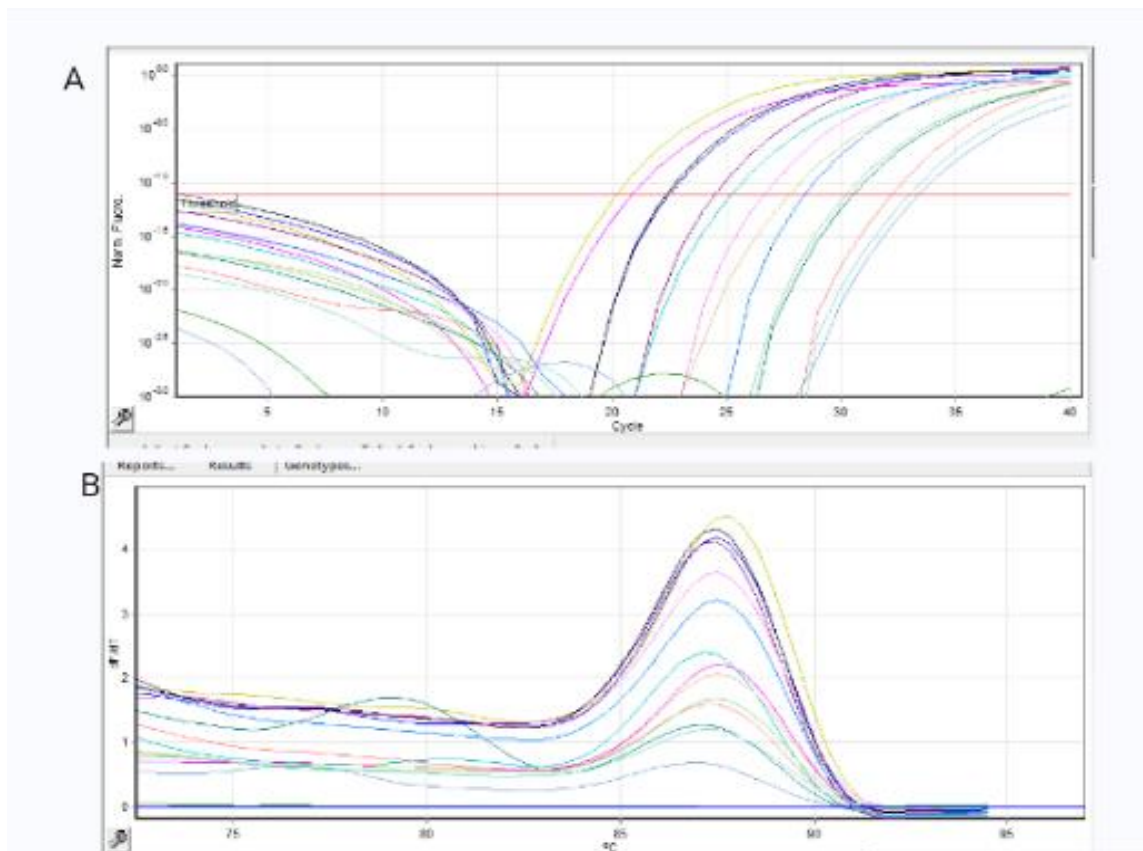


Figura 15. **Ciclos de amplificación en la qPCR (S7).** En el eje “X” se muestran los ciclos de amplificación (Ct) y la temperatura, y en el eje “Y” representa la concentración de amplificación. A) Análisis de Cycling A. Green (Threshold= 0.0788) y B) el análisis de la curva Melt.

Los resultados obtenidos de las mediciones de cada dilución de S7 fueron utilizados para el diseño de una curva estándar. Posteriormente, con ayuda del equipo se calculó la fórmula de la curva relativa (Figura 16) que se importó a las qPCRs de DENV y ZIKV para su cuantificación relativa. Esta curva estándar presenta una eficiencia de 0.92 y una R^2 de 0.97024 (Threshold= 0.0788). La curva estándar de S7 nos permitió conocer la cuantificación relativa de DENV y ZIKV en los tejidos del mosquito.

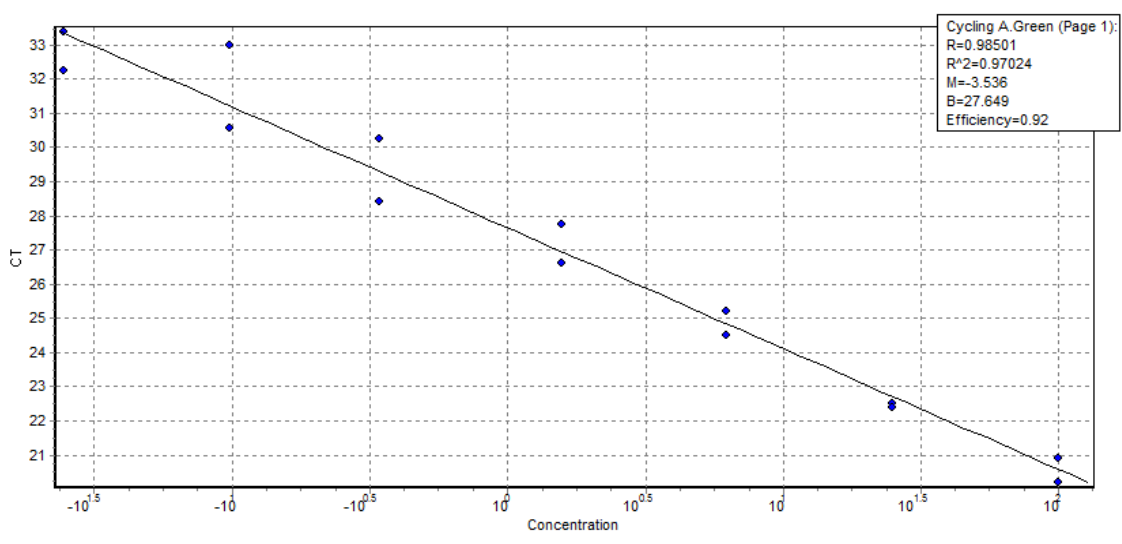


Figura 16. **Curva estándar (S7)**: Resultados obtenidos del RT-PCR, en el eje X representa en número de copias de cada concentración obtenida de las diluciones. En el eje Y es la CT, obteniendo una R^2 : 0.98 y una Eficiencia de 0.92.

6.10.- Análisis estadísticos

La tasa de infección se calculó con el número de mosquitos positivos en el intestino medio entre el número total de mosquitos analizados. La tasa de transmisión se determina como el número de mosquitos positivos en la glándula salival entre el número total de mosquitos analizados.

Se utilizó el programa de GraphPad Prism 7 para realizar el análisis estadístico y la construcción de las gráficas. Todos los análisis se realizaron con 2way ANOVA, los datos se procesaron con un intervalo de confianza del 95% y los valores con una $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7.- Resultados

7.1.- Los mosquitos *Ae aegypti* de Puente de Ixtla, Morelos presentan infecciones con DENV y ZIKV a partir de los 4 dpi

Los *Ae aegypti* de Puente de Ixtla, Morelos (F1) fueron infectados con DENV y ZIKV después de los 8 días post-emergencia; la infección y transmisión de DENV y ZIKV se analizó mediante RT-qPCR en el IM y la GS a los 4, 7 y 14 días. Se observó que los *Ae aegypti* infectados con DENV (Figura 17) mostraron un pico máximo de infección a los 4 dpi en IM y GS, posteriormente se observó una disminución de DENV a los 7 dpi y a los 14 dpi, siendo estadísticamente significativa la carga viral entre los 4 y 7 dpi ($P < 0.0001$), así como entre los 4 dpi y 14 ($P < 0.0001$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los 7 y 14 dpi ($P = 0.4785$). Lo anterior sugiere que DENV es capaz de diseminarse e infectar las GSs de *Ae aegypti* de Puente de Ixtla en un tiempo corto. Aunque a los 14 dpi se observan bajas concentraciones del virus no indica que el mosquito ya no pueda transmitir el virus ya que un mosquito una vez infectado con algún arbovirus será portador por todo su ciclo de vida (Cheng et al, 2015).

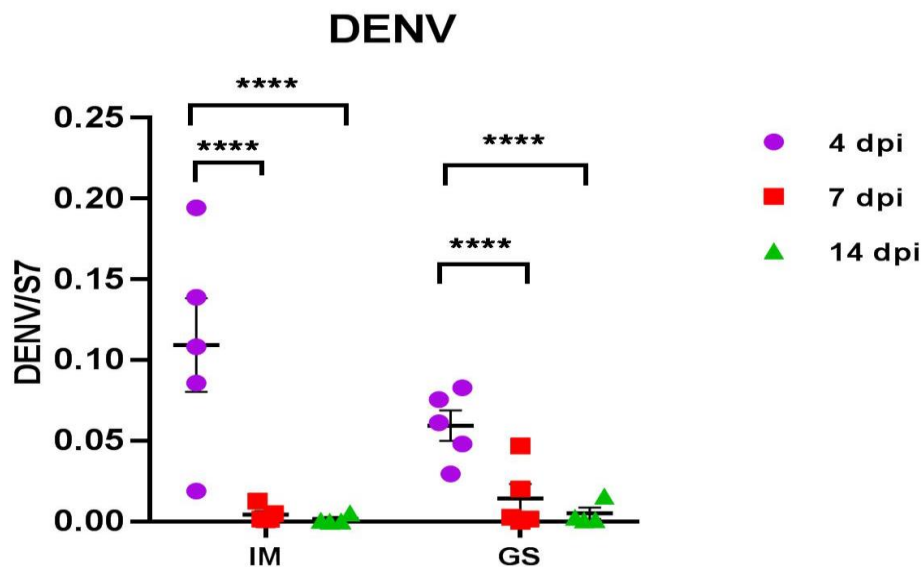


Figura 17. **DENV presenta infecciones a partir de los 4 dpi en *Ae aegypti* de Puente de Ixtla.** En la gráfica se observa la cuantificación relativa con DENV en el IM y GS a los 4, 7 y 14 dpi. Observando un pico máximo de infección a partir de los 4 dpi y una disminución de la carga viral a los 7 y 14 dpi ($P < 0.0001$). La gráfica muestra los datos de tres experimentos independientes y el análisis de 3 polos de mosquitos infectados. Análisis 2way ANOVA. Eje X, IM (intestino medio), GS (glándula salival), eje Y, valor de concentración.

En cambio, la infección de los mosquitos *Ae aegypti* de Puente de Ixtla con ZIKV (Figura 18) es baja en comparación con DENV (Figura 17). La presencia de ZIKV en el IM y la GS se observa desde los 4 dpi aunque con baja carga viral respecto a la infección con DENV (Figura 17). En el IM el pico de replicación ocurre a los 7 dpi, en comparación con la GS que se observa a los 4 dpi. Sin embargo, no se presentan una diferencia significativa ($P=0.5405$), al realizar múltiples comparaciones no se observaron diferencias significativas entre los días analizados y entre los tejidos. La diferencia en la infección entre ZIKV y DENV podría sugerir una dificultad de ZIKV en atravesar las barreras tisulares; por lo cual se requiere mayor investigación al respecto.

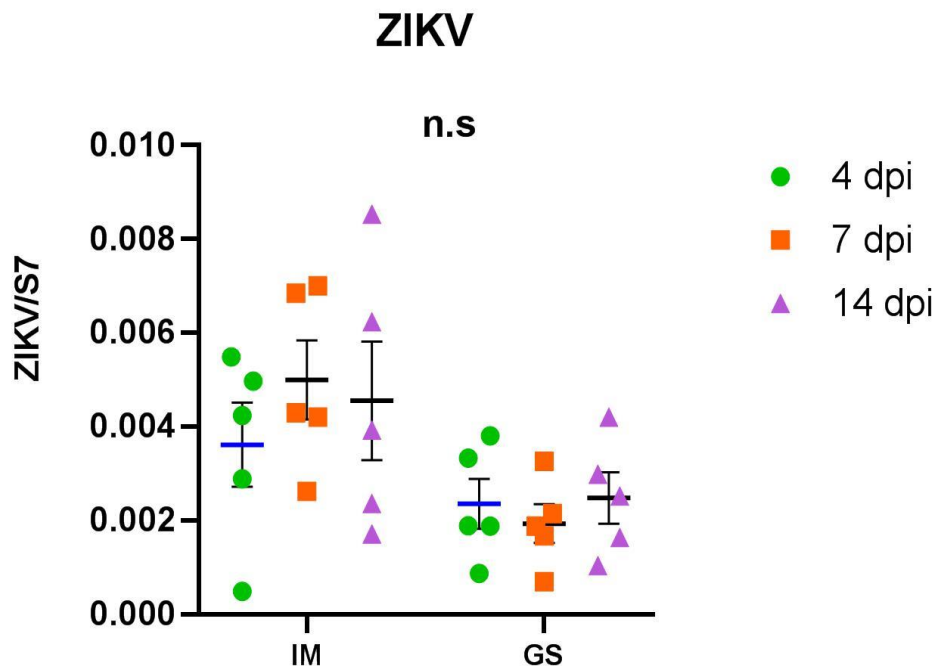


Figura 18.- **ZIKV en los mosquitos de Puente de Ixtla presenta su pico máximo de infección a los 7 dpi.** De la cuantificación relativa con ZIKV en el IM y GS a los 4, 7 y 14 dpi. Se observa un pico máximo de infección a los 7 dpi en el IM, sin embargo, en la GS se observa a los 4 dpi. En los análisis estadísticos no presenta diferencias significativas (ns). A los 4 dpi y 7 dpi se tiene una $P=0.8234$, entre los 4 dpi y 14 dpi se tiene una $P= 0.7881$ y entre los 7 dpi y 14 dpi una $P= 0.9977$. Análisis 2way ANOVA.

En las figuras 17 y 18, se muestran infecciones con ambos virus en *Ae aegypti* de Puente de Ixtla, Morelos a partir de los 4 dpi, también, se observa una clara disminución de la carga viral a los 14 dpi con DENV y ZIKV. La posibilidad de la presencia de las

barreras tisulares en *Ae aegypti* de Puente de Ixtla son evidentes y se presenta en las infecciones para ZIKV. En cuanto al PIE en mosquitos depende del virus, en algunos datos muestra que las infecciones en la GS con DENV son desde los 4 dpi, mientras que para ZIKV es a los 14 dpi, tiempo para una transmisión exitosa a un huésped humano (Palomares et al., 2018).

7.2.- Los mosquitos *Ae aegypti* de Puente de Ixtla, Morelos presentan una mayor competencia vectorial para DENV

Se determinó la tasa de infección en el IM y la tasa potencial de transmisión en la GS según indica en M&M. Los resultados muestran una CV del 100% para DENV y el 73% para ZIKV (Tabla 4), indicando que los mosquitos *Ae aegypti* de Puente de Ixtla, Morelos son altamente competentes para DENV y también son capaces de infectarse y transmitir ZIKV aunque en menor grado.

Tabla 3. **DENV presenta una CV superior comparada con ZIKV.** La CV de *Ae aegypti* de Puente de Ixtla con DENV es del 100%, siendo superior a ZIKV con un 73%.

<i>Flavivirus</i>	Tasa de infección (Intestino medio)	Tasa potencial de transmisión (Glándula salival)	Total CV
DENV	n=14 14/14= 100%	n=14 14/14=100%	100%
ZIKV	N=15 11/15= 73%	N=15 11/15=73%	73%

Los datos anteriores, sugieren que las barreras tisulares (BIM, BEIM, BIGS y la BEGS) no son capaces de anular las infecciones para DENV, aunque los mosquitos *Ae aegypti* de Puente de Ixtla presentan una cierta barrera en el IM y la GS para diseminar y transmitir el ZIKV. Por lo cual, se realizaran a futuro estudios en nuestro grupo de trabajo para determinar la contribución de las barreras tisulares en la infección con DENV y ZIKV en los mosquitos *Ae aegypti*.

7.3.- En *Ae aegypti* de Puente de Ixtla, DENV presenta mayor infección en el IM y la GS comparado con ZIKV

Al comparar las infecciones de ambos virus (Figura 19) en los tejidos analizados, observamos que DENV presenta una carga viral mayor que ZIKV en los mosquitos *Ae aegypti* de Puente de Ixtla, tanto en IM como en la GS. A los 4 dpi, se obtuvo diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la infección en el IM respecto a la GS, sin embargo entre los 7 y 14 dpi no se muestran diferencias ($P = 0.7242$).

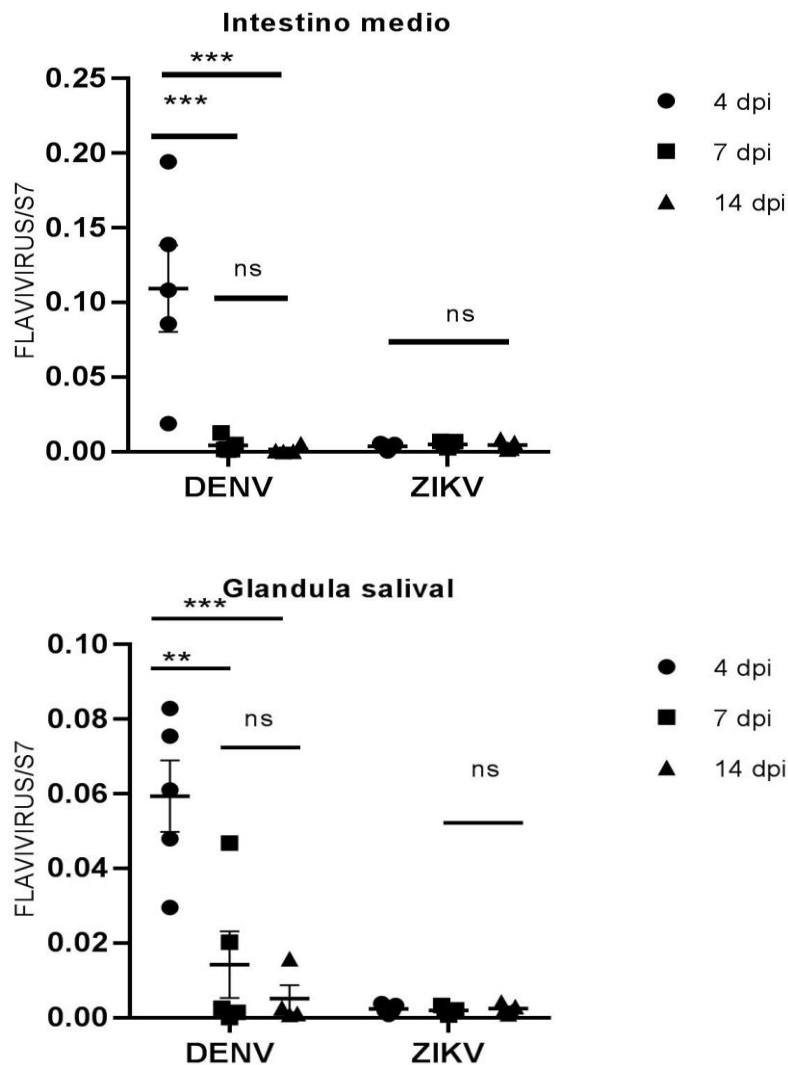


Figura 19. *Ae aegypti* de Puente de Ixtla infectados con DENV es más competente comparado con ZIKV. La comparación en ambos virus es muy vista, siendo que DENV presenta mayor infección a los 4, 7 y 14 dpi en ambos tejidos, en cambio con ZIKV las titulaciones virales son bajas en los días analizados y tejidos. Presentando una variación significativa en el IM ($P < 0.0002$) y en la GS ($P < 0.0001$).

En este estudio, se observó que el periodo de incubación de DENV es a los 4 dpi, mientras en ZIKV es a los 7 dpi, esto significa que el PIE de DENV en los mosquitos de Puente de Ixtla es de menor duración comparado con ZIKV. A pesar que los mosquitos se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales se observa una diferencia significativa entre la infección con DENV y ZIKV en los mosquitos *Ae aegypti* de Puente de Ixtla. En la literatura se ha reportado que la duración del PIE varía significativamente entre cada arbovirus e incluso en la especie del mosquito (Cheng et al., 2015). Lo anterior explica las diferencias observadas entre la infección con DENV y ZIKV en la misma especie de mosquito.

8.- DISCUSION

La competencia vectorial de los mosquitos *Ae aegypti* es específica para cada virus y cambia de acuerdo al origen geográfico de los mosquitos (Souza-Neto et al., 2019). En el presente estudio, se comparó la CV de los *Ae aegypti* de Puente de Ixtla, Morelos para transmitir de manera independiente el DENV y el ZIKV. Se observó que los *Ae aegypti* de Puente de Ixtla, infectados con DENV presentan un mayor nivel de infección en el IM y la GS a los 4 días, en comparación con las infecciones con ZIKV en los mismos tejidos, en ZIKV se observa un pico máximo de infección a los 7 dpi.

Además, nuestros resultados muestran que la CV entre DENV y ZIKV es diferente, aun siendo de la misma zona geográfica. Previamente, se ha publicado que los mosquitos *Ae aegypti* silvestres de distintas regiones de México infectados con ZIKV muestran una mayor carga viral a los 7 dpi y una disminución de la misma a los 14 dpi, además de que la CV varía entre las poblaciones aun siendo mosquitos de la misma especie (Garcia-Luna et al., 2018). Pocos estudios han evaluado infecciones en tiempos cortos después de la ingesta de sangre infecciosa, sin embargo, en un estudio realizado en mosquitos silvestres obtenidos de Acapulco, Guerrero infectados con ZIKV, se muestra la presencia del virus a partir de los 4 dpi, con una infección máxima a los 7 dpi y una disminución a los 14 dpi (Sánchez et al., 2019). En las infecciones con DENV en *Ae aegypti* no se observa un aumento en la carga viral a los 2 dpi, en cambio a los 3 dpi hay un pequeño aumento y un pico máximo a los 7 dpi (Raquin et al., 2017). Existe variabilidad en la susceptibilidad a las infecciones por arbovirus en poblaciones

geográficas de mosquitos e inclusive para la misma población, esta variabilidad se debe al hecho de que la CV es un fenotipo complejo y en evolución, además depende de la interacción del vector y el virus (Souza-Neto et al., 2018).

DENV y ZIKV son virus endémicos de México y se encuentra ampliamente distribuido en todo el país, sin embargo se ha demostrado que la CV varía según la especie del mosquito y la región geográfica (Garcia-Luna et al., 2018; Benette et al., 2002). Además, *Ae aegypti* es capaz de transmitir DENV y ZIKV pero depende de la cepa del mosquito y la capacidad de poder replicarlo y de transmitir el virus (Musso et al., 2016). Los factores ambientales y genéticos tanto del mosquito como del patógeno interactúan para influir en la CV, por ejemplo, la temperatura influye en el PIE y la supervivencia del mosquito vector (Souza-Neto et al., 2019; Márquez et al., 2018). En el caso de la infección con DENV en los mosquitos *Ae aegypti* a temperaturas de 35°C resulta un PIE más corto mientras que a temperaturas de 21°C causa un PIE más largo (Palomares et al., 2018), sin embargo, los mosquitos de Puente de Ixtla se mantuvieron a temperaturas iguales (28°C) y se observa una diferencia en la CV entre DENV y ZIKV mostrando infecciones a partir de los 4 dpi.

Se ha demostrado que la temperatura es un factor que ejerce una considerable influencia en el ciclo de vida del mosquito ya que puede afectar o beneficiar el ciclo biológico del mosquito y las respuestas a la interacción con el virus. A temperaturas mayores de 31°C acelera su ciclo biológico por lo que acorta su tiempo de vida, mientras que a temperaturas entre los 21°C el desarrollo y tiempo de vida son más largos teniendo la oportunidad de infectarse con algún arbovirus y poder transmitirlo. (Márquez et al., 2018). Actualmente, el cambio climático es un factor preponderante que podría afectar o beneficiar en al mosquito vector, sin embargo, al aumento en la temperatura mínima (más de 10°C) se asocia con un aumento en la actividad de la ovoposición y por lo tanto al aumento de la población. Se ha descrito que hay poca actividad de ovoposición de *Ae aegypti* durante el invierno seco, mientras que la mayor actividad es durante la temporada de lluvias, además que los casos de infecciones aumentan en esta temporada.

La diversidad genética de *Ae Aegypti* afecta la infección de los *Flavivirus* y la CV como se ha demostrado en varios estudios de las poblaciones de estos vectores (Souza-Neto

et al., 2019). Además, los mosquitos han desarrollado estrategias inmunes para restringir la replicación viral, mientras que el virus ha desarrollado estrategias de evasión de la respuesta inmune para poder infectar una célula huésped y dependen de su estricta capacidad de interactuar y manipular la maquinaria de la célula para propagarse y poder evitar las respuesta antivirales tanto de la célula huésped como de las barreras del mosquito presentes en los distintos tejidos (Neufeldt et al., 2018).

En condiciones de laboratorio, las cepas de *Ae aegypti* son altamente competentes para transmitir diferentes arbovirus, sin embargo podría variar entre la cepa del mosquito que se está analizando. Además, en los mosquitos que se encuentran en condiciones naturales la CV y el PIE son variables comparado con los mosquitos de laboratorio, por lo cual las tasas de infección son distintas (Palomares et al., 2018). La rápida adaptación de los mosquitos *Ae aegypti* a las diferentes condiciones climáticas y hábitats lo hace un importante vector que influye en la distribución de estos arbovirus en lugares no endémicos e incluso sin reportes de infecciones por estos arbovirus (Márquez et al., 2018).

Los programas químicos para el control de vectores son muy eficaces para reducir la población de mosquitos vectores y las transmisiones por arbovirus. Sin embargo se obstaculizan por los recursos financieros disponibles, así como por los desafíos constantes de la resistencia a insecticidas que se genera y por el cambio evolutivo de estos arbovirus (Golding et al., 2015). Aunque todavía no se cuente con alguna vacuna o un tratamiento específico para la mayoría de las enfermedades transmitidas por arbovirus, por lo tanto que las emergencias y las epidemias aumenten, depende del control de vectores y la protección personal (Carneiro et al., 2017). La distribución geográfica de la CV en *Ae aegypti* es el primer paso para determinar el potencial de transmisión para DENV, ZIKV, entre otros virus, y así establecer medidas de control de vectores basado en evidencia científica.

9.- Conclusión

- La CV de DENV y ZIKV son variables en los mosquitos *Ae aegypti* de Puente de Ixtla.
- *Ae aegypti* de Puente de Ixtla, Morelos presenta una CV mayor en DENV comparado con ZIKV.
- Los mosquitos de Puente de Ixtla pueden replicar y transmitir DENV y ZIKV.

9.1.-Perspectivas

- Realizar la cuantificación absoluta del virus en los mosquitos de Puente de Ixtla, Morelos infectados con DENV y ZIKV.
- Analizar la CV en *Ae aegypti* de diferentes regiones de México, estos datos serian la clave para el control de mosquitos vectores y las infecciones provocadas por arbovirus.

10.- BIBLIOGRAFIA

1. Palomares LA, Moreno-Garcia, Lanz-Mendoza H and Salazar MI. Molecular basis for Arbovirus transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. *Intervirology*.2018; 61 (6): 255- 264 DOI: 10.1159/000499128.
2. Anderson RJ and Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75(5): 886-892 PMC1993907
3. Arredondo-Garcia, JL; Méndez-Herrera, A y Medina-Cortina, H. Arbovirus en Latinoamérica. *Acta pediatr. Méx.* 2016, vol.37, n.2, pp.111-131.Disponible: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912016000200111&lng=es&nrm=iso>. ISSN 2395-8235
4. Bartholomay LC and Michel K. Mosquito immunobiology: The intersection of vector health and vector competence. *Annu. Rev. Entomol.* 2018. 7. 63: 145- 167. Doi: 10.1146/annurev-ento-010715- 023530.
5. Baz M and Boivin G. 2019. Antiviral agents in Development for Zika virus infections. *Pharmaceuticals.* 12, 101. DOI: 3390/ph1203010.
6. Bennett KE, Olson KE, Muñoz M., et al. Variation in vector competence for Dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from México and the United States. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67 (1): 85-92.
7. Cabezas C y Garcia P. Diagnóstico de la infección por el virus Zika. *An Fac Med.* 2017; 78 (1): 89-93. <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v78it.13028>
8. Calvez E, Mousson L, Vazeille M, O'Connor O, Cao-Lormeau VM, Mathieu-Daudé F, et al. (2018) Brote de virus Zika en el Pacífico: competencia vectorial de los vectores regionales. *PLoS Negl Trop Dis.* 12 (7): doi: 10.1371/journal.pntd.0006637
9. Calvo E, Tokumasu F, Marinotti O, Villeval JL and Francischetti MB. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents it interaction with platelet glycoprotein VI, integrin alpha 2 beta 1, and von. Willebrand factor. *J Biol Chem.* 2007; 282 (37): 26. 928-38. DOI: 10.1074/jbe.M705669200.
10. Chatel- Chaix L and Bartenschlage. (2014). Dengue virus- and Hepatitis C virus- induced replication and assembly compartments: The Enemy Inside- Caught in the Web. *Journal of Virology.* Vol. 88, No. 11. DOI: 10.1128/JVI.03404-13.
11. Cheng G, Liu Y, Wang P and Xiao X. Mosquito defense strategies against viral infection. *Trends parasitol.* 2015: 32 (3): 177-186. DOI: 10.1016/j.pt.2015.09.009.
12. Chouin- Carneiro T and Barreto dos Santos F. Transmission of major arboviruses in Brazil: The role of *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* vectores. *Biological Control of pest and vectors insect.* 2017. Chapter 11. Pp: 231-255. <http://dx.doi.org/10.5772/66946>.

13. Chouin T, Vega A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, ET AL. (2016). Diferential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the America to zika virus. Plos Negl Tro Dis 10 (3).
14. Christine Cruz-Oliveira, João Miguel Freire, Thaís M. Conceição, Luiza M. Higa, Miguel A.R.B. Castanho, Andrea T. Da Poian, Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 39, Issue 2, March 2015, Pages 155–170, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>
15. Coronel RW, Arteta AC, Suarez FMA, Burgos RMC, Rubio SMT, Sarmiento GM y Corzo DC. Infección por virus del Zika en el embarazo, impacto fetal y neonatal. *Rev. Chilena Infectol.* 2016; 33 (6): 665-673.
16. Dahar R and Kumer N. Role of mosquito salivary glands. *Current science.* 10 November 2003, 85 (9), 1308-1313.
17. Dennison NJ, Jupatanakul N and Dimopoulos G. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr Opin insect Sci.* 2014; 3: 6-13. Doi.10.1016/j.cois.2014.07.004.
18. Dong S, Balarama V, Kantor AM, Lin J, Grant DG, Held NC et al. (2017). Chikungunya virus dissemination from the midgut of *Aedes aegypti* is associated with temporal basal lamina degradation during bloodmeal digestion. *PLoS Negl Trop Dis.* 11 (9): e0005976.
19. Elizondo-Quiroga D, Ramírez-Medina M, Gutiérrez-Ortega A, et al. Vector competence of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* from the metropolitan area of Guadalajara, Jalisco, Mexico for zika virus. *Sci Rep.* 2019 Nov. 18; 9 (1):16955. Doi: 10.1038/s41598-019-53117-1.
20. Espinosa M. Aspectos clínicos de la infección por el virus Zika. *An. Fac. Med.* 2017; 78 (1):79-82. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v78it.13026>.
21. Fernandez- Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of Flavivirus infection: Using and Abusing the host cell. *Cell Host Microbe.* 2009; 4(5):318-328. Doi: 10.1016/j.chom. 2009.04.001.
22. Frantchez V, Formelli R, Sartori G, Arteta S, Sosa L y Medina J. Dengue en adultos: diagnóstico, tratamiento y abordaje de situaciones especiales. *Rev Medica Uruguay.* 2016. 32 (1) Online ISSN 1688-0390.
23. Franz WE, Kantor M, Passarelli A and Clem R. Tissue barriers to Arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses* 2015, 7, 3741-3767: doi. 10.3340/v7072795.
24. Garcia-Luna SM, Weger- Lucarelli J, Rückert C, Murrieta RA, MC Young, Byas AD, et al. (2018). Variation in competence for Zika transmission by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in México. *PLoS Negl Trop Dis* 12 (7): e0006599. Doi: 10.1371/journal.pntd.0006599.
25. Gómez LA, Montoya G, Rivera HM, Hernández JC. (2017) Características de la estructura molecular de las proteínas E del virus del Zika y E1 del virus de la rubeola y posibles implicaciones en el neurotropismo y en las alteraciones del sistema nervioso. *Biomedica;* 37 (supl. 1): 121-132.

26. Gómez-García GF. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: *Culicidae*) and its importance for human health. *Rev Cubana Med Trop.* 2018, vol.70, n.1 pp.55-70. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602018000100007&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0375-0760.
27. Grillet EM y Ventura F. (2016) Transmisión del virus: Patrones y mecanismos eco-epidemiológicos de una arbovirosis. *Tribuna del investigador* (Vol. 17 No. 2). Venezuela.
28. Gutiérrez B, Gladys PO, et al. (2018). Ciclos de transmisión del virus zika y especies involucradas; actualización. *Environment and Health Unit*.
29. Hegde S, Rasgon JL, Hughes GL. The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. *Curr Opin Virol.* 2015. doi: 10.1016/J.coviro.2015.08.11.
30. Houé V, Bonizzoni M, and Failloux A-B. Endogenous non-retroviral elements in genomes of *Aedes* mosquitoes and vector competence. *Emerge Microbes Infect.* 2019; 8(1):542-555. Doi:10.1080/22221751.2019.1599302.
31. Javed F, Khanzad N, Mubashar A, Irsnad U et al. (2017). Zika virus: what we need to know? *J Basic Microbiol.* 2018; 58:3- 16. DOI: 10.1002/jobm.201700398.
32. Kostyuchenko, V., Lim, E., Zhang, S. *et al.* Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature* 533, 425–428 (2016). <https://doi.org/10.1038/nature17994>
33. Kraemer UG, Sinka EM, Duda KA, Myhe QN, Shearer MF, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Ecology and global health.* 2015; 4: e08347. DOI: 10.7554/eLife.08347.
34. Kramer LD and Ciota AT. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr Opin Virol.* 2015 December; 15: 112- 118. Doi: 10.1016/j.coviro.2015.10.003.
35. Laredo- Tiscareño, Stephanie V Guo, Bocanegra G. Virus Dengue: estructura de serotipos y epidemiología molecular. 2012 *Ciencia UAT*, Vol. 6 (3). Pp: 27-33.
36. Laureti M, Narayanon D, Rodriguez A, Fazakerley JK and Kedzierski L. Flavivirus receptors: Diversity, Identity and cell entry. *Front. Immunol.* 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02180>.
37. Liu MZ, Vosshall LB. General visual and contingent thermal cues interact to elicit attraction in female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Curr Biol.* 2019;29(13):2250-2257. Doi:10.1016/j.cub.2019.06.001.
38. Liu-Helmersson J, Stenlund H, Wilder-Smith A and Rocklöv J. Vectorial capacity of *Aedes aegypti*: effects of temperature and implications for global dengue epidemic potential. *PLoS ONE* 2014 9 (3): e89783. DOI: 10.1371/journal.pone.0089783
39. Loredó AA, Figueroa BZ, Vargas FJ, Perea MA, Arredondo GJ y Casas MA. (2016) Zika ¿catástrofe biológica mundial? *Acta pediátr Mex.* 37 (6): 341- 348.
40. Lozano- Fuentes, Kenney L, Varnado W, Brian D Byrd, Burkhalter K and Savage H. Susceptibility and Vectorial Capacity of American *Aedes albopictus* and

- Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*) to American Zika Virus Strains. JMed Entomol. 2019 Jan 8; 56(1): 233-240. Doi: 10.1093/jme/tjy114.
41. Luo D, Vasudeven SG and Lescar J. The flavivirus NS2B-NS3 protease- helicase as a target for antiviral drug development. Antiviral Res. 2015 Jun; 118:148-58. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.03.014.EPud2015Apr2.
 42. Márquez Benítez Y, Monroy Cortez KJ, Martínez Montenegro EG, Peña Garcia VH y Monroy Diaz AL. Influencia de la temperatura ambiental en el mosquito *Aedes spp* y la transmisión del virus Dengue. Rev ES Med 2019; 33 (1): 42-50. DOI: 10.21615/cesmedicina.33.15.
 43. Mateo Estol, Barbara Iliana, Torres Acosta, Guadalupe Rafael, Manet Lahera, et al. (2017) Comportamiento clínico epidemiológico del dengue en colaboradores Cubanos en el estado Bolivar de Venezuela. Correo Cientifico Medico, 21 (1), 3-18. Version On-line ISSN 1560-4381.
 44. Mosso C, Galván-Mendoza IJ, Ludert JE and Del Angel RM. (2008). Endocytic pathway followed by Dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. Virology. 2008.15; 378 (1):193-199. Doi:10.1016/j.virol.2008.05.012.
 45. Musso D y Gubler DJ. (2016). Zika virus. American Society for Microbiology. Journals. 2016, 29 (3): 487-524. Doi:10.1128/CMR.00072-15.
 46. Nelson J. *Aedes aegypti*: Biología y ecología. Organización Panamericana de la salud. 1986. REF. PNSP/86-63.
 47. Neufeldt C., Cortez M., Acosta E., et al. Rewiring celular networks by members of the *Flaviviridae* family. Nat Rev Microbiol. 16, 125- 142 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>.
 48. Ocaña- Sanchez M, Aguilar-Guardado K, Guzman-Martinez D, Castro- Geronimo VD y Hernandez-Baltazar D. Alteraciones en células neuronales y cardíacas en la infección por el virus Zika. Revista eNeurobiología, 2019. 10 (23): 130319. www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2019/23/23.html.
 49. Olson SM, Delaney A, Jones AM, Carr CP, et al. Updated baseline prevalence of birth defects potentially related to zika virus infection. Birth defects Research. 2019; 1; 111 (13): 938- 940. Doi: 10.1002/ bdr2. 1546.
 50. Pacheco SE, Mackarena NG, Roberto OC, Luppi MN y Gaete GP. (2016) Virus Zika. Epidemiología, manifestaciones clínicas y prevención. Rev Hosp Clin Uni. Chile. 26: 277- 284.
 51. Pando Robles V, Ortega Morales A y Huerta H. (2020). Mosquitos vectores de arbovirus. Ciencia Rev. de la Academia Mexicana de Ciencias. Vol 71 No. 1
 52. Pasgarelli A. Barriers to success: How *Baculovirus* establish efficient systemic infections. Virology 411 (2011) 383- 392. Doi: 10.1016/j.virol.2011.01.009.
 53. Perera B and Kuhn J. (2008). Structural Proteomics of Dengue virus. Curr Opin Microbiol. 11 (4), 369-377. <https://doi/10.1016/j.mib.2008.06.004>

54. Quintero DC, Osorio E y Martínez M. (2010). Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue. LATREIA. Vol. 23. No. 2.
55. Rainey SM, Shah P, Kohl A and Dietric I. Understanding the Wolbachia-mediated inhibition of arbovirus in mosquitoes: progress and challenges. Journal of General Virology. 2014, 95, 517- 530. DOI: 10.1099/vir0.057422-0.
56. Raquin V, Lambrechts L. Dengue virus replicates and accumulates in *Aedes aegypti* salivary glands. Virology. 2017; 507:75-81. Doi:10.1016/j.virol.2017.04.009.
57. Romano D, Stefanini C. Canale A, Benelli G. (2018). Artificial blood feeders for mosquitoes and ticks. Acta Tropical. 183 (18) 43-56.
58. Rossi-Gustavo y Almiron- Walter R. Características generales de los mosquitos. CEPAVE. Serie Enfermedades Transmisibles. 2004. Monografía 5. Capítulo 1.
59. Rucket C and Ebel D. How do virus- mosquito interactions lead to viral emergence? Trends in parasitology. 2018. 34 (4): 310-321. Doi: 10.1016/j.pt.2017.12.004.
60. Sánchez C., Cime CT., Ovilla M., Ramírez AJ., et al. Experimental infection and vector competence of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes from Acapulco, Guerrero, México. Salud Pública de México. 2019. Vol. 62, No. 2 (PP: 203-210). DOI: <https://doi.org/10.21/49/10835>.
61. Savidis G, McDougall WM, Meraner P, Perreira JM, et al. Identification of zika virus and Dengue virus dependence factors using functional genomics. Cell Rep. 2016.28; 16 (1)232-246. Doi:10.1016/j.celrep.2016.06.028.
62. Secretaria de salud. Casos confirmados de infección por Zika. Semana epidemiológica. No. 29 de 2021. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/zika-informacion-relevante>
63. Secretaria de salud. Panorama epidemiológico de Dengue. Semana epidemiológica 30, 2021. <https://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2021>
64. Sim S, Jupatanakul N and Dimopoulos G. Mosquito immunity against arboviruses. Viruses. 2014; 6 (11): 4479-4504. Doi.10.3390/v6114479.
65. Sirohi D, Chen Z, Sun L, et al. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of zika virus. Science. 2016 April 22: 352 (6284): 467-470. Doi:10.1126/science.aaf5316.
66. Souza-Neto J, Powell JR and Bonizzoni M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. Infect Genet Evol. 2019; 67: 191-209. DOI: 10.1016/ j.meegid. 2018.11.009.
67. Tchouassi DP, Jacob JW, Ogola EO, Sang R and Torto B. Aedes vector-host olfactory interactions in sylvatic and domestic dengue transmission environments. Proc Biol Sci. 2019; 286(1914): DOI: 1098/rspb. 2019.2136.

68. Tesla B, Demakovskiy LR, Murdock C, et al (2018). Temperature drives zika virus transmission. Evidence from empirical and mathematical models. Proc R. Soc. B. 285. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2018.0795>.
69. Than H-W, Balasubramaniam V, Ooi MK and Chew M.F. (2018). Viral determinants and vector competence of zika virus transmission. Front Microbiol. Vol. 9 Article 1040.
70. Torres- Galicia I, Cortes-Poza Dy Becker I. Dengue en México: Incremento en la población juvenil durante la última década. Bol Med Hosp Infant Mex. 2014; 71 (4): 196- 201. Doi. Orgl 10.1016/j.bmhix.2014.08.003.
71. Torres PS, Padrón SA Y Bravo PR (2003) Síndrome de Guillain Barre. Rev Cubana Milit (32 Vol 2: 137- 142).
72. Velandia ML y Castellano JE. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. Infection. 2011; 15 (1): 33-43.
73. Weaver SC, Costa F, Vasilakis N, et al (2016). Zika virus: history emergence, biology and prospects for control. Publisher's Disclaimer. 130: 69-80.
74. Weger-Lucarelli J, Rückert L.C, Chotiwan N, Nguyen C, Garcia-Luna SM, Fauver JR, et al. (2016). Vector competence of America mosquitoes for three strains of zika virus. PLoS Negl Trop Dis 10 (10): e 0005101 doi: 10. 1371/journal.pntd. 0005101.
75. William C. Marquardt RS, Demarae RB. (2000). Parasitology Vector Biology. 2° Edicion. Copyright Academic Press. Cap 47.
76. Yadar V. Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del ARN del virus dengue: propuesta de un modelo de replicación del ARN. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2003; 20 (1).
77. Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV, Sedlak D et al. Structures of immature flavivirus particles. The EMBO Journal. 2003 Jun. 2; 22 (11): 2604-13. Doi: 10.1093 /emboj/cdg270.
78. Zhao L, Alto BW, Jiang Y, Yu F, Zhang Y. Transcriptomic analysis of *Aedes aegypti* innate immune system in response to ingest of Chikungunya virus. Int J Mol Sci. 2019; 27; 20 (13). Doi.3390/ijms. 2013.31.33.