

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

Análisis de flavivirus y alfavirus presentes en larvas de *Aedes aegypti* colectadas en el Estado de Morelos

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

MÓNICA IZQUIERDO SUZÁN

DIRECTORA

DRA. MARTHA YOCUPICIO MONROY



Ciudad de México. enero 2018

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

Sit down before a fact as a little child, be prepared to
give up every preconceived notion, follow humbly
wherever and to whatever abysses nature leads, or
you shall learn nothing

Thomas Henry Huxley

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por la posibilidad de estudiar una maestría

Al CONACyT por la beca otorgada para poder completar mis estudios de maestría bajo los proyectos 183448 y 233977

A la doctora Martha por aceptarme en su laboratorio, tener la paciencia de enseñarme a trabajar con virus y apoyarme para asistir a congresos y cursos que me ayudaron a completar mi formación de maestría.

A la doctora Selene por su infinita paciencia para enseñarme las herramientas bioinformáticas que me ayudaron a realizar este proyecto y por sus correcciones en la tesis.

Al doctor Jesús y la doctora Rosalia por su ayuda en el desarrollo de mi proyecto, por sus críticas constructivas y tips para poder desarrollar mejor mi proyecto.

A la doctora Elizbeth por tomarse el tiempo de leer mi tesis y sus comentarios, además del apoyo brindado.

Al Dr Vadim Pérez Koldenkova por su apoyo técnico en el Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada/ Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

A Jorge y Carlos de la Unidad de Control de Vectores de Jojutla, por enseñarme todo lo que ahora se de mosquitos y acompañarme a las colectas. Son los mejores compañeros de campo, gracias por todo lo que me enseñaron.

A la Unidad de Control de Vectores de Jojutla por la donación de muestras, ya que sin estas el proyecto no hubiera sido posible.

A la M. en C. G. Fabiola Hernández por su paciencia para enseñarme bioinformática y siempre estar dispuesta a ayudarme.

A tod@s los profesor@s del posgrado de Ciencias Genómicas por sus enseñanzas a lo largo de este proceso

A Ileana, Yara, Alexa y Emi porque aunque estemos lejos siempre me han apoyado y escuchado

A mis compañeros de maestría Frederik, Yareli, Victor, David, Diana y Jorge sin quienes este proceso hubiera sido mucho más duro de lo que fue

A Marylu y Carlos por esos ratos de desestres y buenos consejos

A Adan y Tona por siempre escucharme y estar dispuestos a darme una mano siempre que la necesite

A mi familia por siempre apoyarme

Dedicatorias

A mis papas, porque sin su apoyo este proceso hubiera sido imposible, gracias por siempre apoyarme y confiar en mí. Gracias por inculcarme esa curiosidad y esas ganas de ir por más siempre. Este logro no solo es mío, es suyo también, los amo.

A mis hermanos por que sin ellos mi vida sería tediosa, gracias por todos los buenos momentos, por siempre estar ahí y por siempre hacerme reír cuando más lo necesite, los amo manatís

A Jorge, por apoyarme en los momentos difíciles, por enseñarme lo fuerte que soy y recordarme constantemente que puedo hacer lo que me proponga. Gracias por siempre estar ahí a pesar de mi mal humor y de mis ratos de duda. Te amo mucho y me encanto coincidir contigo en este proceso tan duro que fue la maestría.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 Arbovirus	3
1.2 Flavivirus	5
1.2.1 Dengue	9
1.2.2 Zika	11
1.3 Alfavirus	13
1.3.1 Chikungunya	16
1.4 <i>Aedes aegypti</i>	18
1.4.1 Ciclo de vida	20
1.4.2 Transmisión horizontal y vertical de virus en <i>Aedes aegypti</i>	22
2. Antecedentes	26
2.1 Transmisión vertical de DENV	26
2.2 Transmisión vertical de ZIKV	29
2.3 Transmisión vertical de CHIKV	30
3. Justificación	32
4. Hipótesis	33
5. Objetivos	34
5.1 Objetivo general	34
5.2 Objetivos particulares	34
6. Estrategia experimental	35
7. Materiales y métodos	36
7.1 Recolección de huevos	36

7.2 Obtención de larvas	37
7.3 Extracción de RNA	39
7.4 Detección viral	39
7.5 Aislamiento viral	42
7.6 Microscopia de fluorescencia	42
7.7 Ensayo de titulación viral por placas líticas	43
7.8 Filogenia	44
7.9 Secuenciación masiva	46
7.9.1 Preparación de la muestra	46
7.9.2 Secuenciación masiva	46
7.9.3 Procesamiento de secuencias	47
7.9.4 Ensamble de genomas <i>de novo</i>	47
7.9.5 Análisis de variación de secuencias	49
8. Resultados	51
8.1 Obtención de pools de larvas y extractos de RNA total	51
8.2 Detección de DENV, ZIKV y CHIKV	53
8.3 Aislamiento de DENV, ZIKV y CHIKV	57
8.3.1 Aislamiento de DENV	59
8.3.2 Aislamiento de CHIKV	61
8.3.3 Aislamiento de ZIKV	63
8.3.4 Aislamiento de virus específicos de mosquito	65
8.4 Inmunofluorescencia para la detección de proteínas de ZIKV en aislamientos	67
8.5 Titulación del virus por placas líticas	69
8.6 Filogenia de ZIKV utilizando la región codificante de la proteína E	71
8.7 Obtención de los genomas virales a partir de los aislados	73

8.7.1 Depleción de RNAr	73
8.7.2 Análisis de calidad de las secuencias	75
8.7.3 Secuencias obtenidas del pool 31	77
8.7.3.1 Análisis metagenómico	77
8.7.3.2 Ensamble del genoma de ZIKV	79
8.7.3.3 Análisis de variación de secuencias de la secuencia de ZIKV del pool 31	79
8.7.4 Secuencias obtenidas del pool 53	82
8.7.4.1 Análisis metagenómico	82
8.7.4.2 Ensamble de genoma de CFAV	84
9. Discusión	85
10. Conclusiones	91
11. Perspectivas	92
12. Bibliografía	93
Apéndice 1	102

Índice de figuras

Figura 1.1 Representación esquemática del genoma de los flavivirus	7
Figura 1.2 Representación esquemática del genoma de los alfavirus	15
Figura 1.3 Adulto de <i>Aedes aegypti</i>	19
Figura 1.4 Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	21
Figura 1.5 Infección de <i>Aedes aegypti</i> por arbovirus	23
Figura 7.1 Ovitrapa	38
Figura 7.2 Ubicación de ovitrampas	38
Figura 8.1 Amplificación de fragmentos de la unidad ribosomal S7 de <i>Aedes aegypti</i>	52
Figura 8.2 Amplificación de fragmento de la proteína NS5 de DENV	54
Figura 8.3 Obtención de fragmentos amplificados de la proteína E de ZIKV	54
Figura 8.4 Obtención de fragmentos amplificados de la proteína C de CHIKV	54
Figura 8.5 Aislamiento de DENV en células C6/36 y Vero a partir de los pools 5 y 99	60
Figura 8.6 Amplificación de la región NS5 de DENV a partir de RNA obtenido de aislados	60
Figura 8.7 Aislamiento de CHIKV en células C6/36 y Vero a partir de los pools 4 y 20	62
Figura 8.8 Aislamiento de ZIKV en células C6/36 y Vero a partir de los pools 31 y 37	64
Figura 8.9 Aislamiento de CFAV a partir de extracto de larvas	66
Figura 8.10 Inmunodetección de la proteína E de ZIKV en células Vero infectadas con los virus de los pools 31 y 37	68
Figura 8.11 Ensayo de titulación viral por placas líticas	70
Figura 8.12 Árbol filogenético (ML) construido con las secuencias del gen E	72
Figura 8.13 Análisis de calidad de las lecturas obtenidas de la secuenciación masiva	76

Figura 8.14 Análisis metagenómico de las lecturas del pool 31	78
Figura 8.15 Análisis metagenómico de las lecturas del pool 53	83

Índice de tablas

Tabla 2.1 MIR reportados previamente para transmisión vertical en <i>Ae. aegypti</i>	28
Tabla 2.2 MIR reportados previamente para transmisión vertical de CHIKV en <i>Ae aegypti</i>	31
Tabla 7.1 Iniciadores utilizados en el estudio	41
Tabla 7.2 Iniciadores utilizados para secuenciación	45
Tabla 7.3 Genomas incluidos en el análisis de variación de secuencias	50
Tabla 8.1 Resumen de los resultados de la detección de DENV, ZIKV y CHIKV por RT-PCR	56
Tabla 8.2 Tasa mínima de infección (MIR)	56
Tabla 8.3 Número de pools procesados para el aislamiento viral y aislamientos exitosos	58
Tabla 8.4 Ct de aislados de CHIKV	62
Tabla 8.5 Ct de aislados de ZIKV	64
Tabla 8.6 Cuantificación de RNA de muestras enviadas a la Unidad de Secuenciación Masiva del IBT	74
Tabla 8.7 Mutaciones sinónimas y no sinónimas de la secuencia de ZIKV ensamblada del pool 31	80
Tabla 8.8 Mutaciones no sinónimas en las secuencias de ZIKV ensamblada a partir del pool 31	81

Resumen

Las enfermedades infecciosas emergentes, tales como las causadas por arbovirus, son un problema de salud pública en el mundo. Los virus de Zika (ZIKV), Dengue (DENV) y Chikungunya (CHIKV) pertenecen a los virus transmitidos por artrópodos hematófagos, o arbovirus, siendo *Aedes aegypti* su principal vector. La información acerca de la dinámica viral en el vector es limitada, sin mencionar que se desconoce el papel de la transmisión vertical en la dinámica y epidemiología de estos virus, por lo que nuestro objetivo fue la detección y aislamiento de estos tres virus en larvas de *Ae. aegypti* a fin de obtener información acerca de la transmisión vertical.

Se colectaron huevos de mosquito en Jojutla, Morelos, usando ovitrampas colocadas en casas o casas cercanas a casos registrados de DENV, ZIKV o CHIKV. La colección de huevos y la eclosión y crecimiento de larvas fueron realizados de acuerdo a los protocolos del Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. Las larvas eclosionaron bajo condiciones controladas y éstas se separaron en pools para posteriormente realizar la extracción de RNA. La detección viral fue realizada mediante RT-PCR y RT-qPCR para DENV, ZIKV y CHIKV.

Los resultados muestran que existe la transmisión vertical de DENV, ZIKV y CHIKV en *Aedes aegypti* silvestres. En este estudio encontramos un total de 45 pools positivos para DENV, 17 para ZIKV y 7 para CHIKV de 162 analizados. De estos se pudieron aislar virus de DENV a partir de 2 pools, ZIKV a partir de 4 y CHIKV a partir de 2. Se logró ensamblar el genoma completo de uno de los aislados de ZIKV a partir de las secuencias obtenidas a través de Secuenciación de Siguiete Generación, reportando así el primer genoma ensamblado de ZIKV aislado de larvas.

Abstract

Emerging infectious diseases, such as the ones caused by arboviruses, are an important health issue worldwide. Zika (ZIKV), dengue (DENV) and chikungunya (CHIKV) belong to the group of viruses transmitted through the bite of hematophagous arthropods, or arboviruses, being *Aedes aegypti* their main vector. Information about the viral dynamics in their vectors is limited; notably the role of vertical transmission in the dynamics and epidemiology of these viruses needs to be established, therefore our aim was to detect and isolate these viruses in *Ae. aegypti* larvae in order to obtain more information about vertical transmission.

Mosquito eggs were collected in Jojutla, Morelos using ovi-traps that were placed inside houses or nearby houses with registered cases of Zika, dengue or chikungunya. The collection of eggs and breeding of larvae were done according to the National Center of Preventive Programs and Disease Control protocols. Eggs were grown under controlled conditions to obtain the larva stage up to the second or the third state. Larvae were pooled and then used to obtain RNA extracts that were tested by RT-PCR and RT-qPCR for ZIKV, DENV and CHIKV.

The results showed natural vertical transmission of ZIKV, DENV and CHIKV in wild *Aedes aegypti*, we found 45 positive pools for DENV, 17 for ZIKV and 7 for CHIKV out of 162 pools examined. Of these positive pools we isolated DENV out of 2 pools, ZIKV out of 4 pools and CHIKV out of 2 pools. In order to confirm viral isolation we amplified fragments of the genome of these viruses. We obtained the complete genome of ZIKV through Next Generation Sequencing, being the first complete genome isolated from larvae.

Our results are evidence of the vertical transmission of DENV, ZIKV and CHIKV in mosquito populations from Morelos; these results would help us understand how viruses can remain in the wild between outbreaks and the importance of vertical transmission in the ecology of the arbovirus.

1. Introducción

1.1 Arbovirus

Las zoonosis son enfermedades a las cuales se les ha prestado una atención especial en los últimos años debido a su continua emergencia y re-emergencia. Estas enfermedades se definen como enfermedades causadas por un patógeno que puede ser transmitido entre animales y humanos. En los últimos años las zoonosis emergentes y re-emergentes han llamado la atención de los especialistas de la salud debido a brotes epidémicos en diversas partes del mundo (Vasconcelos y Calisher, 2016).

La Organización Mundial de la Salud define como zoonosis emergentes o re-emergentes a “aquellas enfermedades que se reconocieron o evolucionaron recientemente o aquellas que ocurrieron previamente pero muestran un incremento en la incidencia o expansión geográfica del hospedero o vector”. Una parte importante de las zoonosis es la ocasionada por los arbovirus (Vasconcelos y Calisher, 2016), los cuales tienen un impacto importante en la salud pública, y en la carga económica mundial debido a los brotes causados tanto en humanos como en animales (Boelling et al, 2015).

Los arbovirus son un grupo heterogéneo de virus transmitidos mediante vectores a hospederos vertebrados. Estos vectores son artrópodos hematófagos, como mosquitos o garrapatas, los cuales contraen el virus al alimentarse de un vertebrado infectado y lo transmiten a otro hospedero al alimentarse nuevamente (Conteras-Gutiérrez y Uribe, 2014; Vasconcelos y Calisher 2016). En general los ciclos naturales de estos virus se mantienen en zonas selváticas o rurales donde pasan de vectores selváticos a hospederos vertebrados, en varios casos primates no humanos (Coffey et al, 2013; Conteras-Gutiérrez y Uribe, 2014). Las aves, primates y pequeños mamíferos conforman los hospederos amplificadores en los ciclos selváticos, ya que tras contraer el virus mediante la picadura o mordedura de algún vector desarrollan viremias, lo que permite que los vectores que se alimenten de este organismo durante dicho periodo contraigan el virus (Coffey et

al, 2013). Debido a las alteraciones ecológicas y modificaciones humanas en el ambiente, se ha propiciado un aumento en la población de los vectores como los mosquitos, y la exposición a nuevos hospederos, como lo son los humanos, propiciando un nuevo ciclo de transmisión urbano en el que el humano juega el papel de hospedero vertebrado (Conteras-Gutiérrez y Uribe, 2014).

En su mayoría, el genoma de los arbovirus es de RNA, probablemente debido a la plasticidad genética requerida para infectar tanto a sus vectores como a los hospederos invertebrados (Weaver y Vasilakis, 2009). La estabilidad genética de los arbovirus representa una paradoja pues se sabe que la polimerasa RNA dependiente de RNA de estos virus no posee una actividad de “proofreading” o corrección de errores y la ausencia de mecanismos de reparación permiten que la tasa de mutación sea miles de veces mayor que la que los vertebrados presentan (alrededor de 1.5×10^{-3} mutaciones por nucleótido por replicación genómica) (Duffy et al, 2008; Weaver y Vasilakis, 2009); sin embargo los arbovirus presentan una menor tasa de sustitución que la esperada para virus de RNA (menor a 1×10^{-3} sustituciones por sitio por año). Esto refleja la selección purificadora que está asociada con la replicación tanto en hospederos vertebrados como en vectores invertebrados; (Duffy et al, 2008; Lambrechts y Lequime, 2016; Weaver y Vasilakis, 2009).). Esta evolución limitada a la cual se ven sometidos los arbovirus se puede ver como el resultado de un paisaje adaptativo en donde la adaptación en el hospedero o el vector reducen la adecuación en el otro organismo; solo aquellas mutaciones que son benéficas o neutrales tanto para la replicación tanto en el hospedero como en el vector se mantienen, resultando en la eliminación de la mayoría de las mutaciones por selección purificadora (Coffey et al, 2013).

Hasta la fecha se conocen alrededor de 500 arbovirus, de los cuales 134 son denominados emergentes o re-emergentes; estos virus pertenecen a las siguientes 5 familias: *Flaviviridae* (género *flavivirus*), *Togaviridae* (género *alphavirus*), *Bunyaviridae* (género *Orthobunyavirus*, *Nairovirus* y *Phlebovirus*), *Reoviridae* (género *Orbivirus*) y *Rhabdoviridae* (género *Vesiculovirus*) (Conteras-Gutiérrez y Uribe, 2014; Gould et al, 2006); siendo los géneros de las primeras dos familias los de interés para este estudio.

Diversos arbovirus de los géneros *flavivirus* y *alphavirus* han llegado a América en los últimos 20 años, encontrando a una población vulnerable ante estas infecciones. Algunos ejemplos son el virus del Oeste del Nilo que presentó un brote importante en América en 1999; el virus de Chikungunya para el cual no se tenía registrado ningún caso antes del 2013 y más recientemente el virus de Zika el cual entró a Brasil y se expandió por América en el 2015 (Fauci y Morens, 2016).

1.2 *Flavivirus*

El género *flavivirus* cuenta con más de 70 especies de las cuales solo una pequeña fracción es clínicamente relevante (Mukhopadhyay et al, 2005; Oliviera et al, 2017). La transmisión de estos virus se da predominantemente por artrópodos hematófagos como mosquitos o garrapatas siendo los mosquitos pertenecientes al género *Aedes* el vector más importante (Oliveira et al 2017). Estos virus se dividen en dos grupos epidemiológicos: el primer grupo lo integran virus con neurotropismo y son transmitidos comúnmente por mosquitos del género *Culex* por ejemplo: virus de encefalitis de San Luis (SLE), encefalitis japonesa (JEV), encefalitis Kunjin (KUN) y virus del Oeste del Nilo (WNV). El segundo grupo se conforma por los virus no neurotrópicos que tienen como vectores a las especies del género *Aedes* como lo son el virus de Dengue (DENV), fiebre amarilla (YFV) y Zika (ZIKV) (Kramer y Ebel, 2003).

Los virus pertenecientes al género *flavivirus* son envueltos y poseen un genoma de RNA con cadena sencilla de polaridad positiva (+ssRNA) con alrededor de 9500 a 12,500 nucleótidos con un solo marco de lectura abierto. El genoma de estos virus es liberado al citoplasma una vez que entra a la célula, y codifica para una poliproteína de 350kDa la cual es procesada proteolíticamente. La poliproteína es cortada co- y post-traduccionamente por una combinación de proteasas celulares de tipo furina y otras proteasas localizadas en el aparato de Golgi y la serin-proteasa viral en el dominio N-terminal de NS3, lo que da lugar a 3 proteínas estructurales (C, prM y E) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A,

NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5A) como se puede observar en la figura 1.1 (Bollati et al, 2010; Mukhopadhyay et al, 2005; Oliveira et al, 2017; Pastorino et al, 2010).

El extremo 5' del genoma de los flavivirus posee una cap tipo 1 con una metilación que lo protege de la degradación y ayuda con su eficiente traducción, esta región no codificante es relativamente corta (100 nucleótidos). Por otro lado la región no codificante en el extremo 3' es más larga (340 a 700 nucleótidos) y termina con CU_{OH} en lugar de la cola poli A. Existen varias estructuras de RNA conservadas localizadas en la región terminal del extremo 3' como lo son el motivo pentanucleotido 5' CACAG3' y el 5' CU3' terminal. Ambas secuencias son importantes ya que son el sitio de reconocimiento para la polimerasa viral (RdRp) (Briton y Bason, 2015; Goertz et al, 2017; Pastrino et al, 2010).

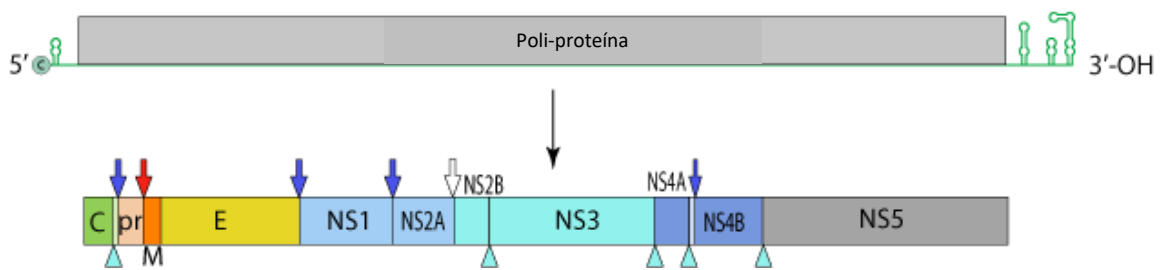


Figura 1.1 Representación esquemática del genoma de los flavivirus. Se muestran la poli-proteína junto con sus extremos UTR 5' y 3' en la parte superior. En la parte inferior se muestran las 10 proteínas en las que es cortada la poli-proteína y los sitios en donde se corta. Tomada y modificada de Virus Pathogen Resource 2017.

Las proteínas estructurales como su nombre lo indica forman una estructura icosaédrica dentro de la cual se encuentra material genético del virus. La proteína C forma dímeros que conforman la nucleocápside a la que se asocia el material genético (Mlera et al, 2014; Oliveira et al, 2017). La proteína prM forma un heterodímero con la proteína E y actúa como chaperona para el plegamiento de ésta (Mlera et al, 2014). Por su parte la proteína E es uno de los principales componentes estructurales presentes en la partícula viral, esta participa en pasos clave durante el ciclo de vida viral como la unión y entrada a células susceptibles (Oliveira et al, 2017).

La proteína NS1 se expresa en múltiples formas oligoméricas y está presente en diferentes localizaciones celulares como la membrana intracelular, la superficie celular y extracelularmente como una lipopartícula soluble secretada. La forma secretada de NS1 en hospederos promueve la adquisición del virus por el mosquito; la proteína NS1 secretada parece ayudar al virus a sobrepasar la barrera inmune del intestino del mosquito (Liu et al, 2016). Asimismo la proteína NS1 se asocia con NS4A y NS4B para formar el complejo de replicación. NS2A está implicada en la replicación viral y el armado de la cápside, NS2B es un co-factor de NS3 (Mlera et al, 2014). NS3 y NS5 presentan funciones de enzimas y son esenciales para el virus; la primera es una proteína multidominio con una proteasa N-terminal (NS3Pro) y una RNA trifosfatasa en una porción de C-terminal (NS3RTPasa) además de helicasa (NS3Hel) que participan en el capping y la síntesis de RNA viral. Por su parte NS5 consiste en un dominio metiltransferasa N-terminal (NS5MTase) y un dominio C-terminal RNA dependiente de polimerasa RNA (NS5RdRp) (Bullati et al, 2010; Mlera et al, 2014).

1.2.1 Dengue

El virus del dengue (DENV) es epidemiológicamente importante ya que se calcula que existen 390 millones de infecciones por dengue al año de los cuales 96 millones se manifiestan clínicamente (OMS, 2016). En México se confirmaron un total de 13,820 casos en el 2016 (Secretaría de Salud 2017). Este virus es un patógeno emergente en zonas tropicales y subtropicales; los casos de infección por este virus parecen ir en aumento, y en países como México, la transmisión ocurre durante todo el año, siendo mayor en los meses de lluvia. Este virus es transmitido por mosquitos pertenecientes al género *Aedes*, principalmente las especies *A. aegypti* y *A. albopictus* (Pessoa-Martins et al, 2012; Uribarren-Berrueta T., 2016).

DENV actualmente se mantiene en dos ciclos de transmisión denominados epidémico y selvático. En el ciclo epidémico el virus circula entre humanos, que sirven como hospederos y reservorios amplificadores, y mosquitos del género *Aedes* peridomésticos como lo son *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*; siendo el primero su principal vector en América. En cambio en el ciclo selvático los hospederos y amplificadores son primates no humanos y los vectores son diferentes especies de *Aedes* que habitan en las selvas como lo son *Ae. furcifer*, *Ae. africanus*, *Ae. taylori* entre otros (Fernandes da Costa et al, 2017; Weaver y Vasilakis, 2009)

Cuatro eventos zoonóticos dieron origen a los cuatro serotipos de dengue: 1, 2, 3 y 4, los cuales son filogenéticamente distintos, compartiendo un 65% de su genoma. (Holmes y Twiddy, 2003; Mustafa et al, 2015; Weaver y Vasilakis, 2009). Estos serotipos divergieron en diferentes tiempos siendo DENV-4 el primero en divergir, seguido por DENV-2 y finalmente la división de DENV-1 y DENV-3 (Holmes y Twiddy, 2003). Cada uno de estos serotipos consta de diversos genotipos los cuales difieren en menos de un 6% entre ellos (Holmes y Twiddy, 2003; Weaver y Vasilakis, 2009). Los 4 serotipos con sus diversos genotipos se encuentran distribuidos mundialmente, existiendo en diversas regiones de los trópicos en los cuales co-circulan varios serotipos y genotipos lo que resulta en patrones de competencia complejos y fluctuación de genotipos (Allicock et al,

2012). Además de estos 4 serotipos, Mustafa y colaboradores describieron recientemente (2015) un quinto serotipo de dengue, DENV-5, el cual solo se ha reportado en el Bosque de Sarawak, Malasia, el cual se mantiene en el ciclo de vida selvático teniendo únicamente reporte de infección en humanos en el 2007.

En México encontramos los 4 serotipos co-circulando en el territorio nacional (Carrillo-Valenzo et al, 2010; Uribarren-Berrueta T., 2016). Se sabe que han existido diversas introducciones de diferentes genotipos al territorio mexicano, la mayoría de los genotipos registrados para México se comparten con aquellos registrados en Centro América. El genotipo registrado de DENV-1 en México es el genotipo III, el cual se expande por toda América, el cual parece haber sido introducido en tres ocasiones diferentes a nuestro país. DENV-2 presenta 3 genotipos introducidos en diferentes ocasiones, el primer genotipo en ser introducido fue el americano, sin embargo este no ha sido registrado en muestras desde 1995. El segundo genotipo en ser introducido fue el Cosmopolita, sin embargo este no ha sido reportado desde el 2002; el último genotipo de DENV2 en ser introducido a México fue el Asiático/americano, el cual es el genotipo dominante en México. Para DENV-3 se tiene el registro del genotipo III el cual se encuentra en toda América y para DENV-4 tenemos el genotipo II. La evolución de este virus en México se caracteriza por las introducciones independientes de múltiples linajes; además de diversos factores tanto ecológicos como genéticos como lo son la deriva génica, inmunidad de hospederos, características ambientales, entre otros (Carrillo-Valenzo et al, 2010; Diaz et al 2006)

La enfermedad por este virus se caracteriza por síntomas como fiebre elevada, cefalea, dolor retro-orbital, mialgias y artralgias, náuseas, vómito, diarrea, exantemas maculopopulares los cuales a menudo son confundidos con infección por otros arbovirus como Zika y Chikungunya. El diagnóstico se lleva a cabo mediante ELISA (IgM e IgG), inmunocromatografía rápida y RT-PCR sin embargo muchas veces se confunde con infecciones por virus de Zika(Uribarren-Berrueta T, 2016)

1.2.2 Zika

En los últimos años ha surgido interés por otro de los flavivirus previamente mencionado, el virus Zika (ZIKV), el cual fue descubierto en 1947 en Uganda (Fauci y Morens, 2016). En el 2007 se reportaron los primeros brotes epidémicos por la enfermedad en las islas de Yap, en el 2013 se reportó otro brote en la Polinesia Francesa y a partir de esta fecha dicho virus siguió los patrones de distribución de DENV y CHIKV, los cuales, al igual que ZIKV fueron descritos en África y tiempo después se dispersaron a Asia antes de distribuirse globalmente (Fauci y Morens, 2016; Shen et al, 2016).

Al igual que el DENV, el ZIKV es transmitido por mosquitos pertenecientes al género *Aedes*, compartiendo las especies de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* como vectores en el ciclo de vida epidémico, en el cual el humano es el hospedero vertebrado; además de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* se sabe que las especies *Ae. vitattus*, *Ae. furcifer*, *Ae. africanus*, *Ae. apicoargenteus* y *Ae. luteocephalus* pueden transmitirlo en el ciclo de vida selvático en donde primates no humanos son los hospederos (Saiz et al, 2016; Tilak et al, 2016; Vorou 2016).

Existen dos linajes de este virus, el africano y el asiático, siendo este último el que tuvo una amplia dispersión por el mundo en el 2015 (Shen et al, 2016; Vorou, 2016). El ancestro común más reciente parece ser la cepa registrada para Uganda en 1920, a partir de donde se dispersó al Oeste de África y posteriormente a Malasia en donde surgió el linaje Asiático (Fajardo et al 2016). El linaje asiático logró dispersarse a lo largo de Micronesia, la Polinesia Francesa, llegando hasta Brasil de donde se propaga al resto de América (Vorou 2016). Las cepas del linaje asiático/americano parecen agruparse en variantes provenientes de Oceanía y variantes de América por separado, lo que muestra que al parecer han evolucionado en dos sub-linajes diferentes (Fajardo et al, 2016; Shi et al 2016). Poco después de la introducción de ZIKV al continente americano el virus empezó a diversificarse, hasta el momento ninguna cepa ha demostrado ser dominante ante las demás (Shi et al 2016).

ZIKV se mantiene en la población humana no sólo por su transmisión a través de vectores, sino también presentando transmisión por vía sexual, perinatal y transfusión sanguínea (Vorou, 2016). A pesar de que el 80% de las infecciones son subclínicas, los síntomas comunes de aquellas que no lo son incluyen fiebre, artralgia, dolor de cabeza, dolor retro-ocular, conjuntivitis, mialgias y astenia post-viral; algunos otros síntomas poco frecuentes incluyen anorexia, mareos, constipación, dolor abdominal, diarrea, ulceraciones en membrana mucosa (Tilak et al, 2016). En el 2016 en nuestro país se registraron 7,320 casos confirmados, convirtiendo a este virus en un problema de salud pública (Secretaria de Salud Pública, 2017)

La infección por ZIKV presenta síntomas muy parecidos a las infecciones por DENV por lo que estas dos infecciones eran fácilmente confundidas (Fauci y Morens, 2016); sin embargo en estudios recientes el ZIKV ha presentado características distintivas que en las infecciones por DENV no se dan como el neurotropismo (Vorou, 2016). Existe un gran número de casos de niños con microcefalia CUANTOS? nacidos de madres infectadas con ZIKV durante el embarazo (Schuler-Faccini et al, 2016; Tilak et al, 2016; Vorou, 2016). Varios síntomas oftalmológicos y neurológicos como cerebro pequeño, ausencia de circunvalaciones del cerebro, dilatación de los ventrículos laterales, calcificación distrófica del cortex cerebral e hipoplasia del tronco cerebral y medula espinal se han registrado en niños de madres infectadas (Vorou, 2016). Es por estas afecciones y su rápida expansión geográfica a partir del 2015 que en la actualidad se ha prestado un interés especial a este virus.

1.3 Alfavirus

El género alfavirus pertenece a la familia *Togaviridae* y cuenta con 29 especies diferentes, dentro de las que encontramos agentes causantes de enfermedades en humanos, animales domésticos, animales silvestres terrestres y peces. La mayoría de los alfavirus son transmitidos a sus hospederos vertebrados mediante la picadura de mosquitos (Weaver et al, 2012). Dentro de los miembros de este género encontramos a virus bien estudiados como el virus sindbis (SINV), virus del bosque de Semliki (SFV), virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) y el virus del río de Ross (RRV). El virus chikungunya (CHIKV) ha recibido especial atención debido a la dispersión que ha presentado en los últimos años (Jose et al 2009)

Los virus pertenecientes al género Alfavirus cuentan con un genoma de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva de aproximadamente 11.5kb (Garmashova et al 2007; Weaver et al, 2012). El genoma cuenta con 5' cap y con una cola de poli A en el extremo 3', posee dos marcos de lectura abiertos, el primero para las proteínas no estructurales y el segundo que codifica para las proteínas estructurales (Weaver et al, 2012). El primer marco de lectura es traducido directamente por la célula hospedera a proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3 y NSP4) que forman un complejo de enzimas replicativas las cuales transcriben el RNA subgenómico (Garmashova et al 2007). NSP1 es la proteína encargada de la síntesis de la cadena negativa de RNA y tiene la capacidad de adicinal el cap al RNA, NSP2 participa como helicasa y proteinasa, además de estar involucrada en el apagado de la transcripción de proteínas celulares; NSP3 es parte fundamental de la unidad replicativa de los alfavirus pues ayuda con el síntesis del RNA, y por ultimo NSP4 es la RNA polimerasa dependiente de RNA. El segundo marco de lectura codifica para las proteínas de cápside, las glicoproteínas de envoltura E1 y E2 y una pequeña proteína E3 (Figura 1.2) (Garmashova et al, 2007; Weaver et al, 2012).

Las glicoproteínas E1 y pE2 (precursora de la E3 y E2 antes de ser cortada por furina) son ensambladas como heterodímeros en el retículo endoplásmico. La

proteína E3 es cortada de la pE2 por una furina en el aparato de Golgi. E1 es responsable de la fusión de la membrana viral y endosomal, esta proteína interactúa con E2 para formar la estructura rígida alrededor de la membrana. La proteína E2 está involucrada en la unión a receptores, por otra parte la proteína E3 media el plegamiento de pE2 e interacciona con E1 para su fusión; además E3 es necesaria para el armado de la partícula viral (Jose et al, 2009).

El RNA de los alfavirus contiene elementos estructurales y elementos de secuencias conservadas (CSE) fundamentales para la replicación del genoma viral. En la región 5' no traducida del genoma se encuentra un CSE que forma una estructura de tallo-burbuja en los primeros 44 nucleótidos del genoma y se cree que promueve la síntesis de la cadena de RNA positiva del molde de RNA negativa. Un segundo CSE de 51 nucleótidos también en el extremo 5' actúa como promotor para el inicio de la síntesis de la cadena negativa de RNA. El extremo 3' también cuenta con estas secuencias, una CSE muy cerca de la cola poliA mide 19 nucleótidos y participa como co-promotor en el inicio de la síntesis de la cadena negativa del RNA. El último CSE de 24 nucleótidos está localizado en medio de las secuencias codificantes de las proteínas estructurales y no estructurales (Jose et al, 2009).

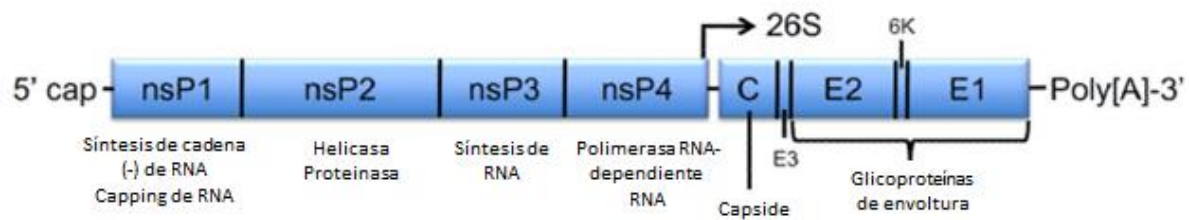


Figura 1.2 Representación esquemática del genoma de los alfavirus. Se muestran las 4 proteínas estructurales y las 4 proteínas no estructurales junto con la función principal que estas tienen; así como también el cap y la cola poli A que posee el genoma de estos virus. Tomada y modificada de Weaver et al 2012.

1.3.1 Chikungunya

Dentro del género alfavirus se encuentra el virus de Chikungunya (CHIKV). Este virus al igual que el DENV y ZIKV se mantiene en dos ciclos de transmisión: (1) el ciclo enzootico: en donde primates no humanos son el principal hospedero reservorio/ amplificador, registrado únicamente en el Africa sub-Sahariana, y los vectores son mosquitos silvestres del género *Aedes* como *Ae. furcifer*, *Ae. vittatus*, *Ae. fulgens*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. dalzieli*, *Ae. vigilax*, *Ae. camptorhynchites*, *Culex annulirostris*, *Mansonia uniformis* y algunos mosquitos pertenecientes al género *Anopheles* (Pialoux et al, 2007; Weaver et al, 2012; Weaver y Lecuit 2015). (2) el ciclo epidémico: en donde el humano es el principal hospedero y los vectores son los mosquitos antropofágicos *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Las tasas de sustitución son más altas en el ciclo de vida epidémico debido a la diferencia que presentan entre el periodo de incubación antes de la transmisión por el mosquito, la frecuencia de transmisión y la disponibilidad de hospederos susceptibles (Coffey et al, 2013; Pialoux et al, 2007; Weaver et al, 2012). Las epidemias por este virus se dan de forma abrupta sin embargo declinan rápidamente en el momento que la población comienza a desarrollar inmunidad (Pialoux et al, 2007).

El virus de chikungunya se clasifica en 4 linajes: este, centro y sur de África (ECSA), Oceano Indico (IOL), asiático y oeste de África (Pialoux et al, 2007; Volk et al, 2010). En el 2004 una nueva cepa del linaje enzootico ECSA emergió y se dispersó a lo largo de las Islas del Océano Indico, durante esta epidemia una transición de amino ácidos se presentó en la mayoría de las secuencias reportadas. La transición de alanina por valina en la posición 226 de la proteína de envoltura E1 resulto en un aumento en la capacidad de infección de CHIKV sobre *Ae. albopictus*, así el nuevo linaje continuo expandiéndose y divergiendo a través de Asia. Diversos estudios sugieren que, al igual que el IOL, el linaje asiático diverge del linaje ECSA. El linaje asiático se mantuvo circulando en Asia hasta el 2013, ya que en este año se reportaron los primeros casos de CHIKV en América. Este virus llego a la isla de San Martin de donde se propago a Centro América para después dispersarse tanto a norte como sur américa (Camacho et

al, 2017; Sahadeo et al, 2017; Weaver y Forrester, 2015; Weaver y Lecuit, 2015). Secuencias registradas para diversos países de América indican que todas las cepas reportadas para América pertenecen al linaje asiático; aquellas reportadas en México, El Salvador, Venezuela, Trinidad y Tobago, Guyana, Haití, Panamá, Brasil, República Dominicana, Guatemala, Jamaica, Honduras, Puerto Rico y Estados Unidos se agrupan en el clado del Caribe (Camacho et al 2017). A partir del 2013 todas las secuencias reportadas de CHIKV han pertenecido al linaje asiático a excepción de un brote en el 2014 que se dio en el norte de Brasil en donde las cepas pertenecientes al linaje ECSA, sin embargo no se han vuelto a encontrar virus pertenecientes a este linaje en años posteriores ni en otras regiones de América (Sahadeo et al, 2017).

CHIKV es uno de los patógenos del género *alfavirus* más importantes para humanos, el cuadro clínico de esta enfermedad se caracteriza por la presencia de fiebres altas, dolor de espalda, salpullido, mialgias y artralgias. Se ha llegado a registrar fiebre hemorrágica pero éstos han sido casos aislados en Tailandia. Los síntomas son parecidos a los reportados en infecciones por ZIKV o DENV, por lo que típicamente esta subreportado, sin embargo las artralgias y artritis en una infección por CHIKV pueden persistir por varios meses después de la infección (Pialoux et al, 2007; Weaver et al, 2012). En comparación con la infección por ZIKV en donde el 80% de las personas infectadas son asintomáticas (Tilak R. et al, 2016), en las infecciones por CHIKV alrededor del 85% de las personas presentan síntomas (Weaver y Lecuit, 2015). En México para el 2016 se registraron un total de 747 casos confirmados, a pesar de que son un número bajo de casos comparado con otras enfermedades este virus tuvo su máximo pico de infecciones en el 2015 donde en México se registraron un total de 11,577 casos confirmados (Secretaría de Salud Pública 2016). Las infecciones de CHIKV en mujeres embarazadas también presenta un efecto en los infantes nacidos de estas madres, pues cerca del 50% presentan encefalopatías con secuelas neurológicas (Weaver y Lecuit, 2015).

El diagnóstico de CHIKV es muy parecido al realizado para DENV y ZIKV, esto es que además observar el cuadro clínico, se realizan pruebas serológicas con IgG e

IgM, sin embargo esta prueba puede resultar en una reactividad cruzada con varios arbovirus (Pialoux et al, 2007). También se diagnostica por medio de RT-PCR siempre y cuando la muestra haya sido tomada durante los primeros 7 días después de iniciados los síntomas (Pialoux et al, 2007; Weaver y Lecuit, 2015). No existe un medicamento específico para tratar infecciones por CHIKV, al igual que con DENV y ZIKV, únicamente se tratan los síntomas del paciente (Weaver y Lecuit, 2015).

1.4 *Aedes aegypti*

Aedes aegypti es una especie de mosquito del género *Aedes* el cual juega un papel muy importante como vector para varios arbovirus. Como se mencionó anteriormente, DENV, ZIKV y CHIKV comparten esta especie como vector, lo cual lo convierte en un blanco de estudio como transmisor de diversas enfermedades que afectan al humano. (Kraemer et al, 2015)

El ancestro de *Aedes aegypti* era una especie que se alimentaba de animales silvestres y habitaba en los bosques de África, sin embargo esta especie se fue adaptando a un estilo de vida doméstico ocupando nuevos nichos dentro de los ecosistemas urbanos. Se empezó a distribuir gracias al comercio y a los viajes y así fue como hoy en día *Aedes aegypti* está presente en África, la mayoría de las ciudades de Asia y gran parte de América, ocupando gran parte de los trópicos y subtrópicos. Normalmente se alimenta de humanos y descansa dentro de las viviendas de las personas (Kraemer et al 2015)

Este mosquito tiene características morfológicas que lo hacen fácilmente distinguible (figura 1.3). Posee una coloración oscura del cuerpo, el tórax muestra rayas longitudinales en el escudo, en el escutelo todos los lóbulos presentan escamas planas y blancas formando una banda transversal. El fémur exhibe una raya longitudinal de escamas blancas, la tibia no presenta escamas blancas y es hasta el tarsomero 1 en donde empiezan las características bandas blancas a lo largo del resto de las patas (Red Nacional de Laboratorio de Salud 1997; Rueda, 2004).



Figura 1.3 Adulto hembra de *Aedes aegypti*. En esta imagen se pueden observar las características distintivas de la especie *Aedes aegypti* anteriormente mencionadas. Imagen tomada de la página de la CDC 2014.

1.4.1 Ciclo de vida

El ciclo biológico de *Aedes aegypti* es holometábolo, es decir, pasan por una metamorfosis completa teniendo una fase acuática y otra terrestre. El ciclo de vida (figura 1.4) consta de 4 etapas: huevo, larva, pupa y adulto; cada una de estas etapas posee características diferentes a las demás. Las hembras de mosquito son atraídas a recipientes oscuros de boca ancha, en la sombra y con agua; en este tipo de sitios colocan los huevos en la pared del recipiente, cerca de la superficie del agua. Los huevos son colocados individualmente, miden 1mm de largo y son de color blanco sin embargo estos cambian a negro dentro de las primeras dos horas. Los huevos son sumamente resistentes pues pueden sobrevivir hasta 2 años en dipausa (Red Nacional de Laboratorio de Salud 1997).

Una vez que las condiciones de humedad son óptimas las larvas eclosionan; existen 4 estadios larvarios cada uno de estos de mayor tamaño que el anterior sin presentar cambios a nivel morfológico. Las larvas pasan la mayor parte de su tiempo alimentándose de microorganismos y materia orgánica en el agua, y poseen movimientos característicos serpenteantes. Si la temperatura esta alrededor de los 37°C y existe disponibilidad de alimento a los 7 días las larvas pasan a ser pupas. Las pupas permanecen en la superficie del agua, no se alimentan durante esta etapa y 3 días después se convierten en mosquitos adultos. En el adulto el exoesqueleto se endurece, los machos sufren una rotación de la parte terminal del abdomen y a partir de las 24 horas como adulto se producen apareamientos, generalmente durante el vuelo. Las hembras se alimentan de sangre la cual es la fuente de proteínas necesarias para poder ovopositar (CDC, 2012; Red Nacional de Laboratorio de Salud 1997).

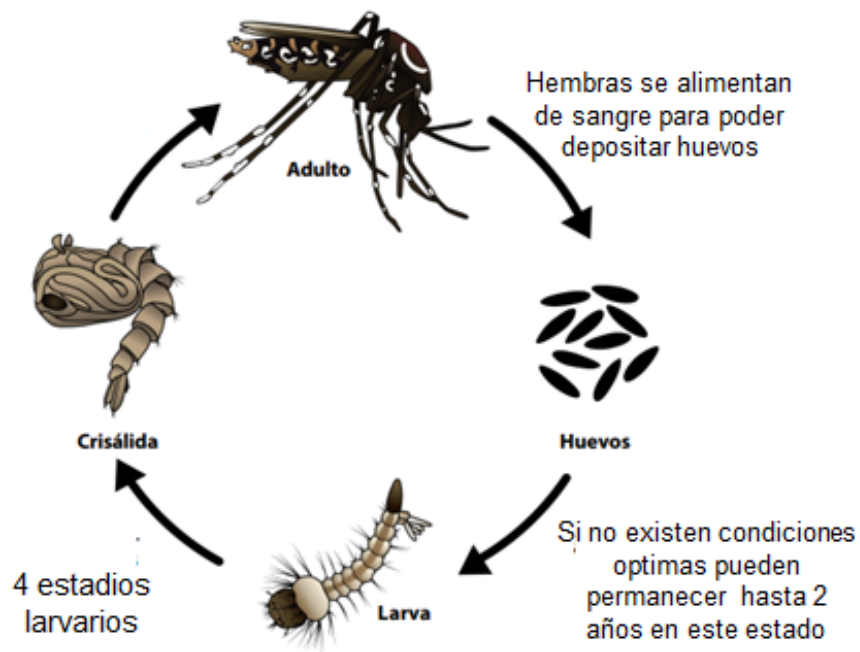


Figura 1.4 Ciclo de vida de *Aedes aegypti*. Al ser un díptero holometábolo esta especie de mosquito pasa por una metamorfosis completa. A partir de los huevos se producen las larvas que pasan por 4 estadios para después convertirse en pupas. Posteriormente las pupas sufren una metamorfosis que da lugar a mosquitos adultos los cuales se reproducirán después de 24 horas. Las hembras necesitan alimentarse de sangre para poder poner huevos y así se repita el ciclo. Imagen obtenida y modificada del CDC (<https://blogs.cdc.gov/publichealthmatters/2014/01/coming-to-america/aedes-aegypti/>)

1.4.2 Transmisión horizontal y vertical de virus en Aedes aegypti

Aedes aegypti es un importante vector para diversos arbovirus por lo que la expansión de esta especie de mosquito por el mundo ha permitido la dispersión de diversos arbovirus (Kraemer et al, 2015). Existen 3 mecanismos mediante los cuales los mosquitos pueden adquirir un arbovirus, el mecanismo clásico es la transmisión horizontal vector-hospedero-vector, la transmisión sexual y la transmisión vertical (da Costa et al, 2017).

La transmisión horizontal se da mediante la ingestión de sangre infectada de virus, después de ingerir sangre de un hospedero virémico, el virus infecta las glándulas epiteliales del mesenterón del mosquito (intestino) ahí se replica y se libera para poder diseminarse mediante el hemocoele al resto del cuerpo del mosquito. Los virus vuelven a replicarse en las células del cuerpo graso para posteriormente replicarse en las glándulas salivales. La infección en las glándulas salivales le permite al virus pasar a la saliva y transmitirse a otro hospedero durante la alimentación del mosquito (figura 1.5) (Coffey et al, 2013; Kramer y Ebel, 2003; Uribarren-Berreta, 2016). La diversidad genética de los virus va cambiando conforme atraviesa las diferentes barreras en el cuerpo del mosquito, gran parte de las variantes se pierden cuando pasan de la sangre del hospedero al abdomen de éste, sin embargo al llegar a las glándulas salivales la población viral vuelve a presentar una alta diversidad genética (Coffey et al, 2013; Lambrechts y Lequiem, 2016).

Existen 4 puntos claves en la transmisión horizontal de los virus en el mosquito: la infección en el mesenterón, el escape hacia el hemocoele, la infección de glándulas salivales y la transmisión al vertebrado; si los virus no logran pasar alguna de estas barreras para diseminarse y replicarse en la siguiente zona el vector quedaría infectado pero no sería un vector competente, es decir, el mosquito no sería capaz de pasar el virus a otro hospedero. (Coffey et al, 2013; Kramer y Ebel, 2003; Uribarren-Berreta, 2016).

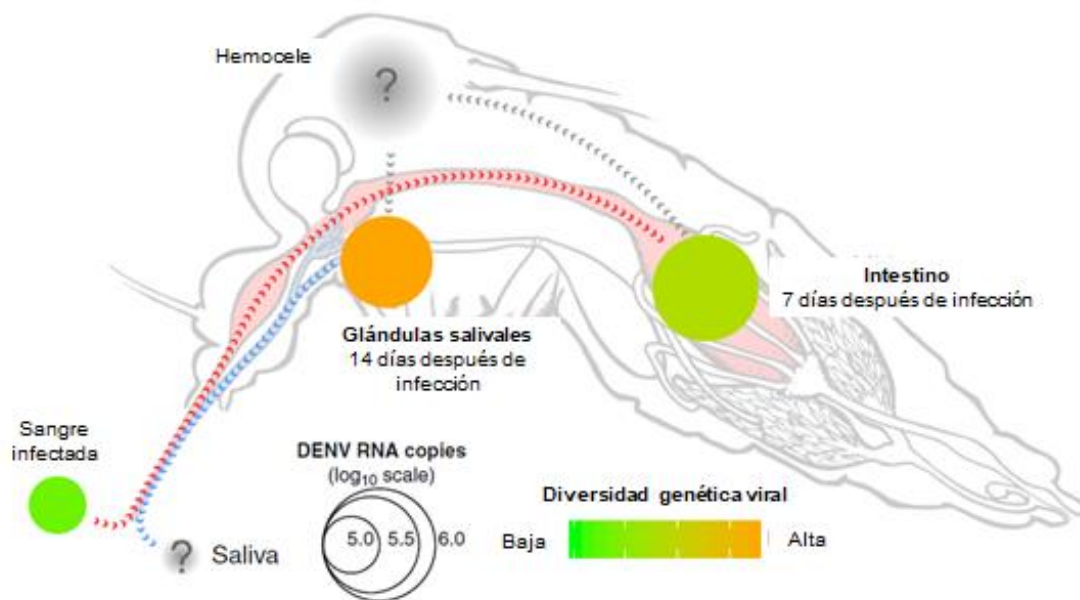


Figura 1.5 Infección de *Aedes aegypti* por arbovirus. El mosquito ingiere sangre infecciosa, el virus llega al abdomen del mosquito donde se da la infección y replicación del virus en células del mesenterón. El virus se libera del mesenterón para diseminarse a través del hemocoele hasta que llega a las glándulas salivales. Aquí infecta a las células y se replica. El virus se libera a la saliva siendo así capaz de pasar al siguiente vertebrado del que se alimente el mosquito. Se muestra en los círculos la diversidad genética que tiene la población de virus a través de la infección al vector. Imagen tomada y modificada de Lambrechts y Lequiem, 2016.

La transmisión vertical o hereditaria se define como aquella en la que un patógeno pasa de los padres a su descendencia (Lequime et al, 2016). A pesar de que la transmisión horizontal es la estrategia más utilizada para el mantenimiento de los arbovirus en una población, la combinación de transmisión horizontal y vertical permite la persistencia de los arbovirus ante condiciones adversas como la baja densidad de hospederos susceptibles, temporadas frías o reducción en la población de vectores (Coffey et al, 2013; Lequime et al, 2016).

Se propone que la transmisión vertical es un mecanismo de mantenimiento del virus en los artrópodos ante condiciones adversas para la transmisión horizontal; este tipo de transmisión está bien documentada para ciertos arbovirus de la familia *flaviviridae*, *togaviridae* y *orthobunyaviridae*. La transmisión vertical no es igualmente eficiente en todos los vectores ni para todos los virus, existen diversos estudios en los que se demuestra que el género *Aedes* muestra mayor capacidad para la transmisión vertical de los virus que el género *Culex* (Lequime et al, 2016). Se sabe que la transmisión vertical de un arbovirus en su vector depende de muchos factores entre ellos la especie de mosquito, cepa del virus, condiciones ambientales, entre otros (Adams y Boots, 2010; Coffey et al 2013; Lequime et al 2016; Nelms et al, 2013). Los resultados de los estudios de la capacidad de transmisión vertical en vectores son sumamente variables, se proponen múltiples explicaciones entre las que encontramos la sensibilidad de las técnicas, el tipo de técnica utilizada, y el método de procesamiento de la muestra. La mayoría de estos estudios encuentran evidencia de este tipo de transmisión, sin embargo la importancia epidemiológica de este suceso es controversial.

Comúnmente para experimentos en laboratorio se utiliza la tasa de transmisión vertical, VTR por sus siglas en inglés, la cual se calcula con la proporción de mosquitos parentales infectados que producen por lo menos un individuo de la progenie infectado; otra medida es la tasa filial de infección, FIR por sus siglas en inglés, la cual es la proporción de progenie infectada producida de padres infectados.

El cálculo de las dos medidas permite conocer la tasa de infección vertical (VIR) la cual es la VTR multiplicada por FIR. Sin embargo, para estudios con larvas o mosquitos de campo obtener estas mediciones es imposible, por lo que la mayoría de estudios que trabajan con mosquitos adultos o fases inmaduras provenientes de campo utilizan la tasa mínima de infección o MIR para medir la transmisión vertical. El MIR se calcula dividiendo el número de pools positivos entre los individuos muestreados por 1000; esta es una medida de la proporción de la población de larvas o mosquitos que están infectados con el virus. A pesar de que este número se ve afectado por el número de individuos que conforman los pools es la medida en la que se presentan la mayoría de los resultados de estudios de transmisión vertical en mosquitos y estados inmaduros en campo (Grunnill y Boots, 2016)

2. Antecedentes

No hay duda de que la transmisión vertical en el mosquito puede favorecer la persistencia de los virus como dengue, zika y chikungunya brindando un reservorio para el virus (Adams y Boots, 2010), sin embargo son pocos los reportes que se tiene para estos virus, en especial para ZIKV y CHIKV; además de que varios reportes acerca de este tipo de transmisión son contradictorios y los resultados sumamente variables (Grunnil y Boots, 2016).

2.1 Transmisión vertical de DENV

Los virus presentan diversas estrategias para mantenerse en la naturaleza durante periodos inter-epidemicos, la transmisión vertical es una estrategia que le permite al virus permanecer en sus vectores durante estos periodos (Costa et al, 2017). Existe un gran número de estudios de transmisión vertical de DENV en *Aedes aegypti*, teniendo registros de este tipo de estudios desde 1920 hasta el día de hoy. Los resultados son altamente variables pues múltiples investigadores reportan la existencia de transmisión vertical de DENV en esta especie de mosquito mientras que otros no son capaces de detectar el virus, o se detecta en muy baja proporción (Grunnil y Boots, 2016; Kramer y Ebel, 2003).

Se ha observado que la transmisión vertical varía dependiendo del serotipo y genotipo de DENV al igual que la población de mosquitos que se esté estudiando pues cada uno de los serotipos presentan diferentes proporciones de transmisión vertical (Kramer y Ebel, 2003). Thongrungrat y colaboradores (2010) observaron que a lo largo del año el MIR detectado tanto en larvas como adultos varía desde 0 a 24 teniendo los mayores niveles en Abril (temporada seca en Tailandia, justo antes de empezar la temporada de lluvias) justo antes de que empiece la etapa en donde la transmisión del DENV es mayor. Esto sugiere que un mayor MIR registrado en estadios inmaduros refleja los adultos infectados en el futuro, lo que lo vuelve epidemiológicamente importante. Tomando estos datos en cuenta, es de

esperarse que los MIR reportados en los diferentes estudios varíen dependiendo del lugar donde se realizaron, técnicas utilizadas, esfuerzos de muestreo, temporada de muestreo, etc. En la tabla 1.1 se pueden observar diversos estudios en los que se calculó el MIR durante la transmisión vertical y como se puede observar los resultados son sumamente variables teniendo MIR de 0 hasta 40, sin embargo estos estudios varían tanto en estrategia de colecta, temporada, técnica de detección y lugar de muestreo, volviendo difícil hacer una comparación entre los estudios reportados.

Existen otros estudios en los que se ha demostrado que el DENV puede persistir a través de varias generaciones en esta especie de mosquito mediante transmisión vertical. Así en el caso de DENV-2 se ha llegado a detectar el virus hasta la quinta generación después de la primera infección (Rohani et al 2008); En el caso de DENV-3 se detectó hasta la séptima generación (Joshi et al 2002) demostrando así la persistencia del virus a través de varias generaciones lo que puede ser de gran importancia epidemiológica.

Tabla 2.1 MIR reportados previamente para transmisión vertical en *Ae aegypti*. En esta tabla se indica el estadio de los mosquitos, el serotipo detectado, el país en el que se realizó el estudio, el MIR obtenido y la referencia.

Estadio de mosquitos	País	Serotipo detectado	MIR	Fuente
Adultos (Crecidos de larvas colectadas en campo)	Brasil	DENV-2	0.5	Pessoa-Martins et al, 2012
Adultos (Crecidos de larvas colectadas en campo)	Bolivia	DENV-1	Hembras: 0.4 Machos: 1.73	Le Goff et al, 2011
Adultos	Reino Unido	DENV-2	17	Grunnil y Boots, 2016
Pupas	Reino Unido	DENV-2	2.63	Grunnil y Boots, 2016
Estadios inmaduros	India	DENV	0	Ramalingam et al, 1986
Adultos y larvas (colectados en campo)	Brasil	DENV-3	Adultos: 16.9 Larvas: 0.18	Vilela et al, 2010
Adultos y larvas (colectados en campo)	Brasil	DENV-1, DENV-2, DENV-3	Adultos: 29.9 Larvas: 0.6	Guedes et al, 2010
Adultos (Crecidos de larvas colectadas en campo)	Tailandia	DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4	Adultos: 12.9 y 15.6	Thongrungrat et al, 2010
Adultos (Criados e infectados en laboratorio)	Francia	DENV-2	0.52-2	Jousset 1981
Larvas (Colectadas en campo)	Malasia	DENV	5.77-40	Lee y Rohani 2005
Larvas	Brasil	DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4	17.7	Da Costa et al 2017

2.2 Transmisión vertical de ZIKV

A pesar de que el ZIKV fue descubierto en 1947 no se le había dado importancia hasta el 2007, fecha en la que se presentaron los primeros brotes en la Isla de Yap y posteriormente en el 2015 cuando se expandió por el mundo (Fauci y Morens, 2016; Shen et al, 2016). Debido a que este virus recibió la atención de los científicos hasta hace poco, existen pocos datos acerca de su dinámica con el vector, en especial en lo que se refiere a la transmisión vertical.

Chun-Xiao y colaboradores (2017) reportan que existe transmisión vertical de este virus en *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio, obteniendo una MIR en huevos de 1.81 y 1.74. En dicho estudio también examinaron los órganos de la progenie de hembras infectadas dentro de los cuales encontraron la presencia de ZIKV en glándulas salivales, intestinos y saliva. Thangamani y colaboradores (2016) infectan mosquitos de laboratorio con ZIKV y obtienen un MFIR (mínimum filial infection rate) de 1:290 en *Aedes aegypti*, lo que nos indica el número de mosquitos infectados obtenidos de una hembra infectada, el cual es comparable con el obtenido en otros arbovirus que presentan transmisión vertical.

Ferreira-de-Brito y colaboradores en el 2016 detectan ZIKV en un pool de machos de *Aedes aegypti*, lo que sugiere la presencia de transmisión vertical o sexual de este virus; Diallo y colaboradores (2014) también detectan este virus en machos, sin embargo los machos pertenecen a la especie *Aedes furcifer*. Por otro lado Smartt y colaboradores (2017) detectan la presencia de este virus *Aedes albopictus* obtenidos de huevos colectados en áreas con casos de zika en humanos, sin embargo no pudieron aislarlo.

2.3 Transmisión vertical de CHIKV

A diferencia de DENV o ZIKV se conocen varias especies que participan como vectores en el ciclo de transmisión de CHIKV, entre ella *Aedes albopictus*. Varios estudios de transmisión vertical fueron realizados en *Ae. albopictus* como el de Niyas y colaboradores (2010) donde demostraron la presencia de transmisión vertical de CHIKV en este mosquito. No obstante *Aedes aegypti* es un vector competente para este virus y los estudios realizados son pocos. En la tabla 1.2 se muestran los estudios realizados de transmisión vertical de CHIKV en *Ae. aegypti*.

Como se puede ver en la tabla 1.2, los estudios realizados son de diversos tipos, por ejemplo, en el estudio realizado por Jain y colaboradores (2016) se muestrea durante 6 meses presentando en la tabla únicamente el MIR más bajo obtenido en Junio y el MIR más alto obtenido en Agosto. Chompoosri demuestra que el virus de CHIKV del linaje IOL en condiciones de laboratorio puede llegar hasta la generación 5 una vez que se infectó a una hembra. A pesar de que esto puede explicar la persistencia del virus en periodos intra-epidémicos quedan muchos aspectos que estudiar acerca de la transmisión vertical, en especial en el linaje asiático pues fue el que llegó a América y se desconoce la dinámica en vectores, los ciclos intra-epidémicos que puede llegar a presentar y como se puede mantener entre estos.

Tabla 2.2 MIR reportados previamente para transmisión vertical de CHIKV en *Ae aegypti*. En esta tabla se indica el estadio de los mosquitos, el linaje estudiado, el país en donde se realizó el estudio, el MIR obtenido y la referencia.

Estadio de mosquitos	País	Linaje estudiado	MIR o porcentaje	Fuente
Adultos (Capturados y crecidos de larvas colectadas en campo)	Nueva Delhi	Asiático	4.2 (Junio) a 33.3 (Agosto)	Jain et al 2016
Larvas y adultos (laboratorio)	Tailandia	IOL*	Larvas: F1-8.33 a F5-1.63 Adultos: F1-10 a F5-1.67	Chompoonsri et al 2016
Larvas y adultos (laboratorio)	India	ECSA**	Larvas: 28.2 Adultos: 20.2	Agarwal et al 2014
Adultos (colectados de campo)	India	ECSA**	Adultos machos:21%	Thavara et al 2009
Huevo y adulto (Laboratorio)	Malasia	CHIKV	Huevos:56.3% Adulto: 10%	Wong et al 2016

*IOL: Linaje del Océano Indico

**ECSA: Linaje del Este, Centro y Sur de África

3. Justificación

Existen múltiples estudios acerca de la dinámica de arbovirus en humanos, sin embargo, las características de los virus en sus vectores se encuentran poco estudiadas. La transmisión vertical es un mecanismo importante para la prevalencia de estos virus en la naturaleza, sin embargo la existencia de este mecanismo en ciertas poblaciones, las características de los virus y la dinámica que presentan durante este mecanismo son poco estudiados. Por ello este trabajo propone investigar los virus de Zika, Dengue y Chikungunya encontrados en larvas de *Ae. aegypti* de vida libre colectadas en México.

4. Hipótesis

Los virus Dengue, Zika y Chikungunya son transmitidos verticalmente en mosquitos *Aedes aegypti* y su carga viral es suficiente para ser aislados.

5. *Objetivos*

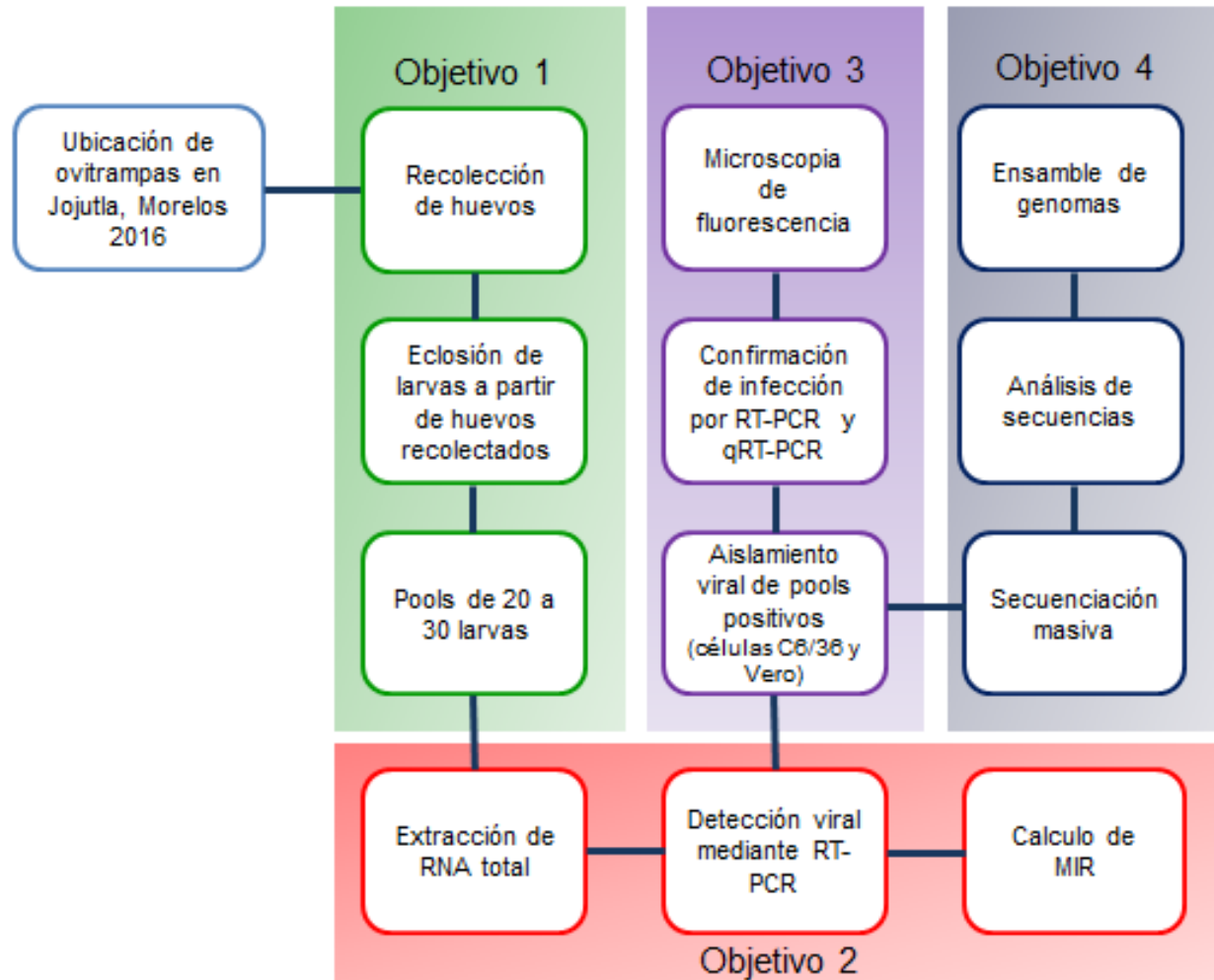
5.1 *Objetivo general*

Detectar y analizar los virus de Dengue, Zika y Chikungunya presentes en larvas de *Aedes aegypti* del estado de Morelos.

5.2 *Objetivos particulares*

- Colectar huevos de mosquitos *Aedes aegypti* del Estado de Morelos y obtener las larvas a partir de éstos.
- Detectar la presencia de virus de Dengue, Zika y Chikungunya en los pools de larvas.
- Obtener virus aislados de los pools positivos a Dengue, Zika o Chikungunya.
- Obtener el genoma completo de arbovirus a partir de los aislados virales.

6. *Estrategia experimental*



7. *Materiales y métodos*

7.1 *Recolección de huevos*

El estudio se realizó con larvas de mosquito *Aedes aegypti*, las cuales se obtuvieron en colaboración con el CENAPRECE (organismo del gobierno encargado del monitoreo de vectores), el cual incluye la colecta de huevos de mosquito. La recolección de los huevos se llevó a cabo mediante ovitrampas colocadas en Jojutla, Morelos siguiendo la Guía metodológica para la vigilancia entomológica con ovitrampas (Guía sustentada en los numerales 6.15.1, 6.15.2, 7.1.5, 7.5.1, 7.5.2 de la NOM-032-SSA2-2014).

Las ovitrampas consisten en un recipiente cilíndrico oscuro de un litro de capacidad que posee un orificio a 8cm de la base del recipiente a los que se les coloca por dentro pellón F-1600 previamente rotulado con fecha, número de ovitrampa, colonia o localidad y número de lectura (Figura 7.1). Una vez armadas las trampas se colocan entre plantas, alejadas de otros criaderos, en un lugar sombreado, fuera del alcance de niños y animales domésticos, hasta metro y medio de altura y evitando los rayos directos del sol.

Estas trampas se colocan una por cada lado de la manzana (en la medida que sea posible) en grupo de 4 a 6 manzanas, tomando como referencia los domicilios en donde hubo reportes previos de enfermedades transmitidas por mosquitos como lo son Dengue, Zika y Chikungunya en humanos. En la figura 7.2 se muestra el mapa con la distribución de las ovitramapas en Jojutla para el año 2016. Las ovitrampas se revisaron una vez por semana y se mantienen en el mismo sitio un año como mínimo. La revisión de estas trampas se realizó una vez por semana y consiste en la colecta de las papeletas en las cuales se cuenta el número de huevos en cada una de ellas, si el número de huevos es mayor a 100 se considera como una ovitrampa positiva.

Las papeletas positivas se almacenaron poniéndolas a secar durante uno o dos días a la sombra. Una vez secas las papeletas se guardaron en bolsas de papel

kraft debidamente etiquetadas. Aquellas papeletas negativas son inactivaron con cloro y se desecharon

7.2 Obtención de larvas

Las papeletas colectadas la semana del 19 de Junio del 2016 y la semana del 15 de noviembre del 2016 se colocaron en agua para lograr la eclosión de las larvas a una temperatura de 37° C por una semana con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Después de una semana las larvas se encontraban en estadio 2 o 3, en esa etapa fueron recolectadas y separadas en pools de 20 a 30. Los pools se colocaron en 600µl de medio de transporte viral el cual contiene albumina bovina 5%, penicilina –estreptomicina 50000U/50000µg, fungizona 250 µg/ml, bicarbonato de sodio 7.5% y solución de Hank. Las larvas fueron homogeneizadas utilizando un triturador de tejidos (Amersham) y fueron almacenadas a -80°C.

Algunas de las larvas obtenidas de las papeletas de la semana de Junio se dejaron crecer hasta adultos en las instalaciones del CENAPRECE en la Unidad de Monitoreo Entomológico de Jojutla. Una vez teniendo los adultos se separaron por sexo formando pools de 10 adultos de hembras o machos. Estos fueron colocados en 600µl de medio de transporte viral, al igual que las larvas fueron homogeneizadas y almacenadas a -80°C.

7.3 Extracción de RNA

El RNA total se obtuvo a partir de las muestras de 200µl de larvas maceradas, se les agregó una solución de lisis (Lysis/Binding Buffer Ambion) en un volumen 3:1, mezclando en el vortex durante 10 segundos y dejando a temperatura ambiente 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 4,500 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. A estos clarificados se les agregó etanol en una relación de volumen 1:1, se mezcló por pipeteo y se pasó a través de columnas Zymo-Spin (Zymo) a 8000 rpm durante 30 segundos; se realizaron dos lavados con 600 µl de buffer de lavado (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, etanol al 100%) y se centrifugaron a 8,000 rpm durante 1 minuto. Se eliminó el exceso de buffer de lavado centrifugando a 10,000 rpm durante 2 minutos y se eluyó con 35 µl de H₂O libre de nucleasas a 10,000 rpm durante 2 minutos. La concentración de cada una de las muestras se cuantificó por espectrofotometría utilizando el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se almacenaron a -70°C

7.4 Detección viral

Después de la extracción del RNA total se realizó la amplificación del fragmento ribosomal S7 de *Aedes* a fin de verificar la integridad del RNA. Después de observar la amplificación de dicho fragmento se prosiguió con las reacciones utilizando los iniciadores de detección para DENV, ZIKV y CHIKV.

La detección de los virus se realizó a partir de los extractos de RNA utilizando reacciones de RT-PCR punto final y tiempo real. Las reacciones RT-PCR de punto final se formaron a partir de RT-PCR Buffer (Ambion), 500ng de molde de RNA tratado con DNAasa, 0.2µM de iniciadores y 0.4µl de AgRT mezcla de polimerasa 25x teniendo como volumen final 10µl. Las condiciones de amplificación fueron 45°C 30min, 95°C 10min, 40 ciclos de 95°C 15seg, T_m60°C 30seg (esta varía dependiendo de los iniciadores utilizados) y 60°C 30seg, un ciclo de 60°C 3min. Los productos se resolvieron en geles de agarosa al 2%. Los

iniciadores utilizados para la detección de DENV, ZIKV y CHIKV se muestran en la Tabla 7.1. Todos los pools fueron analizados inicialmente con estos tres pares de iniciadores.

En el caso de ZIKV se realizó una RT-PCR tiempo real previamente reportada por Lanciotti y cols (2008) complementaria a la RT-PCR punto final debido a que presenta una mayor sensibilidad. La reacción se hizo usando RT-PCR Buffer 2x (Ambion), 500ng de molde de RNA tratado con DNAasa, 0.2µM de oligos, 250 µM de sonda y 0.4 µl 0.4µl de AgRT mezcla de polimerasa 25x teniendo como volumen final 10µl. Las condiciones de amplificación fueron 45°C 10 minutos, 95° 10 minutos, 50 ciclos de 95°C 15 segundos y 60°C 50 segundos.

La tasa mínima de infección en larvas y adultos por semana se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{MIR} = \frac{\text{\# pools positivos}}{\text{\# Mosquitos o larvas muestreadas}} \times 1000$$

En donde se toma el número de pools positivos se divide entre el número de larvas o mosquitos que se muestrearon, y el resultado obtenido se multiplica x 1000. El MIR obtenido fue posteriormente comparado con otros previamente registrados en la literatura.

Tabla 7.1 Iniciadores utilizados en el estudio. En la tabla se muestran los iniciadores forward (Fw) y reverso (Rv) utilizados para una amplificación del fragmento del genoma de *Ae aegypti*, DENV, ZIKV y CHIKV. También se muestra el nombre de la proteína y el tamaño del fragmento para cada caso

Organismo	Secuencia	Proteína	Fragmento
<i>Ae aegypti</i>	Fw: GGGACAAATCGGCCAGGCTATC Rv: TCGTGGACGCTTCTGCTTGTTG	Ribosomal S7	292 pb
Dengue	Fw: TAC AAC ATG ATG GGA AAG CGA GAG AA Rv: GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA	NS5	266pb
Zika	Fw: GAT TGC CCC GGC ATA CAG Rv: GGC TTC ACC TTG TGT TGG	E	240pb
Zika (tiempo real)	Fw: CCGCTGCCCAACACAAG Rv: CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT FAM: AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA	E	77pb
Chikungunya	Fw: GCACATGAAGTCCGACGC RV: GGCTGTACGGGCTCCTTC	C	211pb
Chikungunya (tiempo real)	Fw: AAAGGGCAAACCTCAGCTTCAC Rv: GCCTGGGCTCATCGTTATTC FAM: CGCTGTGATACAGTGGTTTCGTGTG	NSP1	87pb

7.5 *Aislamiento viral*

Los pools que resultaron positivos para cada uno de los virus y que presentaban una banda de amplificación más intensa en el gel de agarosa o menor Ct en el caso del tiempo real fueron los pools seleccionados para hacer el aislamiento viral. Se omitieron las muestras positivas a más de un virus. El pool de mosquitos se centrifugó a 14,000rpm durante 10 minutos a 4°C (dos veces) y el sobrenadante se pasó por un filtro de 0.2µm para posteriormente infectar a células C6/36. La infección se dejó durante 2hs, agitando cada 15 minutos. Al finalizar las 2hs se completó el volumen de la placa con medio MEM-EMEM con SFB 1%, penicilina-estreptomicina 1x y glutamina 1x.

Cada pase por células se mantuvo por 7 días y una alícuota del sobrenadante de las células infectadas se usó para llevar a cabo un nuevo pase y el resto se guardó a -80°C. Después del primer pase por células de mosquito C6/36 se hicieron infecciones en células Vero provenientes de riñón de mono verde.

Los sobrenadantes de cada pase se usaron también para la extracción de RNA total para verificar que el RNA virus correspondiente se encontraba presente en éstos, como una manera de determinar que las células estaban siendo infectadas. El método de amplificación para ZIKV como para CHIKV fue el RT-qPCR con los oligos de la tabla 7.1, mientras que para DENV se utilizaron los mismos iniciadores que se ocuparon para detección viral.

7.6 *Microscopia de fluorescencia*

En el caso del aislamiento del ZIKV se realizaron microscopias de fluorescencia a fin de confirmar la presencia de las partículas virales. Se colocaron laminillas en una caja de 24 pozos para cultivo celular y sobre éstas se sembraron células Vero. Las células se infectaron con los sobrenadantes del pase 2 por células Vero y se incubaron durante 72 horas, posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Una vez fijadas se permeabilizaron

con metanol durante 8 min a -20°C , seguido de dos lavados con PBS durante 5 min. Las células se bloquearon con suero fetal bovino (SFB) 10% durante 2 hs, y se lavaron con PBS/ 1% SFB por 5 min. A continuación se colocó el anticuerpo primario (monoclonal 4G2) a una concentración de 1:500, y se incubó a 4°C / ON. Antes de empezar con los siguientes lavados las laminillas se dejan una hora a temperatura ambiente continuando con 3 lavados por 5 min con PBS/ 1% SFB. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón AF-488 en una dilución 1:300 durante 1 hr a temperatura ambiente cubierto de la luz. Por último se hicieron 5 lavados de 5 min cada uno, los primeros cuatro con PBS / 1% SFB y el último con PBS solo. Las laminillas se montaron con Dapi-Vectashield sobre porta-objetos limpios y se almacenan a 4°C en oscuridad hasta su observación en un microscopio confocal.

7.7 Ensayo de titulación viral por placas líticas

La titulación del ZIKV por placas líticas se llevó a cabo en placas de 24 pozos sembradas con células Vero, las cuales se infectaron con el virus en diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Después de dos horas de infección, agitando la placa cada 15 minutos, se les coloca carboximetil celulosa al 2% en medio DMEM, con SFB al 1%, penicilina-estreptomicina ($50\mu\text{g}$) y de glutamina (2mM). Después de 5 días se retira la carboximetil-celulosa, y se lavan los pozos con PBS para posteriormente teñir las células viables con 500 μl de cristal violeta-paraformaldehído. Las unidades formadoras de placas (pfu/ml) se calculan tomando en cuenta el número de placas líticas que produce una determinada dilución de la muestra y haciendo las correcciones necesarias para llegar a la cantidad de virus en la muestra original.

7.8 Filogenia

A fin de confirmar la identidad de los virus aislados y conocer su relación con virus previamente reportados se diseñaron iniciadores específicos para la región codificante de la proteína E de ZIKV (Tabla 7.2), de esta manera se amplificó la proteína E en dos partes.

Los fragmentos fueron amplificados mediante RT-PCR de punto final a partir de RT-PCR Buffer 2X (Ambion), 500ng de molde de RNA, 0.2 μ M de oligos y 0.4 μ l de AgRT mezcla de polimerasa 25x teniendo como volumen final 10 μ l. Las condiciones de amplificación fueron 45°C 30min, 95°C 10min, 40 ciclos de 95°C 15s, Tm58°C 1 min y 60°C 30s, con un último ciclo de 60°C 3min. Los productos se resolvieron en geles de agarosa al 1% y los amplicones del tamaño esperado se cortaron del gel. Dichos fragmentos fueron purificados mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, siguiendo el protocolo indicado. Una vez teniendo los productos de PCR purificados estos fueron enviados a Macrogen donde fueron secuenciados por el método Sanger.

Las secuencias resultantes se utilizaron para hacer un alineamiento en Blast contra la secuencia reportada de ZIKV aislada de *Aedes aegypti* en Chiapas (KY648934) a fin de comprobar la identidad de las secuencias. Mediante el programa AliView se unieron la secuencia forward con la secuencia reverse.

Mediante el programa *muscle* (Galtier et al 1996) se alinearon las secuencias de este estudio con secuencias previamente reportadas para humano y mosquito (número de acceso especificados en el Apéndice 1), tomando únicamente el fragmento codificante de la proteína E de todas las secuencias. Se seleccionaron 9 secuencias del linaje africano y 34 secuencias del linaje asiático, contemplando aquellas reportadas en diferentes países (Uganda, Republica Central de Africa, Nigeria, Senegal, Polinesia Francesa, Brasil, Honduras, México y Colombia) y tanto en humanos como en mosquitos. Utilizando el método de máxima verosimilitud (100 réplicas de bootstrap) se obtuvo un árbol filogenético.

Tabla 7.2 Iniciadores utilizados para secuenciación. La tabla muestra los iniciadores forward (Fw) y reverso (Rv) utilizados para la amplificación de los fragmentos de la proteína E del genoma de ZIKV así como el tamaño de fragmento.

Virus	Secuencia	Posición en E	Fragmento
Zika E 5'	Fw: GCT TGG CTT TTG GGA AGC TC Rv: TTG GCA TGT GCG TCC TTG AAC	874 1703	830pb
Zika E 3'	Fw: CTC CAC ACT GGA ACA ACA AAG AAG C Rv: CTT CTT TGA GAA GTC CAC CGA GCA	1649 2496	848pb

7.9 Secuenciación masiva

7.9.1 Preparación de la muestra

Los aislados de muestras en donde se observó un mayor efecto citopático y que se confirmó el aislado como positivo al virus correspondiente mediante RT-PCR se procesaron para realizar secuenciación masiva. Los extractos totales de RNA de dichas muestras se sometieron a un proceso de depleción de RNAr. El procedimiento se realizó utilizando 2µg de RNA y se llevó a un volumen total de 12 µl con agua libre de nucleasas. Se empleó el kit NEBNext rRNA Depletion Kit (Human/Mous/Rat) (New England, Biolabs, MA, USA) siguiendo las indicaciones del proveedor. El RNA se hibridizó para después hacer la digestión con RNasa (2 µl) incubando a 37°C por 30 min. Luego se realizó la digestión con DNasa (2.5 µl) bajo las mismas condiciones que la digestión anterior para posteriormente purificar el RNA siguiendo el procedimiento previamente mencionado utilizando las columnas Zymo-Spin (Zymo)

7.9.2 Secuenciación masiva

Las muestras tratadas para eliminación de los RNA ribosomales fueron analizadas en la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática (USMB) del Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM. Previo a la secuenciación las moléculas de RNA son separadas por tamaño mediante electroforesis microcapilar (Agilent 2100 Bioanalyzer). Con estos datos se determina el RIN (*RNA Integrity Number*) por medio del cual se puede ver el grado de degradación de las muestras de RNA en función de la presencia de RNAr 28S y 18S. Se construyeron bibliotecas genómicas con insertos de 85 a 315pb y adaptadores que en promedio poseían un tamaño de 135pb. La secuenciación masiva RNAseq (Shotgun) se llevó a cabo empleando un sistema MiSeq (*Illumina*) *paired end*. Esta tecnología integra los pasos de generación de *clusters*, amplificación, secuenciación y análisis de datos en un solo instrumento.

7.9.3 Procesamiento de secuencias

Las secuencias resultantes se analizaron en la plataforma de Galaxy a fin de determinar su calidad. Mediante la herramienta FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) se obtuvieron los siguientes datos de las secuencias obtenidas: calidad de las lecturas por base, el contenido de GCs, la distribución de los largos de lecturas, el contenido de adaptadores, entre otros aspectos. Enseguida se utilizó la herramienta Trimmomatic (Bolger et al, 2014) con los parámetros pre-determinados de esta herramienta la cual elimina aquellas bases al principio o final de las lecturas que posean una mala calidad. El análisis metagenómico de las secuencias se llevó a cabo mediante la herramienta Kraken (Wood and Salzberg 2014), la cual realiza un mapeo de k-meros en su biblioteca genómica. Mediante la herramienta de Krona pie (Cuccuru et al 2014) se visualizaron los resultados, que muestra el porcentaje de secuencias que se alinean con un grupo taxonómico de virus.

7.9.4 Ensamble de genomas de novo

Una vez que conocíamos a que grupos taxonómicos pertenecían las secuencias con las que trabajamos se emplearon dos métodos para ensamblar los genomas *de novo*. En el primero, se utilizó la herramienta de Trinity (Grabherr et al, 2011) en la plataforma de Galaxy; debido a que el 98% de las secuencias de una de las muestras correspondían al mismo virus. La herramienta de Trinity (Grabherr et al, 2011) no utiliza un genoma de referencia para el ensamble *de novo*, en su lugar usa las partes sobrelapadas de los fragmentos para ir armando *contigs*. Este ensamblador utiliza secuencias de RNA ya que está diseñado para ensamblar transcritos *de novo*; combina tres softwares independientes: Inchworm, Chrysalis y Butterfly en un solo paso. Inchworm ensambla un solo *contig* con las secuencias de RNA que posee, reportando también los transcritos alternos, posteriormente Chrysalis toma los resultados de Inchworm y arma graficas de Brujin para cada uno de los clusters reportados y divide la secuencia entre las diferentes graficas; Butterfly procesa estas graficas individuales de forma paralela, traza un camino en donde las lecturas se van uniendo en una sola grafica para reportar un solo

transcrito (Haass B., 2017). Para el uso de Trinity se utilizaron los parámetros pre-determinados señalando que se tenían secuencias pareadas.

El segundo método utilizado para el ensamble de genomas *de novo* fue aplicado a un pool que presentaba secuencias de varios organismos. Para este procedimiento lo primero que se hizo fue un mapeo, para esto se creó un índice de secuencias mayores a 500pb correspondientes a la familia flaviviridae que fueron obtenidas de Virus Pathogens Resources (<https://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=vipr>). Una vez teniendo el índice se realizó un reclutamiento de fragmentos mediante el software SMALT (Ponsting H. <http://www.sanger.ac.uk/science/tools>), de esta forma únicamente se reclutaron a las lecturas que presentaran una identidad de al menos 60% con las secuencias del índice de flaviviridae; para esto los *k*-meros llamados fueron de 13 nucleótidos de longitud empezando cada 4 nucleótidos. Luego se realizó un ensamble de genoma *de novo* empleando el software Velvet 1.2.10 (Zerbino and Birney, 2008) en donde se probaron diferentes tamaños de *k*-meros hasta obtener un solo *contig* de una longitud de aproximadamente 10000 pb. Los siguientes comandos se emplearon para los procedimientos descritos arriba:

Crear el índice para la base de datos:

```
smalt index -k 13 -s 4 flavivirus_index  
PATH/sequence_flaviviridae.fasta
```

Mapear los reads de cada muestra contra el índice de la base de datos:

```
smalt map -f samsoft -o P53.sam -y 0.6 -i 320 -j 80 -l pe  
flavivirus_index PATH/Pool53_R1.fastq PATH/Pool53_R2.fastq
```

Convertir a formato fastaq los *reads* que hicieron *match*:

Secuencias Forward

```
cut -f 1,2,10,11 P53.sam | awk '$2==83||$2==99' | cut -f 1,3,4  
| awk '{print $1"\n"$2"\n"+" "\n"3}' | sed -e  
"s/NS500/@NS500/g" > P53_match_flavi_F.fastq
```

Secuencias Reverse

```
cut -f 1,2,10,11 P53.sam | awk '$2==147||$2==163'| cut -f 1,3,4 |awk '{print $1"\n"$2"\n"+" "\n"3}' | sed -e "s/NS500/@NS500/g" > P53_match_flavi_R.fastq
```

Ensamble de genoma *de novo*

```
velveth ensamble17/ 17 -fastq -separate -shortPaired P53_match_flavi_F.fastq P53_match_flavi_R.fastq
```

```
velvetg ensamble/ -cov_cutoff auto -exp_cov auto
```

Finalmente, la identidad de los genomas ensamblados *de novo*, independientemente del método utilizado, fue comprobada mediante la herramienta Blastx (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

7.9.5 Análisis de variación de secuencias

Los genomas ensamblados se usaron para realizar un análisis de polimorfismos con respecto a genomas previamente reportados. El análisis fue realizado en la plataforma de Virus Pathogen Resources usando la herramienta de *Sequence Variation Analysis* (<https://www.viprbrc.org/brc/snpAnalysis.spg?method=ShowCleanInputPage&deco rator=flavi>) y visualizado en el software *Seaview*.

Las secuencias que se incluyeron para llevar a cabo este análisis fueron secuencias de genomas completos previamente reportados de aislados tanto de humano como de mosquitos. Las 15 secuencias incluidas fueron 2 de México, 1 de Haití y 1 de EUA aislados de mosquito; 3 de México, 2 de EUA, 1 de Nicaragua, 2 de Brasil, 1 de Haití, 1 de Colombia y 1 de Guatemala provenientes de aislados de humanos; todas pertenecientes al linaje asiático (Tabla 7.3)

Tabla 7.3 Genomas incluidos en el análisis de variación de secuencias. En la tabla se muestra el organismo del cual se aislaron los virus, el país donde se aislaron y el número de acceso en el NCBI.

Organismo	País	Número de acceso
Mosquito	Haití	MF384325.1
Aedes sp	México	KX446951.2
Ae. Aegypti	México	KY648934.1
Ae. Aegypti	Estados Unidos de América	KY014323.2
H. Sapiens	Estados Unidos de América	KY328289.1
H. Sapiens	Estados Unidos de América	KX827268.1
H. sapiens	Nicaragua	MF434517.1
H. Sapiens	Brasil	KU926309.2
H. Sapiens	Brasil	KX197192.1
H. Sapiens	Haití	KU509998.3
H. sapiens	México	MF801413.1
H. Sapiens	México	MF801402.1
H. Sapiens	México	MF801418.1
H. Sapiens	Colombia	KX087102.2
H. Sapiens	Guatemala	MF801378.1

8 Resultados

8.1 Obtención de pools de larvas y extractos de RNA total

La primera parte del presente trabajo tuvo como objetivo la obtención de pools de larvas a partir de las papeletas que contenían a los huevos de mosquito *Ae. Aegypti*. Se obtuvieron 105 pools de larvas de la colecta del mes de junio y 46 pools de larvas de las papeletas correspondientes al mes de noviembre de 2016. Además se obtuvieron mosquitos adultos, 6 pools de hembras y 5 pools de machos, todos correspondientes a huevos colectados el mes de junio. Se tuvieron un total de 162 pools para su análisis.

Los pools se procesaron a fin de obtener extractos de RNA total, la concentración de estos extractos osciló entre los 100 y 200 ng/ μ l. A partir del RNA extraído de los pools de larvas y mosquitos se amplificó el RNA ribosomal S7 de *Aedes aegypti* a fin de corroborar que la calidad del RNA obtenido permitía la amplificación de un RNA constitutivo en este tipo de muestras (Figura 8.1). Los pools que no amplificaron esta unidad fueron descartados, quedándonos así con un total de 157 pools por analizar.

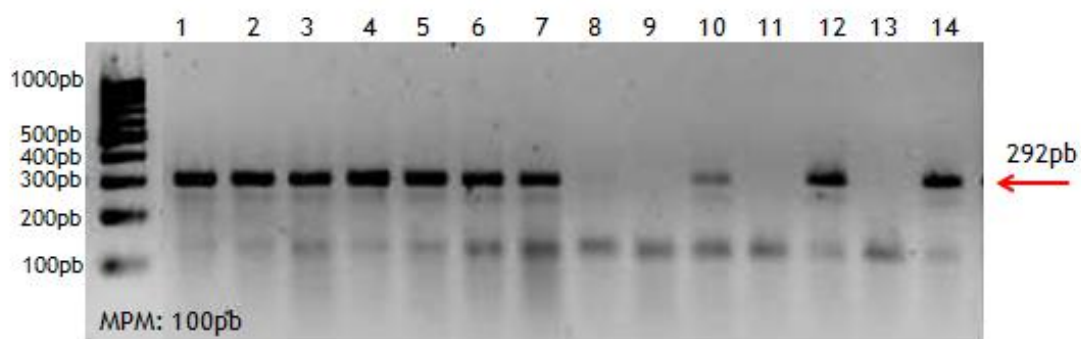


Figura 8.1 Amplificación de fragmentos de la unidad ribosomal S7 de *Aedes aegypti*. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 100pb. La flecha indica el fragmento de 292pb de la unidad ribosomal S7 de *Aedes aegypti*.

8.2 Detección de DENV, ZIKV y CHIKV

Los extractos de RNA total se utilizaron para llevar a cabo la detección del genoma viral de DENV, ZIKV y CHIKV mediante la técnica de RT-PCR de punto final utilizando los iniciadores mostrados en la tabla 7.1, los cuales han sido previamente reportados para la detección de cada uno de estos virus (Chien et al, 2006; Lanciotti et al 2008). Los iniciadores de DENV amplifican un fragmento de 266pb de la región que codifica para la proteína NS5. En la figura 8.2 se muestra una imagen representativa conteniendo algunos de los pools positivos para DENV.,

En el caso de la detección de ZIKV el fragmento de 240pb corresponde a la región codificante de la proteína E, en la figura 8.3 se presenta una imagen representativa de algunos de los pools positivos para la detección del virus ZIKV en la técnica de RT-PCR de punto final. En este caso se decidió implementar la técnica de RT-PCR en tiempo real descrita por Lanciotti y colaboradores (2008) en la que además de los iniciadores utilizan una sonda TaqMan lo cual nos da una confirmación de los resultados obtenidos en el procedimiento de amplificación en punto final para la detección de este virus. En este caso se tomaron como pools positivos a ZIKV sólo las muestras que tuvieran una Ct menor a 36 como el límite de detección a fin de descartar falsos positivos. Utilizando la técnica de RT-PCR tiempo real se confirmó la presencia del virus en el 50% de las muestras que inicialmente habían sido positivas en la técnica de punto final (14 muestras de 28)

La detección del genoma de CHIKV en los pools se llevó a cabo mediante RT-PCR de punto final usando un par de iniciadores que generan un fragmento de 211pb correspondiente a la región codificante de proteína E1.

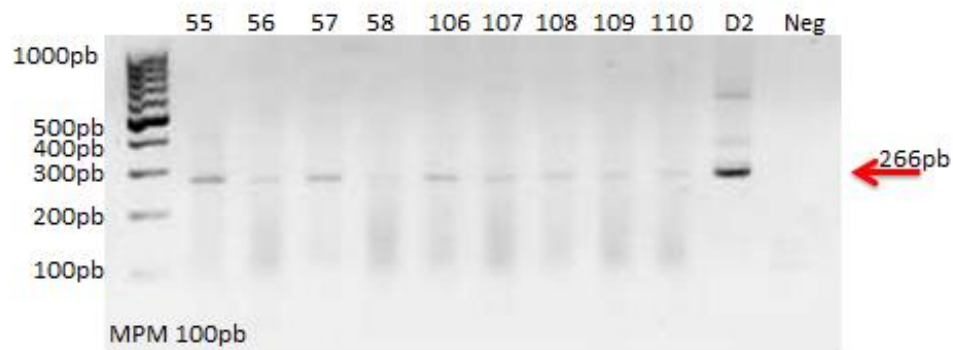


Figura 8.2 Amplificación de fragmento de la proteína NS5 de DENV. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 100pb. La flecha indica el fragmento de 266pb de la proteína NS5 del genoma de DENV.

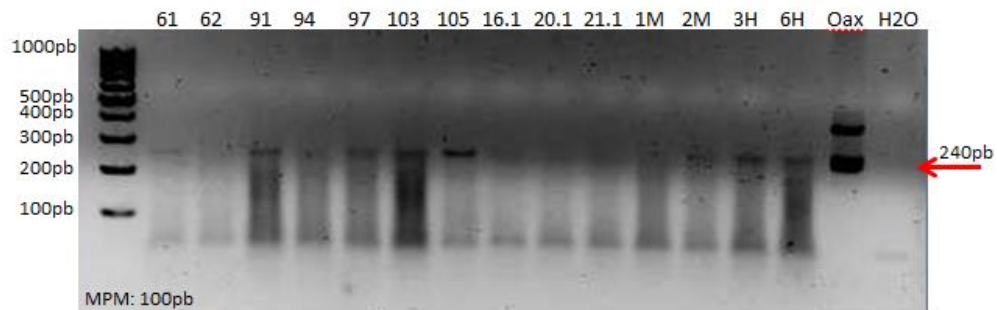


Figura 8.3 Obtención de fragmentos amplificados de la proteína E de ZIKV. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 100pb. La flecha indica el fragmento de 240pb de la proteína E del genoma de ZIKV.

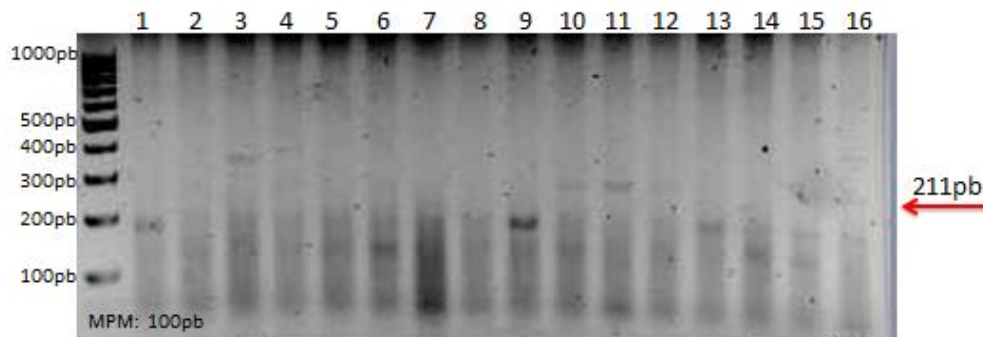


Figura 8.4 Obtención de fragmentos amplificados de la proteína C de CHIKV. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 100pb. La flecha indica el fragmento de 211pb de la proteína C del genoma de CHIKV

Los resultados de la detección de los tres virus en el total de pools de larvas y mosquitos adultos analizados en este estudio se muestran en la tabla 8.1. Se puede observar que se obtuvieron un total de 30 pools de larvas, dos pools de machos y tres pools de hembras positivos para DENV de la colecta del mes de junio y 22 pools de las larvas colectadas el mes de noviembre de 2016,; en el caso de ZIKV, el genoma de este virus se detectó en 7 pools de larvas, un pool de machos y dos de hembras de la colecta de junio y 8 de larvas de la colecta de noviembre. Por último los resultados para la detección del genoma de CHIKV nos indican que se tuvieron 5 pools de larvas y un pool de machos positivos en la colecta de junio así como un pool de larvas en la colecta de noviembre, siendo este virus el que se detectó en un menor número de pools.

Después de obtener los resultados de detección de los tres virus en los pools analizados se procedió a calcular la tasa mínima de infección (MIR). El MIR fue calculado para las dos semanas de colecta debido a la evidencia que se tiene de que esta tasa varía dependiendo del mes de colecta (Jain et al 2016). En este caso como se esperaba por los resultados descritos en el párrafo anterior el MIR más alto fue para DENV seguido por ZIKV y finalmente está el de CHIKV (Tabla 8.2).

Es importante mencionar que el MIR nos dice en general la proporción de larvas o mosquitos de la población que están infectados con el virus, es decir nos da el número de individuos infectados por cada mil muestreados, por lo que nuestros resultados indican que existe un mayor número de larvas portando DENV, seguido de ZIKV. A pesar de que CHIKV tiene un MIR bajo, esto no indica una falta de transmisión vertical ya que el MIR puede fluctuar entre los diferentes meses del año (Jain et al 2016).

Tabla 8.1 Resumen de los resultados de la detección de DENV, ZIKV y CHIKV por RT-PCR. Se muestra el número de pool en el que se detectó la presencia de alguno de los virus. Los pools que se identifican también con letra corresponden a adultos, la H indicando hembras y la M machos.

Virus	Pools positivos	Pools positivos
	Junio	Noviembre
Dengue	2, 8, 11, 12, 14, 15, 27,28, 30, 37, 39, 55, 57, 61, 67, 73, 74, 76, 77, 78, 88, 90, 92, 100, 106, 107, 108, 109, 110, 3M, 5M, 1H, 2H y 4H	1, 3, 4, 5,10, 14, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 33, 34, 35, 36, 38, 44, 45,
Zika	20, 51, 53,91, 103,105, 1M, 3H y 6H	2, 9, 15, 16, 20, 21, 31, 37
Chikungunya	4, 12, 20, 24, 51 y 2M	16

Tabla 8.2 Tasa mínima de infección (MIR) de cada virus analizado

Virus	MIR	
	Junio	Noviembre
DENV	11.42	19.13
	45.4 (adultos)	
ZIKV	2.6	6.95
	27.2 (adultos)	
CHIKV	1.9	0.86
	9.0 (adultos)	

8.3 Aislamiento de DENV, ZIKV y CHIKV

Los resultados anteriores nos indican la presencia de los tres virus en los pools de larvas analizados, por lo que se realizó el aislamiento viral con la finalidad de determinar que además de que los pools obtenidos contenían el RNA de cada uno de los virus también contenían partículas virales infecciosas o viables lo cual nos sugeriría fuertemente la capacidad de dichos virus de transmitirse verticalmente en los mosquitos silvestres. El criterio de selección de los pools para llevar a cabo el aislamiento viral fue utilizar los que presentaban una mayor intensidad en la banda amplificada en el procedimiento de RT-PCR y se excluyeron los pools positivos para más de un virus.

Los ensayos para el aislamiento se llevaron a cabo en dos de las líneas celulares señaladas como altamente susceptibles a la infección por estos virus, C6/36 (provenientes de larvas de *Ae albopictus*) y Vero (provenientes de riñón de mono verde africano). Los extractos totales de larvas se inocularon primeramente en células C6/36 y después de 7 días de infección, el sobrenadante resultante se tomó para infectar células vero o continuar la infección en otro cultivo de células C6/36. Este procedimiento en general permite aumentar el título viral. Así se procedió a llevar a cabo cuatro pases como máximo en células C6/36 y cuatro pases en células Vero.

Tabla 8.3 Número de pools procesados para el aislamiento viral y aislamientos exitosos.

Virus	Número de pools procesados para aislamiento	Número de pools que se logró el aislamiento viral
DENV	11	2
ZIKV	11	4
CHIKV	7	2

8.3.1 Aislamiento de DENV

Los ensayos para el aislamiento de DENV se llevaron a cabo partiendo de 11 de los pools positivos a este virus y su aislamiento se logró a partir del pool 5 y 99 de larvas eclosionadas en el mes de junio. Los cultivos de células C6/36 infectadas con estos pools presentaron una disminución en la población de células; por otro lado el efecto citopático que se presenta en las células Vero por la infección con dichos pools es redondeamiento por muerte celular así como desprendimiento celular lo que permite observar huecos en la monocapa. Cabe mencionar que el efecto citopático de este virus fue mayor en células de mamífero, como se puede observar en la Figura 8.5.

Para monitorear el proceso de aislamiento se llevó a cabo la detección de RNA viral en el sobrenadante de cada pase de la infección como se describe en la sección de Métodos. En la figura 8.6 se muestra la amplificación del fragmento deseado tanto en los sobrenadantes del pase 2 en células C6/36 y el pase 2 en células Vero de los cultivos inoculados con el pool 5 y 99 de larvas.

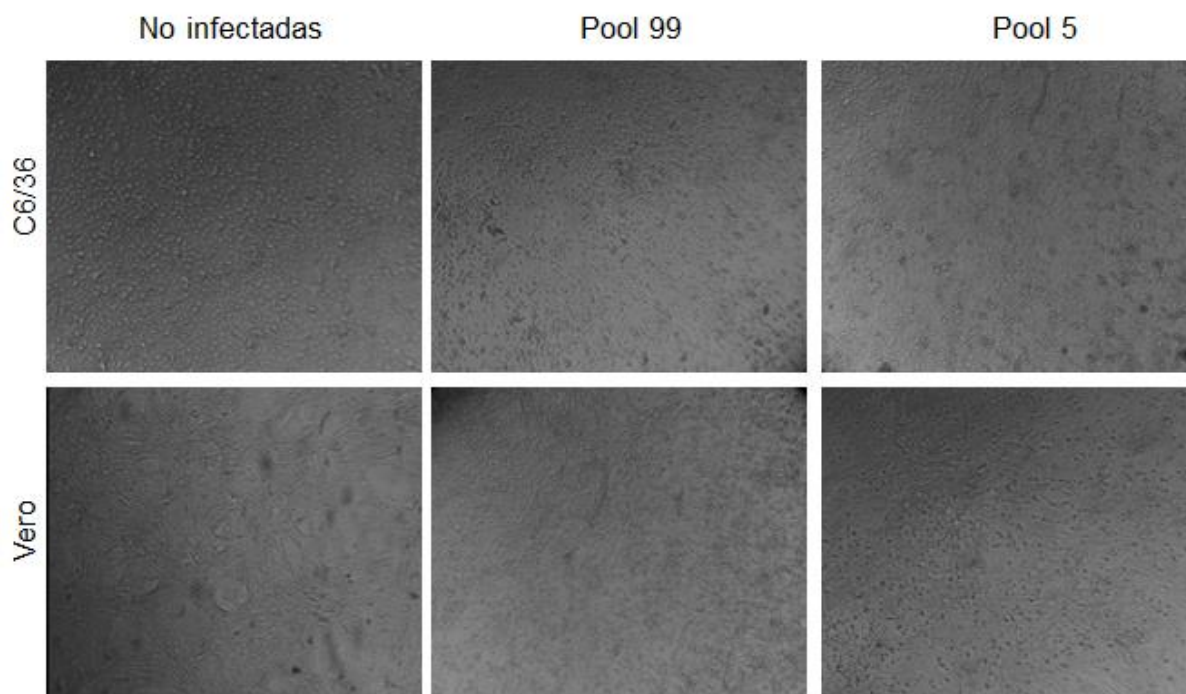


Figura 8.5 Aislamiento de DENV en células C6/36 y Vero a partir de los pools 5 y 99. En las imágenes se muestra el pase 2 de la infección en células C6/36 y Vero con los virus obtenidos del pool 99 y pool 5 así como el control de células no infectadas. Las fotos fueron tomadas 7 dpi. Aumento 20X

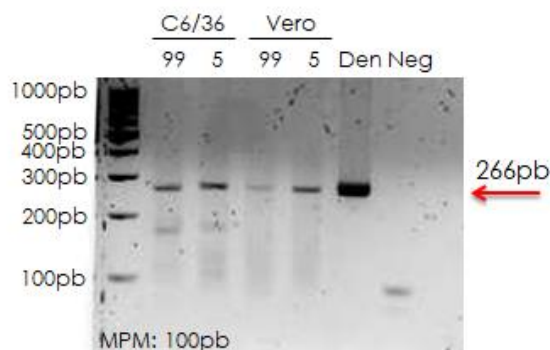


Figura 8.6 Amplificación de la región NS5 de DENV a partir de RNA obtenido de aislados. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular de 100pb. La flecha indica el fragmento de 266pb de la proteína NS5 del genoma de DENV. El RNA obtenido corresponde al segundo pase de los aislados virales.

8.3.2 Aislamiento de CHIKV

Los ensayos para el aislamiento de CHIKV se hicieron a partir de los 7 pools positivos y siguiendo el procedimiento indicado para DENV se logró el aislamiento a partir de los pools 4 y 20 provenientes de larvas colectadas el mes de junio. En este caso los aislados en células C6/36 mostraron poco efecto citopático, pero se observó una inhibición en el crecimiento de la monocapa ya que las células se infectan entre un 70 y 80% de confluencia, pero en este caso se veía muy poca proliferación celular al paso del tiempo. En las infecciones de las células Vero se observó redondeamiento celular y el desprendimiento de la monocapa (figura 8.7). El efecto citopático de este virus se empieza a observar a los 3 días después de la infección.

La confirmación del aislamiento se llevó a cabo mediante la detección del genoma viral en los sobrenadantes de las infecciones en células C6/36 y Vero mediante RT-PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan con los iniciadores y sonda previamente descritos por Lanciotti y colaboradores (2007): En la tabla 8.4 se muestran los resultados obtenidos de los ensayos de RT-PCR en tiempo real en el pase 2. Estos resultados nos indican que CHIKV también puede transmitirse verticalmente en mosquitos *Ae aegypti* de vida libre.

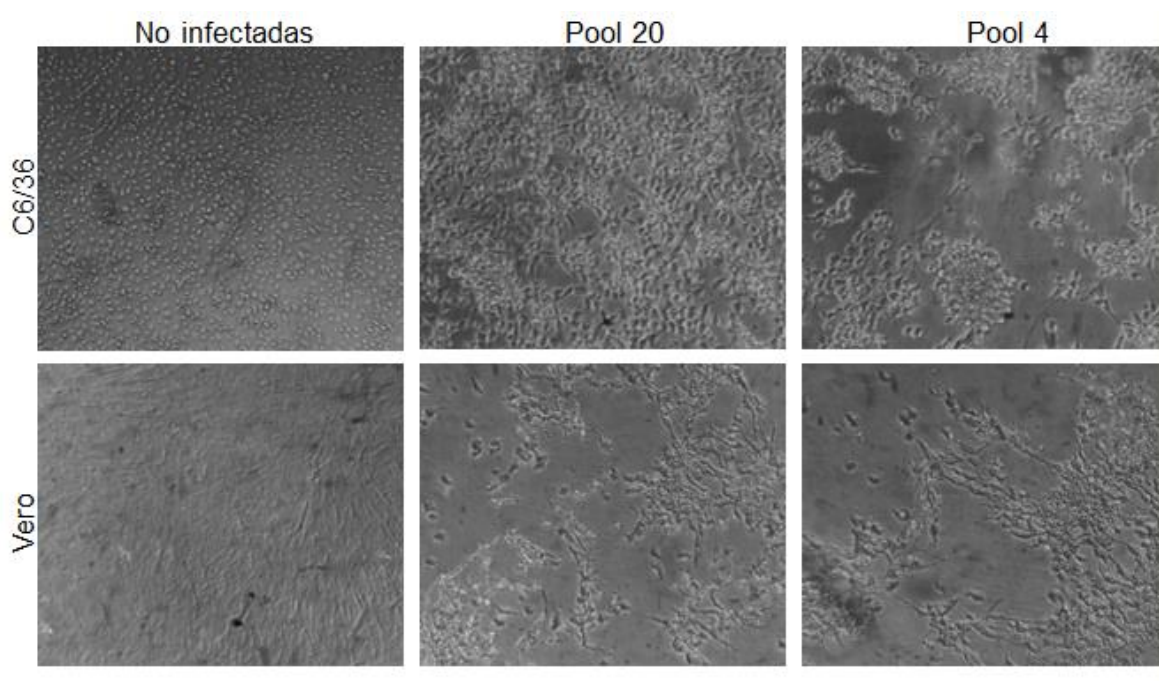


Figura 8.7 Aislamiento de CHIKV en células C6/36 y Vero a partir de los pools 4 y 20. En las imágenes se muestra el pase 2 de la infección en células C6736 y Vero de virus obtenidos del pool 20 y pool 4 así como el control de células no infectadas. Las fotos fueron tomadas 3 dpi. Aumento 20X

Tabla 8.4 Ct de aislados de CHIKV. Ct obtenidas en el qRT-PCR utilizando el RNA extraído de aislados de células Vero.

Muestra	Ct
Pool 4	14
Pool 20	22

8.3.3 Aislamiento de ZIKV

El aislamiento de ZIKV se realizó a partir de 11 pools de larvas positivos por RT-PCR para este virus y se logró el aislamiento a partir de los pools 2, 21, 31 y 37, todos ellos pertenecientes a larvas provenientes de las papeletas colectadas en noviembre. En la figura 8.8 se muestran las imágenes de los aislados provenientes de los pools 31 y 37. Como se puede observar el efecto citopático en las células C6/36 difiere entre estos dos pools, mientras que en el pool 31 se puede ver el desprendimiento de la monocapa, en el pool 37 podemos ver la formación de sincitios. En el caso del aislamiento en células Vero el efecto citopático de la infección fue el redondeamiento celular y el desprendimiento de la monocapa. Los sobrenadantes de las células infectadas se utilizaron para extraer el RNA total y determinar mediante RT-PCR en tiempo real la presencia del genoma viral en dichos sobrenadante lo que indicaba que las células estaban siendo infectadas con ZIKV viable (Tabla 8.5).

El aislamiento de ZIKV de 4 de los 11 pools probados es de suma importancia debido a que es el primer registro de aislado de partículas virales infecciosas a partir de larvas obtenidas de huevos colectados en campo. Al ser el primer registro sugiere que ZIKV puede mantenerse en la naturaleza también por transmisión vertical en esta población de mosquitos del Estado de Morelos. Debido a que este es el primer registro decidimos llevar a cabo más experimentos que confirmen dicho hallazgo.

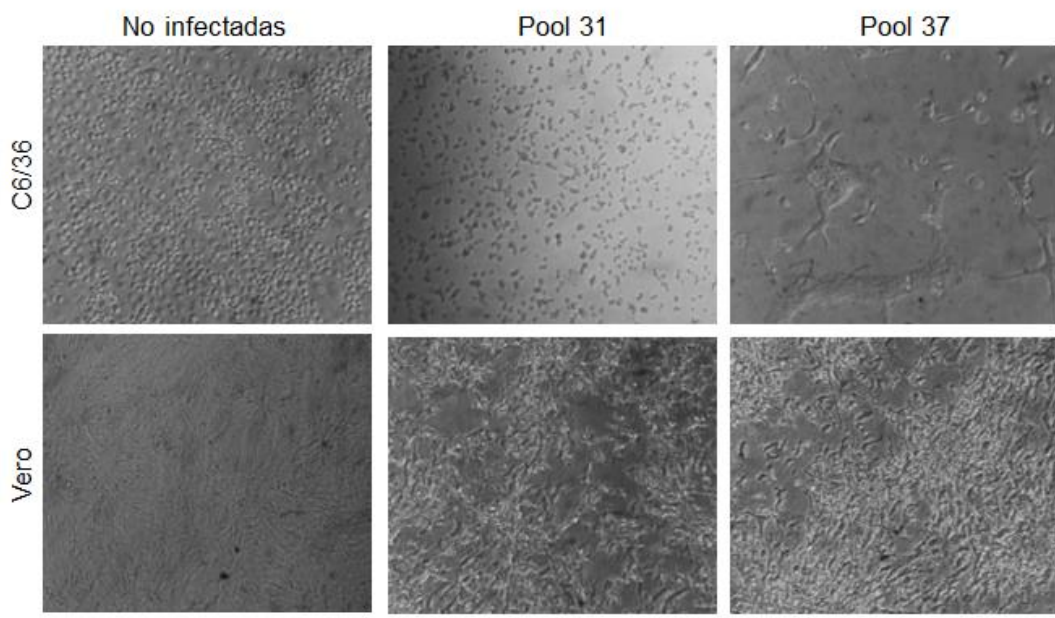


Figura 8.8 Aislamiento de ZIKV en células C6/36 y Vero a partir de los pools 31 y 37. En las imágenes se muestra el pase 2 de la infección en células C6/36 y Vero de los virus obtenidos del pool 31 y 37 así como el control de células no infectadas. Las fotos fueron tomadas 7 dpi. Aumento 20X.

Tabla 8.5 Ct de aislados de ZIKV. Ct obtenidas en el qRT-PCR utilizando el RNA extraído de aislados de células Vero. Se utilizó el aislado de Oaxaca como control positivo.

Muestra	Ct
2	25.49
21	24.97
31	23.73
37	22.3
Oax	23

8.3.4 Aislamiento de virus específicos de mosquito

Los ensayos para el aislamiento de ZIKV se llevaron a cabo a partir de las 11 muestras positivas para la detección de este virus por RT-PCR, sin embargo en los cultivos de células C6/36 inoculadas con el extracto de larvas correspondiente al pool 53 se obtuvo un efecto citopático inusual para este virus debido a que se presentó la formación de grandes sincitios a las 48 horas post-infección (Figura 8.9), sin embargo dicho efecto no se presentaba en los pases en células de mamífero. Por lo tanto, al tratarse de un efecto atípico de este virus se decidió enviar el RNA que se extrajo del sobrenadante del cultivo para la secuenciación masiva.

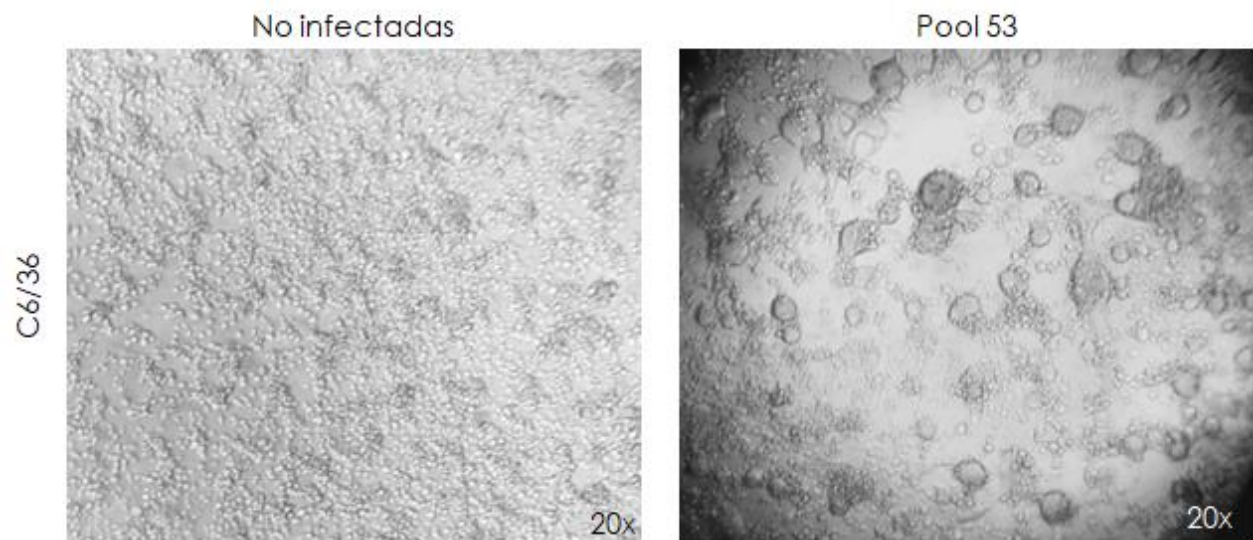


Figura 8.9 Aislamiento de CFAV a partir de extracto de larvas. Imagen que muestra el virus aislado a partir del pool 53 en células C6/36 en el pase dos a los tres días post infección y en la imagen de la izquierda se muestra el control de células no infectadas. Aumento 20x

8.4 Inmunofluorescencia para la detección de proteínas de ZIKV en aislamientos

Otra de las maneras en que se confirma un aislamiento es mediante la detección de las proteínas virales en las células infectadas, por lo que se llevó a cabo el ensayo de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo monoclonal 4G2 el cual es capaz de detectar la proteína E.

La inmunofluorescencia indirecta se llevó a cabo con las células Vero infectadas con los cuatro pools positivos para el aislamiento de ZIKV por RT-PCR, de éstas los aislamientos de los pools 31 y 37 fueron los que mostraron una mayor intensidad de fluorescencia en la detección de las proteínas virales (figura 8.10). La detección de esta proteína se observa principalmente en el área perinuclear, como era de esperarse de acuerdo con lo observado en otros aislados de ZIKV. Estos resultados nos confirman el aislamiento de ZIKV a partir de transmisión vertical en *Ae aegypti* empleando ahora un método que detecta a las proteínas de este virus en los cultivos inoculados con los extractos de larvas.

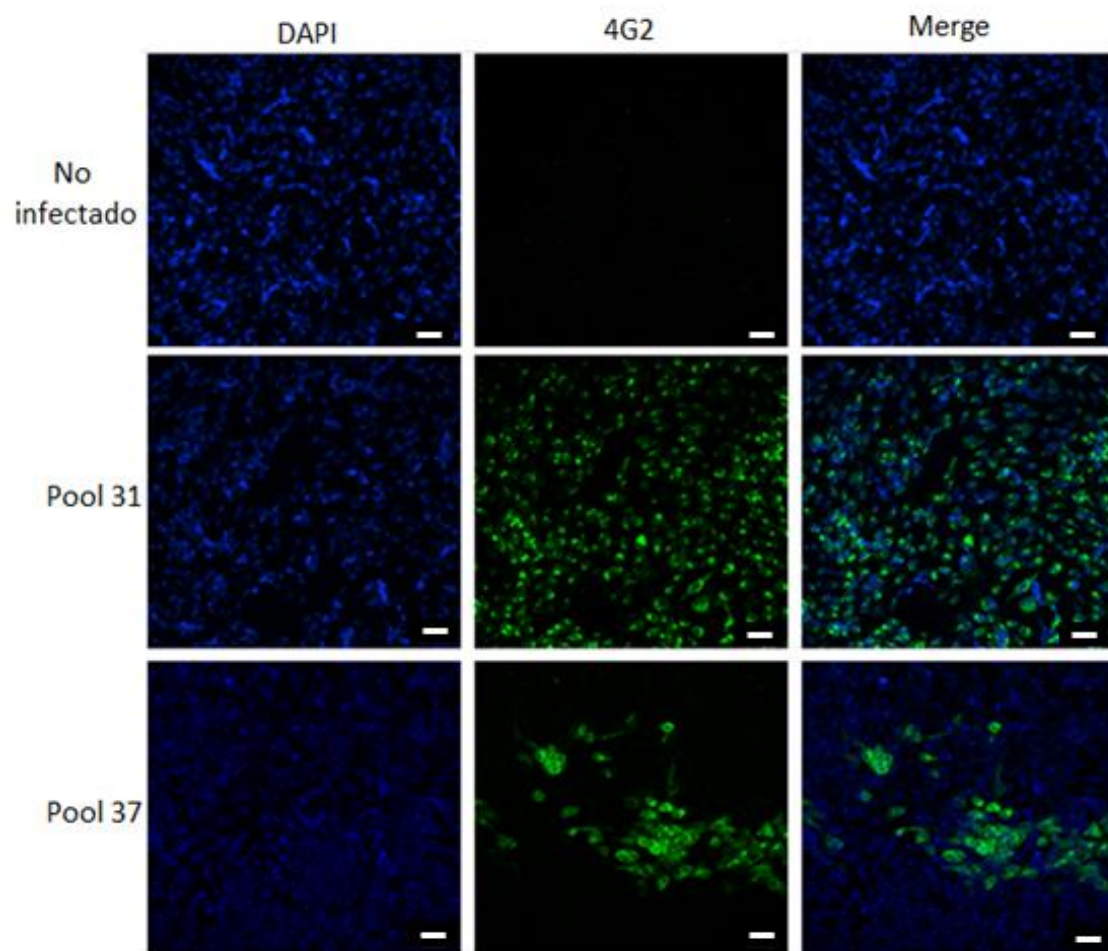


Figura 8.10 Inmunodetección de la proteína E de ZIKV en células Vero infectadas con los virus de los pools 31 y 37. Las células Vero infectadas durante 72 horas con ZIKV proveniente de los pools 31 y 37. Anticuerpo monoclonal 4G2 teñido con Alexa 488. Merge: empalme de DAPI y Alexa 488, las células se visualizaron en microscopio confocal. La barra en las imágenes representa un tamaño de 50 μm .

8.5 Titulación del virus por placas líticas

La titulación viral es otro de los procedimientos que confirman los aislamientos virales, y permiten cuantificar los virus viables por volumen sobre todo en virus citopáticos. En el caso del aislamiento de ZIKV se tituló el aislamiento proveniente del pool 31 el cual tiene un título de 2×10^5 pfu/ml. Cabe mencionar que como se observa en la figura 8.11 las placas líticas son pequeñas cuando se comparan con las placas producidas por el ZIKV control positivo, lo cual podría indicar que existen diferencias en la capacidad citopática del virus aislado de transmisión vertical cuando se compara con virus aislados de suero de pacientes. Lo anterior podría deberse a que los virus transmitidos transováricamente podrían estar sometidos a una selección que permite a los virus con menor efecto citopático o menos virulentos estar presentes en los huevos y larvas a fin de dejarlas desarrollarse hasta llegar a adultos.

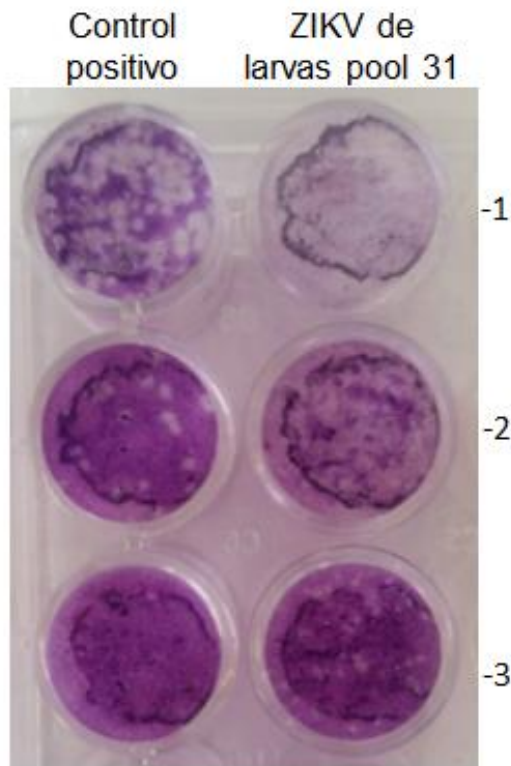


Figura 8.11 Ensayo de titulación viral por placas líticas. Las células Vero fueron infectadas con diluciones señaladas en el lado derecho de la imagen. Del lado izquierdo se muestran los pozos infectados con un aislado de ZIKV proveniente de suero humano de Chiapas utilizado como control positivo y del lado derecho se muestran los pozos infectados con virus provenientes del pool 31.

8.6 Filogenia de ZIKV utilizando la región codificante de la proteína E

A fin de comprobar la identidad de nuestros aislados y analizar la variabilidad de nuestras secuencias se amplificó la región codificante de la proteína E de los cuatro aislados de ZIKV mediante RT-PCR usando dos pares de iniciadores para obtener la totalidad de la secuencia de la región correspondiente a la proteína E; los amplicones se purificaron y se enviaron para la secuenciación nucleotídica por el método de Sanger. El árbol se construyó mediante máxima verosimilitud (100 réplicas *bootstrap*) con secuencias reportadas para diferentes países: México, Uganda, Republica Central de África, Nigeria, Senegal, Polinesia Francesa, Brasil, Honduras y Colombia provenientes tanto de humano como de mosquito. Como se puede observar en la figura 8.12, los virus aislados a partir de larvas pertenecen al linaje asiático como lo refleja el árbol filogenético construido con las secuencias codificantes de la proteína E, dos de las secuencias aisladas de larvas (Larvae2_aegypti y larvae31_aegypti) se agrupan con todas las secuencias reportadas para México, tanto de humano como de mosquito. Las secuencias de este trabajo se nombraron como: larvae37_aegypti, larvae31_aegypti, larvae21_aegypti, larvae2_aegypti. Las secuencias aisladas de los pools 21 y 37 quedan más alejadas de este grupo, sin embargo en el caso del pool 21 no se logró determinar la secuencia completa de E lo que puede incrementar de manera errónea la distancia genética. Cabe mencionar que las muestras marcadas como Mosq1_aegypti, Mosq2_aegypti y Mosq3_aegypti pertenecen a otro estudio realizado por nuestro grupo de investigación. Estas son secuencias que se obtuvieron de hembras adultas de *Aedes aegypti* capturadas en el estado de Guerrero.

8.7 Obtención de los genomas virales a partir de los aislados

8.7.1 Depleción de RNAr

En los procedimientos de la preparación de la muestra para la secuenciación masiva de los RNAs, se tiene como etapa inicial la eliminación de los RNAr, ya que son un gran porcentaje de los RNAs contenidos en los extractos totales de RNA, los cuales deben ser eliminados para permitir que se registren las lecturas de los otros RNAs contenidos en la muestra a analizar. En el caso de los flavivirus, que carecen de cola de poliA, dicho procedimiento se lleva a cabo mediante un sistema de depleción de ribosomales mediante el cual se tienen secuencias que hibridan con los RNAs ribosomales y luego estos RNAs de doble cadena se degradan por RNasas específicas para RNAs en dicha conformación. Los pools procesados fueron el pool 31 el cual era el que mayor efecto citopático mostraba en los aislados y una menor Ct presentaba en los análisis de RT-qPCR, el otro pool enviado fue el pool 53 que presentaba un efecto citopático interesante en las células de mosquito C6/36. En la tabla 8.6 se muestra la concentración del RNA antes y después del tratamiento. Como se puede ver con este procedimiento se pierde alrededor del 80% del RNA de las muestras. El extracto de RNA fue enviado a la Unidad de Secuenciación Masiva del Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación.

Tabla 8.6 Cuantificación de RNA de muestras enviadas a la Unidad de Secuenciación Masiva del IBT. En la tabla se muestra la concentración de RNA en ng/μl del pool 31 (ZIKV) y pool 53 y la concentración en ng/μl después del proceso de depleción de RNAr.

Muestra	Concentración (ng/μl)	Concentración después de depleción de ribosomales (ng/μl)
Pool 31N (ZIKV)	149	26
Pool 53	305	33

8.7.2 Análisis de calidad de las secuencias

Las lecturas de las muestras de RNA de los dos pools se sometieron a un análisis de la calidad. Dicho análisis se realizó con el programa FASTQC y encontramos que la calidad de las secuencias forward como las secuencias reverse obtenidas a partir del pool 31 y 53 tienen una calidad entre 32 y 35 PHRED (figura 8.13). . En este tipo de secuenciación la calidad decae conforme aumenta el llamado de las bases, sin embargo en nuestras muestras aun los últimos nucleótidos caen en la zona verde de la gráfica, calificando así como una lectura de óptima calidad. Se realizó también un análisis de porcentaje de GC, para las lecturas obtenidas del pool 31 el contenido de GC es 50%. El porcentaje de GC para las lecturas obtenidas del pool 53 presentaba varios picos y no una distribución normal, este hecho refleja la naturaleza diversa del origen de las moléculas de RNA.

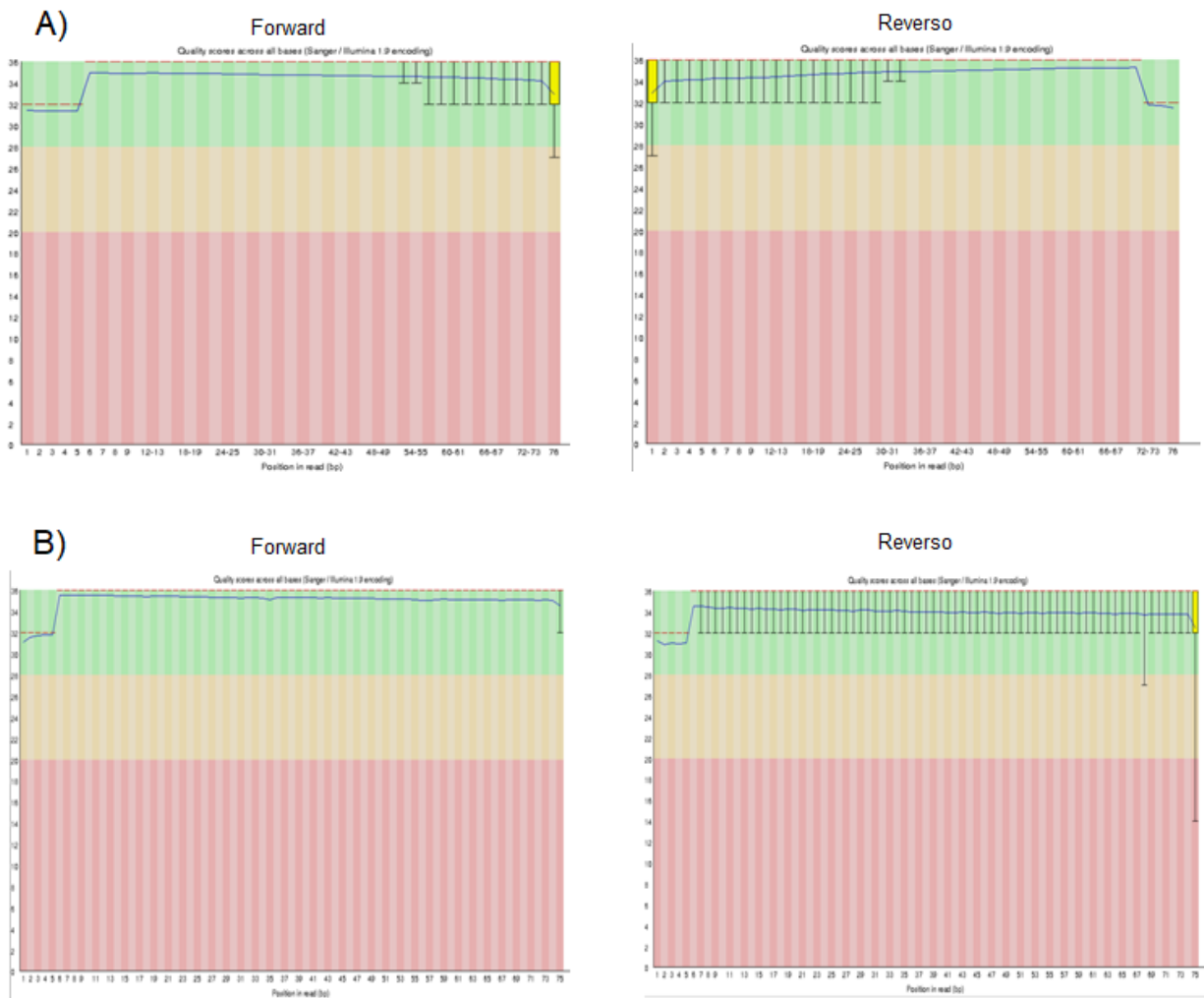


Figura 8.13 Análisis de calidad de las lecturas obtenidas de la secuenciación masiva. Los gráficos muestran la calidad de las lecturas obtenidas de la secuenciación masiva realizado en la plataforma Galaxy. El eje de las X indica la posición (en pares de bases) y el eje de las Y la calificación Phred A) Lecturas obtenidas a partir del aislado del pool 31 B) Lecturas obtenidas a partir del aislado del pool 53. Las líneas muestran las lecturas forward y reverse. (<https://usegalaxy.org/>)

8.7.3 Secuencias obtenidas del pool 31

8.7.3.1 Análisis metagenómico

El análisis metagenómico de estas secuencias obtenidas del pool 31 se llevó a cabo mediante el programa *Kraken*, donde nuestras secuencias fueron mapeadas contra la base de datos de secuencias de virus del programa, con lo que se determinan los grupos taxonómicos presentes en las secuencias. Estos resultados fueron visualizados mediante el programa *Krona pie chart*, el cual nos permite ver los resultados de *Kraken* en una gráfica de pastel. Como se puede ver en la figura 8.14, un total de 7×10^5 lecturas correspondían a secuencias de virus, todas aquellas secuencias que no correspondían a virus fueron eliminadas de este análisis. Del total de lecturas de virus el 98% de estas lecturas corresponde a ZIKV y un 2% a virus Wesselsborn (perteneciente al grupo de virus de fiebre amarilla), aunque en un análisis metagenómico se esperan lecturas de muchos organismos al provenir esta muestra de virus aislados en cultivos celulares puede haber reducido la cantidad de secuencias provenientes de diversos organismos.

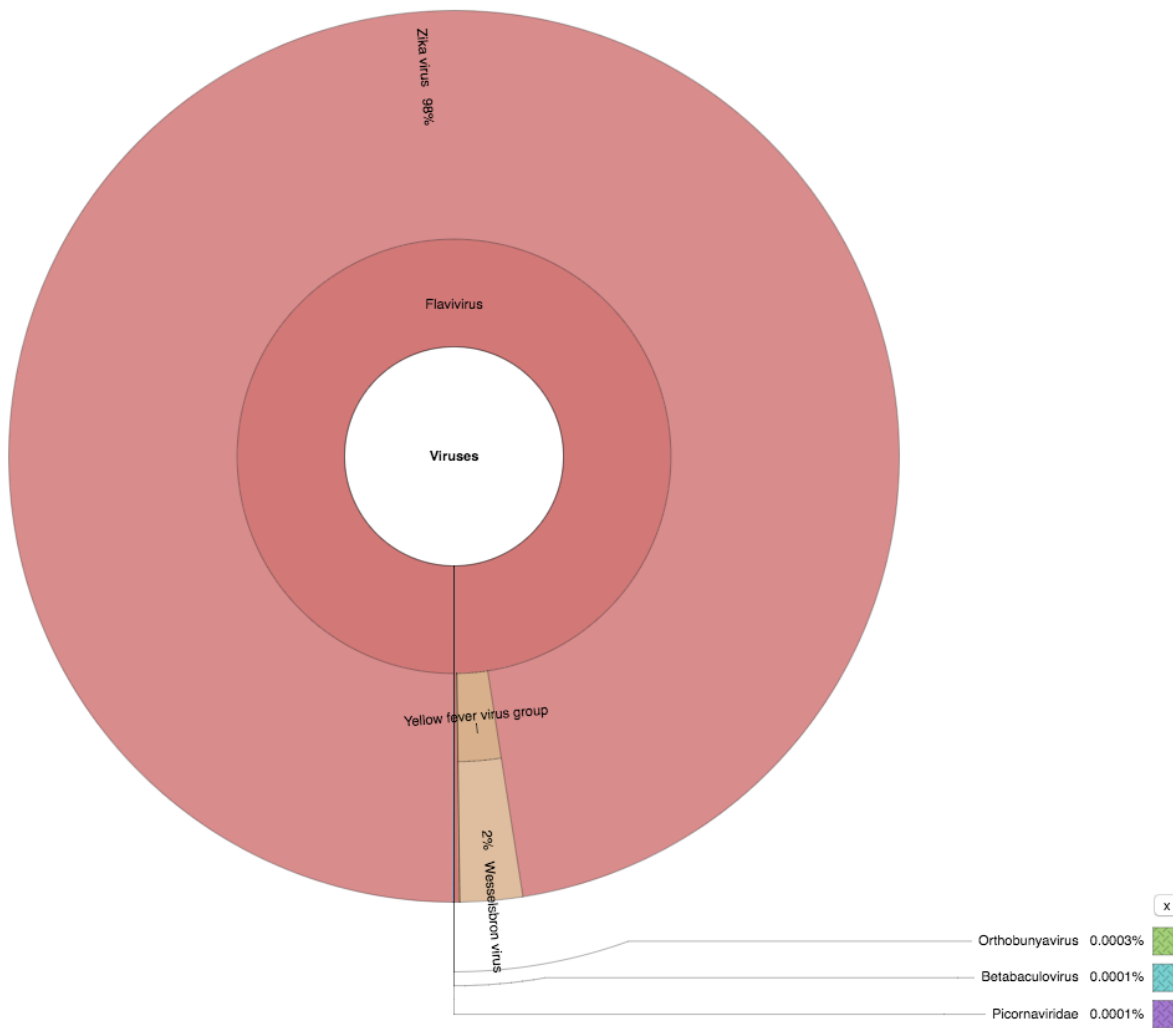


Figura 8.14 Análisis metagenómico de las lecturas del pool 31. Resultado del análisis realizado en la plataforma Galaxy con la herramienta de Kraken. El porcentaje de lecturas que corresponde a cada uno de los virus. El 98% de las lecturas pertenecían a ZIKV, 2% a virus Wesselsborn, 0.0003% a Orthobunyavirus, 0.0001% a betabaculovirus y 0.0001% a picornavirus. (<https://usegalaxy.org/>)

8.7.3.2 Ensamble del genoma de ZIKV

El análisis del metagenoma nos permitió ensamblar el genoma de ZIKV de manera directa debido a que la mayor parte de las lecturas correspondían a este virus. El proceso de ensamble se realizó utilizando el programa de *Trinity* donde las lecturas se ensamblaron en un solo *contig* de 10,802 nucleótidos y la identidad de dicha secuencia se determinó utilizando BLAST. Los resultados mostraron que la secuencia obtenida mediante *Trinity* presenta un 99% de identidad con secuencias de ZIKV reportadas previamente.

8.7.3.3 Análisis de variación de secuencias de la secuencia de ZIKV del pool 31

En la tabla 8.7 se muestran los sitios polimórficos del genoma ensamblado con respecto a las de las secuencias previamente reportadas y si corresponden a mutaciones sinónimas o no sinónimas. La proteína con mayor número de mutaciones sinónimas fue la NS3 lo cual es de esperarse debido a que es la segunda proteína más larga de todas; llama la atención que la proteína NS2A que es de las más pequeñas (226pb) posea el mismo número de mutaciones que la proteína más larga que es la NS5 (903pb). En las mutaciones no sinónimas se encontraron tanto mutaciones conservativas como no conservativas. Cabe resaltar que la proteína NS1 presenta un cambio conservativo de alanina por glicina en el triplete 894 y dos cambios no conservativos: treonina por lisina en el triplete 1059 y alanina por treonina en el triplete 1096. La proteína NS3 presenta una mutación no sinónima conservativa en el triplete 2074 en el cual presenta una leucina en lugar de una metionina. La proteína NS5 presenta dos mutaciones no sinónimas no conservativas: cisteína por arginina en el triplete 3045 y serina por prolina en el triplete 3047. En la tabla 8.8 se muestran estas mutaciones no sinónimas y con qué secuencias están compartidas.

Tabla 8.7 Mutaciones sinónimas y no sinónimas de la secuencia de ZIKV ensamblada del pool 31. Las mutaciones sinónimas y no sinónimas por región del genoma (<https://www.viprbrc.org/brc/snpAnalysis.spg?method=ShowCleanInputPage&decorator=flavi>)

Región del genoma	Sinónimas	No sinónimas	
		Conservativas	No conservativas
C	0	0	0
Pr	1	0	0
M	0	0	0
E	1	0	0
NS1	6	1	2
NS2A	4	0	0
NS2B	1	0	0
NS3	8	1	0
NS4A	2	0	0
Péptido 2K	0	0	0
NS4B	1	0	0
NS5	4	0	2

Tabla 8.8 Mutaciones no sinónimas en la secuencia de ZIKV ensamblada a partir del pool 31. El análisis de variación de secuencia se llevó a cabo mediante el software Seaview. Se presentan las mutaciones no sinónimas, la región del genoma a la que pertenece la mutación, y los genomas registrados que comparten la mutación encontrada en ZIKV del pool 31.

Región del genoma	Mutación	Secuencias que la comparten
NS1	Ala 894 Gly	Todas las secuencias de México*, 2 aislados de humano de EUA y Guatemala
NS1	Thr 1059 Lys	-
NS1	Ala 1096 Thr	-
NS3	Leu 2074 Met	Todas las secuencias de México,* Guatemala, 2 aislados de humano de EUA y Nicaragua
NS5	Cys 3045 Arg	Todas las de México*, un aislado de humano de EUA, Guatemala y Nicaragua.
NS5	Ser 3047 Pro	Aislado de <i>Aedes aegypti</i> en México

*Todas las secuencias de México se refiere a las incluidas en el análisis.

8.7.4 Secuencias del pool 53

8.7.4.1 Análisis metagenómico

Para el análisis metagenómico del pool 53 se utilizó el programa de *Kraken*. El total de lecturas del pool 53 correspondientes a virus fue de 1×10^5 y como se puede observar en la figura 8.15 las secuencias corresponden a diversos virus. El 44% de las lecturas correspondían a *Choristoneura occidentalis granulovirus* (Betabaculovirus) el cual es un virus específico de insecto, el 54% de las lecturas corresponde a virus no asignados y un 2% corresponde a un flavivirus llamado virus agente de fusión celular (CFAV), el cual también es un virus específico de insecto cuya característica más importante es la formación de sincitios en cultivos celulares de insecto, efecto observado en los cultivos en los cuales se aisló.

Cabe mencionar que existen pocos estudios con este virus de mosquitos y sólo se han reportado 4 genomas completos, lo cual aunado al creciente interés por su probable capacidad para el control de la transmisión de arbovirus a humanos nos ha motivado a llevar a cabo el ensamble del genoma de este virus (Bolling et al, 2015; Vasilakis y Tesh 2015; Zhang et al, 2017).

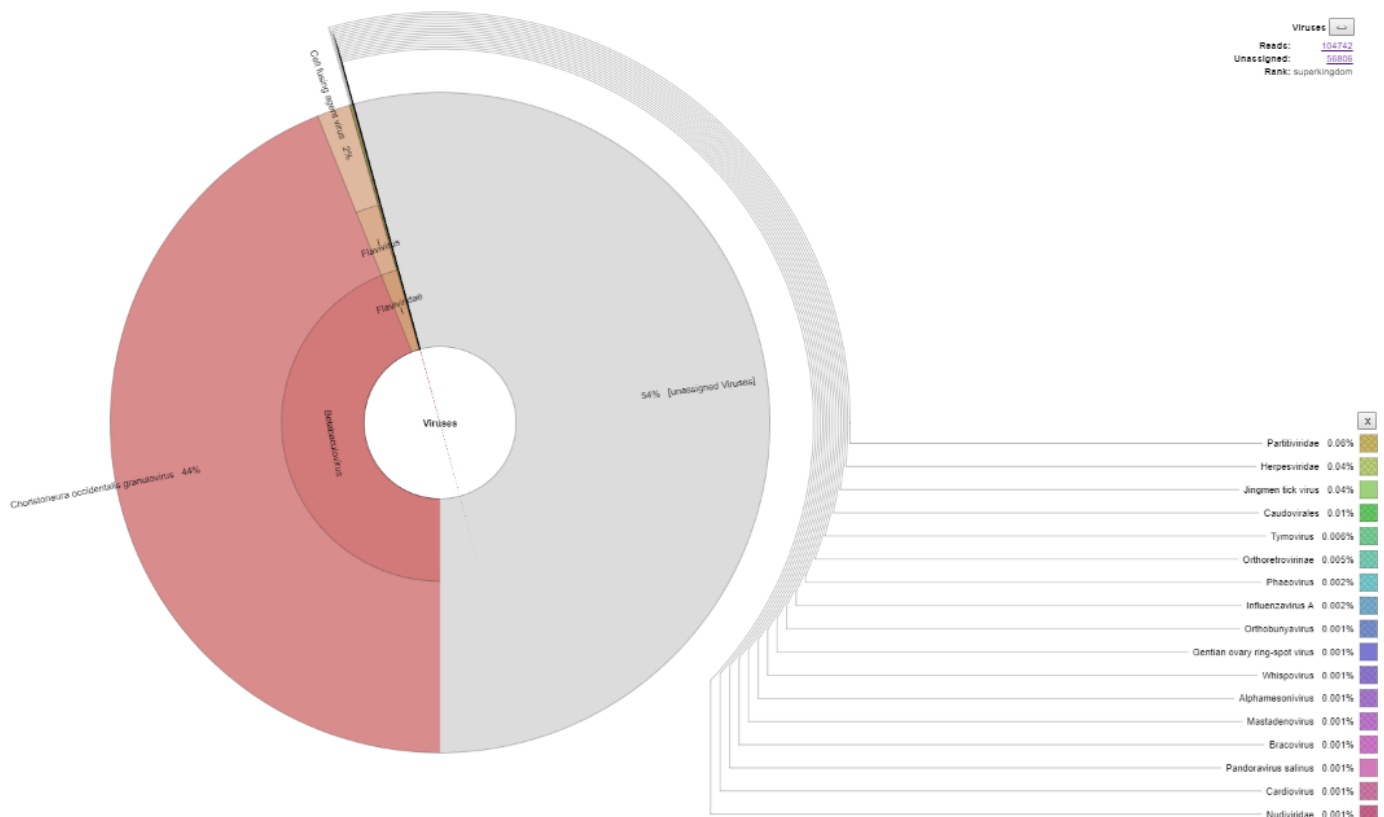


Figura 8.15 Análisis metagenómico de las lecturas del pool 53. Esquema de los resultados del análisis metagenómico realizado mediante *Kraken*. Diagrama de las lecturas encontradas en el pool 53, se muestra el porcentaje de lecturas que correspondían a cada uno de los virus. El 54% (color gris) corresponde a virus no asignados, el 44% (rojo) corresponde a *Choristoneura occidentalis granulovirus* y el 2% (naranja) corresponde al virus agente de fusión celular. Los cuadros de colores del lado derecho indican virus que presentan porcentajes de lecturas menores a 0.01%

8.7.4.2 Ensamble de genoma de CFAV

Dado que sólo el 2% de las secuencias obtenidas del pool 53 corresponden a CFAV, para llevar a cabo el ensamble del genoma se siguió otro procedimiento. Del total de lecturas que resultaron de la secuenciación masiva (16×10^6) se trabajó únicamente con aquellas que mapearon contra el índice de *flavivirus*, esto se llevó a cabo con el programa *smalt*. Con las lecturas resultantes se procedió a ensamblar el genoma utilizando el software *Velvet*, este programa manipula graficas de Brujin basadas en *k-meros*, mediante esta técnica se puede obtener *contigs* largos a partir de lecturas pequeñas pareadas. Para el ensamble del genoma con las lecturas obtenidas el largo del *k-mero* seleccionado fue de 17 nucleótidos, ya que con este se logró ensamblar un solo *contig*. El *contig* resultante tenía un largo de 10661 nucleótidos a partir de 3216 lecturas. La identidad del genoma obtenido fue verificada mediante BLAST, en donde se obtuvo una identidad del 98% con la secuencia del virus agente de fusión celular previamente reportada para Estados Unidos (NC_001564.2) (Bolling et al, 2015).

9 *Discusión*

Los arbovirus se encuentran en constante adaptación conquistando nuevos nichos ecológicos; la continua modificación de los ecosistemas por los humanos permite la entrada de estos virus a nichos a los que anteriormente no tenían acceso. El crecimiento urbano constante, viajes, comercio y otras conductas humanas han perturbado la naturaleza causando la emergencia de múltiples agentes infecciosos (Fauci y Morens, 2016). Debido a esto, es de suma importancia entender la dinámica que tienen estos virus con sus vectores y hospederos al igual que comprender la forma en que se pueden mantener entre ciclos epidémicos.

La transmisión vertical se propone como un mecanismo de mantenimiento de virus en la población de vectores, en especial en condiciones adversas, cuando la transmisión horizontal se vuelve complicada (Coffey et al, 2013; Lequime et al, 2016). Detectar este tipo de transmisión en los diversos arbovirus supone una parte importante de entender tanto la transmisión como la manera en que se mantienen.

DENV, ZIKV y CHIKV fueron detectados en pools de larvas de *Aedes aegypti* que eclosionaron de huevos colectados en Jojutla. Las larvas colectadas en el mes de junio fueron más numerosas que las del mes de noviembre probablemente debido a que al ser noviembre un mes frío y con pocas lluvias hay menor ovoposición que en meses cálidos y lluviosos. DENV fue el virus detectado en un mayor número de pools de larvas, seguido por ZIKV y por último CHIKV. Varios pools dieron positivos para dos virus y uno de ellos dio positivo para los tres virus, siendo muy probable que esto se deba a la naturaleza heterogénea de la muestra, pues al tener en promedio 25 larvas por pool es posible que alguna estuviera infectada con un virus y otra con otro virus, sin embargo no podemos descartar la posibilidad de que exista una co-infección.

A pesar de que el MIR se ha propuesto como una medida para la transmisión vertical en poblaciones silvestres este se ve afectado por el número de individuos

que conforman el pool por lo que se puede estar subestimando el número de infectados. En el MIR se asume que un pool positivo a un virus se debe únicamente a un solo individuo infectado sin saber si más individuos del pool estaban infectados (Grunnill y Boots, 2016) por lo que a pesar de ser una de las medidas más utilizadas para la transmisión vertical no refleja la realidad de individuos infectados por este mecanismo..

El MIR para DENV en las larvas de julio es de 11.42 y para las de noviembre es de 19.13, si lo comparamos con registros previamente publicados, estos MIR son altos, pues Vilela y colaboradores (2010) registran un MIR de 0.18, Guedes y colaboradores (2010) de 0.6 ambos en larvas colectadas en campo. Sin embargo existen reportes en los que el MIR varía ampliamente de 5.77 a 40 dependiendo el mes y la localidad en que se muestrearon (Lee y Rohani 2005). Los MIR obtenidos para ZIKV son de 2.6 en julio y 6.95 en noviembre, en este caso es difícil comparar pues no existen estudios que reporten el MIR en poblaciones silvestres para ZIKV en etapas inmaduras. Los MIR registrados para CHIKV en este estudio son parecidos a los niveles bajos de otros reportes, el resultado fue 1.9 en julio y 0.86 en noviembre; los análisis publicados por otros autores reportan MIR desde 28.2 a 1.63 (Agarwal et al, 2014; Chompoosri et al, 2016) sin embargo ninguno de estos reportes pertenece a países del continente Americano.

Algunos de los huevos colectados en julio se dejaron crecer hasta adultos, esto como otra forma de comprobar si había transmisión vertical, ya que estos adultos no habían estado expuestos a virus mediante transmisión horizontal. El MIR para cada uno de estos virus en mosquitos adultos fue de 45.4 para DENV, 27.2 para ZIKV y 9 para CHIKV. Los reportes previos para MIR en adultos varían ampliamente, incluso más que en los registrados para larvas. Como se puede ver en la tabla 1.1, los MIR registrados para DENV van desde 0 (Ramalingam et al 1986) hasta 40 (Lee y Rohani, 2005). Como se mencionó anteriormente no se cuenta con estudios de MIR relacionados con transmisión vertical en mosquitos obtenidos de huevos colectados en campo para ZIKV. En el caso de CHIKV los valores de MIR desde 1.7 (Chompoosri et al 2016) hasta 33.3 (Jain et al 2016). A pesar de la variación del MIR en estudios como el de Thongrungrukiat y

colaboradores (2010) se puede ver como a pesar de tener un MIR de 0 en diciembre, en los meses siguientes éste aumenta, llegando en Abril a 30, justo un mes antes de que los casos clínicos en humanos se disparen, recalcando así la importancia epidemiológica que tiene el monitorear la transmisión vertical a lo largo del año.

La transmisión vertical se ve afectada por múltiples factores como el genotipo viral, la población y subespecie del mosquito, el nicho ecológico, entre otros aspectos (Guedes et al 2010). Sumado a estos factores el tamaño del pool y el mes de colecta afectan el MIR resultante, Jain y colaboradores (2016) muestrean a lo largo de todo el año y demuestran que el MIR para CHIKV varía dependiendo del mes de muestreo. Con estos datos se puede explicar que tanto para DENV como para ZIKV el MIR fue mayor en noviembre que en julio; noviembre es un mes frío donde hay pocos adultos, por lo tanto baja la transmisión horizontal, siendo la transmisión vertical el principal mecanismo de mantenimiento de los virus durante estos meses. Esta dinámica se ha observado en ambientes con fluctuaciones ambientales en donde se cuenta con una época marcada de lluvias y una de secas durante el año; estos ambientes presentan mayor transmisión vertical que ambientes más estables (Adams y Boots 2010).

Existen reportes de transmisión vertical en DENV desde 1980, la mayoría de los cuales no detectaba la presencia de este virus en etapas inmaduras del mosquito; es importante mencionar que conforme las técnicas de detección van mejorando en sensibilidad, los resultados de la transmisión vertical positivos se han incrementado, lo que nos sugiere que se necesitan técnicas de alta sensibilidad para detectar a los virus transmitidos verticalmente. La comparación entre estos análisis se debe hacer con cuidado pues los resultados pueden variar dependiendo de las técnicas usadas en la detección y colecta (Costa et al, 2017; Lequime y Lambrechts, 2014).

El RNA viral fue detectado mediante RT-PCR, sin embargo el RNA detectado muchas veces puede provenir de RNA desnudo, fragmentos de éste o partículas virales no viables (Grunnill y Boots, 2016), por lo que es importante llevar a cabo el

aislamiento viral, lo que nos asegura la presencia de la partícula viral completa e infecciosa, sugiriendo fuertemente replicación viral activa en el espécimen analizado. El aislamiento de partículas virales infecciosas a partir de larvas de vida libre demuestra que DENV, ZIKV y CHIKV son transmitidos verticalmente y que éstos permanecen viables. Todos los virus obtenidos de larvas son capaces de infectar células de mosquito (C6/36) y células de mamífero (Vero), por lo que se sugiere su capacidad de infectar los dos organismos descritos para estos virus en el ciclo infeccioso urbano.

Previamente se había reportado el aislamiento de DENV y CHIKV a partir de larvas, sin embargo éste es el primer reporte de aislados virales de ZIKV a partir de larvas originadas de huevos colectados en campo. El hecho de tener partículas virales infecciosas demuestra que existe una transmisión vertical de estos tres virus en la población de mosquitos de Jojutla, Morelos.

Por lo anterior, el aislado de ZIKV fue caracterizado adicionalmente mediante la detección de proteínas virales y la titulación de las partículas virales infecciosas. La inmunodetección nos permitió confirmar la producción de la proteína viral de envoltura (E) en nuestros aislados de ZIKV. El título virale del aislado del pool 31 fue de 2×10^5 pfu/ml, cabe mencionar que las placas formadas por este virus son pequeñas.

Se construyó un árbol filogenético utilizando secuencias de la proteína E, tanto aquellas reportadas previamente como las obtenidas a partir de los virus aislados de los pools 2, 21, 31 y 37. Estas 4 secuencias pertenecen al linaje asiático/americano como esperábamos y se agruparon con el resto de secuencias de este linaje. Las secuencias correspondientes al linaje Africano se agrupan, presentando ramas largas lo que nos indica una mayor divergencia entre estas secuencias, esto puede deberse a que el virus se encuentra circulando en África desde hace más de 50 años y existen diversas secuencias reportadas en las diferentes décadas. Por otra parte podemos observar que las ramas dentro del grupo del linaje asiático/americano son cortas, indicando un bajo nivel de divergencia. Como sabemos los virus de este linaje empezaron a dispersarse en el

2007, logrando saltar a América hasta principios del 2015 por lo que todas las secuencias registradas son contemporáneas. Esto puede estar afectando el árbol que vemos pues la divergencia que se puede observar en el linaje es poca.

El genoma de ZIKV ensamblado a partir del aislado proveniente del pool 31 presenta varias mutaciones que nos parece importante mencionar. En la región codificante para la proteína E se encontró solo una mutación sinónima, lo que nos indica que esta región tiene poca variabilidad con respecto a otras regiones del genoma viral. Las secuencias de la proteína E son comúnmente utilizadas para elaborar arboles filogenéticos, sin embargo parece ser una región con pocas mutaciones, por lo que no parece ser la mejor secuencia para elaborar filogenias, en especial aquellas de reciente dispersión como sucedió en el linaje asiático de ZIKV

Las regiones codificantes para la proteína NS5 y NS2A presentan el mismo número de mutaciones sinónimas (4), lo cual llama la atención debido a que la proteína NS5 es la más grande de todas las proteínas virales y la NS2A es de las más pequeñas, sin embargo existen reportes previos en los que se reportan varios cambios en esta pequeña proteína (Boheeman et al, 2017), lo cual sugiere que se trata de un hotspot para mutaciones.

Dentro de las mutaciones que llaman nuestra atención están las encontradas en la región codificante NS1, ya que en reportes anteriores se ha visto que mutaciones en esta proteína han conferido propiedades diferentes a las cepas de ZIKV. Liu y colaboradores (2017) describieron que la mutación A188V en la proteína NS1 promueve la antigenemia de esta proteína lo que facilita la infección o aumenta los niveles de virus en *Aedes aegypti*. En el genoma completo ensamblado se presentan 3 mutaciones no sinónimas y dos de éstas no se habían reportado previamente para otros genomas de ZIKV. Es importante recalcar que no existen reportes previos de genomas de ZIKV completos provenientes de larvas por lo tanto no podemos saber si estas mutaciones son específicas de larvas y si podrían desempeñar funciones importantes en la transmisión vertical. Otras de las mutaciones que llamaron nuestra atención son las no sinónimas presentes en la

región codificante NS5, ya que están en la polimerasa dependiente de RNA de estos virus. Las dos mutaciones que se encontraron en esta proteína son compartidas con secuencias aisladas de *Ae. aegypti* en México y aisladas de humano en México, EUA, Guatemala y Nicaragua anteriormente reportadas.

Una vez aislado el CFAV, el cual es un *flavivirus* específico de insectos, se llevó a cabo la secuenciación masiva y el ensamble del genoma completo. Únicamente existen 4 genomas completos reportados en el mundo, dos de EUA, uno de Reino Unido y uno reportado en Francia (Espinoza-Gómez et al 2011; Bolling et al 2015; Maringer et al 2016; Crochu et al 2001). Este virus llama nuestra atención debido a que varios autores sugieren que los virus específicos de insectos (ISV) podrían jugar un papel importante en la dinámica que tienen los arbovirus en el mosquito. Vasilakis y Tesh (2015) proponen que los ISV presentan una inhibición competitiva en las co-infecciones con arbovirus, sin embargo este mecanismo es desconocido y no se comporta igual con todos los arbovirus. A este respecto, Bolling y colaboradores (2015) proponen que algunos ISV pueden alterar la susceptibilidad de los mosquitos a ciertos arbovirus, volviéndolos incapaces de transmitirlos a humanos. Zhang y colaboradores (2017) reportan por el contrario, que la infección con CFAV en células de *Aedes aegypti* promueve la replicación de DENV, contradiciendo lo que anteriormente publicado. Existen pocos estudios acerca de los ISV y se entiende poco de sus mecanismos.

10 Conclusiones

Se demostró la existencia de transmisión vertical de DENV, ZIKV y CHIKV en la población de mosquitos de *Aedes aegypti* de Jojutla, Morelos. Los virus encontrados en larvas fueron aislados y tienen la capacidad de infectar tanto a células de mosquito como a células de mamífero. Esta constituye la primera descripción de transmisión vertical de ZIKV en mosquitos en condiciones silvestres.

La población de mosquitos de Jojutla, Morelos, también presenta transmisión vertical de CFAV, un virus específico de mosquito, el cual fue aislado en células de mosquito. Los reportes del efecto de las co-infecciones de arbovirus con ISV son contradictorios. Este estudio se centra en la detección de transmisión vertical de los arbovirus, la cual es de suma importancia pues representa un modo de mantenimiento viral entre ciclos interepidémicos, ya sea porque existen pocos individuos susceptibles a la infección o porque las condiciones climáticas limitan la transmisión viral por otras vías.

11 Perspectivas

- Ensamblar los genomas de DENV y CHIKV
- Analizar los dominios en los que se encontraron mutaciones en las secuencias de ZIKV
- Secuenciar, ensamblar y analizar más genomas virales provenientes de estados larvarios para observar mutaciones específicas

12 Bibliografia

- Agarwal A., Kumar Dash P., Kumar Singh A., Sharma S., Gopalan N., Lakshmana Rao P.V., Mohan Parida M., and Reiter P. (2014) Evidence of experimental vertical transmission of emerging novel ECSA genotype of Chikungunya virus in *Aedes aegypti*. *Neglected Tropical Diseases* 8(7).
- Allicock O.M., Lemey P., Tatem A. J., Pybus O.G., Bennet S.N., Mueller B.A., Suchard M.A., Foster J.E., Rambaut A. and Carrington C.V. F.(2012) Phylogeography and population dynamics of Dengue viruses in the Americas. *Mol. Biol. Evol.* 29(6), 1533-1543.
- Adams B. and Boots M. (2010) How important is vertical transmission in mosquitoes for the persistence of dengue? Insights from a mathematical model. *Epidemics* 2, 1-10.
- Boheemen S., Tas A., Anvar S.Y., Grootveld R., Albulescu I.C., Bauer M.P., Feltkamp M.C., Bredenbeek P.J., and Hemert M.J. (2017) Quasispecies composition and evolution of a typical Zika virus clinical isolate from Suriname. *Scientific Reports* 7
- Bollati M., Alvarez K., Assenberg R., Baronti C., Canard B., Cook S., Coutard B., Decroly E., Lamballerie X., Gould E.A., Grard G., Grimes J.M., Hilgenfeld R., Jansson A.M., Malet H., Mancini E.J., Mastrangelo E., Mattevi A., Milani M., Moureau G., Neyts J., Owens R.J., Ren J., Selisko B., Speroni S., Steuber H., Stuart D.I., Unge T., and Bolognesi M. (2010) Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research* 87, 125-148.
- Bolling B.G., Weaver S.C., Tesh R.B. and Vasilakis N. (2015) Insect-specific virus discovery: significance for the arbovirus community. *Viruses* 7, 4911-4928
- Bolling B.G., Vasilakis N., Guzman H., Widen S.G., Wood T.G., Popov V.L., Thangamani S., and Tesh R.B. (2015) Insect-Specific viruses detected in laboratory mosquito colonies and their potential implications for experiments evaluating arbovirus vector competence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92 (2), 422-428.
- Bolger A.M., Lohse M., and Usadel B. (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 170
- Brinton M.A., and Basu M. (2015). Functions of the 3' and 5' genome RNA regions of members of the genus Flavivirus. *Virus Res.* 206, 108-119
- Buckner E.A., Alto B.W., and Lounibos L.P. (2013) Vertical transmission of Key West Dengue-1 virus by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes from Florida. *J Med Entomol* 50(6): 1291-1297

- Camacho D., Reyes J., Negredo A., Hernández L., Sánchez-Seco M., and Comach G. (2017) Asian genotype of Chikungunya virus circulating in Venezuela during 2014. *Acta Tropical* 174, 88-90
- Carrillo-Valenzo E., Danis-Lozano R., Velasco-Hernández J.X., Sánchez-Burgos G., Alpuche C., López I., Rosales C., Baronti C., Lamballerie X., Holmes E.C., and Ramos-Castañeda J. (2010) Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement. *Arch Virol*
- CDC. (2012) Dengue, Entomology, Ecology. Consultado en https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m_lifecycle.html el 03/01/17
- CDC. (2014) Aedes aegypti. Consultado en <https://blogs.cdc.gov/publichealthmatters/2014/01/coming-to-america/aedes-aegypti/> el 05/10/17
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). 2014. Guía metodológica para la vigilancia entomológica con ovitrampas. Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud. NOM-032-SSA2-2014.
- Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ y Chang GJJ. 2006. Development of Real Time Reverse Transcriptase PCR assay to detect and serotype dengue virus. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (4): 1295-1304.
- Chompoosri J., Thavara U., Tawatsin A., Boonserm R., Phumee A., Sangkitporn S. and Siriyasatien P. (2016) Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Parasites & Vectors* 9, 227
- Chun-xiao L., Xiao-xia G., Yong-qiang D., Dan X., Ai-juan S., Qin-mei L., Qun W., Yan-de D., Ying-mei Z., Heng-duan Z., Wu-chun C., Cheng-feng Q., and Tong-yan Z. (2017) Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. *Emerging Microbes & Infections* 6
- Coffey L.L., Forrester N., Tsetsarkin K., Vasilakis N. and Weaver S.C. (2013) Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiology*. 8(2), 155-176.
- Conteras-Gutiérrez M.A. and Uribe S. (2014) Arbovirus y virus específicos de insectos: flebotomíneos un caso de interés. *Boletín del Museo Entomológico Francisco Luís Gallego* 6 (4), 11-24.
- Crochu S., Cook S., Attoui H., Charrel R.N., De Chesse R., Belhouchet M., Lemasson J.J., De Micco P., and Lamballerie X. (2004) Sequences of flavivirus-related

RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. Mosquitoes. *J. Gen. Virol.* 85

- Cuccuru G., Orsini M., Pinna A., Sbardellati A., Soranzo N., Travaqlione A., Uva P., Zanetti G., and Fotia G. (2014) Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. *Bioinformatics*.
- Da Costa C.F., Dos Passos R.A., Pereira Lima J.B., Roque R.A., Sampaio V. S., Campolina T.B., Secundino N.F.C., and Pimenta P.F.P. (2017) Transovarial transmission of DENV in *Aedes aegypti* in the Amazon basin: a local model of xenomonitoring. *Parasites & Vectors* 10 (249).
- Diallo D., Sall A.A., Diagne C.T., Faye O., Faye O., Ba Y., Hanley K.A., Buenemann M., Weaver S.C., and Diallo M. (2014) Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS ONE* 9
- Díaz F.J., Black IV W.C., Farfán-Ale J.A., Loroño-Pino M.A., Olson K.E., and Beaty B.J. (2006) Dengue virus circulation and evolution in Mexico: A phylogenetic perspective. *Archives of Medical Research* 37, 760-773.
- Duffy S., Shackelton L.A., and Holmes E.C. (2008) Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews* 9, 267-276
- Fajardo A., Cristina J., and Moreno P. (2016) Emergence and spreading potential of Zika virus. *Front. Microbiol.* 7 (1667).
- FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Fauci A.S and Morens D.M. (2016) Zika virus in the Americas-Yet another arbovirus threat. *N. Engl. J. Med.* 374(7), 601-603
- Ferreira-de-Brito A., Ribeiro I.P., Moraes de Miranda R., Fernandes R.S., Silva Campos S., Antunes Barbosa da Silva K., Goncalves de Castro M., Bonaldo M.C., Brasil P., and Lourenco-de-Oliveira R. (2016) First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 111(10), 655-658
- Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N. and, Regev A. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 29(7), 644-652

- Galtier N., Gouy M. and Gautier C. (1996) SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl. Biosci.* 12, 543-548.
- Garmashova N, Gorchakov R, Volkova E, Paessler S, Frolova E y Frolov I. (2007) The old world and new world alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. *Journal of Virology* 81 (5), 2472-84.
- Göertz G.P., Abbo S.R., Fros J.J. and Pijlman G.P. (2017) Functional RNA during Zika virus infection. *Virus Research*.
- Gould E.A., Higgs S., Buckley A. and Sergeevna-Gritsun T. (2006) Potencial arbovirus emergence and implication for the United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases* 12(4), 549-554.
- Grunnil M., and Boots M. (2016) How important is vertical transmission of Dengue viruses by mosquitoes (Diptera:Culicidae)?. *J of Med Ent* 53(1), 1-19
- Guedes D.R.D., Cordeiro M.T., Melo-Santos M.A.V., Magalhaes T., Marques E., Regis L., Furtado A.F., and Ayres C.F.J. (2010) Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. *J Vector Borne Dis* 47, 67-75
- Haas B. (2017) RNA-Seq De novo assembly using Trinity. GitHub (Consultado en <https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki> el 2/01/18)
- Holmes E.C. and Twiddy S.S. (2003) The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, Genetics and Evolution* 3,19-28
- Jain J., Kushwah R.B.S., Singh S.S., Sharma A., Adak T., Singh O. P., Bhatnagar R.K., Subbarao S.K., and Sunil S. (2016). Evidence for natural vertical transmission of Chikungunya virus in fiel populations of *Aedes aegypti* in Delhi and Haryana States in India- A preliminary report. *Acta Tropica*.
- Jose J., Snyder J.E., and Kuhn R.J. (2009) A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 4, 837-856
- Joshi V., Mourya D.T. and Sharma R.C. (2002) Persistence of Dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 67(2), 158-161
- Jousset F.X. (1981) Geographic *Aedes aegypti* strains and Dengue-2 virus: susceptibility, ability to transmit to vertebrate and transovarial transmission. *Ann. Virol.* 132, 357-370
- Kraemer M.U.G., Sinka M.E., Duda K.A., Mylne A.Q.N., Shearer F.M., Barker C.M., Moore C.G., Carvalho R.G., Coelho G.E., Bortel W.V., Hendrickx G., Schaffner F., Elyazar

I.R.F., Teng H.J., Brady O.J., Messina J.P., Pigott D.M., Scott T.W., Smith D.L., Wint G.R.W., Golding N. and Hay S.I. (2015) The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae albopictus*. *eLife Ecology | Epidemiology and global health*

- Kramer L.D. and Ebel G.D. (2003) Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Advances in Virus Research* 60, 187-231.
- Lambrechts L. and Lequime S. (2016) Evolutionary dynamics of dengue virus populations within the mosquito vector. *Current Opinion in Virology* 21, 47-53.
- Lanciotti R.S, Kosoy O.L, Laven J.J, Panella A.J, Velez J.O, Lambert A.J y Campbell G.L. (2007). Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerging infectious Diseases* 13(5).
- Lanciotti R.S., Kosoy O.L., Laven J.J., Velez J.O., Lambert A.J., Johnson A.J., Stanfield S.M., and Duffy M.R. (2008) Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap state, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Disease*, 14(8), 1232-1239
- Lee H.L. and Rohani A. (2005) Transovarial transmission of Dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in relation to Dengue outbreak in an urban area in Malaysia. *Dengue Bulletin* 29
- Lequime S. and Lambrechts L. (2014) Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: A historical perspective. *Infection, Genetics and Evolution*.
- Lequime S., Paul R.E., and Lambrechts L. (2016) Determinants of arbovirus vertical transmission in mosquitoes. *PLoS Pathogen* 12(5).
- Le Goff G., Revollo J., Guerra M., Cruz M., Barja Simon Z., Roca Y., Vargas Flores J., and Hervé J.P. (2011) Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Bolivia. *Parasite* 18, 277-280.
- Liu J., Liu Y., Nie K., Du S., Qiu J., Pang X., Wang P., and Cheng G. (2016) Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. *Nat Microbiol* 1(9).
- Liu Y., Liu J., Du S., Shan C., Nie K., Zhang R., Li XF., Zhang R., Wang T., Qin CF., Wang P., Shi PY., and Cheng G. (2017) Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature* 545, 482-485
- Maringer K., Yousuf A., Heeson K.J., Fan J., Fernandez-Sesma A., Bessant C., Matthews D.A., and Davidson A.D. (2016) Proteomics Informed by Transcriptomics for characterizing active transposable elements and genome annotation in *Aedes aegypti*. Unpublished. Accession KU936054.1.

- Mlera L., Melik W. and Bloom M.E. (2014) The role of viral persistence in flavivirus biology. *Pathog Dis.* 71(2), 137-163
- Mukhopadhyay S., Kuhn R.J. and Rossman M.G. (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews* 3, 13-22
- Mustafa M.S., Rasotgi C.V., Jain C.S. and Gupta L.C.V. (2015) Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): a new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India* 71,67-70
- Nelms B.M., Fechter-Leggett E., Carroll B.D., Macedo P., Kluh S. and Reisen W.K. (2013) Experimental and natural vertical transmission of West Nile Virus by California Culex (Diptera:Culicidae) mosquitoes. *Entomological Society of America* 50(2),371-378
- Niyas K.P., Abraham R., Unnikrishnan R.N., Mathew T., Nair S., Manakkadan A., Issac A., and Sreekumar E.(2010) Molecular characterization of Chikungunya virus isolates from clinical samples and adult Aedes albopictus mosquitoes emerged from larvae from Kerala, South India. *Virology Journal* 7
- Oliveira E.R.A, Mohana-Borges R., B. de Alencastro R. and Horta B.A.C. (2017) The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Research* 227, 115-123
- Organización Mundial de la Salud. (2016) (Consultado en Agosto 2016 en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>)
- Pastrino B., Nougairède A., Wurtz N., Gould E. and de Lamballerie X. (2010) Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral Research* 87, 281-294
- Pessoa Martins V.E., Alencar C.H., TottKamimura M., Montenegro de Carvalho Araújo F., De Simone S.G., Fireman-Dutra R. and Florindo-Guedes M.I. (2012) Occurrence of natural vertical transmission of Dengue- 2 and Dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Plos ONE* 7 (7).
- Pialoux G., Gaüzère B.A., Jaurèguiberry S. and Strobel M. (2007) Chikungunya, an epidemic arbovirus. *Lancet Infectious Disease* 7, 319-327.
- Ponsting H. SMALT. Manual by Hannes Ponsting. <http://www.sanger.ac.uk/science/tools>
- Ramalingam S., Chandra Shekhar K., PangT., Rampal L., Chew C.B., Ramakrishna K., Poon G.K., and Lam S.K. (1986). Does transovarial transmission of dengue viruses occur in Malaysia? *Trop. Biomed.* 3, 87-88.

- Red Nacional de Laboratorio de Salud (1997) Guía práctica para la identificación de *Aedes aegypti*. Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública. Ministerio de Salud. Lima. *Serie de Guías Entomológicas 2*.
- Rosen L., Shroyer D.A., Tesh R.B., Freier J.E., and Lien J.C. (1983) Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 1108-1119
- Rohani A., Zamree I., Joseph R.T. and Lee H.L. (2008) Persistency of transovarial dengue virus in *Aedes aegypti* (Linn.). *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 39(5).
- Rueda L.M. (2004) Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus transmission. *Zootaxa*, 589.
- Sahadeo N.S.D., Allicok O.M., De Salazar P.M., Auguste A.J., Widen S., Olowokure B., Gutierrez C., Valadere A.M., Polson-Edwards K., Weaver S.C., and Carrington C.V.F. (2017) Understanding the evolution and spread of chikungunya virus in the Americas using complete genome sequences. *Virus Evol.* 3 (1).
- Saiz J.C., Vázquez-Calvo A., Blázquez A.B., Merino-Ramos T., Escribano-Romero E. and Martín-Acebes M.A. (2016) Zika virus: the latest newcomer. *Frontiers in Microbiology* 7.
- Schuler-Faccini L., Ribeiro M.E., Feitosa M.L.I., Horovitz D.G.D., Cavalcanti P.D., Pessoa A., Doriqui R.M.J., Neri J.I., Monteiro de Pina Neto J., Wanderley Y.C.H., Cernach M., El-Husny S.A., Pone V.S.M., Serano L.C.C. and Sanseverio V.M.T. (2016) Possible association between Zika virus infection and microcephaly- Brazil, 2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 65 (3),59-62.
- Schwartz O. and Albert M.L. (2010) Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature Reviews Microbiology* 8, 491-500
- Secretaria de Salud Pública (2017) Boletín Epidemiológico 34 (49), (Consultado en <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico> el 19/diciembre/2017)
- Secretaria de Salud Pública (2016) Boletín Epidemiológico 22 (52). (Consultado en <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/179535/sem52.pdf> el 28/diciembre/2017)
- Shabman R., Puri V., Dilley K., Fedorova N., Shrivastava S., Amedeo P., Williams M., Hu L., and Rashid S. (2016). Direct Submission. Zika virus strain ZIKV/Aedes.sp/MEX/MEX_I-7/2016. Accession number KX446951.2

- Shen S., Shi J., Wang J., Tang S., Wang H., Hu Z., and Deng F. (2016). Phylogenetic analysis revealed the central roles of two African countries in the evolution and worldwide spread of Zika virus. *Virologica Sinica*. 31 (2), 118-130
- Shi W., Zhang Z., Ling C., Carr M.J., Tong Y., and Gao G.F. (2016) Increasing genetic diversity of Zika virus in the Latin American outbreak. *Emerging Microbes and Infections* 5
- Smartt C.T., Stenn T.M.S., Chen T.Y., Teixeira M.G., Queiroz E.P., Souza Dos Santos L., Queiroz G.A.N., Ribeiro Souza K., Kalabric Silva L., Shin D., and Tabachnick W.J. (2017) Evidence of Zika Virus RNA fragments in *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) field-collected eggs from Camacari, Bahia, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 0, 1-3.
- Thangamani S., Haun J., Hart C.E., Guzman H., and Tesh R.B. (2016) Vertical transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* mosquitoes. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*.
- Thavara U., Tawatsin A., Pengsakul T., Bhakdeenuan P., Chanama S., Anantapreecha S., Molito C., Chompoosri J., Thammapalo S., Sawanpanyalert P., and Siriyasatien P. (2009) Outbreak of Chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* skuse (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 40 (5), 951-962
- Thongrungrat S., Maneekan P., Wasinpiyamongkol L., and Prummongkol S. (2011). Prospective field study of transovarial dengue-virus transmission by two different forms of *Aedes aegypti* in an urban area of Bangkok, Thailand. *J of Vector Ecology* 36(1), 147-152
- Tilak R., Sougat Ray S.C., Tilak M.G.V.W, and Sandip-Mukherji A.C. (2016) Dengue, chikungunya and the missing entity-Zika fever: A new emerging threat. *Medical Journal Armed Forces India* 72, 157-163.
- Uribarren Berrueta T. (2016) Dengue, fiebre chikungunya y otros arbovirus. Departamento de microbiología y parasitología- Recursos en virología. UNAM. (Consultado en agosto 2016 en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/dengue.html>)
- Vancini R., Hernandez R. and Brown D. (2015) Alphavirus entry into host cells. Chapter two. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 129, 33-62
- Vasconcelos P.F.C. and Calisher C.H. (2016) Emergence of human arboviral diseases in the Americas, 2000-2016. *Vector-Borne and zoonotic diseases*.

- Vasilakis N. and Tesh R.B. (2015) Insect-specific viruses and their potential impact on arbovirus transmission. *Curr Opin Virol* 15, 69-74.
- Vilela A.P.P., Figueiredo L.B., dos Santos J.R., Eiras A.E., Bonjardim C.A., Ferreira C.P., and Kroon E.G. (2010). Dengue Virus 3 genotype I in *Aedes aegypti* mosquitoes and eggs, Brazil, 2005-2006. *Emerging infectious diseases* 16 (6), 989-992
- Vorou R. (2016) Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. *International Society for Infectious Diseases* 48: 85-90.
- Weaver S.C and Lecuit M. (2015) Chikungunya virus and the global spread of mosquito-borne disease. *The New England Journal of Medicine* 372 (13), 1231-1239.
- Weaver S.C. and Vasilakis N. (2009) Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution* 9, 523-540.
- Weaver S.C., Winegar R., Manger I.D., and Forrester N.L. (2012) Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Res.* 94(3), 242-257
- Wong H.V., Vythilingam I., Sulaiman W.Y.W., Lulla A., Merits A., Chan Y.F., and Sam I.C. (2016) Detection of persistent Chikungunya virus RNA but no infectious virus in experimental vertical transmission in *Aedes aegypti* from Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 94(1), 182-186.
- Wood D.E. and Salzberg S.L. (2014) Kraken: ultrafast metagenomics sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 15(3).
- Zerbino D.R. and Birney E. (2008) Velvet: Algorithm for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18(5), 821-829.
- Zhang G., Asad S., Khromykh A.A., and Asgari S. (2017) Cell fusin agent virus and dengue virus mutually interact in *Aedes aegypti* cell lines. *Scientific Reports* 7

Apéndice 1

Números de acceso de secuencias incluidas para el árbol filogenético

- Senegal aislado de humano: MF629799, MF629798
- Senegal aislado de mosquito: HQ234501
- Nigeria aislado de humano: KU963574, HQ234500
- Gabón aislado de humano: KF270887
- Republica Central de África aislado de mosquito: KF268948, KF268950
- Uganda aislado de mosquito: KY288905
- Polinesia Francesa aislado de humano: KJ776791, KX447516, KX447517, KX447515, KX447511
- Brasil aislado de humano: KR872956, KX197205, KU940228, KU729217, KU527068, KY014313
- Brasil aislado de mosquitos: KX986761, KX986760, KY354186, KY354187
- Colombia aislado de humano: KY989971, KY785477, KX548902, MF574587, KY317940
- Ecuador aislado de humano: KX879603
- Guyana Francesa aislado de humano: KU758877, KX216637
- Perú aislado de humano: KY693679
- Chila aislado de humano: KM078954, KM078948, KM078946, KM078968
- Guatemala aislado de humano: KU501216
- El Salvador aislado de humano: KX216638
- Haití aislado de humano: KU509998
- Honduras aislado de humano: KY014306, KY014312
- México aislado de humano: KY631494, KY606271, KY120349, KY631493, KX954122
- México aislado de mosquitos: KX247632, KY648934, KX856011, KX446950, KX446951

