



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**INDUCCIÓN DE PRIMING INMUNE
TRANSGENERACIONAL EN EL MOSQUITO *Aedes
aegypti* INFECTADOS CON VIRUS DENGUE
SEROTIPO 4.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

CARLOS ISAAC ROLDÁN ALDAY

DIRECTORES:

Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza.

Dra. Valeria Vargas Ponce de León.

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2024

ÍNDICE GENERAL.

LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE TABLAS.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
MARCO TEÓRICO.....	10
Modelo de estudio: <i>Aedes aegypti</i>	10
Aspectos biológicos del mosquito <i>Aedes aegypti</i>	11
El dengue en México.....	13
El virus dengue.....	14
Replicación viral.....	16
Sistema inmunológico del mosquito.....	18
Respuestas inmunitarias en el mosquito.....	18
Respuesta inmunológica antiviral en mosquitos.....	21
La vía de RNA interferente en mosquitos.....	23
Priming inmunológico en insectos.....	26
ANTECEDENTES.....	28
Priming inmune en <i>Aedes aegypti</i> contra virus dengue.....	28
Priming inmune transgeneracional en invertebrados.....	31
JUSTIFICACIÓN.....	36
HIPÓTESIS.....	36
OBJETIVO GENERAL.....	36
OBJETIVOS PARTICULARES.....	36
METODOLOGÍA.....	37
Mantenimiento de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> cepa Rockefeller.....	37
Mantenimiento de células Aag2 y LCC-MK2.....	38
Propagación de virus dengue serotipo- 4.....	39
Cuantificación del título viral de dengue serotipo 4 mediante el ensayo de placa lítica.....	40
Inactivación del virus dengue serotipo 4 mediante luz ultravioleta (uv)....	40
Inducción de priming inmune a mosquitos de <i>Aedes aegypti</i> con virus dengue serotipo 4 (F0).....	41

Inducción de TGIP en mosquitos <i>Aedes aegypti</i> sensibilizados con virus dengue serotipo 4 (F1).....	42
Extracción de ARN total de excretas de mosquito individuales.....	44
Extracción de RNA total de mosquitos adultos F1.....	45
Tratamiento con DNAsa y síntesis de cDNA.....	46
Cuantificación de la carga viral en excretas y genes de la respuesta inmune mosquitos adultos F1 mediante qPCR.....	46
Generación de la curva estándar.....	48
Análisis estadístico.....	48
RESULTADOS.....	49
Titulación por UFP del stock viral Virus dengue Serotipo 4 (VD-4).....	49
cuantificación de la carga viral de VD-4 en excretas de mosquitos F1 individuales 7DPI.....	50
Cuantificación de la carga viral de VD-4 en mosquito completo F1 mediante qPCR.....	51
Expresión relativa de transcritos de marcadores de la respuesta inmune antiviral mediante qPCR.....	52
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES.....	56
PERSPECTIVAS.....	56
ANEXO 1: DIETA ALIMENTICIA DE <i>Aedes agypti</i>.....	57
ANEXO 2: ESQUEMA DE ALIMENTACION DE 200 LARVAS DE <i>Aedes agypti</i>.....	58
REFERENCIAS.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Aedes japonicus*.

Figura 2. Esquema descriptivo del ciclo de desarrollo del mosquito *Ae. aegypti*, desde el huevo hasta el mosquito adulto.

Figura. 3. Dimorfismo sexual de *Ae. aegypti* adulto.

Figura 4. Casos reportados de fiebre por dengue en las Américas.

Figura 5. Esquema de la organización del genoma del virus dengue.

Figura 6. Diagrama del ciclo viral intracelular del virus del dengue y la localización subcelular de cada uno de los eventos.

Figura 7: Diagrama de flujo de la respuesta inmune celular y humoral en los mosquitos.

Figura 8: Hemócitos vivos de *A. albopictus* observados en Cámara de Neubauer a través de microscopía de luz.

Figura 9. Vías de inmunidad antiviral en mosquitos *Aedes aegypti*.

Figura. 10. Esquema de las vías antivirales a través de los RNAi. siRNA (small interference RNA), miRNA (micro RNA) y piRNA (piwi RNA).

Figura. 11. Árbol filogenético de la fenología actual de la memoria inmune inducida en invertebrados.

Figura 12. Cuantificación de Unidades Formadoras de Focos (UFF) en intestino medio y carcasa de mosquitos adultos individuales con y sin priming inmune.

Figura 13. Carga viral del virus dengue detectado en excretas individuales de mosquitos infectados a los 2, 7 y 14 días post-2^o reto.

Figura. 14. Expresión relativa de DCR-2, AGO-2 y R2D2 en larvas, pupas y mosquitos adultos después de exposición con dengue inactivo con luz UV en estadio larvario durante 24 horas.

Figura 15. Expresión basada en los datos del RNAseq de abejas reinas retadas y obreras (F1).

Figura 16. Número de descendientes acumulados de *D. magna* expuesta a diferentes cepas de *P. ramosa*.

Figura 17. Cuantificación de la replicación viral en *Drosophila melanogaster* mediante ensayos de placa lítica y Actividad luciferasa.

Figura 18. Efecto prolongado del TGIP en *D. melanogaster* a partir de la generación F1.

Figura 19. Cuantificación de partículas virales infectivas mediante el ensayos de placa lítica.

Figura 20. Eclosión de huevos y mantenimiento de larvas del mosquito *Aedes aegypti*.

Figura 21. Mosquitos adultos de *Aedes aegypti* mediante alimentación sanguínea.

Figura 22. Efecto citopático de células de Aag2 infectadas con virus dengue.

Figura 23. Diseño experimental para inducir un estímulo inmunológico (priming).

Figura 24. Diseño experimental para evaluar el TGIP (priming inmunológico transgeneracional).

Figura 25. Esquema utilizado para la obtención y presesamiento de las excretas de mosquitos.

Figura 26. Ensayo de placa lítica utilizando células de LLC-MK2 para determinar el número de partículas virales infectivas.

Figura 27. Carga viral en excretas de mosquitos individuales F1 de 7 días post-infección VD-4.

Figura 28. Carga viral de mosquitos individuales F1 de 14 días post-infección VD-4.

Figura 29. Expresión relativa de Argonauta 2 y Relish 1 de mosquitos *Ae. aegypti* (F1) a los 14 dpi.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Sistemática del mosquito *Aedes aegypti*.

Tabla 2. Clasificación de los genes inmunes a evaluar.

Tabla 3. Ciclos de qPcr.

1. INTRODUCCIÓN

Los mosquitos del género *Aedes* son importantes vectores de enfermedades virales, entre ellas Dengue, Zika, Fiebre Amarilla, Chikungunya y virus del Nilo Occidental. Como consecuencia del cambio climático y la globalización, entre otros factores, el área de distribución de los mosquitos de este género se está expandiendo. Se estima que cada año ocurren 390 millones de infecciones en humanos con el virus dengue, de las cuales 96 millones padecen algún nivel de severidad de la enfermedad (Bhatt et al., 2013).

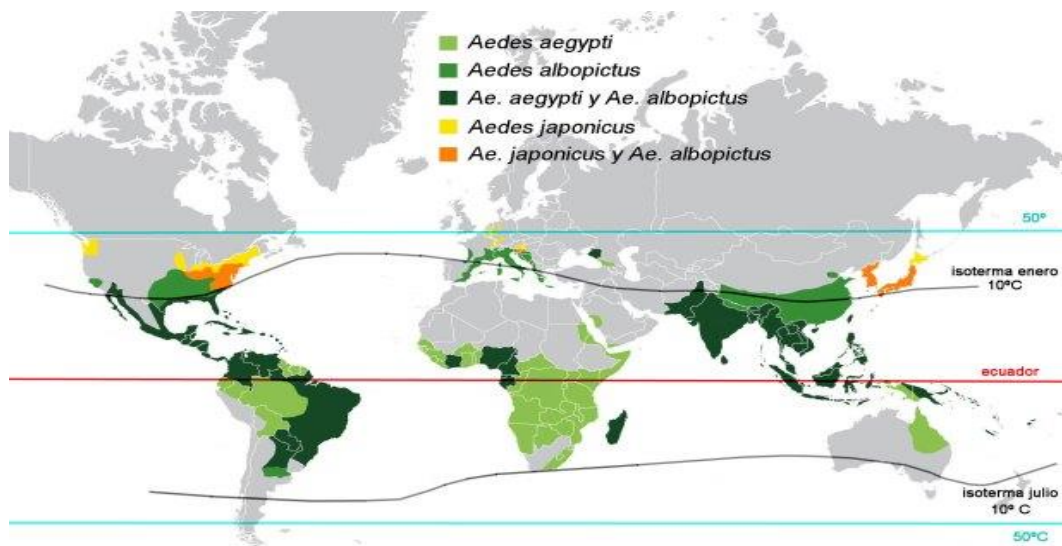


Figura 1. Distribución mundial de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Aedes japonicus*. Tomada de <https://desinsectador.com/2016/02/07/mosquitos-invasores-aedes/>

Los mosquitos hembra de este género presentan una alimentación hematófaga, es decir, los nutrientes que adquieren son de la sangre. A raíz de esto, pueden adquirir microorganismos patógenos como el virus dengue, la cual es una enfermedad viral infecciosa que posee cuatro serotipos genéticamente relacionados, pero antigénicamente diferentes con múltiples genotipos (OMS, 2009). Hasta ahora, no existe ningún tratamiento específico para el virus dengue. En México sólo se aplica una vacuna con licencia en el sector privado, la cual además presenta problemas de eficacia y riesgo de seguridad (Rabaa et al., 2017). Debido a lo anterior, se han generado estrategias de prevención, dedicadas a limitar la distribución del vector (Fig. 1), así como evitar que se transmita el virus.

Las técnicas más comunes que se utilizan en la erradicación de estos vectores consisten principalmente en la reducción de criaderos de mosquitos, los posibles sitios de oviposición, así como, sitios de crecimiento y acumulación de mosquitos adultos. Además, se utiliza el rociado de insecticidas en lugares con abundancia de mosquitos adultos que también reduce las poblaciones de mosquitos. No obstante, el uso de estos componentes conlleva repercusiones ambientales que dañan el medio ambiente, generan problemas en la salud humana y la afectación en las poblaciones de otros insectos benéficos (Kandel *et al.*, 2019; Benelli *et al.*, 2021). Por otra parte, la resistencia a los insecticidas por parte de las poblaciones de mosquitos va en aumento, principalmente debido a su constante uso descontrolado. Es por esto que recientemente, se han desarrollado estrategias alternas que permiten la reducción de poblaciones de mosquitos. Bian (2013) reportaron que mosquitos de *Aedes aegypti* infectados con *Wolbachia*, mejoran su respuesta inmune contra los arbovirus (virus de invertebrados). Ramyasoma (2020), mostró que generando mosquitos transgénicos se pueden reducir las tasas de infección por virus dengue, en Mexico se lleva acabo la vigilancia entomológica de *A. Aegypti* lo cual consiste en medir y controlar las densidades poblacionales de este vector y la vigilancia entomoviológica la cual se basa en la búsqueda de partículas virales en mosquitos *Aedes* y *Culex* (González-Acosta & Cime-Castillo,2020).

Por otra parte, se ha propuesto al "priming inmune" como una estrategia alterna para limitar la transmisión al virus dengue. Recientemente, Serrato y colaboradores (2018), mostraron en mosquitos adultos de *A. aegypti* un estado resistencia al virus dengue, sensibilizándolos previamente con virus dengue inactivado por luz UV, disminuyendo de este modo la replicación viral. A este fenómeno se le conoce como "priming inmunológico", que se define como la capacidad adquirida de los organismos para enfrentar a los patógenos con mayor eficiencia, después de una exposición a dosis subletales; se propone que es funcionalmente análogo a la memoria inmunológica en vertebrados (Claudio-Piedras & Lanz-Mendoza, 2016). Así mismo, Vargas y colaboradores (2020), indujeron el priming inmunológico desde el estadio larval, provocando una mejora en la respuesta inmune contra el virus dengue, limitando de esta manera su replicación viral y por lo tanto su

transmisión. Sin embargo, hasta ahora se desconoce si la descendencia de *Ae. aegypti* tiene la capacidad de generar la misma respuesta inmunológica, como la que tuvieron sus padres en un encuentro previamente con el mismo patógeno; este fenómeno se define como, "priming inmune transgeneracional" (TGIP; sus siglas en inglés) . Es por ello, que en este trabajo se tuvo como objetivo demostrar si el TGIP en el mosquito *Ae. aegypti* es un fenómeno que actúa contra el virus dengue

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Modelo de estudio *Aedes aegypti*

Aedes aegypti pertenece a la familia Culicidae del género *Aedes* (Tabla 1), su origen probable se dio en el cinturón Tropical de África. Su distribución latitudinal oscila entre los 35° norte y 35° sur, pero puede extenderse hasta los 45° norte y hasta los 40° sur; la altitud promedio de su hábitat es por debajo de los 1, 200 metros sobre el nivel del mar (msnm), aunque se ha registrado en alturas alrededor de los 2, 400 msnm (Fernández *et al.*, 1999).

TAXONOMÍA	
REINO:	Animalia
FILO:	Arthropoda
CLASE:	Insecta
ORDEN:	Diptero
FAMILIA:	Culicidae
TRIBU:	Aedini
GÉNERO:	<i>Aedes</i>
SUBGÉNERO:	<i>Stegomyia</i>
ESPECIE:	<i>Ae. aegypti</i> (Linnaeus, 1762)

Tabla 1. Clasificación Sistemática del mosquito *Aedes aegypti*. (Salas, 1999)

2.2 Aspectos biológicos del mosquito *Aedes aegypti*

Los mosquitos *A. aegypti* ovipositan en criaderos de agua limpia, reducida en oxígeno con bajo tenor orgánico y de sales disueltas, mediante la puesta de huevos en la superficie del cuerpo acuático a la altura de la interfase agua-aire. Los huevecillos miden menos de un milímetro de largo, son inicialmente de color blanco, y se tornan negros con el desarrollo del embrión, posterior a ese período, los huevos son capaces de resistir desecación y temperaturas extremas, sobreviviendo de seis a siete meses. Las larvas que emergen, inician un ciclo de cuatro estadios larvales (Fig. 2), creciendo a lo largo de tres mudas con una longitud inicial de 1 mm hasta llegar a los 6 o 7 mm en el cuarto estadio. Estas larvas poseen como caracteres morfológicos, espículas torácicas laterales quitinizadas, peine de escamas unilineales en el octavo segmento y un sifón en forma de oliva corta. Durante su desarrollo las larvas se alimentan de zoo y fitoplancton en donde habitan (Mora-Covarrubias *et al.*, 2010).

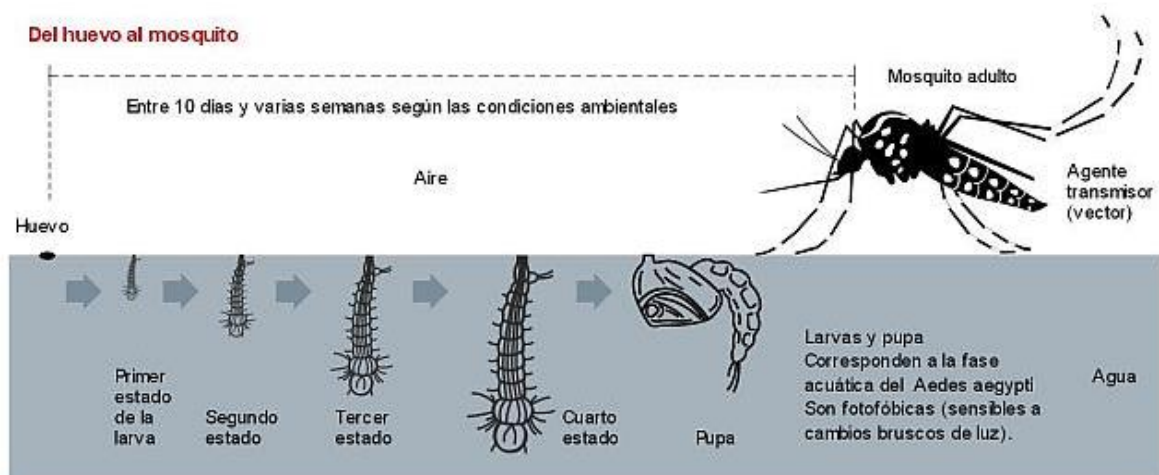


Figura 2. Esquema descriptivo del ciclo de desarrollo del mosquito *A. aegypti*, desde el huevo hasta el mosquito adulto. Tomada de (<https://comercioyjusticia.info/blog/profesionales/sigue-alta-la-presencia-de-larvas-de-aedes-aegypti-en-cordoba/>)

Después del cuarto estadio, la larva comienza a secretar una cubierta por todo su cuerpo que finalmente la encierra y pasa al estadio de pupa (Fig. 2). Dentro de esta cubierta, la pupa deja de alimentarse, solo puede nadar con sus aletas caudales y dos sifones respiratorios en su cabeza que le permiten el intercambio gaseoso. En

el estadio de pupa, es necesario para llevar a cabo los cambios en su cuerpo que le permitan su desarrollo a la etapa adulta.

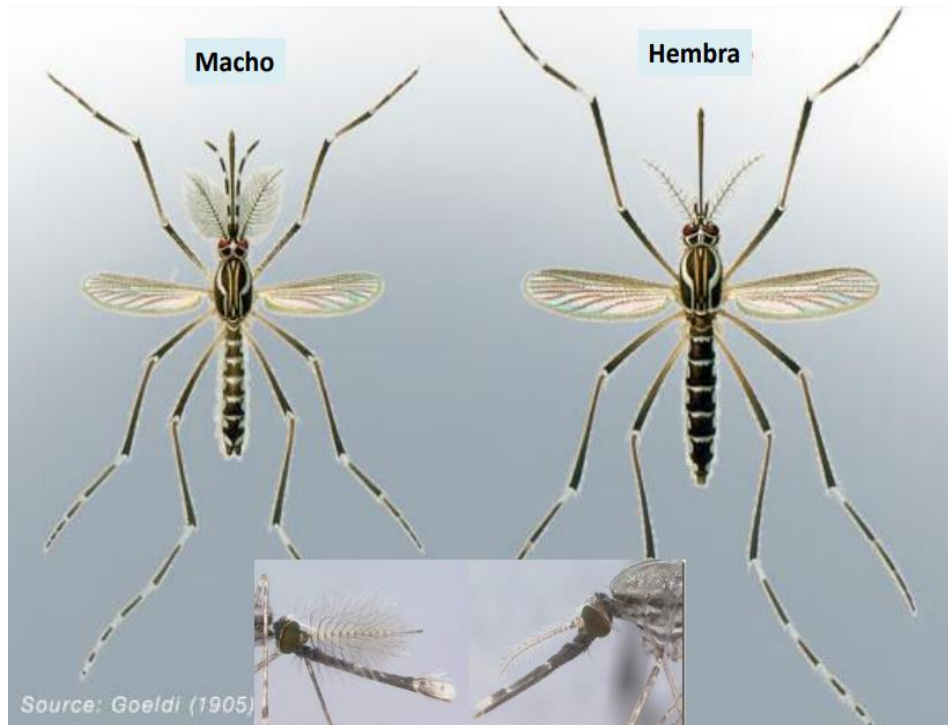


Figura. 3. Dimorfismo sexual de *A. aegypti* adulto. Los mosquitos machos cuentan con antenas más plumosas que las hembras y el gran tamaño de las hembras difiere del macho. Tomada de **Fernández et al., 1999.**

Generalmente, al emerger, el exoesqueleto del mosquito adulto deja la cubierta pupal durante el fotoperiodo, ya sea temprano por la mañana o crepuscular (Mora-Covarrubias *et al.*, 2010). El cuerpo del mosquito aun es suave, requiere por lo menos 24 horas para endurecerse y poder realizar vuelos largos (Mora-Covarrubias *et al.*, 2010). La proporción de hembras y machos es aproximadamente 1:1 pero dependiendo de la temperatura, esta proporción puede variar (Fernández *et al.*, 1999). El macho se puede diferenciar de la hembra por presentar un tamaño menor y dos antenas plumosas (Fig. 3). La dieta del macho adulto se compone del néctar que obtiene de las flores y azúcares de frutos. Los machos copulan e inseminan a las hembras adultas para producir los huevos, la hembra adulta debe alimentarse de sangre durante un ciclo gonotrófico tanto en condiciones de insectario y natural.

2.3 El dengue en México

El dengue es una enfermedad febril aguda, este virus pertenece al género *Flavivirus* se compone de cuatro serotipos antigénicamente distintos, los cuales circulan periódicamente en áreas tropicales. Este virus es transmitido por mosquitos hembras principalmente de las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, siendo uno de los principales virus transmitidos por estos vectores (Torres *et al.*, 2014). Durante las últimas décadas, el virus dengue ha representado un problema severo de salud pública. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), casi la mitad de la población en los trópicos se encuentra en riesgo de contraer esta enfermedad, en donde las personas más afectadas son las que tienen mayores carencias en servicios de salud pública (Torres, *et al.*, 2014). En la Figura 4, se muestra el panorama epidemiológico hasta el 2023 en las Américas según la Organización Panamericana de la Salud (PAHO, 2023.), se observa un aumento en el número de casos totales de fiebre por dengue, desde el 2010 hasta el 2021 y en la cual México cuenta con los cuatro serotipos del virus dengue (DENV) circulando.

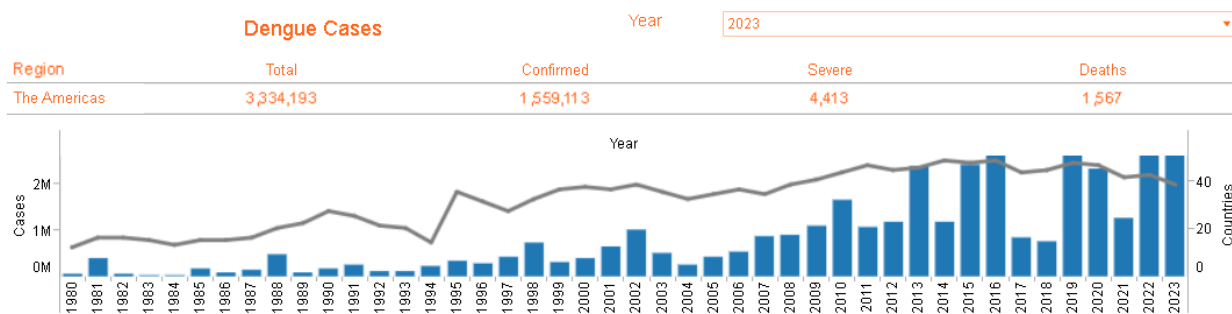


Figura 4. Casos reportados de fiebre por dengue en las Américas. Se muestra el número de casos de fiebre por dengue va en aumento desde el 2010. Datos obtenidos de <https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en.html>

2.4 El Virus Dengue

Es un virus que se encuentra clasificado en el cuarto grupo según la clasificación de Baltimore, por presentar una cadena monocatenaria de RNA de polaridad positiva (+), presenta una membrana lipídica icosaédrica, la única hebra de RNA codifica para un polipéptido, que contiene tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales, las cuales intervienen en los procesos de ensamblaje y replicación viral (Velandia *et al.*, 2010).

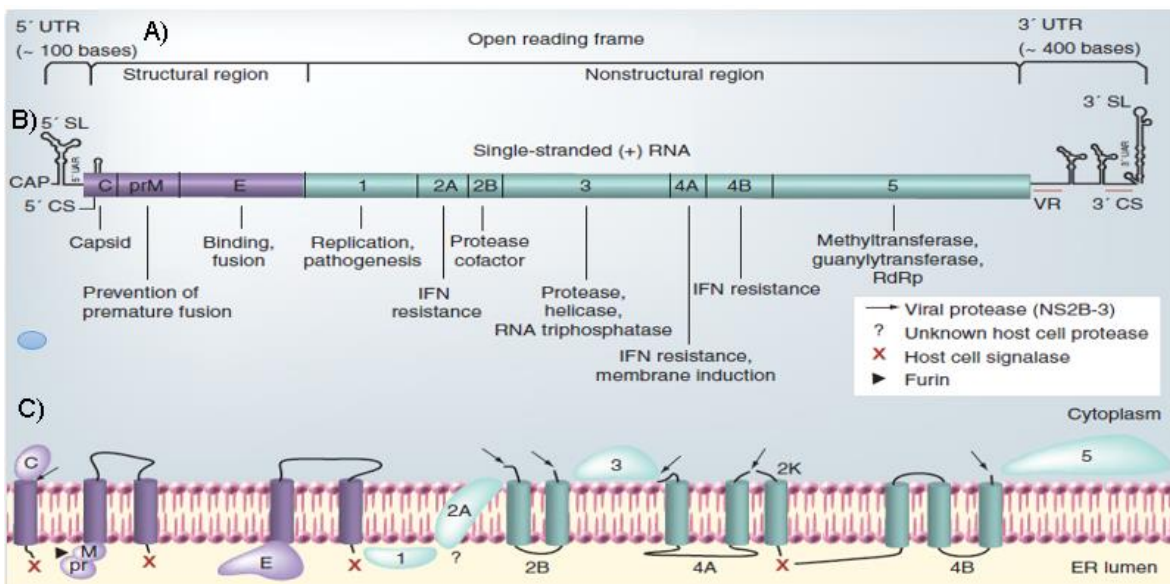


Figura 5. Esquema de la organización del genoma del virus dengue. A) RNA genómico del virus del dengue. B) Sitios en los que se encuentran distribuidos los pares de bases de las proteínas del virus dengue antes de ser traducidas a proteínas. C) Distribución de la poliproteína del virus dengue en el retículo endoplasmático de una célula blanca. (Bartenschlager & Miller, 2008).

Las proteínas estructurales son la Cápside, Pre-Membrana y de Envoltura. La proteína de la Cápside (C) consiste de cuatro hélices alfa, la tercera y cuarta hélice anclan la proteína a la membrana del retículo endoplasmático. La primera hélice situada en el extremo N-terminal de la proteína, posee aminoácidos de carácter básico que hace que se una fuertemente con el ARN genómico. La segunda hélice recluta pequeñas gotas lipídicas que promueven la formación de la partícula viral. La proteína prM (pr; pre membrana) y M (membrana), participan en conjunto para la maduración del virus. La proteína de envoltura (E) se distribuye en toda la

superficie del virus y es determinante para la interacción entre el virus y las células blanco que favorecen la endocitosis del virus (Fig. 5C).

Además, el virus dengue contiene siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, las cuales están involucradas en la replicación y en el ensamblaje viral. La proteína NS1 puede estimular al sistema inmunitario del hospedero, pues se ha demostrado que en suero de pacientes infectados con virus dengue, atrae la presencia de inmunoglobulinas y estimula la lisis mediada por el complemento. La proteína NS2 promueve el ensamblaje y la replicación viral. La proteína NS3 actúa hidrolizando los complejos no estructurales, dependiendo de su asociación con la proteína NS2B que le confiere estabilidad proteolítica. Se sabe poco sobre las proteínas NS4A y NS4B, sin embargo, se ha reportado que están implicadas en la degradación de la membrana de la célula diana y que NS4B está asociada en la replicación viral promoviendo la envoltura del virión. La proteína NS5 es multifuncional, ya que posee actividad enzimática de metiltransferasa, es responsable del capping y de la metilación del extremo 5', lo que permite que el RNA viral no sea degradado por RNAsas que se encuentran en el citosol de la célula huésped. Además, la proteína NS5, tiene actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA viral (Velandia *et al.*, 2010; Fig. 5A).

2.5 Replicación viral

El virus dengue tiene dos tipos de replicación, el *ciclo lítico* que permite utilizar la maquinaria de la célula del hospedero y destruirla; mientras que en el *ciclo lisogénico* el genoma del virus se introduce en el genoma celular hasta que algún tipo de estrés lo active continuando con la replicación viral. Una vez que la proteína de envoltura interactúa con los proteoglicanos que se encuentran en la membrana celular, se dará inicio a la endocitosis a través de la membrana, favorecido por las clatrin, lipoproteínas cuya única función es recubrir al virión. Posteriormente, se forma el endosoma, el cual se fusiona con el lisosoma, acidificando el pH de la vesícula, esto favorece la exposición y el anclaje, liberando la nucleocápside al citoplasma (Fig. 6; Bartenschlager & Miller, 2008; Velandia *et al.*, 2010).

En el momento en el que la nucleocápside se encuentra libre en el citoplasma, se da inicio a los procesos de replicación del genoma viral. La síntesis de la poliproteína se lleva a cabo en el retículo endoplásmico con asistencia de proteasas celulares y la actividad de la proteína NS3, liberando así a las proteínas estructurales y no estructurales (Velandia *et al.*, 2010). Una vez separadas las proteínas, se lleva el proceso de ensamblaje de las proteínas estructurales (M, PrM, E) en el retículo endoplásmico rugoso. Posteriormente, la enzima furinasa se encarga de madurar al virión en el aparato de Golgi, provocando que el virus sea liberado fuera de la célula mediante exocitosis (Bartenschlager & Miller, 2008).

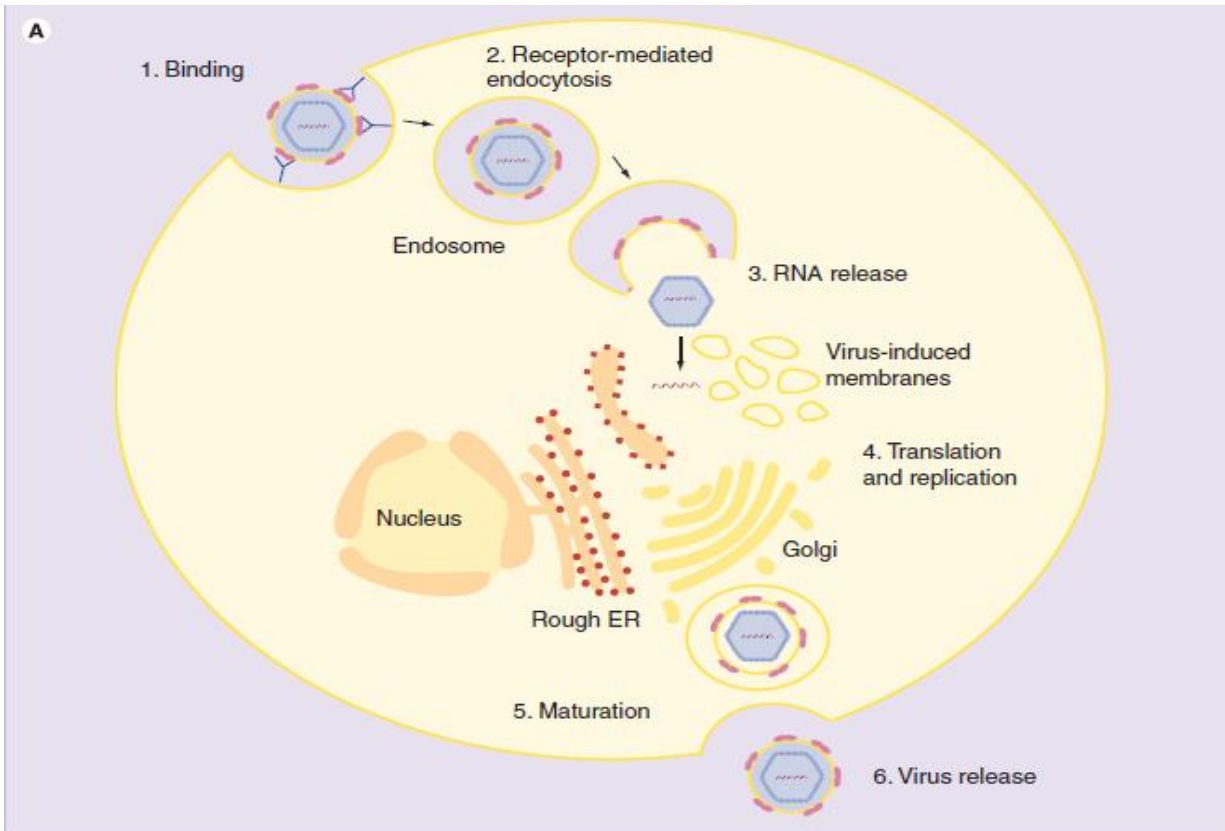


Figura 6. Diagrama del ciclo viral intracelular del virus del dengue y la localización subcelular de cada uno de los eventos. 1) Unión del virus a la membrana celular. 2) Virus endocitado mediante receptores. 3) Liberación del RNA viral. 4) Replicación del RNA y translocación al RE. 5) Maduración en el citosol celular. 6) Liberación del virus al medio. **Tomado de Bartenschlager & Miller, 2008.**

2.6 SISTEMA INMUNOLÓGICO EN EL MOSQUITO

2.6.1 Respuestas inmunitarias en el mosquito

Los mosquitos presentan una respuesta inmune innata que consiste en un sistema humoral y celular capaz de defenderse contra patógenos que les pueden ocasionar daño. En *A. aegypti* se encuentra como primera línea de defensa una barrera física como el exoesqueleto de quitina, posteriormente el cuerpo graso y la matriz peritrófica, que están compuestas de fibrillas y glicoproteínas de quitina, su función primordial es impedir la entrada de patógenos que puedan alterar la integridad del organismo. En la respuesta de la inmunidad humoral, se liberan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, propiciando daño oxidativo, esta respuesta inmune se inicia a través de la unión de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) y los Receptores de Reconocimiento de Patógenos (PRRs), induciendo la síntesis de genes efectores como los péptidos antimicrobianos (PAMs). Por ejemplo, las Defensinas ricas en cisteínas, las Cecropinas, Gambicinas, Atacinas, entre otros (Saraiva *et al.*, 2016). Los PAMs se unen en la membrana de los patógenos para desestabilizar la membrana plasmática. Por otra parte, también se liberan otras cascadas enzimáticas como la Pro-fenoloxidasa, la cual favorece la melanización de los patógenos (Hillyer *et al.*, 2010; Fig. 7).

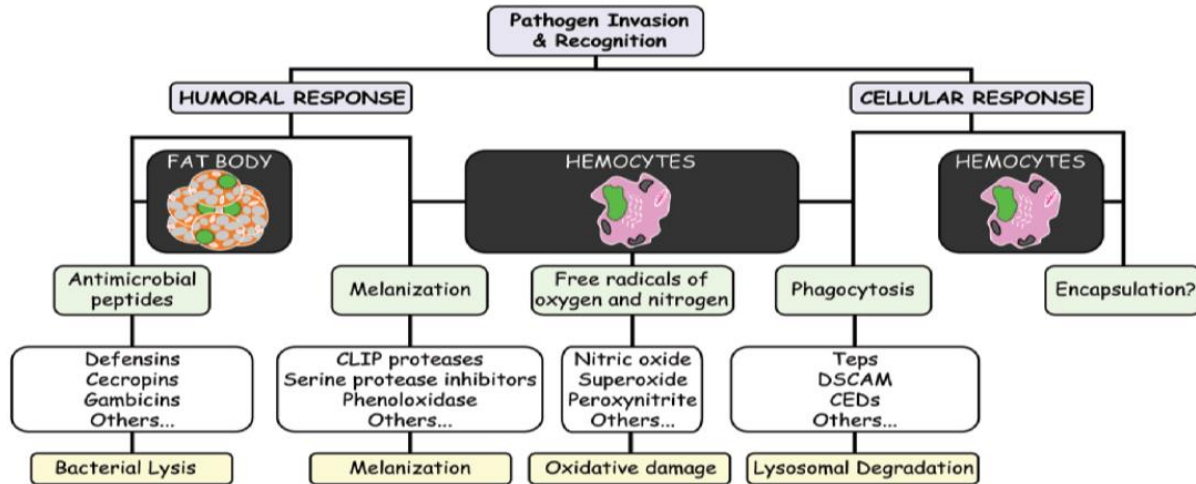


Figura 7: Diagrama de flujo de la respuesta inmune celular y humoral en los mosquitos. Cada una de las respuestas inmunitarias está iniciada por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y los factores que conducen a la muerte celular. Tomado de **Hillyer (2010)**.

En la respuesta inmune celular es responsable la actividad fagocítica mediada por los hemocitos presentes en la hemolinfa del mosquito como lo muestra la Figura 8, induciendo la degradación del organismo invasor por medio de lisozimas. La fagocitosis es un proceso con dos objetivos; la defensa de invasores externos por ingestión, la eliminación de agentes intrusos, homeostasis y remodelación tisular de las células dañadas. Se ha demostrado que la fagocitosis de cuerpos apoptóticos prepara a los hemocitos para que se vuelvan reactivos a las señales de daño. Otro mecanismo de defensa celular es la encapsulación, cuyo objetivo es eliminar los parásitos multicelulares demasiado grandes para ser fagocitados. Los hemocitos implicados en este proceso, se adhieren entre sí y sobre la superficie de las partículas extrañas, a través de moléculas de adhesión formando capas celulares, cuando la encapsulación está completamente formada, los hemocitos inician un proceso de melanización de la cápsula y esto tiene lugar a la activación de la Pro-fenoloxidasasa (Melillo *et al.*, 2018).

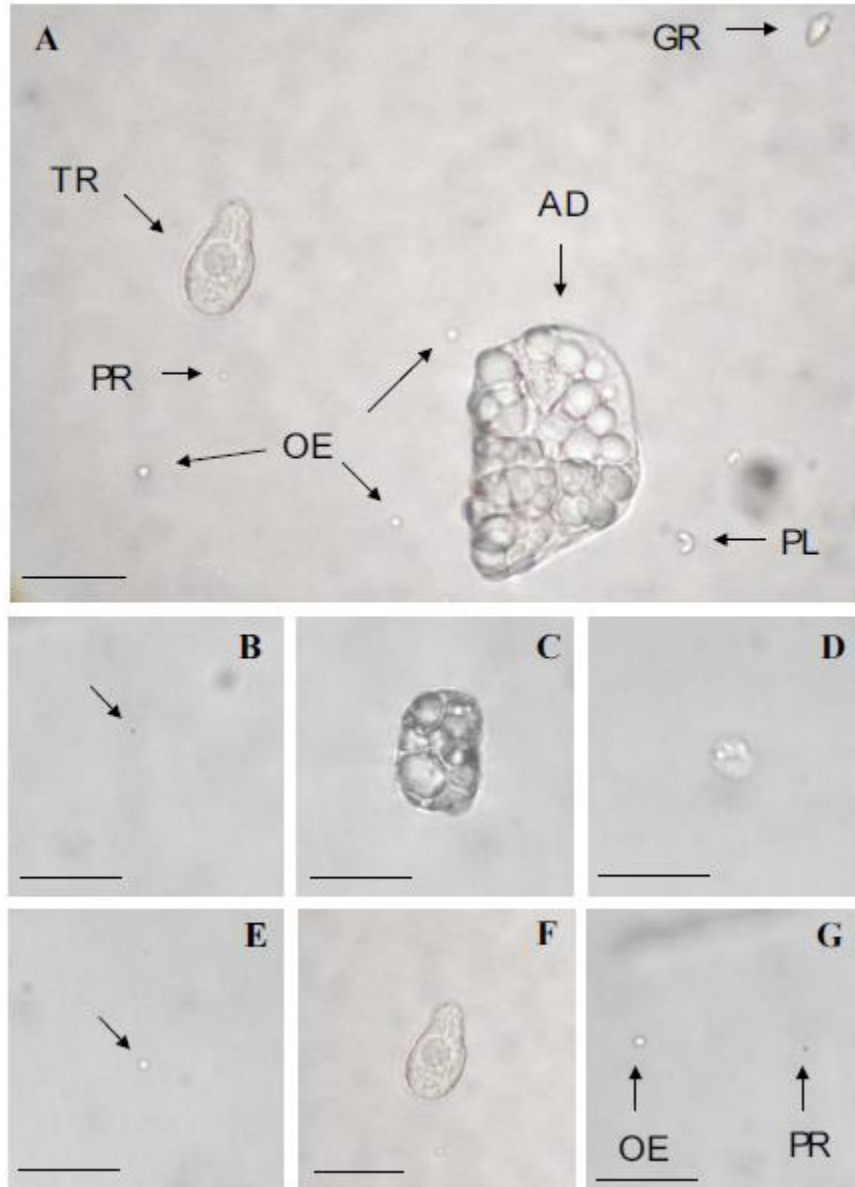


Figura 8: Hemócitos vivos de *A. albopictus* observados en Cámara de Neubauer a través da microscopia de luz. A) Todos los tipos celulas, B) Prohemócito (PR), C) Adipohemócito (AD), D) Granulócito (GR), E) Oenocitóide (OE), F) Trombocitóide (TR), G) Oenocitóide y Prohemócito. Barras = 25µm. Tomado de Rocha *et al.*, 2011.

2.6.2 Respuesta inmunológica antiviral en mosquitos

Generalmente, los mosquitos *A. aegypti* adquieren el virus a través de la alimentación de sangre infectada, una vez que el virus ingresa al intestino del mosquito, comienza su replicación viral, esto tiene como consecuencia la activación de vías inmunitarias como las vías de señalización de Jak-Stat, Toll e IMD (Fig. 9), así como las vías de RNA de interferencia (RNAi) (Fig. 10). Se ha reportado en el mosquito que a los diez días post-infección con virus dengue, las especies reactivas del oxígeno (ROS) se suprimen, pero se mantienen los efectores de las vías Toll y Jak-Stat (Mukherjee *et al.*, 2019).

La activación de la vía de señalización Toll requiere la unión del ligando derivado del virus por los PRRs, los cuales promueve la fosforilación de proteínas como Relish 1 (REL 1) que actúa como un factor de transcripción para genes que codifican péptidos antimicrobianos (PAMs). Xi y colaboradores (2008), mencionan que la activación de la vía de señalización inmune Toll está fuertemente regulada por *Rel 1* a través de la activación de diversos PRRs y sus péptidos antimicrobianos tras una infección por virus dengue.

La vía de señalización IMD, también se activa mediante la unión a los receptores de membrana, provocando que se activen dos segmentos, las quinasas C-Jun N-terminal (JNK) y Relish 2 (REL 2); cuando REL 2 se fosforila y se libera, permite la entrada al núcleo para sintetizar los PAMs.

La vía Jak-Stat es una vía de señalización inmune innata de insectos caracterizada en *Drosophila melanogaster*, se activa mediante la unión de diferentes ligandos promoviendo la dimerización del receptor, lo que permite la fosforilación de las quinasas, liberándolas y permitiendo que lleguen al núcleo hacia los genes efectores de los PAMs (Mukherjee *et al.*, 2019), Souza-Neto y colaboradores (2009), realizaron un silenciamiento genético mediado por ARNi del regulador negativo *PIAS* de la vía Jak-Stat o los reguladores positivos *Hop* y *Dome*, la ausencia de ambos reguladores condujo a un aumento en la infección por dengue a los tres días post-infección.

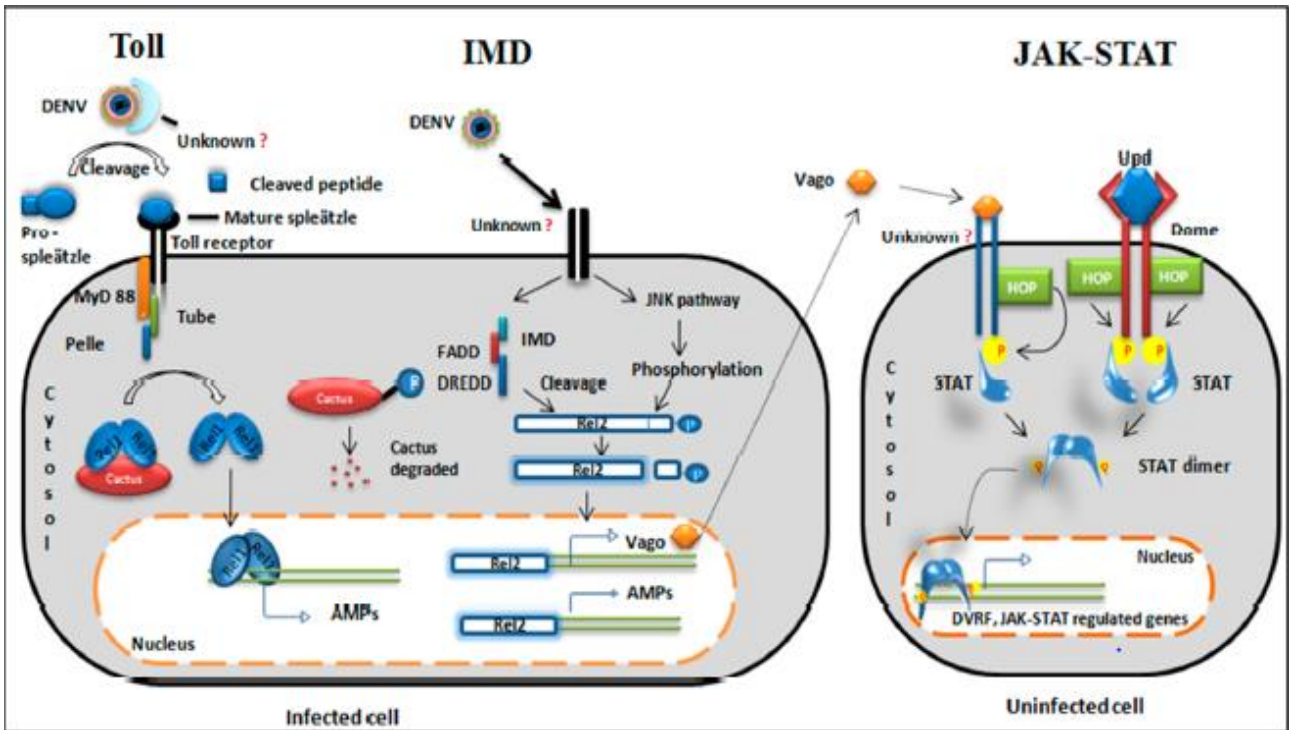


Figura 9. Vías de inmunidad antiviral en mosquitos *Aedes aegypti*. **Vía Toll:** el virus es reconocido por un receptor citoplasmático desconocido. La citocina pro-spleätzle se escinde a la citocina spleätzle activa y se une al receptor de Toll. Las proteínas adaptadoras se incorporan al receptor Toll. El regulador negativo de cactus se degrada y liberá el dímero Rel1, para poder trasladarse al núcleo. El dímero Rel1 actúa como factor de transcripción de genes regulados por Toll que sintetiza a los péptidos antimicrobianos (PAMs) (cecropina y defensina). **Vía IMD:** el virus se une a un receptor transmembrana de la célula y divide la vía en dos segmentos. Un segmento activa la vía JNK y fosforila Rel2. Otro segmento recluta otras proteínas adaptadoras, del dominio de muerte asociado a fas (FADD) y proteína similar a ced-3 / Nedd2 relacionada con la muerte (DREDD) para escindir el dominio fosforilado C-terminal de Rel2, escindido se traslada al núcleo y transcribe PAMs y una proteína secretora llamada Vago. **Vía JAK-STAT:** esta vía es activada por una proteína similar a una citocina de una célula o por el ligando Upd de JAK-STAT conservado. Vago se secreta a partir de células infectadas cercanas, se une a un receptor desconocido, y recluta la quinasa HOP (Rocha *et al.*, 2011) De manera similar, los receptores Dome se unen a Upd y la fosforilación del receptor, se produce a través de la quinasa HOP. El receptor fosforilado es un sitio de acoplamiento para STAT, la fosforilación STAT conduce a la dimerización. El dímero STAT se transloca al núcleo y generando genes efectores del DENV, denominados factores de restricción del virus del dengue (DVRF). DVRF 1 es el receptor transmembranal de la vía y DVRF 2 reconoce al virus por los dominios anticongelante y alérgeno. El dominio del alérgeno se ha reportado en el gen inmune MDL1 del receptor de reconocimiento de patrones (PRR) de *Anopheles gambiae*. Se sabe que el gen inmune MDL1 tiene actividad *anti-plasmodium*. Por lo tanto, DVRF2 podría ser un PRR y participar en el reconocimiento de DENV (Souza-Neto *et al.*, 2009). **Esquema tomado de Mukherjee (2019).**

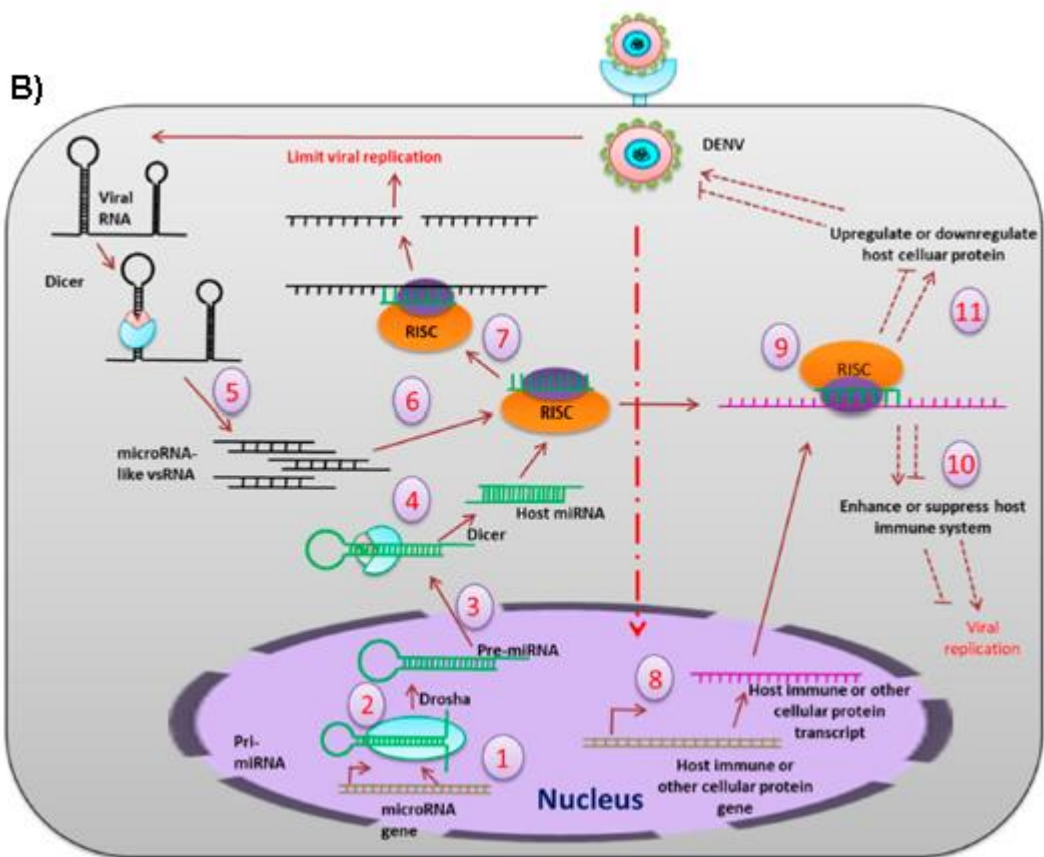
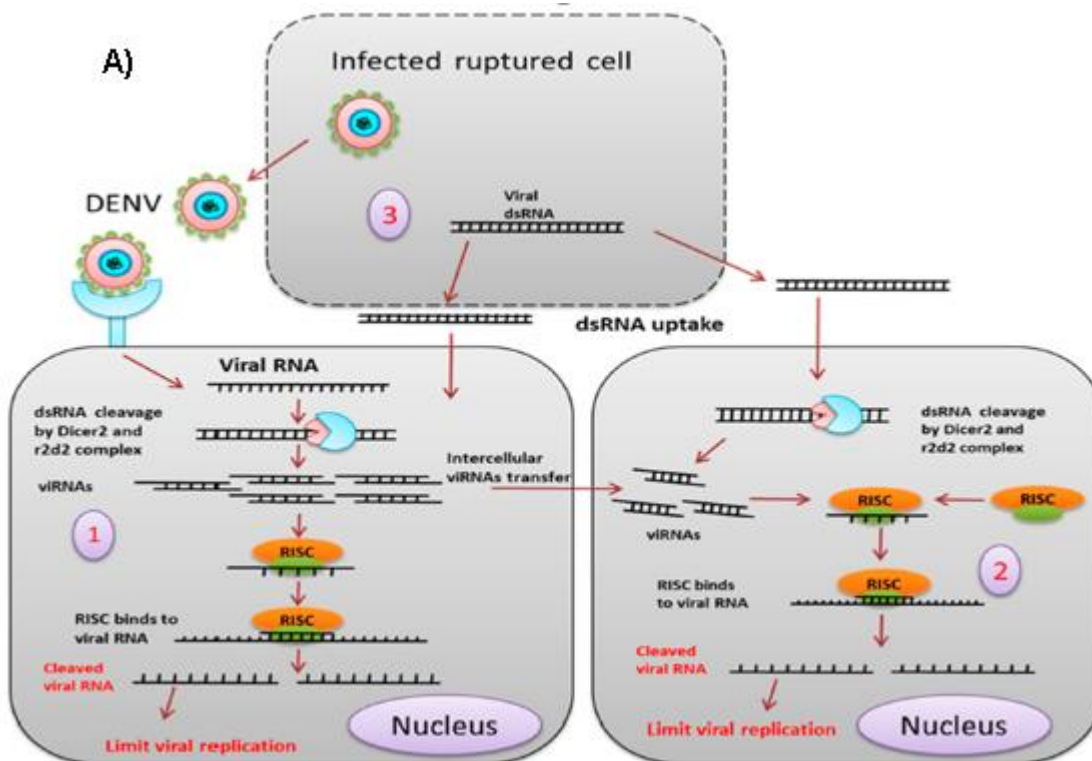
2.6.3 La vía de RNA interferente en mosquitos

Existen diferentes tipos de silenciamientos de RNA viral, cuyas diferencias se basan principalmente en la naturaleza de los complejos efectores (Vázquez *et al*, 2006). Se dividen en tres vías: siRNA (small interference RNA), miRNA (micro RNA) y piRNA (piwi RNA).

La vía de los siRNA, se activa cuando el RNA viral se replica formando una doble cadena de RNA (dsRNA) o cuando este es adquirido del exterior de manera exógena, promoviendo que las proteínas como Dicer 2 y R2D2 detecten estos dsRNA para que se active el Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés), cortándolo en 21 a 23 nucleótidos, que posteriormente son degradados por la proteína Argonauta 2 (Fig. 10A).

En la vía de los miRNAs, se transcriben desde el genoma del hospedero miRNAs primarios (*pri-miRNAs*), después la ribonucleasa Drosha madura al *pri-miRNA*, ya fuera del núcleo los *pri-miRNA* se vuelven miRNAs precursores (*pre-miRNAs*) que tiene un tamaño aproximadamente de 70 pares bases (pb). Los *pre-miRNAs* son escindidos en el citoplasma, donde Dicer 1 los lleva al complejo RISC y son cortados en pequeños fragmentos (Fig. 10B).

En el mecanismo de la vía de los piRNA durante una infección viral, el ARN viral es procesado por las proteínas PIWI1, PIWI5 y PIWI6 para formar un piRNA primario. Este piRNA primario puede sufrir un bucle de amplificación del tipo ping-pong para producir un piRNA secundario dependiente de Argonauta 3 (Fig. 10C).



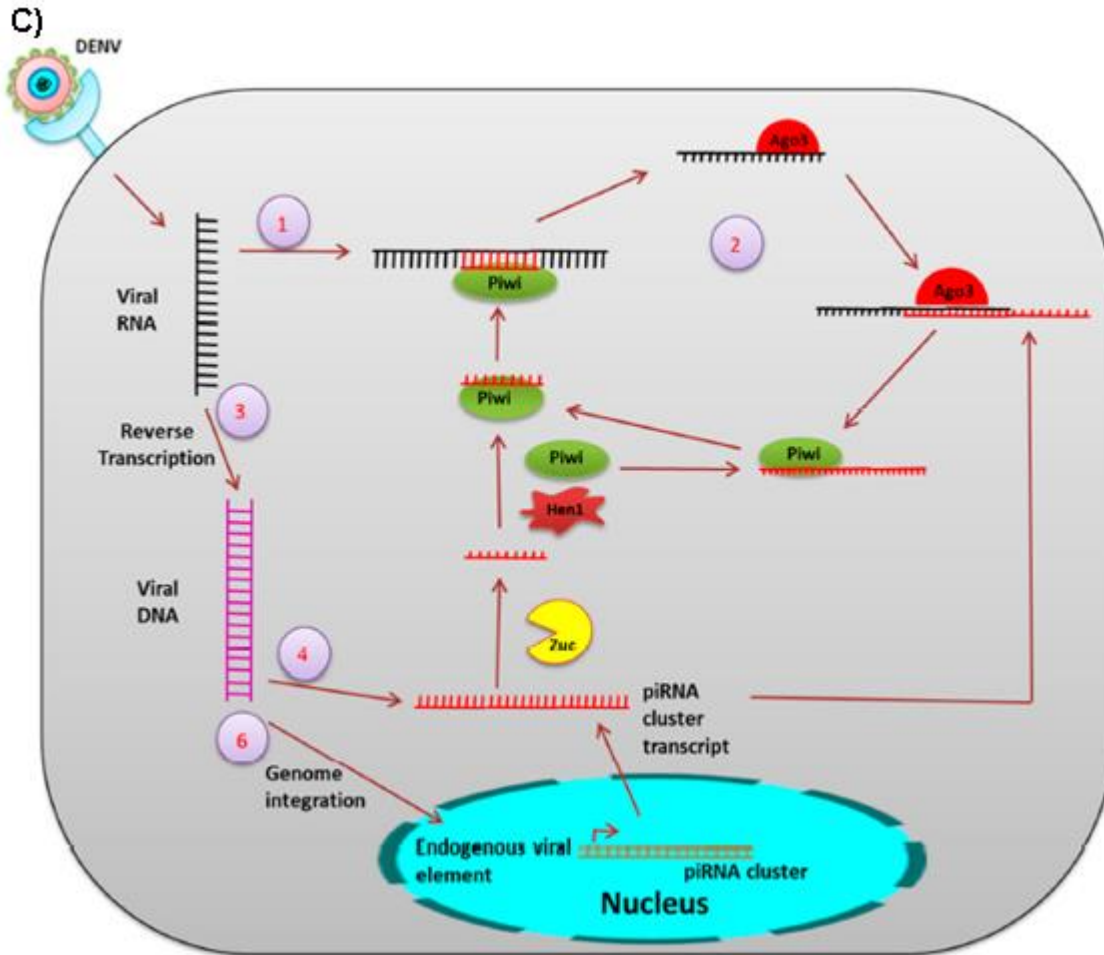


Figura 10. Esquema de las vías antivirales a través de los RNAi. siRNA (small interference RNA), miRNA (micro RNA) y piRNA (piwi RNA). A) siRNA, se activa cuando el dsRNA derivado del virus es reconocido y escindido por el complejo Dcr2 y r2d2 en aproximadamente 19-21 pb. Los dúplex de ARNip se cargan en RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN), que degrada la hebra del virus. La señal de siRNA o el siRNA del virus entra a la célula vecina no infectada a través de una unión gap o puente citoplasmático. Liberación de dsRNA viral de la célula infectada es absorbida por las células, lo que proporciona inmunidad adaptativa por parte de la vía de siRNA. **B) miRNA**: miRNA primarios (pri-miARN) se transcriben del genoma del huésped, que es escindido por la proteína nuclear Drosha en precursores de miARN (pre-miARN) de aproximadamente 70 pb de longitud, que luego se transportan al citoplasma, donde se escinden aún más por Dicer en 21 -23 pb de miARN de longitud. Por otra parte, el ARN viral, que forma estructuras secundarias en horquilla, también es escindido por Dicer para generar ARN viral pequeño, similar a microARN y se cargan adicionalmente en RISC. La infección viral también influye en la producción de transcripciones inmunes del huésped y otras transcripciones celulares. La traducción de estas transcripciones también están moduladas por los miARN del huésped o los ARN pequeños virales similares a microARN. Esto resulta en la regulación hacia arriba o hacia abajo de las moléculas inmunes y otras proteínas celulares del hospedero, que puede regular positiva o negativamente la replicación viral en la célula huésped. **C) piRNA**: Durante la infección viral, el ARN viral es procesado por las proteínas PIWI, PIWI5 y PIWI6, para formar el piRNA primario. Este piRNA primario puede sufrir un bucle de amplificación de tipo ping-pong para producir piRNA secundarios dependiente de Ago3. Además, el ARN viral también se transcribe de forma inversa para formar ADN viral (vDNA). Estas transcripciones derivadas de vDNA sirven como precursores adicionales para la producción de piRNA viral. La integración genómica de vDNA podría ocurrir. La integración en la línea germinal conduce a la formación de un elemento no retroviral endógeno. **Tomado de Mukherjee (2019).**

2.6.4 Priming inmunológico en insectos

El "priming inmunológico", se define como la capacidad de un individuo de intensificar o mejorar su respuesta inmune contra un patógeno después de haber recibido un estímulo previo (ya sea patógenos muertos por calor, dosis subletal, inmunógeno, daño, etc.). Este fenómeno se considera análogo a la inmunidad adaptativa de los vertebrados, debido a que los invertebrados carecen de la maquinaria que se requiere para generar una respuesta inmune adaptativa (Little & Kraaijeveld, 2004; Sadd & Schmid-Hempel, 2009). Un ejemplo de este fenómeno es el trabajo que realizó Wu-Gongqing (2014), quién reportó la sensibilización de las larvas de *Galleria mellonella* con perlas de dextrano, potenciando su sistema inmune y promoviendo una mejor encapsulación de patógenos. Otro estudio demostró que la inmunización de las larvas de *Bombyx mori* con bacterias *Photobacterium luminescens* y *Bacillus thuringiensis* muertas por calor, mejoran su respuesta inmune contra los mismos patógenos ante un segundo encuentro con una dosis letal. Hernández-Tablas (2017), demostró que la sensibilización de *Anopheles albimanus* contra *Plasmodium bergeri*, promueve una mejora en la velocidad de la respuesta inmune, liberando una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno. Milutinović & Kurtz (2016) construyeron un árbol filogenético, en el cual se reportan a los organismos estudiados en diversos trabajos de priming inmunológico en invertebrados, considerando los métodos de infección, los patógenos utilizados e incluso si se genera una memoria inmunológica (Fig. 11).

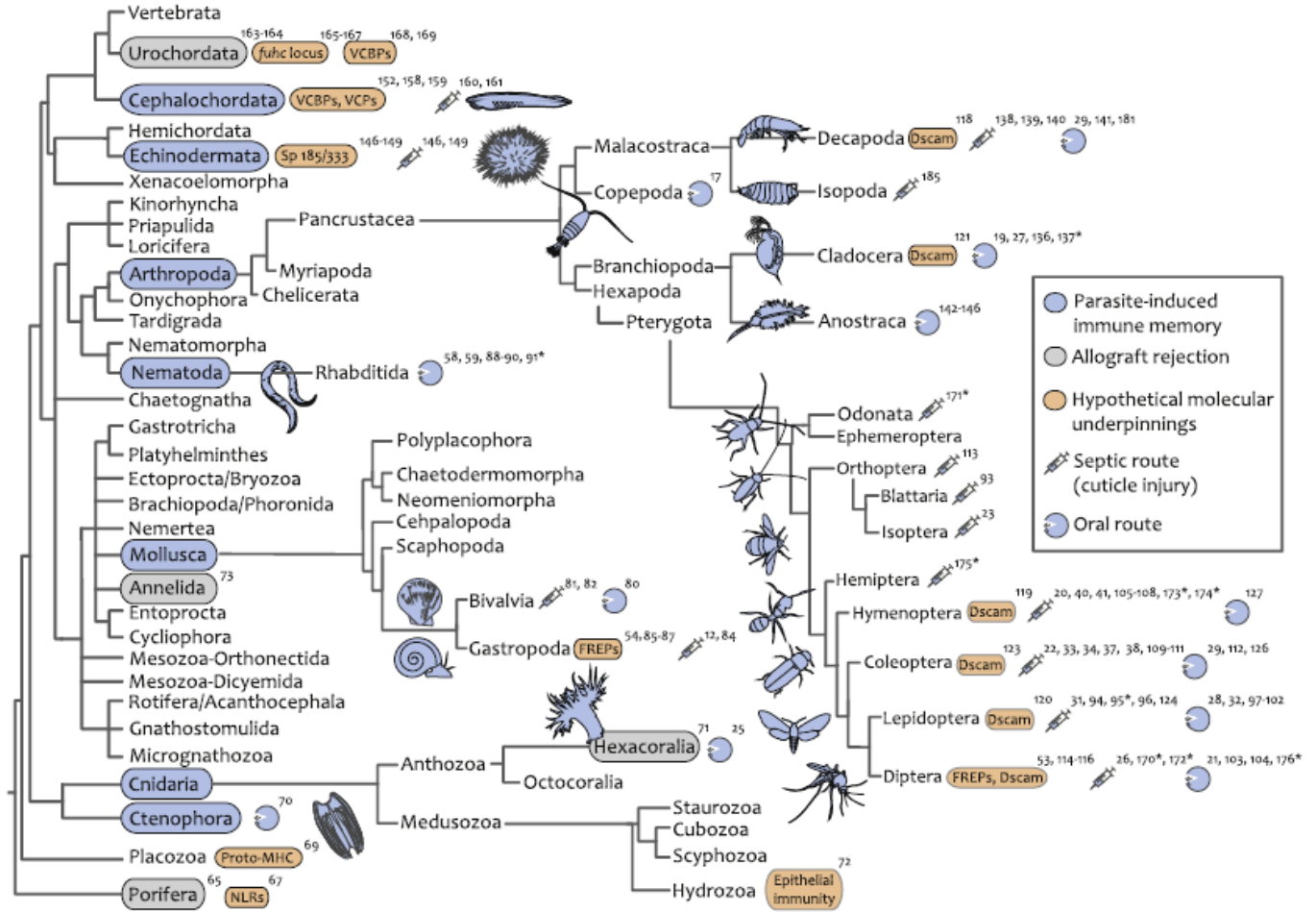


Figura. 11. Árbol filogenético de la fenología actual de la memoria inmune inducida en invertebrados. En azul se indica la memoria inmune por parásitos y el rechazo de injerto de tejido en color gris, con algunos de los que se discuten actualmente mecanismos hipotéticos subyacentes en color naranja. En algunos *phylum*, se han identificado moléculas candidatas para la memoria inmune, no obstante, el mecanismo de la memoria inmune en sí mismo aún no ha sido descrito. Los estudios que utilizan una herida séptica para el priming inmune; por ejemplo, un pinchazo o inyección de antígenos, penetración cuticular por hongos o trematodos e infección por parasitoides, se indican con una jeringa; mientras que el priming inmune por vía oral está indicado por un círculo. El asterisco en el número de referencia respectivo indica que no se encontró evidencia de memoria inmune en ese estudio en particular. **Tomado de Milutinović & Kurtz, 2016).**

3. ANTECEDENTES

3.1 Priming inmunológico en *Aedes aegypti* contra el virus dengue

Estudios recientes han demostrado que los mosquitos *A. aegypti* son capaces de mejorar su respuesta inmunológica a través del priming inmunológico en contra el virus dengue. Serrato-Salas y colaboradores (2018), observaron una disminución en la replicación del virus (intestinos y carcasa) en mosquitos que fueron previamente infectados con virus dengue inactivo (priming), en comparación con mosquitos que no tuvieron un contacto previo con el virus (DENV)(Fig. 12).

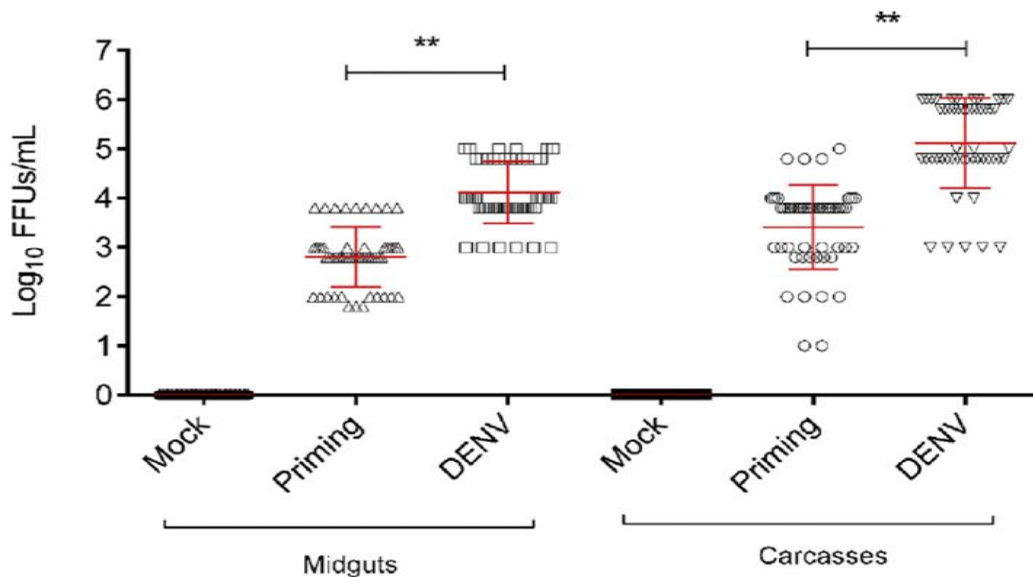


Figura 12. Cuantificación de Unidades Formadoras de Focos (UFF) en intestino medio y carcasa de mosquitos adultos individuales con y sin priming inmune. Mock (mosquitos que se alimentaron con sangre sin infectar); Priming (mosquitos que se estimularon previamente con sangre y virus inactivo y un segundo reto con virus activo), Denv (mosquitos que no fueron infectados previamente con virus inactivo y un segundo reto con virus activo) (Serrato-Salas *et al.*, 2018).

Por otra parte, Vargas y colaboradores (2020) mostraron que en *A. aegypti*, se puede inducir un estímulo inmunológico desde el estadio larval con virus dengue inactivo (1° reto), sin embargo se infectó con virus dengue activo desde la etapa de adulto y se recolectaron excretas a los 2, 7 y 14 días post segundo reto (2° reto). Se determinó que el grupo priming (Pr) obtuvo una respuesta inmunológica mejorada ante un segundo reto con virus dengue, tras estar expuestos previamente con virus inactivo tratado con luz UV (Kladwang *et al.*, 2012) en el estadio larval; en comparación con el grupo no priming (UnPr), los cuales no tuvieron un primer reto con el virus inactivo en las larvas y el grupo control (Ctrl) que representa mosquitos que no tuvieron un contacto previo con el virus tanto en las larvas como en los adultos (Fig. 13).

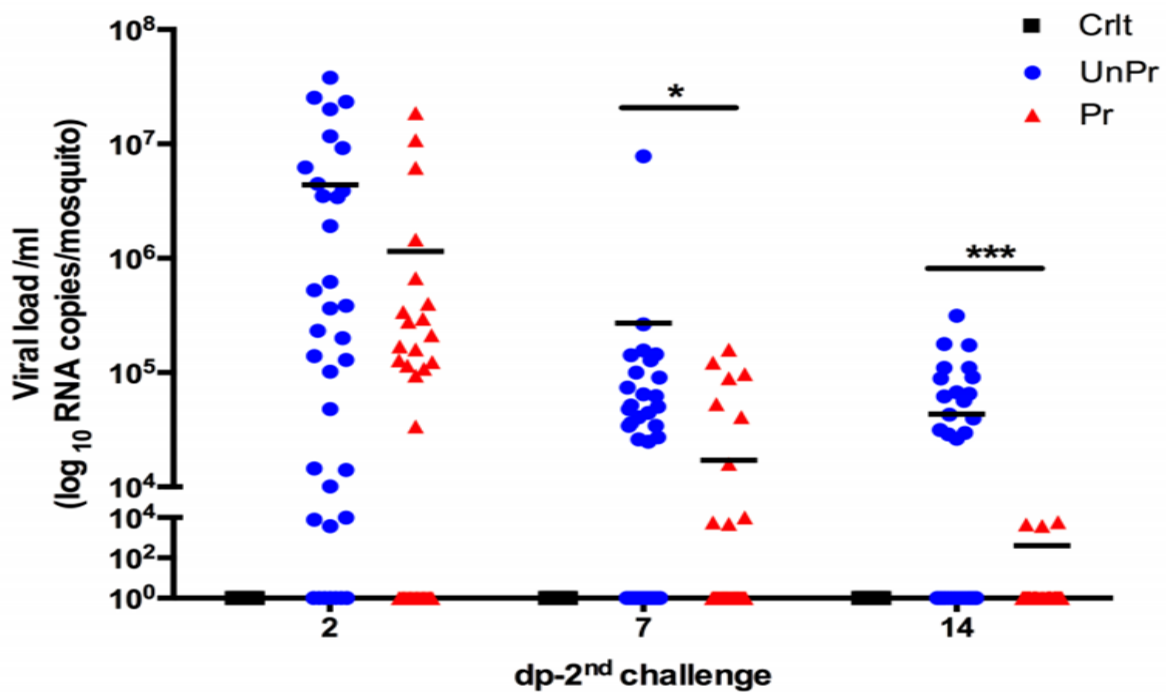


Figura 13. Carga viral del virus dengue detectado en excretas individuales de mosquitos infectados a los 2, 7 y 14 días post-2° reto. Los tratamientos están representados por color rojo como el grupo priming (Pr), color azul representa el grupo no priming (UnPr) y el color negro se representa el grupo control (Ctrl) (Vargas, *et al.*, 2020).

En este estudio, los autores sugieren que la vía de RNA interferente (RNAi) probablemente esté involucrada, ya que midieron la expresión relativa de DCR-2, AGO-2 y R2D2 en larvas, pupas y mosquitos adultos después de una exposición con virus dengue inactivo tratado con luz UV (Fig.14). Se observó la sobreexpresión de AGO-2 en la etapa de pupa después del primer reto con dengue inactivo en larvas.

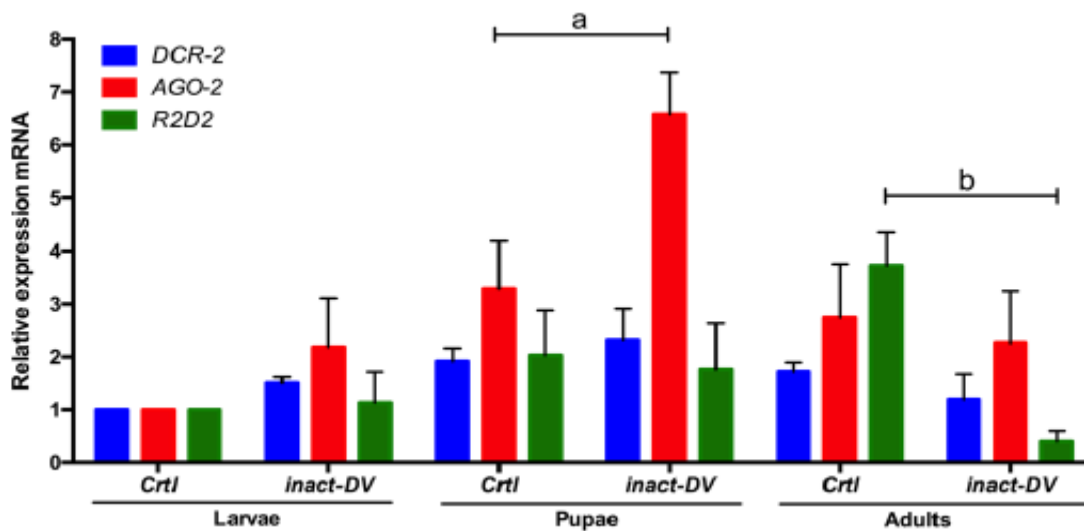


Figura. 14. Expresión relativa de DCR-2, AGO-2 y R2D2 en larvas, pupas y mosquitos adultos después de exposición con dengue inactivo con luz UV en estadio larvario durante 24 horas (Vargas, *et al.*, 2020).

El mejoramiento de la respuesta inmune de los mosquitos *A. aegypti* debería conducir a la eliminación o reducción de la carga viral, haciendo que los mosquitos sean menos susceptibles a transmitir los arbovirus.

Actualmente, el conocimiento sobre la respuesta inmune antiviral en insectos sigue siendo limitado, sin embargo, se sugiere que este priming inmunológico puede heredarse a la siguiente generación.

3.2 Priming inmune transgeneracional en los invertebrados

El Priming inmune transgeneracional (siglas en ingles “TGIP”), se define como la transferencia de memoria inmunitaria de un padre previamente inmunizado a la descendencia y las siguientes generaciones (Melillo *et al.*, 2018); esto puede resultar en la protección de la descendencia de encuentros repetidos con patógenos, que persisten de generación en generación (Tetreau *et al.*, 2019). Existen estudios que han demostrado TGIP en invertebrados. Barribeau (2016), demostró que sensibilizando a reinas de abejorros *Bombus terrestris* con la bacteria *Arthobacter gobliformis*, mostraban en su descendencia una mejora de la respuesta inmune, teniendo una expresión aumentada de genes inmunitarios (Fig. 15), en comparación con sus madres abejas reyna que tuvieron una exposición previa con la bacteria inactivada.

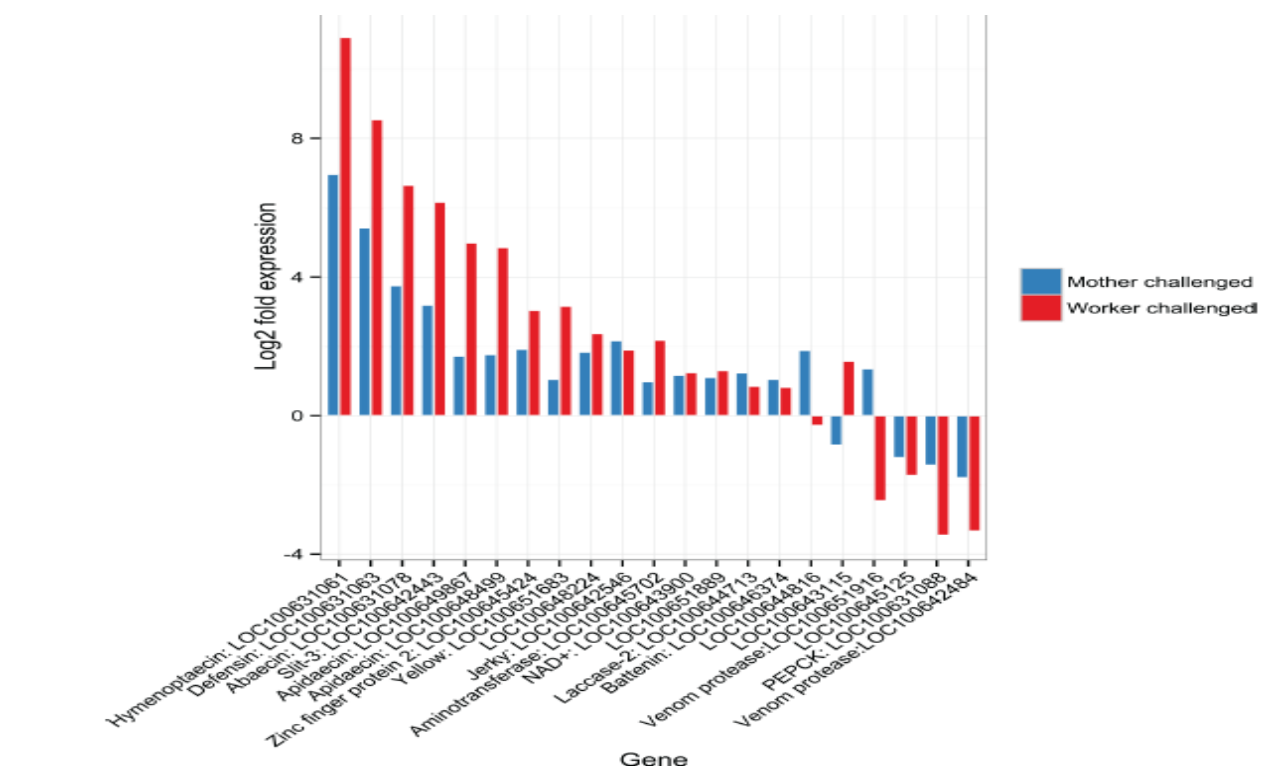


Figura 15. Expresión basada en los datos del RNAseq de abejas reinas retadas y obreras (F1). Se muestra la expresión de genes de abejas reinas e hijas (obreras) de la reina sin sensibilizar, expuestas directamente a bacteria, todos los genes expresados diferencialmente significativa (Tomado de Barribeau, 2016).

En otro estudio, se demostró que inmunizando a las madres del crustáceo planctónico *Daphnia magna* con bacterias inactivadas por calor de *Pasteuria ramosa*, se obtiene una mejora de la respuesta inmune, el cual es heredado a la siguiente generación. Little (2003), mostraron que sensibilizando a *D. magna*, con retos homólogos y heterólogos, utilizando dos diferentes cepas de *Pasteuria ramosa* (cepa A y G; Fig. 16), la descendencia obtuvo un aumento en el número de individuos vivos a través de las generaciones retadas con la cepa A, sugiriendo que por ser un organismo monoclonal y al tener un tiempo de vida tan corto existe una alta recombinación genética, la cual producen adaptaciones en contra de las otras cepas, consecuentemente promueve la proliferación de células inmunitarias nuevas (Hemocitos), preparadas para una infección secundaria (2^{do} Reto) (Little *et al.*, 2003; Fig.16).

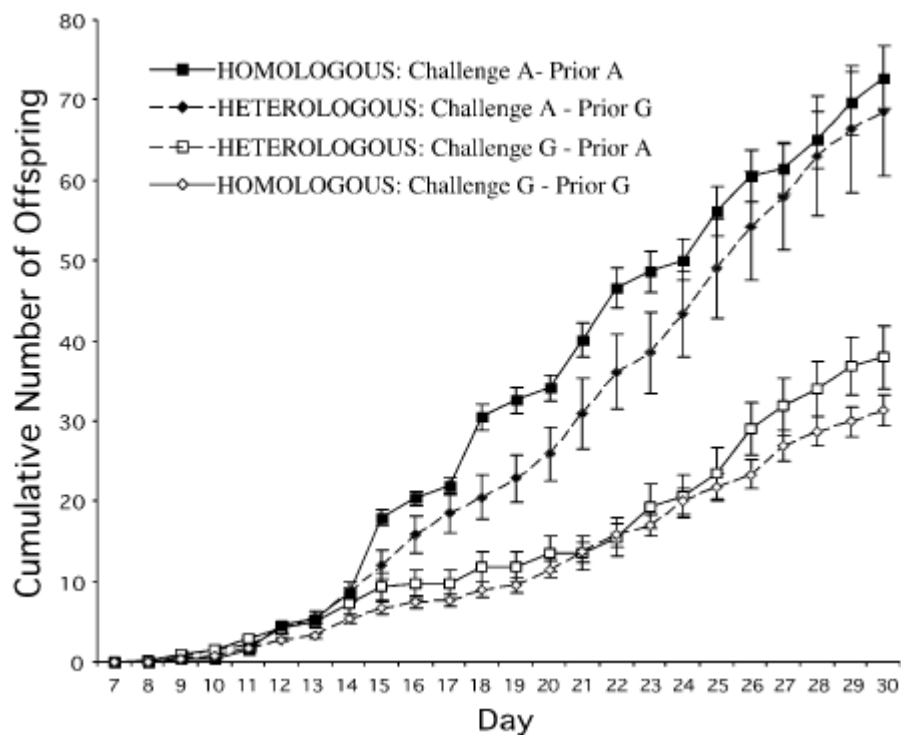


Figura 16. Número de descendientes acumulados de *D. magna* expuesta a diferentes cepas de *P. ramosa*. Los retos homólogos fueron entre la misma bacteria y misma cepa, en cuanto a las infecciones heterólogos fueron entre la misma bacteria y diferente cepa. Los hospederos con desafíos homólogos tienen un rendimiento reproductivo más alto que los hospederos de desafíos heterólogos. "Transferencia materna de la inmunidad específica de la cepa en un invertebrado" (Little *et al.*, 2003).

Por otra parte, se ha demostrado TGIP contra virus de ARN. Mondotte y colaboradores (2020), demostraron el efecto de TGIP en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Para constatar este efecto, sensibilizaron a las moscas con virus Sindbis recombinante (SINV), que metaboliza un plásmido de renilla luciferasa. Posteriormente, retaron las moscas de la generación F1 con SINV. Los autores mostraron una reducción de la infección del virus a través de la actividad de la luciferasa y de partículas virales infectivas en la generación F1 (Fig. 17), en comparación con el grupo control (sin reto inmune previo). Además, se observó que esta inmunidad se prolongó a través de 20 generaciones, pero disminuye hasta la generación 30 (Fig. 18). También se mostró el mismo efecto con diferentes virus de ARN, demostrando la existencia de TGIP antiviral dependiente de ARN, independiente de la vía de ARNi, ya que estimularon las moscas con una proteína mutante Dicer 2 (proteína nula; Pham *et al.*, 2004), la cual está involucrada en la maquinaria de ARNi. Posteriormente, en la generación F1 retaron con SINV, el cual no mostró un cambio significativo con respecto al grupo control. Los autores sugieren que el TGIP puede ser desencadenado, debido a la incorporación de elementos virales endógenos dentro del genoma.

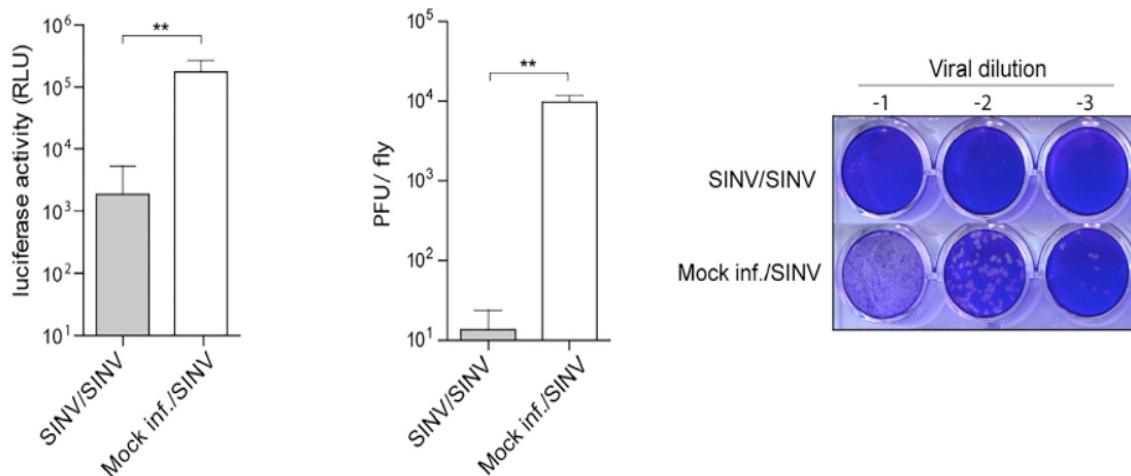


Figura. 17. Cuantificación de la replicación viral en *Drosophila melanogaste* mediante ensayos de placa lítica y Actividad luciferasa. Cuantificación de la actividad de la luciferasa usando el gen reportero de luciferasa de Renilla (RLU), de moscas hijas (F1) de madres inmunizadas (SINV/SINV) y no inmunizadas. Tomada de Mondotte (2020).

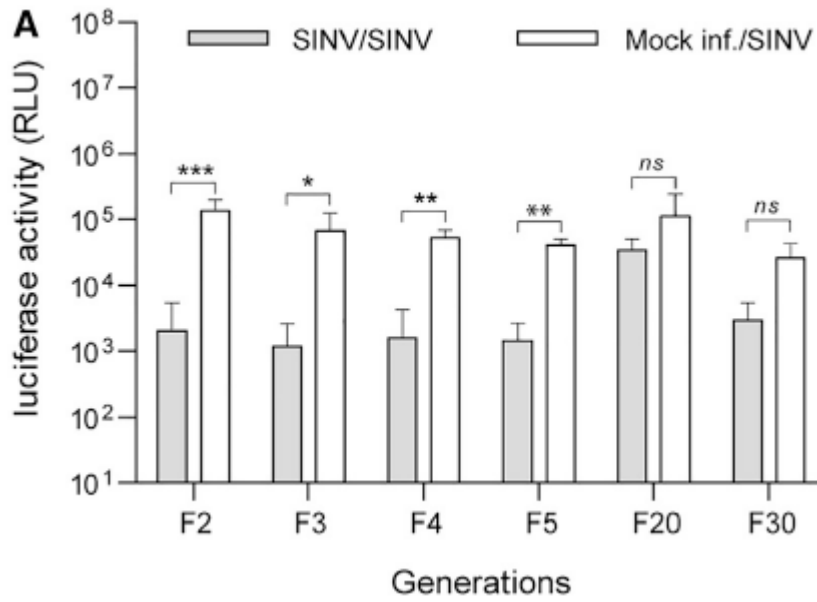


Figura 18. Efecto prolongado del TGIP en *D. melanogaster* a partir de la generación F1. Cuantificación de la expresión de luciferasa de Renilla (SINV-R) para varias generaciones (F2-F30) mediante el sistema indicador basado en el virus Sindbis (SINV). (Tomada de Mondotte,2020).

Además, ,mostraron TGIP en el mosquito *A. aegypti* con virus Chikungunya (CHIKV), un arbovirus de ARN monocatenario de sentido positivo. Al igual que el experimento anterior, los mosquitos fueron alimentados con sangre no infectada.; posteriormente, eclosionaron los huevos de la F0 previamente inmunizados. Los mosquitos de la F1, fueron retados con CHIKV en la etapa adulta, dos días después de la infección, se cuantificó la carga viral por mosquito individual, mediante ensayos de placa lítica. Se observó una disminución de las partículas virales infectivas en mosquitos de madres inmunizadas (CHIKV/CHIKV), en comparación con el grupo control (Mock inf / CHIKV). Los autores sugieren que la presencia y funcionamiento de TGIP en mosquitos *Aedes aegypti*, no es una característica única de *D. melanogaster* sino un mecanismo antiviral general heredado entre los insectos (Fig. 19).

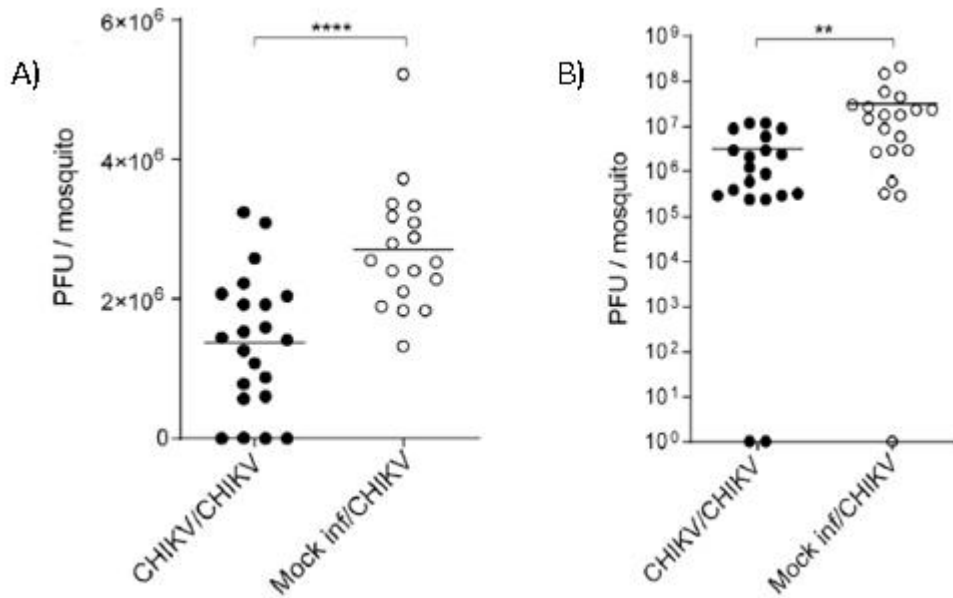


Figura. 19. Cuantificación de partículas virales infectivas mediante el ensayos de placa lítica. Cuantificación de partículas virales (UFP/ml) para mosquitos individuales mediante ensayos de placa de 2 a 3 días después de la infección viral de hijos de madres mosquitos (F0) con priming (CHIKV / CHIKV) o por mosquitos F0 sin priming (Mock inf / CHIKV) **A)** Mosquitos inmunizados mediante micro-inyección, **B)** Mosquitos inmunizados mediante sangre infectada con CHIKV. (Tomada de Mondotte,2020).

Sin embargo, hasta ahora no se ha mostrado TGIP contra del virus dengue en el mosquitos *A. aegypti*.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la problemática que existe en salud pública con respecto a la enfermedad del virus dengue (VD), es necesario generar estrategias alternativas de control biológico para disminuir su transmisión. Es por ello que, la evidencia del priming inmune (IP) en *Aedes aegypti* contra el VD y CHIKV, pudiera ser una estrategia alternativa para evitar o limitar su transmisión de estos arbovirus. Sin embargo, se desconoce si la protección al VD en *A. aegypti*, es capaz de transmitirse a la progenie. Por tal motivo en este estudio, se pretende evaluar si existe evidencia de priming inmune transgeneracional (TGIP) contra el VD, el cual nos permitirá generar conocimiento para facilitar el manejo de las poblaciones naturales de mosquitos infectados e inducir una mejor respuesta inmunitaria que limite la replicación y diseminación viral, promoviendo la disminución de la tasa de transmisión.

5. HIPÓTESIS

La inducción del priming inmunológico en el mosquito *Aedes aegypti* contra el virus dengue, será capaz de transmitir un estado de mejora inmunitaria en la progenie del mosquito ante el mismo patógeno.

6. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el estado de mejora inmunitaria en la descendencia del mosquito *Aedes aegypti* provenientes de madres inmunizadas contra del virus dengue serotipo 4.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Eclosionar huevos de *Aedes aegypti* provenientes de madres previamente inmunizadas contra el virus dengue serotipo 4 .
- Evaluar la carga viral de la progenie (F1) de mosquitos provenientes de madres previamente inmunizadas con virus dengue (F0).
- Evaluar la expresión relativa de los transcritos de marcadores de la respuesta inmune de la progenie de mosquitos de *A. aegypti* (F1), de madres previamente inmunizadas con virus dengue (F0).

8. METODOLOGÍA

8.1 Mantenimiento de la colonia de mosquitos *Aedes aegypti* cepa Rockefeller

Para el mantenimiento de la colonia de mosquitos, se hirvió 500 ml de agua potable en un matraz, disminuyendo la cantidad de oxígeno posible, posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente (22° C). Se colocaron huevecillos de mosquito de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller dentro del matraz para su eclosión (Fig. 20A). Se separaron en grupos de 200 larvas en palanganas de plástico con dos litros de agua potable (Fig, 20B), manteniendo las condiciones de temperatura entre 26° - 28°C y una humedad relativa de 60 a 80 %.

El cambio de agua se realizó diariamente y se alimentó a las larvas dependiendo los días que hayan transcurrido después de su eclosión (Apéndice 1). Al llegar al estadio de pupa, estas fueron separadas en recipientes de plástico, manteniéndolas hasta emerger como mosquito adulto, posteriormente estos fueron alimentados con sacarosa al 10%.

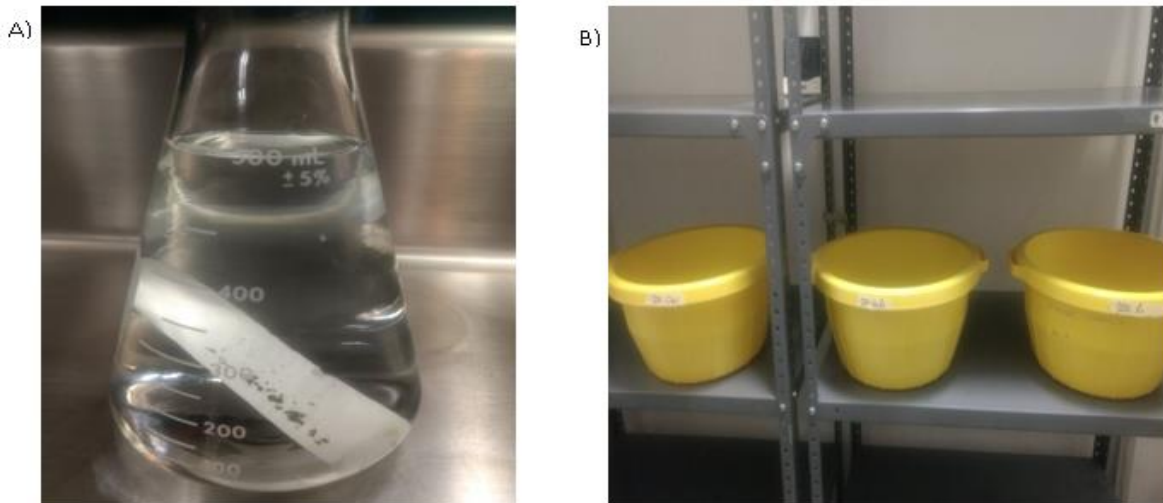


Figura 20. Eclosión de huevos y mantenimiento de larvas del mosquito *Aedes aegypti*. A) Huevos de mosquito *Aedes aegypti* siendo eclosionados en un matraz con agua previamente hervida. **B)** Palanganas con larvas recién eclosionadas.

Los mosquitos adultos de cinco días post-emergencia fueron alimentados con sangre de conejo en alimentadores de vidrio previamente estériles, los cuales se

les colocó una membrana de Parafilm para simular la piel. Posteriormente, los alimentadores fueron conectadas a un recirculador de agua a una temperatura de 37 °C durante 1 hora (Fig. 21A y B).

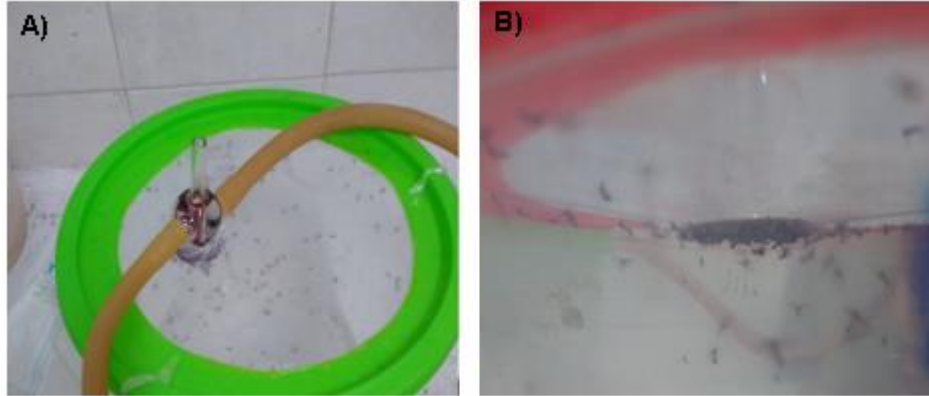


Figura 21. Mosquitos adultos de *Aedes aegypti* mediante alimentación sanguínea. A) Alimentadores con sangre de conejo conectados a un recirculador. **B)** Mosquitos alimentándose con sangre de conejo a través de la malla tul.

8.2 Mantenimiento de células Aag2 y LLC-MK2

La línea celular Aag2 de origen embrionario proveniente de mosquito *Aedes aegypti*, fue propagada en 4 ml de medio Schneider (*Caisoon Labs*) y suplementada con 10 % de suero fetal bovino (SBF; *BYproducts*), las células fueron mantenidas y sembradas en una caja de cultivo de 25 cm². Se dejaron incubando a 28 °C hasta que se obtuvo una confluencia celular del 80% para realizar un pase celular o infección viral. Las células de LLC-MK2 son de origen epitelial provenientes de riñón de mono, fueron resuspendidas en 4 ml de medio MEM (Minimum Essential Medium; *Gibson*) y suero fetal bovino al 10% (SBF; *BYproducts*) y sembradas en cajas de 25 cm². Se dejaron incubar a 37° C a 5% CO₂ hasta que se obtuvo una confluencia celular del 80%, para posteriormente realizar un pase celular o una infección viral.

8.3 Propagación del virus dengue serotipo 4

Para la propagación viral, se sembraron células Aag2 en cajas de cultivo de 25 cm², en medio Schneider con 10% de Suero Fetal Bovino y se incubaron a 28°C, obteniendo una monocapa celular del 80% (Fig. 22A). Posteriormente, se retiró el medio Schneider y se realizaron lavados con PBS 1X para eliminar residuos del medio. Posteriormente, se agregó 4 ml de medio Schneider nuevo y se agregó 100 µl de virus dengue serotipo 4 de un stock viral de 7×10^9 Unidades formadoras de placas por ml (UFP/ml), las células se incubaron aproximadamente de 5 a 7 días post-infección a 28 °C, hasta observar un efecto citopático en las células (Fig. 22B). Posteriormente, se cosechó el inóculo viral tanto de las células como del sobrenadante, el medio de cultivo se colocó en microtubos de 1.5 ml y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

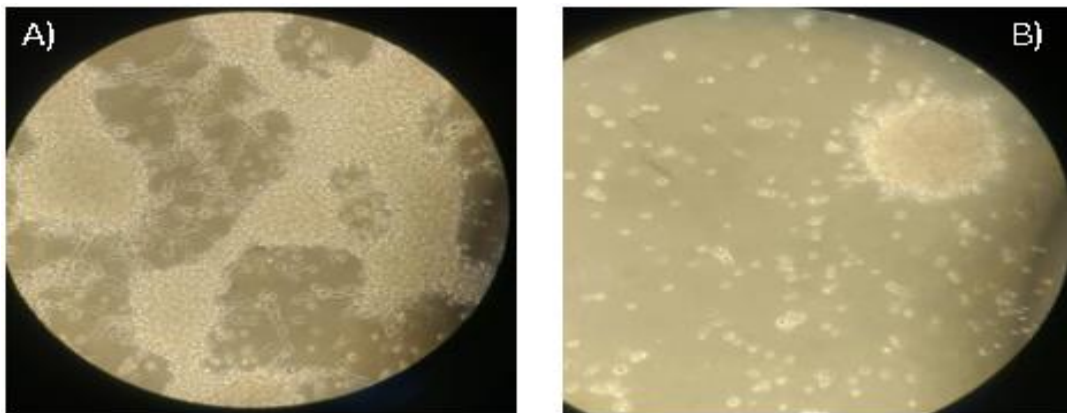


Figura 22. Efecto citopático de células de Aag2 infectadas con virus dengue. A) Células de Aag2 sin infectar con una monocapa del 80% de confluencia. B) A los 4 - 7 días post-infección con DV (7×10^9 UFP/ML), se observa el efecto citopático de las células de Aag2.

8.4 Cuantificación del título viral de dengue serotipo 4 mediante el ensayo de placa lítica

En una placa de 24 pozos se sembraron células LLC-MK2 en 2 ml de medio MEM (Minimum Essential Medium; *Gibson*), crecieron durante 7 días a 37 °C con 5% de CO₂. Una vez que la monocapa obtiene una confluencia del 80%, se agregó en el primer pozo 100 µl de stock viral, a partir de éste, se realizaron 9 diluciones seriadas en base 10. Se dejaron incubar a 37 °C al 5% de CO₂ por 1 hora, posteriormente, se retiró el inóculo y se colocó a cada pozo 400 µl de metilcelulosa-MEM al 2%. Las células fueron incubadas durante 5 a 7 días a 37 °C al 5% de CO₂, hasta observar un efecto citopático. Posteriormente, se retiró la metilcelulosa, se lavaron con PBS 1X y se fijaron las células con 500 µl de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Las células fueron teñidas con 500 µl de cristal violeta y etanol proporción 1:1. Para poder cuantificar el virus se utilizó la fórmula de unidades formadoras de placas (PFU). $PFU/ml = (\text{número de placas observables}) * (\text{factor de conversión}) * (\text{factor de dilución})$.

Donde el número de placas observables por pozo se refiere a las placas generadas por el virus, El factor de conversión es igual a un mililitro sobre el volumen del inóculo (1 ml/100 µl), el factor de dilución es el valor de dilución para la dilución de punto final (*Medina et al.*, 2012).

8.5 Inactivación del virus dengue serotipo 4 mediante luz ultravioleta (UV)

Para la inactivación del virus, se utilizó 1 ml del stock viral previamente titulado para hacer la inactivación del virus mediante la irradiación de luz ultravioleta (*Kladwang et al.*, 2012). Se colocó en una caja Petri estéril y se irradió con luz ultravioleta durante 1 hora, cada 15 minutos se homogenizó el inóculo con una micropipeta, evitando hacer burbujas. Posteriormente, el inóculo se pasó por filtros de 0.20 µm (*Corning*) y se almacenó en microtubos de 1.5 ml.

8.6 Inducción de priming inmune a mosquitos de *Aedes aegypti* con virus dengue serotipo 4 (F0)

Para el primer reto inmune, se colocaron tres grupos de 200 mosquitos adultos hembras 5 días post-emergencia en diferentes tratamientos, se les colocó a cada grupo un alimentador artificial con una membrana de papel parafilm, los alimentadores artificiales estaban conectados a un recirculador de agua, el cual tenía la temperatura de 37° C, la alimentación duró 1 hora. (Figura 23):

- **Grupo Testigo (C):** Mosquitos adultos que fueron alimentados con 1 ml sangre de conejo.
- **Grupo Priming (Pr):** Mosquitos adultos alimentados con virus dengue inactivo en una proporción 1:1 en sangre de conejo.
- **Grupo No Priming (NoPr):** Mosquitos adultos alimentados con 1 ml sangre de conejo.

Se mantuvieron a los mosquitos adultos bajo condiciones de insectario y se alimentaron diariamente con solución de sacarosa al 10%. A los 7 días post-1º reto inmune, se les realizó un 2º reto inmune de acuerdo a los siguientes tratamientos:

- **Al grupo Testigo (C):** Se realizó una segunda alimentación sanguínea durante 1 hora.
- **Al grupo Priming (Pr):** Se infectaron con 1 ml de virus dengue activo con un título viral de 7×10^{19} UFP/ml con 1 ml de sangre de conejo (1:1) durante 1 hora.
- **Al grupo No Priming (NoPr):** Se infectaron con 1 ml de virus dengue activo con un título viral de 7×10^{19} UFP/ml con 1 ml de sangre de conejo (1:1) durante 1 hora.

Parentales PRIMING INMUNE

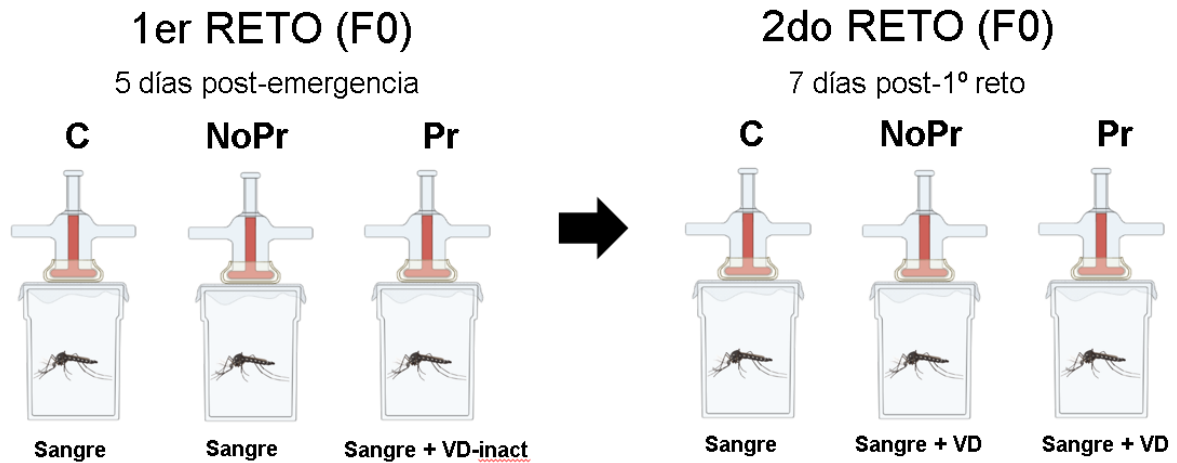


Figura 23. Diseño experimental para inducir un estímulo inmunológico (priming inmune). El primer reto y el segundo reto se llevaron a cabo en mosquitos adultos de *Aedes aegypti* bajo condiciones de laboratorio. Virus dengue (VD), Grupo Testigo (C), Grupo No priming (NoPr), Grupo Priming (Pr).

Posteriormente se separaron los mosquitos hembras que fueron alimentadas por completo y se colocaron de manera individual en pequeños recipientes de plástico con malla tul. A los dos días post-alimentación o infección, se colocó un vaso de plástico con agua corriente y papel filtro para que cada hembra individual depositara sus huevos y obtener la generación 1 (F1).

8.7 Inducción de TGIP en mosquitos *Aedes aegypti* sensibilizados con virus dengue serotipo 4 (F1)

Se eclosionaron huevos de 10 hembras de cada tratamiento antes mencionado, estos huevecillos que corresponden a la generación F1, se crecieron las larvas hasta llegar a la etapa adulta. De 30 hembras individuales para cada tratamiento, se les realizó un reto inmune con el virus 5 días post-emergencia, el cual se describe a continuación (Figura 24):

Control F1: Mosquitos hijos de madres alimentadas con sangre de conejo, se alimento con sangre de conejo.

Priming F1: Mosquitos hijos de madres inmunizadas con virus inactivo, se infectaron con VD (7×10^9 UFP/ml).

NoPriming F1: Mosquitos hijos de madres sin inmunizar con virus dengue, se infectaron con VD (7×10^9 UFP/ml).

Hijas TRANSGENERACIONAL

1er RETO (F1)

5 días post-emergencia

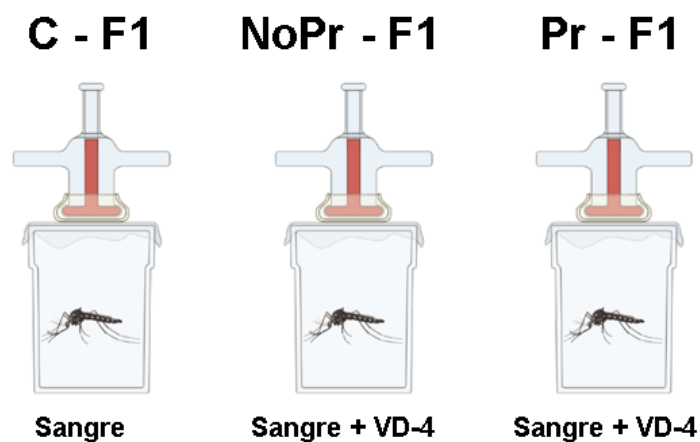


Figura 24. Diseño experimental para evaluar el TGIP (priming inmunológico transfeneracional). El primer Reto se llevo acabo en mosquitos *aedes aegypti* adultos F1 bajo condiciones de laboratorio. Virus dengue (VD), Grupo Testigo (C), Grupo No priming(NoPr), Grupo Priming (Pr).

Posteriormente, se separaron las hembras completamente alimentadas y se colocaron de manera individual en pequeños recipientes de plástico con malla tul para la recolección de las excretas, el cual se describe a continuación y mosquito completo a los 14 días post-infección (dpi).

8.8 Extracción de ARN total de excretas de mosquito individuales

Para colectar las excretas, se utilizó el método de Fontaine (2016), el cual se modificó para este experimento. Se colocó en cada vacito de plástico una hembra adulta con tela tul y un papel filtro al fondo del recipiente, un día después de cada alimentación con sangre (Fig. 25).

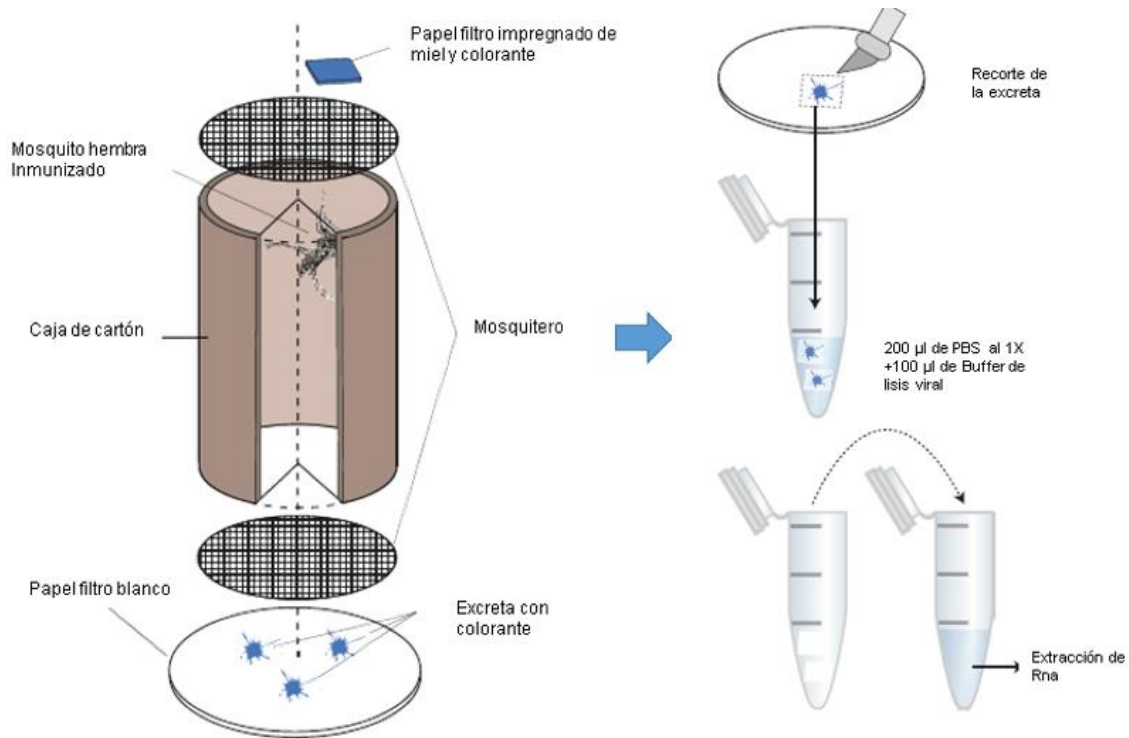


Figura 25. Esquema utilizado para la obtención y presesamiento de las excretas de mosquitos. Las excretas de mosquitos individuales fueron obtenidas fueron de los días 7 días post-infección. **Tomado de Fontaine (2016).**

Las excretas fueron colectadas a los 7 días post-infección (dpi). Posteriormente, se resuspendieron en 200 µl de PBS al 1X, se les agregó 100 µl de Buffer de lisis viral (AVL, Qiagen) y se incubaron a 56° C durante 20 minutos. Se agitaron las muestras durante un 1 minuto cada 10 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 10,000 RPM (revoluciones por minuto) durante 1 minuto. Se recuperó el sobrenadante (aproximadamente 250 µl de cada muestra), se les agregó 500 µl de trizol (TRIzol™ Reagent) y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, después se agregó 200 µl de cloroformo y se homogenizó gentilmente. Enseguida se centrifugó a 12,500 RPM durante 15 minutos a 4°C, nuevamente se colectó la fase

acuosa y se resuspendió en 500 µl de isopropanol, se incubó por 30 minutos o toda la noche a -20°C y se centrifugó a 12,500 RPM durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se agregó etanol al 70%; se centrifugaron las muestras a 13,500 RPM durante 5 minutos a 4°C. Nuevamente, se decantaron las muestras y se dejaron secar durante 30 min a temperatura ambiente o se incubaron a 56° C por 5 min. Las muestras se resuspendieron en 20 µl de agua libre de RNasas y DNasas para su posterior cuantificación mediante el uso del nanodrop (*ThermoScientific*). Las muestras se almacenaron a -70°C.

8.9 Extracción de RNA total de mosquitos adultos F1

A los 14 días post-infección, se colectaron hembras individuales y se resuspendieron en 500 µl de trizol (TRIzol™ Reagent). Se maceraron las muestras utilizando un biovortex por 1 minuto, posteriormente, se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos, después se agregaron 200 µl de cloroformo y se homogenizó gentilmente. Las muestras se centrifugaron a 12,500 RPM durante 15 minutos a 4° C, se recolectó la fase acuosa y se resuspendió en 500 µl de isopropanol. Se incubó por 30 minutos a -20° C y se centrifugaron a 12,500 RPM por 10 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se agregó a cada muestra 500 µl de etanol al 70%, se centrifugaron a 13,500 RPM durante 5 minutos a 4°C, después se decantó y se dejaron secar a temperatura ambiente por 30 minutos o se incubaron a 56 °C por 5 minutos. Posteriormente, las muestras se resuspendieron en 30 µl de agua inyectable y se cuantificó el ARN mediante un espectrofotómetro (Nanodrop, ThermoScientific), añadiendo 1 µl de muestra. Se almacenaron las muestras a -70°C para su posterior procesamiento.

8.10 Tratamiento con DNAsa y síntesis de cDNA

Tras el resguardo de las muestras se procedió a generar la síntesis de cDNA complementario a la cadena de ARN de las muestras, se normalizaron las concentraciones de ARN a 500 ng/μl, se agregó a cada muestra 0.5 μl de DNasa (1 U/ μg; *Thermo Scientific*) y 1 μl de Buffer para DNasa para eliminar posible ADN genómico. Se incubaron las muestras a 37 °C durante 30 minutos, posteriormente se adicionó 1 μl de DNasa Stop solution a cada muestra y se incubaron a 65 °C durante 10 minutos para inactivar la enzima. Para la síntesis de cDNA, se agregó 1 μl de hexámeros al azar (50 μg/ul) y 1 ul de dNTPs (10 mM) a cada muestra y se incubó a 65°C durante 5 minutos. Enseguida, se llevó acabo la retrotranscripción, añadiendo a cada muestra 4 μl de Buffer de la enzima retrotranscriptasa, 0.5 μl de la enzima Reversa Transcriptasa (*Revert Aid Premium Revert Transcriptase, Thermo Scientific*) y 0.5 μl de inhibidor RiboBlock (*Thermo Fisher Scientific*) y se incubó a 25° C durante 10 minutos, 50°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos en el termociclador (*Biorad T100*). Posteriormente, las muestras se resguardaron a -20°C.

8.11 Cuantificación de la carga viral en excretas y genes de la respuesta inmune mosquitos adultos F1 mediante qPCR

Para la cuantificación de la carga viral por excretas de mosquitos, se utilizó un termociclador de tiempo real (CFX96 real time system, Biorad), usando SYBR/Green PCR Master Mix (*Thermo Scientific*), siguiendo las especificaciones del proveedor. Para cada reacción se otuvó un volumen final de 10 μl, el cual consiste de una mezcla de: 5 μl de SYBR Green PCR Master Mix, 1 μl de templado de cada una de las muestras experimentales, 0.4 μM de oligonucleótidos forward y reverse; se aforó a 10 μl con agua libre de RNasa y DNasa. Los oligonucleótidos empleados para este ensayo fueron diseñados para permitir la amplificación de los cuatro serotipos virales, los cuales estan diseñados en a la región 5' UTR del genoma viral (Fw: 5'- CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AA-3' Rv: 5'-CCC CAT CTA TTC AGA ATC CCT GC-3').

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un precalentamiento a 50° C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos (1 ciclo) y 40 ciclos (desnaturalización a 95° C durante 15 segundos y una temperatura de alineamiento a 55° C por 1 minuto). La expresión absoluta de los resultados obtenidos, se extrapolaron con una curva estándar, la cual se describirá más adelante; posteriormente para la evaluación de genes involucrados en la respuesta inmune del TGIP, se utilizó un termociclador de tiempo real (*RotorGene Q- Pure Detection*), se evaluaron los siguientes genes inmunitarios junto con sus condiciones (Tabla 2 y 3):

GEN	PRIMES	TAMAÑO	%CG	TM
Rel 1 FW	5'-CGG ACG CCC CGA TAC C-3'	16 PB	75%	58.7°C
Rel 1 RV	5'-GTT GAA TGT TCA CCA TGA CAG GAT-3'	24 PB	41.7%	58.7°C
AGO-2 FW	5'-CAG TGC GTT CAG GCC AAAAA-3'	18 PB	55.6%	58.7°C
AGO-2 RV	5'TCC ACC CAG TTT CAC GTT GA-3'	20 PB	52.4%	58.7°C
S7 FW	5'-GGG ACA AAT CGG CCA GGC TAT-3'	22 PB	59.1%	58.7°C
S7 RV	5'-TCG TGG ACG CTT CTG CTT GTT G-3'	22 PB	54.5%	58.7°C

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos de genes utilizados como marcadores de la respuesta inmunes antiviral. PB= pares de bases, %CG= concentración de citocinas y guaninas en los primers, Tm= temperatura de fusión.

FASE	HOLD	HOLD	CYCLING (40 CICLOS)	MELT
TEMPERATURA (°C)	50°	95°	95°	60°
TIEMPO	2 mins	10 mins	15 seg	1 min

Tabla 3. Condiciones para el PCR tiempo real (Tomado de Vargas *et al.*, 2020).

8.12 Generación de la curva estándar

La curva estándar se realizó utilizando una serie de siete diluciones 1:10 a partir de una concentración conocida que contiene un plásmido que equivale a 8.3×10^6 UFP/ml. Se colocó 1 μ l del plásmido cada punto de la curva estándar en una reacción de PCR en tiempo real, cuyo volumen final fue de 9 μ l. Una vez que se obtuvieron las lecturas de intensidad de fluorescencia (Ct que es la eficiencia de la amplificación del gen buscado) de cada uno de los puntos, se realizó un análisis de regresión lineal, el cual se determinó el valor de la pendiente (y) y el coeficiente de correlación (R^2). Mediante la obtención de la curva estándar, se obtuvo la cuantificación absoluta de la carga viral de las excretas de los mosquitos experimentales; además de poder determinar la eficiencia de la reacción (Espinoza *et al.*, 2011).

8.13 Análisis estadístico

Para determinar las diferencias significativas entre los mosquitos sensibilizados (Pr) y no sensibilizados (NoPr), para la carga viral y expresión relativa de los transcritos, se utilizó la prueba estadística *U de Mann-Whitney*. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa *GraphPad Prism* versión 8.0.2.

9 RESULTADOS

9.1 Titulación por UFP del stock viral Virus dengue Serotipo 4 (VD-4)

Para el ensayo de placa lítica, se observó el desprendimiento de células de LLC-MK2 en forma de placa conforme al factor de dilución del virus. Se observó que en el pozo con la dilución de 1×10^9 se distinguían siete placas que se forman por el virus (Fig 26). Utilizando la siguiente fórmula, se determinó el número de partículas virales infectivas por ml: $PFU/ml = (7 \text{ placas observables}) \times 10 \times 1 \times 10^9 = 7 \times 10^9$, 10 es el factor de conversión es igual a un mililitro sobre el volumen del inóculo (1 ml/100 μ l).

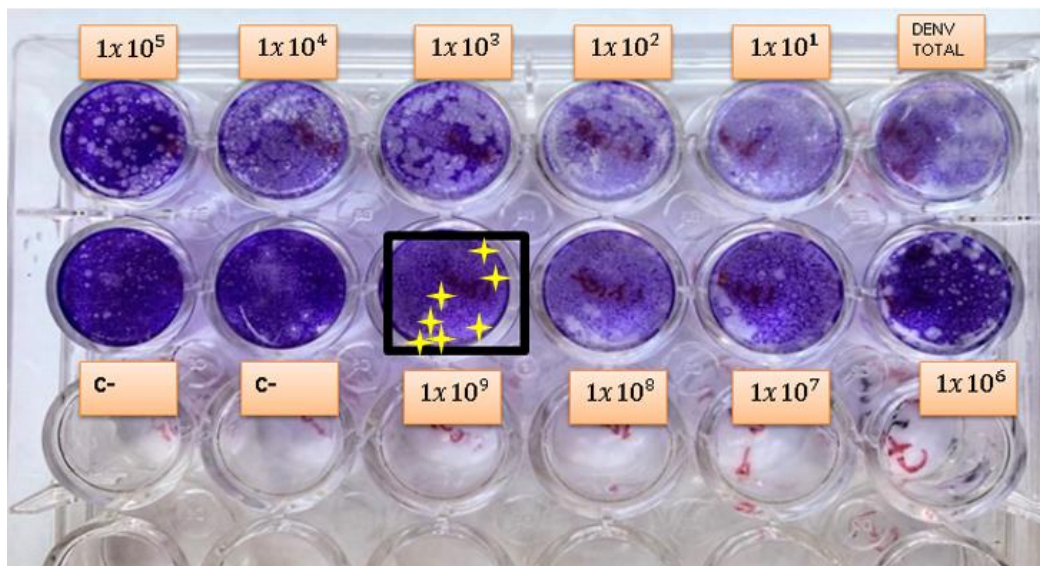


Figura 26. Ensayo de placa lítica utilizando células de LLC-MK2 para determinar el número de partículas virales infectivas. En cada pozo contenía una monocapa celular con una dilución seriada en base 10, a partir del stock viral. A los 7 días post-infección, se observó efecto citopático en las células. La estrellas marcadas en la imagen indican el número de placas observables

9.3 Cuantificación de la carga viral de VD-4 en mosquito completo F1 mediante qPCR

Los resultados mostraron una disminución significativa de la carga viral del VD-4 a los 14 días post-infección (Fig. 28) entre el Grupo Pr (hijas de madres previamente inmunizadas) y el Grupo NoPr (mosquitos hijas de madres que no fueron previamente inmunizados con el virus); ** $p < 0.05$ y *** $p < 0.0002$ en el Grupo Pr con respecto al Grupo Control. Se pudo detectar el amplicon del VD-4 en un 100 % de los mosquitos del Grupo NoPr con intervalos de infección entre 1×10^1 a 2×10^2 copias de ARN viral por mililitro, 93% del Grupo Pr, con intervalos de infección entre 1×10^1 a 2.5×10^1 CV/ml.

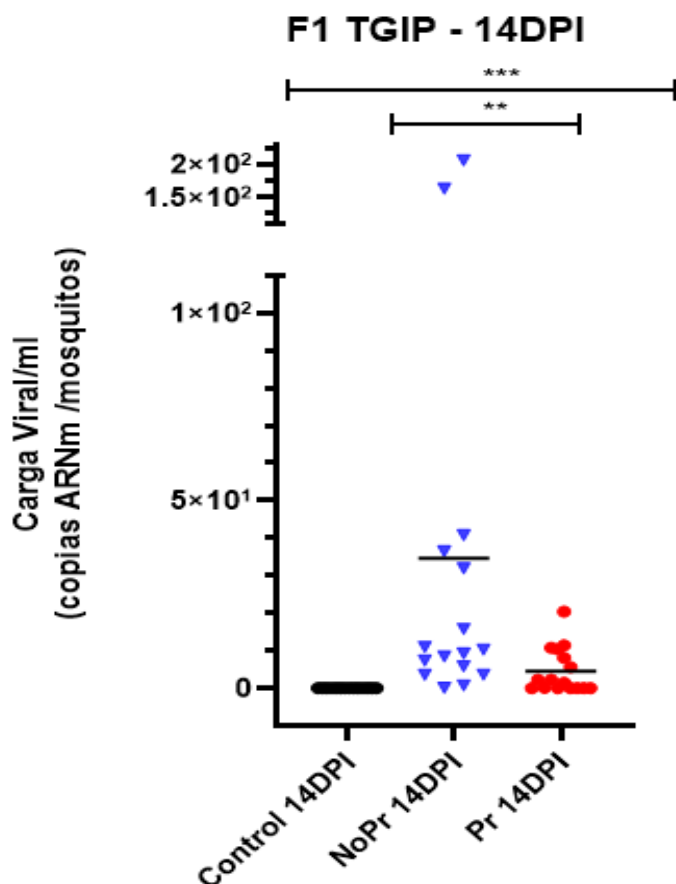


Figura 28. Carga viral del mosquito adulto individual de la progenie (F1) a los 14 días post-infección VD-4. Círculo de color negro representa el grupo Testigo, triangulo invertido de color azul indica el grupo No Priming, círculo de color rojo representa el grupo Priming. La línea negra representa la media para cada tratamiento. Los símbolos en cada gráfico indican que son mosquitos individuales en cada tratamiento. Los asteriscos indican la diferencia significativa correspondientes a la Prueba de U Man-Whitney *** $p < 0.0002$, ** $p < 0.05$.

9.4 Expresión relativa de transcritos de marcadores de la respuesta inmune antiviral mediante qPCR

En la Figura 29, se muestran los resultados de la expresión relativa de Argonauta 2 y Relish1 de mosquitos *Aedes aegypti* (F1), a los 14 días post-infección. Para el gen Argonauta 2, el Grupo NoPr mostró una mayor expresión relativa siendo significativa con una $p < 0.0001$, en comparación con el Grupo Pr; y con respecto al Grupo Priming la expresión relativa fue a la baja y sin diferencias significativas en comparación con el grupo Control. Para el gen Relish1, la expresión relativa fue a la baja en el Grupo Pr y sin diferencias significativas en comparación con el Grupo NoPr y Control.

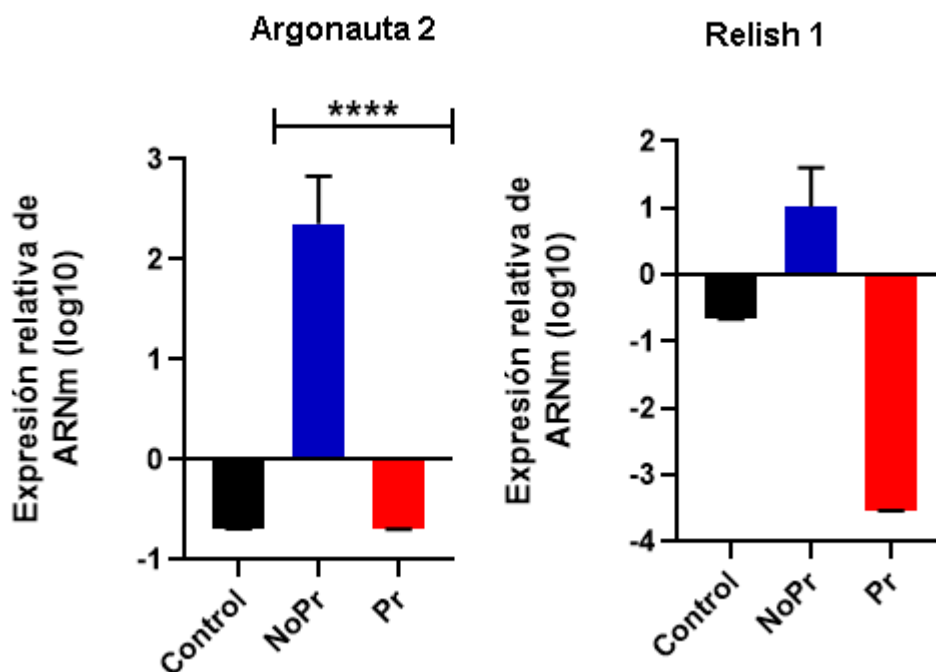


Figura 29. Expresión relativa de Argonauta 2 y Relish 1 de mosquitos *A. aegypti* (F1) a los 14 dpi. El Grupo Control esta representado por el color negro, el Grupo Priming por el color rojo y el Grupo No Priming por el color azul. Los asteriscos indican la diferencia significativa correspondientes a la *Prueba de U Man-Whitney* **** $p < 0.0001$. Para normar las muestras se utilizo el gen endógeno S7 ribosomal.

9. DISCUSIÓN

Los resultados en este estudio mostraron que el mosquito *Aedes aegypti* puede transmitir un estado de mejora inmunitaria transgeneracional (TGIP, por sus siglas en inglés) contra el virus dengue serotipo 4 (DV-4). A los 14 días post-infección, se redujo el número de copias virales en la progenie de mosquitos, cuyas madres tuvieron un encuentro con el virus dengue, esto nos permite ver una ventana del tiempo, donde se observa un aumento de la respuesta inmunitaria en mosquitos los adultos de *Ae. aegypti* contra el virus dengue. De manera similar, se observó la inmunización del mosquito *Ae. aegypti* en estadios de desarrollo temprano en la misma generación (Vargas *et al.*, 2020), el cual mostró una reducción de la diseminación del virus dengue desde el segundo día post-infección, e incluso mostraron un menor número de partículas virales a los 7 y 14 post-infección, teniendo diferencias significativas entre los mosquitos que fueron previamente sensibilizados en su estadio larval (Pr), en comparación con los mosquitos que no tuvieron algún encuentro previo con el patógeno (NoPr). Serrato-Salas y colaboradores (2018), también observaron una mejora inmunitaria en el mosquito *Ae. aegypti* adulto previamente inmunizado con el virus dengue, logrando limitar la replicación del virus a los 7 días post-infección en intestinos y carcasas, en comparación de mosquitos que no tuvieron algún reto inmunitario. Si bien estos estudios no son transgeneracionales, son consistentes, ya que existe una inmunización previa y promueven una disminución en la carga viral.

Por otra parte, Mondotte y colaboradores (2020), demostraron en la descendencia del mosquito *A. aegypti*, una mejora inmunitaria contra el virus chikungunya, demostrando que la mejora de la respuesta inmune es mayor, cuando se infecta mediante una micro-inyección, en comparación con mosquitos alimentados con sangre. También se observó un menor número de unidades formadoras de placa en los grupos provenientes de padres previamente inmunizados. En este mismo estudio, se demostró un efecto de mejora inmunitaria transgeneracional en *Drosophila melanogaster*, disminuyendo la replicación del virus Sindbis recombinante, midiendo a través de qPCR la actividad luciferasa y unidades

formadoras de placas, logrando determinar que esta mejora inmunitaria se prolonga durante 20 generaciones. No obstante, la protección se pierde en la generación 30, posteriormente, estimularon a más mosquitos con otros virus de ARN, teniendo una sobre estimulación de la proteína Dicer 2, pues se sabe que está implicada en la vía de ARN interferente.

Por otra parte, Lang y colaboradores (2022), demostraron que existe evidencia de TGIP, exponiendo a abejas reina de *Apis mellifera* con el virus de las alas deformadas (DWV, por sus siglas en ingles), midiendo la expresión genética de Dicer y Relish en su descendencia, se percataron que la expresión disminuyó significativamente en comparación a las larvas que no estuvieron expuestas al virus de las alas deformes. Por consiguiente, en este estudio, la expresión de los genes efectores para la vía Toll (Relish1) y la vía de los siRNA (Argonaute 2), se ve disminuida, probablemente debido a que el tiempo en el que se analizó, la expresión de los genes (14 dpi) es tardío, en comparación a los estudios ya mencionados. Por tal motivo, se sugiere evaluar la expresión de los genes a tiempos más cortos (3, 5 o 7 dpi) (Sadd & Schmid-Hempel, 2009), pues existe un período de infección aguda, en donde se aumenta la respuesta inmune en el mosquito (Vargas *et al.*, 2020).

Si bien el mecanismo del TGIP aún no se conoce del todo, se ha propuesto que los posibles mecanismos de transferencia inmunológica radican en cinco propuestas: 1) La transferencia de péptidos antimicrobianos en *Aedes aegypti*, aún no se ha descubierto del todo, pero algunos investigadores sugieren que la transferencia y el almacenamiento de péptidos antimicrobianos de las madres se lleva a cabo en los óvulos (Marchini *et al.*, 1997; Esteves *et al.*, 2009). Sin embargo, existen péptidos antimicrobianos involucrados en mantener la inmunidad intestinal de los mosquitos contra la infección por DENV, las defensinas ricas en cisteína, cecropinas, gambicinas ricas en cisteína, péptidos ricos en glicina como las atacinas y dipterocinas (Souza *et al.*, 2009; Xi *et al.*, 2008). 2) En los hemocitos, se ha visto que en el mosquito *Anopheles gambiae*, al ser estimulados con *Plasmodium*, liberan constitutivamente un factor de diferenciación de hemocitos

(complejo Lipoxin/Lipocalin), este complejo es soluble en la hemolinfa que, cuando se transfiere a mosquitos no sensibilizados, también induce una mejora en la respuesta inmune (Ramírez *et al.*, 2015). 3) Los elementos virales endógenos (EVE) son secuencias virales integradas en los genomas del huésped. En *Aedes aegypti*, se ha detectado ARNpi antivirales que se producen en presencia de un EVE natural y su virus afín, demostrando un vínculo funcional entre los EVE no retrovirales y la inmunidad antiviral en una interacción natural entre insectos y virus (Suzuki *et al.*, 2020, Tassetto *et al.*, 2019). 4) La endorreplicación genómica es uno de los procesos más importantes en el desarrollo larvario de *Aedes aegypti* para una rápida actividad transcripcional y secreción de proteínas (Domínguez-Benítez *et al.*, 2021; Cime-Castillo *et al.*, 2018; Serrato-Salas *et al.*, 2018). 5) Las modificaciones epigenéticas están mediadas por la metilación y acetilación del ADN, el cual induce la remodelación del ADN que a su vez, puede estimular o alterar la transcripción de los genes involucrados en la respuesta inmune de los invertebrados contra bacterias, virus u hongos, como es el caso de *Apis mellífera* y el virus de la parálisis aguda israelí, que al ser estimuladas con el mismo virus, presentan un estado de metilación del ADN de 156 genes implicados en las respuestas antivirales (Galbraith *et al.*, 2015). Sin embargo, algunos investigadores sugieren que TGIP es un fenómeno complejo y multifacético, que potencialmente juega un papel como un modo de adaptación ambiental a largo plazo (Freitak *et al.*, 2009).

10. CONCLUSIONES

1. El Priming inmune transgeneracional esta presente en la generación 1 (F1) del mosquito *A. aegypti* y limita la replicación viral a los 14 días post-infección contra el DV-4.
2. A los 14 días post-infección, el Priming inmune transgeneracional contra el DV-4, reduce la expresión relativa de los genes de Argonaute 2 y Relish 1.

11. PERSPECTIVAS

1. Determinar los costos energéticos y benéficos (trade-off) que puede generar el TGIP en el mosquito *Aedes aegypti*.
2. Evaluar la expresión de los genes inmunitarios a tiempos más cortos (24 horas, 3, 5 o 7 dpi).
3. Determinar si existe la traslocación de moléculas implicadas en la transferencia de información contra el DV-4, como péptidos antimicrobianos, receptores de reconocimiento a bacterias, patrones moleculares asociados a patógenos y genes como ARNm involucrados en TGIP, en óvulos y huevos del mosquitos *Ae. aegypti*.

12. ANEXO 1

1. Solución azucarada.

- Azúcar 50 g
- Agua 500 ml

2. Solución miel-colorante.

- Miel 100 g
- Colorante vegetal 4 ml
- Agua 500 ml aforado.

3. Alimento para larva.

- Molido para larvas 25 g
- Agua 200 ml

4. Molido para larvas.

- Alimento para ratón 100 g
- Lacto albumina 100 g
- Extracto de levadura 100 g

13. ANEXO 2

ESQUEMA DE ALIMENTACION DE 200 LARVAS DE *Aedes aegypti*

DIA DE DESARROLLO DE LA LARVA.	CANTDAD DE ALIMENTO EN MICROLITROS
1	500
2	0
3	1000
4	1500
5	2000
6	2000
7	1500
8, 9...	EN FUNCIÓN DE LAS LARVAS RESTANTES.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Araújo, H. R. C. D. (2011). Caracterização morfológica dos hemócitos do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus* e a resposta imune dos hemócitos do *Aedes aegypti* após a infecção pelo Dengue virus (Doctoral dissertation).
2. Barribeau, S. M., Schmid-Hempel, P., & Sadd, B. M. (2016). Royal decree: gene expression in trans-generationally immune primed bumblebee workers mimics a primary immune response. *PLoS One*, 11(7), e0159635.
3. Bartenschlager, R., & Miller, S. (2008). Molecular aspects of dengue virus replication. *Future Microbiology*, 3(2), 155-165. doi.org/10.2217/17460913.3.2.155
4. Benelli, G., Wilke, A. B., Bloomquist, J. R., Desneux, N., & Beier, J. C. (2021). Overexposing mosquitoes to insecticides under global warming: A public health concern?. *Science of The Total Environment*, 762, 143069.
5. Bernini, L. F., Telford, J. L., Marchini, D., Manetti, A. G., Rosetto, M., Baldari, C. T., & Dallai, R. (1995). cDNA Sequence and Expression of the Ceratotoxin Gene Encoding an Antibacterial Sex-specific Peptide from the Medfly *Ceratitidis capitata* (diptera)(*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(11), 6199-6204.
6. Berry, S. J. (1982). Maternal direction of oogenesis and early embryogenesis in insects. *Annual Review of Entomology*, 27(1), 205-227.
7. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):504-7. doi: 10.1038/nature12060. Epub 2013 Apr 7. PMID: 23563266; PMCID: PMC3651993.
8. Bian G, Zhou G, Lu P, Xi Z (2013) Replacing a Native *Wolbachia* with a Novel Strain Results in an Increase in Endosymbiont Load and Resistance to Dengue Virus in a Mosquito Vector. *PLoS Negl Trop Dis* 7(6): e2250. doi.org/10.1371/journal.pntd.0002250
9. Capco, D. G., & Jeffery, W. R. (1979). Origin and spatial distribution of maternal messenger RNA during oogenesis of an insect, *Oncopeltus fasciatus*. *Journal of cell science*, 39(1), 63-76.
10. Cime-Castillo, J., Arts, R. J., Vargas-Ponce de León, V., Moreno-Torres, R., Hernández-Martínez, S., Recio-Totoro, B., ... & Lanz-Mendoza, H. (2018). DNA synthesis is activated in mosquitoes and human monocytes during the induction of innate immune memory. *Frontiers in Immunology*, 9, 2834.
11. Claudio-Piedras, F., & Lanz-Mendoza, H. (2016). Evolución y filogenia de los linfocitos B. *Revista Alergia México*, 63(2), 190-200.

12. Contreras-Garduño, J., Lanz-Mendoza, H., Franco, B., Nava, A., Pedraza-Reyes, M., & Canales-Lazcano, J. (2016). Insect immune priming: ecology and experimental evidences. *Ecological Entomology*, 41(4), 351-366.
13. Domínguez-Benítez, C., Serrato-Salas, J., Condé, R., & Lanz-Mendoza, H. (2021). *Aedes aegypti* Aag-2 culture cells enter endoreplication process upon pathogen challenge. *bioRxiv*, 2021-01.
14. Dubuffet A, Zanchi C, Boutet G, Moreau J, Teixeira M, Moret Y (2015) Trans-generational Immune Priming Protects the Eggs Only against Gram-Positive Bacteria in the Mealworm Beetle. *PLoS Pathog* 11(10): e1005178.
15. Dünwald, T., Gatterer, H., Faulhaber, M., Arvandi, M., & Schobersberger, W. (2019). Body composition and body weight changes at different altitude levels: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in physiology*, 10, 430.
16. Esteves, E., Fogaca, A. C., Maldonado, R., Silva, F. D., Manso, P. P. A., Pelajo-Machado, M., ... & Daffre, S. (2009). Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(8), 913-919.
17. Fernández Salas, I. (1999). *Biología y control del aedes aegypti: manual de operaciones*. In *Biología y control del aedes aegypti: manual de operaciones* (pp. 80-80).
18. Fontaine, A., Jiolle, D., Moltini-Conclois, I. et al. Excretion of dengue virus RNA by *Aedes aegypti* allows non-destructive monitoring of viral dissemination in individual mosquitoes. *Sci Rep* 6, 24885 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep24885>
19. Freitak, D., Schmidtberg, H., Dickel, F., Lochnit, G., Vogel, H., & Vilcinskis, A. (2014). The maternal transfer of bacteria can mediate trans-generational immune priming in insects. *Virulence*, 5(4), 547-554.
20. Galbraith DA, Yang X, Niño EL, Yi S, Grozinger C. Parallel epigenomic and transcriptomic responses to viral infection in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS Pathog*. 2015 Mar 26;11(3):e1004713. doi: 10.1371/journal.ppat.1004713. PMID: 25811620; PMCID: PMC4374888.
21. Gegner, J., Baudach, A., Mukherjee, K., Halitschke, R., Vogel, H., & Vilcinskis, A. (2019). Epigenetic mechanisms are involved in sex-specific trans-generational immune priming in the lepidopteran model host *Manduca sexta*. *Frontiers in physiology*, 10, 137.
22. González-Acosta C., Cime-Castillo, J. & Correa-Morales, F.. (2020). Control integrado de vectores en México. *ciencia*, 71, pp.52-63
23. Harwood, G., Amdam, G., & Freitak, D. (2019). The role of Vitellogenin in the transfer of immune elicitors from gut to hypopharyngeal glands in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of insect physiology*, 112, 90-100.

24. Hasselquist D, Nilsson JA. Maternal transfer of antibodies in vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009 Jan 12;364(1513):51-60. doi: 10.1098/rstb.2008.0137.
25. Hernández Tablas, J. M. (Ed.). (2017). Efecto del intestino medio de *Anopheles albimanus* sensibilizado homológamente en la supervivencia de *Plasmodium berghei* In Vitro (1era Ed., Vol. 1). Universidad Autónoma Del Estado De Morelos.
26. Hillyer, J. F. (2010). Mosquito immunity. *Invertebrate Immunity*, 218-238.
27. Hoffmann, J. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33–38 (2003). <https://doi.org/10.1038/nature02021>
28. Johnstone, O., & Lasko, P. (2001). Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annual review of genetics*, 35(1), 365-406.
29. Jones, C. J., Newsom, D., Kelly, B., Irie, Y., Jennings, L. K., Xu, B., ... & Wozniak, D. J. (2014). ChIP-Seq and RNA-Seq reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens*, 10(3), e1003984.
30. Kandel, Y., Vulcan, J., Rodriguez, S. D., Moore, E., Chung, H. N., Mitra, S., ... & Hansen, I. A. (2019). Widespread insecticide resistance in *Aedes aegypti* L. from New Mexico, USA. *PloS one*, 14(2), e0212693.
31. Kingsolver, M. B., Huang, Z., & Hardy, R. W. (2013). Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. *Journal of molecular biology*, 425(24), 4921-4936.
32. Kladwang, W., Hum, J., & Das, R. (2012). Ultraviolet shadowing of RNA can cause significant chemical damage in seconds. *Scientific reports*, 2(1), 517.
33. Lafont, M., Goncalves, P., Guo, X., Montagnani, C., Raftos, D., & Green, T. (2019). Transgenerational plasticity and antiviral immunity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). *Developmental & Comparative Immunology*, 91, 17-25.
34. Lang, S., Simone-Finstrom, M., & Healy, K. (2022). Context-dependent viral transgenerational immune priming in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Science*, 22(1), 19
35. Little, T. J., & Kraaijeveld, A. R. (2004). Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(2), 58-60.
36. Little, T. J., O'Connor, B., Colegrave, N., Watt, K., & Read, A. F. (2003). Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. *Current Biology*, 13(6), 489-492.
37. Marchini, D., Marri, L., Rosetto, M., Manetti, A. G., & Dallai, R. (1997). Presence of Antibacterial Peptides on the Laid Egg Chorion of the Medfly *Ceratitis capitata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240(3), 657-663.

38. Masri, L., & Cremer, S. (2014). Individual and social immunisation in insects. *Trends in immunology*, 35(10), 471-482.
39. Medina, F., Medina, J. F., Colón, C., Vergne, E., Santiago, G. A., & Muñoz-Jordán, J. L. (2012). Dengue virus: isolation, propagation, quantification, and storage. *Current protocols in microbiology*, 27(1), 15D-2.
40. Melillo, D., Marino, R., Italiani, P., & Boraschi, D. (2018). Innate Immune Memory In Invertebrate Metazoans: A Critical Appraisal. *Frontiers In Immunology*, 9. Doi.Org/10.3389/Fimmu.2018.01915
41. Milutinović, B., & Kurtz, J. (2016). Immune Memory In Invertebrates. *Seminars In Immunology*, 28(4), 328–342. Doi.Org/10.1016/J.Smim.2016.05.004.
42. Mondotte, J. A., Gausson, V., Frangeul, L., Suzuki, Y., Vazeille, M., Mongelli, V., Blanc, H., Failloux, A.-B., & Saleh, M.-C. (2020). Evidence For Long-Lasting Transgenerational Antiviral Immunity in Insects. *Cell Reports*, 33(11), 108506. doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108506.
43. Mora-Covarrubias, A. D. L., Jiménez-Vega, F., & Treviño-Aguilar, S. M. (2010). Distribución geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Salud pública de México*, 52(2), 127-133.
44. Mukherjee, D., Das, S., Begum, F., Mal, S., & Ray, U. (2019). The mosquito immune system and the life of dengue virus: what we know and do not know. *Pathogens*, 8(2), 77.
45. Overgaauw, P. A. M., & Borgsteede, F. H. M. (2004). 100 vragen over dierziekten: een kritische beschouwing. *TIJDSCHRIFT VOOR DIERGENEESKUNDE*, 129(14/15), 490-490.
46. Pham, J. W., Pellino, J. L., Lee, Y. S., Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2004). A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell*, 117(1), 83-94.
47. Pigeault R., Vézilier J., Nicot A., Gandon S. and Rivero A. 2015 Transgenerational effect of infection in Plasmodium-infected mosquitoes *Biol. Lett.* 112014102520141025
48. Rabaa, M. A., Girerd-Chambaz, Y., Duong Thi Hue, K., Vu Tuan, T., Wills, B., Bonaparte, M., ... & Simmons, C. P. (2017). Genetic epidemiology of dengue viruses in phase III trials of the CYD tetravalent dengue vaccine and implications for efficacy. *Elife*, 6, e24196.
49. Raikhel, A. S., & Dhadialla, T. S. (1992). Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual review of entomology*, 37(1), 217-251.
50. Ramirez, J. L., de Almeida Oliveira, G., Calvo, E., Dalli, J., Colas, R. A., Serhan, C. N., ... & Barillas-Mury, C. (2015). A mosquito lipoxin/lipocalin complex mediates innate immune priming in *Anopheles gambiae*. *Nature communications*, 6(1), 7403.

51. Ramyasoma, H. P. B. K. D., Dassanayake, R. S., Hapugoda, M., Capurro, M. L., & Silva Gunawardene, Y. I. N. (2020). Multiple dengue virus serotypes resistant transgenic *Aedes aegypti* fitness evaluated under laboratory conditions. *RNA biology*, 17(7), 918-929.
52. Roth, O., Joop, G., Eggert, H., Hilbert, J., Daniel, J., Schmid-Hempel, P., & Kurtz, J. (2010). Paternally derived immune priming for offspring in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Animal Ecology*, 79(2), 403-413.
53. Sadd, B. M., & Schmid-Hempel, P. (2009). PERSPECTIVE: principles of ecological immunology. *Evolutionary applications*, 2(1), 113-121.
54. Salas, I. F. (1999). *Biología y control del Aedes aegypti: manual de operaciones*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
55. Salmela, H., Amdam, G. V., & Freitak, D. (2015). Transfer of immunity from mother to offspring is mediated via egg-yolk protein vitellogenin. *PLoS pathogens*, 11(7), e1005015.
56. Saraiva, R. G., Kang, S., Simões, M. L., Angleró-Rodríguez, Y. I., & Dimopoulos, G. (2016). Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 53-64.
57. Serrato-Salas, J., Hernández-Martínez, S., Martínez-Barnetche, J., Condé, R., Alvarado-Delgado, A., Zumaya-Estrada, F., & Lanz-Mendoza, H. (2018). De novo DNA synthesis in *Aedes aegypti* midgut cells as a complementary strategy to limit dengue viral replication. *Frontiers in microbiology*, 9, 801.
58. Serrato-Salas, J., Izquierdo-Sánchez, J., Argüello, M., Conde, R., Alvarado-Delgado, A., & Lanz-Mendoza, H. (2018). *Aedes aegypti* antiviral adaptive response against DENV-2. *Developmental & Comparative Immunology*, 84, 28-36.
59. Souza-Neto, J. A., Sim, S., & Dimopoulos, G. (2009). An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(42), 17841-17846.
60. Suzuki, Y., Baidaliuk, A., Miesen, P., Frangeul, L., Crist, AB, Merklings, SH, ... y Saleh, MC (2020). El elemento viral endógeno no retroviral limita la replicación de virus afines en los ovarios de *Aedes aegypti*. *Biología actual*, 30 (18), 3495-3506.
61. Tassetto, M., Kunitomi, M., Whitfield, Z. J., Dolan, P. T., Sánchez-Vargas, I., Garcia-Knight, M., ... & Andino, R. (2019). Control of RNA viruses in mosquito cells through the acquisition of vDNA and endogenous viral elements. *Elife*, 8, e41244.
62. Tate, A. T., Andolfatto, P., Demuth, J. P., & Graham, A. L. (2017). The within-host dynamics of infection in trans-generationally primed flour beetles. *Molecular ecology*, 26(14), 3794-3807.

63. Tetreau, G., Dhinaut, J., Gourbal, B., & Moret, Y. (2019). Trans-generational Immune Priming in Invertebrates: Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in Immunology*, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01938>
64. Tidbury, H. J., Pedersen, A. B., & Boots, M. (2011). Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1707), 871-876.
65. Torres-Galicia, I., Cortés-Poza, D., & Becker, I. (2014). Dengue en México: incremento en la población juvenil durante la última década. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 71(4), 196-201.
66. Trauer-Kizilelma, U., & Hilker, M. (2015). Insect parents improve the anti-parasitic and anti-bacterial defence of their offspring by priming the expression of immune-relevant genes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 64, 91-99.
67. Vargas, V., Cime-Castillo, J. & Lanz-Mendoza, H. Immune priming with inactive dengue virus during the larval stage of *Aedes aegypti* protects against the infection in adult mosquitoes. *Sci Rep* 10, 6723 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63402-z>
68. Vázquez-Ortiz, G., Piña-Sánchez, P., & Salcedo, M. (2006). Grandes alcances de los RNAs pequeños RNA de interferencia y microRNA. *Revista de investigación clínica*, 58(4), 335-349.
69. Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1), 33-43.
70. Voordouw, M. J., Lambrechts, L., & Koella, J. (2008). No maternal effects after stimulation of the melanization response in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Oikos*, 117(8), 1269-1279.
71. Wang, L., Yue, F., Song, X., & Song, L. (2015). Maternal immune transfer in mollusc. *Developmental & Comparative Immunology*, 48(2), 354-359.
72. Wu, G., Zhao, Z., Liu, C., & Qiu, L. (2014). Priming *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae with heat-killed bacterial cells induced an enhanced immune protection against *Photobacterium luminescens* TT01 and the role of innate immunity in the process. *Journal of Economic entomology*, 107(2), 559-569. [10.1603/EC13455](https://doi.org/10.1603/EC13455)
73. Wu, P., Sun, P., Nie, K., Zhu, Y., Shi, M., Xiao, C., ... & Cheng, G. (2019). A gut commensal bacterium promotes mosquito permissiveness to arboviruses. *Cell host & microbe*, 25(1), 101-112.
74. Xi, Z., Ramirez, J. L., & Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS pathogens*, 4(7), e1000098.
75. Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014 Jul;98(13):5807-22. doi: [10.1007/s00253-014-5792-6](https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 22 de agosto de 2023

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 el Pasante de Biólogo: **CARLOS ISAAC ROLDÁN ALDAY**, con el título del trabajo: **INDUCCIÓN DE PRIMING INMUNE TRANSGENERACIONAL EN EL MOSQUITO *Aedes Aegypti* INFECTADOS CON VIRUS DENGUE SEROTIPO 4.**

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 6° 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. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

SECRETARIO: M. EN C. MARÍA LUISA BARROSO GARCÍA

VOCAL: DR. CUAUHTEMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA

SUPLENTE: M. EN B. MARÍA LUISA CASTREJÓN GODÍNEZ

SUPLENTE: DR. JORGE ARMANDO CIME CASTILLO



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

CUAUHTEMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA | Fecha:2023-08-22 18:26:56 | Firmante

pQgnSgpetwJ3CqzYpIYViNpNSJsGCstQLcKjQjkbNTUsIaK0tuoghAsTAowpsaxnQhjtHUG38v7Oj0ZYYFo2t2OHRVrJoGq7orcORD8DHvQzPH6soaU7IE2F1yU5Oq4m3r6yRcK5uflB94Au3QeEMChGvcKCbBiZn2RXeFrijGRQ28rxsRxM0buao/6I0rMRIduwT13bAArgFIZ9Os5475UfuRFG0g18KK/heH5mFsQJZXj7VYNc75ATCnNXRKDCkwuq5b+ZESxisTphn67fL0Hk5RQ0cx4B8VCap3TVhvg57zXzLozf07Mikfa/rJ/qGoT2bvTJ2rLbe5yrH+Q==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2023-08-22 18:38:21 | Firmante

G6BtQ5crosOMlyNMrTldXcRp4K7yB67zyaat0lhXRAhJ+gFug89GdlXpdMDmH+weKh5bJBMBnnlvYAs8HzSTJ/DaT8pY2MD3tTe7rmX5GbcxCjnIrcM3aDhDhDu/Y6/MyTAuM9qBE08q5JXJzaXz09Y72wbuuY1tGZbctkGfqK6ND5+fxVrErI/00mSj3XTYACW1fQRxd5CrO7wqRvQ7pkiMHudVOfRIG5Xr8LobP+uRBbjbVgasJeQsQ1WcS7tIqtct6oGJbZ/VEzR1HQJ0qQUt+G10/oHnl35MqSjjeZKNq/cpBQ67+I0/ibtHWOsDFI/QOCK+CZibt/ToQQ==

MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ | Fecha:2023-08-22 20:11:17 | Firmante

rk4yGzY3neptN8J7vLLUtxyjCvwYMBZgl/f6S6hxvW73FvE5j1depapYYQFxiWey6hQEjW7zZ4L7TsLNoACnbRtt17ArcikANftGUOhNdgDGZMfMBW2FAIUP77LrRnreEZBOBmOw4KJSVJrPkMowLedSlgsSlpqUmkCkxYbNRdbB4nzXxi6XZRTsd7YpqTFG0LrffzoB4PQgB7qy+Prz1d4RsqkIUZSKO8bpZzyB2EZKixvXQAxmJaJ1H1oJ5Fzj6XID4DLT8sh7F5AQ/lqOWIEFWk27ccepE4Vt1rZ2GJcUNcJw925auC1/dnUCvsFz/56CkYkuOWI4M5bRTR4WA==

MARIA LUISA BARROSO GARCIA | Fecha:2023-09-06 13:40:20 | Firmante

nloz4FJ9Fm+bgrSM2bbBs4vPIALALqa7NSbwZyLvaFj00+FfnFDY8m8o5pWYJUv0hPVW0OheoRisAt8tLRQJMtPvOMR/W/calh1j3X3GOTt8WZdYApexQXCDNquEEUKzCEV3Accj/3OOWwfmPpBRmYDlhjmEFfMYS7MXxiPiajffHksuVK/3Yr7Aktmz3V77toLscUmw9YGBtLp3EjB92C79nR1JBrVj8DJ9360Q0ihbaZuMEy68Xkcm/XxBzqj5KzPdKzS4pZvwA0zU1K2o0v8B/vzLsMxagzWLn2WdHA74ODZasLa1yqj0sY4ty/Ve6QmuKe7J5n8zO8+YdDA==

JORGE ARMANDO CIME CASTILLO | Fecha:2023-12-13 10:17:57 | Firmante

egRyHfAhtqBbVo8gJFDXhtc8j3CRu3Cd9Ynii3ak/yn0dHm82dyuekwaV0TEq2ZkAG1WliHomg2mpGluriv65YkiO1Vsr0kcyvbHbDTGe/mMj/YvJoz7zc1BM62idrEcf+F7halo+JTuglZn/JLcJc9JaD4uUeewVY+XXazWZ6tX9q7EI/Zcum9Vrc54VeSnJjettULX4DyQxkln0+VNgldYuSvb3TbA6mSjPN9byogtMYGHGM4bZlaxBtQf4FyLzMd/sgOOAQk+PFtOWZIGSNBM6Q4XOVxezTkrQnX+6ByRfK77NbpkSED5UeRyYZMP2yLnFHv4gpgOhtZoyqGQ==

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



reTURqsKD

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/etpRzykn65sxVwAauYuE29dB9m8PMIDy>

