



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

**UNIDAD ACADÉMICA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**CAPACIDAD VECTORIAL DE *Aedes aegypti*  
(Diptera: Culicidae) MEDIANTE EL  
MECANISMO DE INFECCIÓN HORIZONTAL  
DEL VIRUS DEL DENGUE LARVA-LARVA**

**Tesis que presenta:  
Mayra Mejía Sánchez**

**Para obtener el grado de Maestría**

**Directores:  
Dr. Hipólito Castillo Ureta  
Dr. Rosalio Ramos Payán**

**Asesores:  
Dr. José Israel Torres Avendaño  
Dr. Jorge Armando López Gutiérrez  
Dr. Cuauhtémoc Villareal Treviño**



**Culiacán Rosales, Sin. junio de 2024**



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



## **DEDICATORIA**

*Dedico esta tesis a mis padres: Mayra Sánchez y Abelardo Mejía*

*Gracias por el apoyo incondicional y por hacer que haya llegado hasta aquí.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, a sus directivos y profesores por haberme dado la oportunidad de realizar mi maestría en este programa, gracias por la confianza y los conocimientos brindados en el transcurso de esta etapa de aprendizaje.

De igual manera agradezco a la Unidad Académica Facultad de Biología y a la Unidad Académica Facultad Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa y a sus autoridades por la sede donde realice la fase experimental de mi proyecto de tesis.

Así como también al cuerpo Académico Vida Silvestre y Biología Molecular de la Facultad de Biología y al cuerpo Académico de Inmunogenética y Microbiología Molecular de la Facultad Ciencias Químico-Biológicas.

Tuve la dicha de ser acogida por el Dr. Hipólito Castillo Ureta en todo el proceso de esta nueva etapa, no tengo más que agradecerle por el apoyo que ha tenido hacia mi persona y brindarme la mano cuando lo necesite, aceptarme como tesista sin conocerme realmente como estudiante y ser siempre cordial, muchas gracias.

Asimismo, quiero agradecer al Dr. Rosalio Ramos Payán por ser mi codirector de tesis y darme la oportunidad de poder desarrollar nuevas habilidades, hacer que me diera cuenta de un sin número de deficiencias que debo de cultivar para ser mejor como investigadora, dicho por usted *¡Si realmente deseas ser investigadora!*, así como también por creer en mí y darme la confianza para involucrarme un poco en otras actividades que me sirvieron en mi desarrollo personal y académico.

Quiero agradecer de igual manera al Dr. José Israel Torres Avendaño por ser uno de los primeros en ayudarme con la idea medular del proyecto, sentarse conmigo después de sus clases y ver punto por punto que era lo que se quería lograr y responder, así como también por estar escuchando todas mis inquietudes y animándome siempre.

Gracias Dr. Jorge Armando López Gutiérrez por estar para responder mis dudas y guiarme de la mejor manera, motivarme a ser mejor y por sus llamadas de atención muy necesarias para mi formación y aprendizaje, recuerdo que un día me dijo que sabía que sabía pero que me faltaba confiar en mí, eso me abrió muchos los ojos, gracias.

De igual manera al Dr. Cuauhtémoc Villareal Treviño por brindarme la cepa de mosquitos establecida en el Centro Regional de Salud Pública de Tapachula Chiapas y por responderme a la brevedad las dudas que surgieron con el manejo, reproducción y disección de estos, aunque se encontraba lejos, la comunicación fue excelente.

También quisiera agradecer al Dr. José Ramos Castañeda por proporcionarnos la línea celular C6/36 y medios para el cultivo de estas, sin ellas no hubiera habido un avance en la realización de este proyecto, estoy en deuda aún con usted, muchas gracias.

Le agradezco la Dra. Maribel por darme la oportunidad de darles prácticas a sus alumnos de inmunología, me hizo tener más confianza al momento de pararme frente a personas, punto importante en mi desarrollo tanto personal como profesional.

Se le agradece al Dr. Edith por esas platicas amenas que se tenían, cortas pero necesarias, que siempre brindaban al final una moraleja, por ayudar a conseguir algunos de los medicamentos necesarios para el desarrollo del proyecto y hacer las tramas de vuelo junto con su esposa.

Finalmente, pero no menos importante un agradecimiento a LBG. Carlos Abraham Pérez Herrera y a LBG. Lizbeth Guadalupe Chávez Ramos por darme la bienvenida, orientarme en la manera de trabajar en el laboratorio y enseñarme a manejar las líneas celulares. Al LBIOM. José Antonio Ramos Camacho por enseñarme claves dicotómicas para diferenciar las larvas de Aedes y estar presente en los primeros desafíos con dengue en mi primer año de maestría apoyando a la LBIOM. Marleth Cazares con el desarrollo de su tesis, de igual manera a la niña C. Ileana Ibed Velarde Prieto por estar presente con el desarrollo de la tesis de LBIOM. Marleth y quedarse en el laboratorio siempre conmigo.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	II
RESUMEN .....	III
ABSTRACT .....	V
<b>I INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 ENFERMEDAD DE DENGUE .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.1 Clasificación del Dengue .....</b>	<b>4</b>
2.1.1.1 Dengue no grave.....	4
2.1.1.2 Dengue sin signos de alarma .....	4
2.1.1.3 Dengue con signos de alarma .....	5
2.1.1.4 Dengue grave.....	5
<b>2.2 EPIDEMIOLOGÍA .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 DIAGNÓSTICO .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3.1 Métodos de detección directa del virus .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3.2 Métodos de detección indirecta (serológicos).....</b>	<b>7</b>
<b>2.4 TRATAMIENTO.....</b>	<b>8</b>
<b>2.5 AGENTE ETIOLÓGICO .....</b>	<b>8</b>
<b>2.7 HOSPEDERO .....</b>	<b>10</b>
<b>2.6 VECTOR .....</b>	<b>10</b>
2.6.1 Huevo .....	11
2.6.2 Larva.....	11
2.6.3 Pupa .....	12
2.6.4 Adulto.....	12
<b>2.8 MÉTODOS DE CONTROL VECTORIAL.....</b>	<b>12</b>
<b>2.9 TIPOS DE TRANSMISIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE .....</b>	<b>13</b>
<b>2.9.1 Entre humanos (transmisión horizontal y vertical) .....</b>	<b>13</b>
<b>2.9.2 Mosquitos (Transmisión sexual, transovárica y por coprofagia).....</b>	<b>15</b>

<b>III</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>17</b>
<b>IV</b>	<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>V</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>20</b>
<b>VI</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
	<b>6.1 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>21</b>
	<b>6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>21</b>
<b>VII</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
	<b>7.1 LUGAR DE OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....</b>	<b>22</b>
	<b>7.2 TIPO DE ESTUDIO .....</b>	<b>22</b>
	<b>7.3 MUESTRA .....</b>	<b>22</b>
	<i>7.3.1 Tamaño de la muestra .....</i>	<i>22</i>
	<i>7.3.2 Tipo de muestreo .....</i>	<i>22</i>
	<i>7.3.3 Criterios de inclusión .....</i>	<i>22</i>
	<i>7.3.4 Criterios de exclusión .....</i>	<i>22</i>
	<i>7.3.5 Criterios de eliminación.....</i>	<i>23</i>
	<b>7.4 METODOLOGÍA.....</b>	<b>23</b>
	<i>7.4.1 Diseño metodológico .....</i>	<i>23</i>
	<i>7.4.2 Procedimiento .....</i>	<i>23</i>
	7.4.2.1 Cría y reproducción de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .....	23
	7.4.2.2 Efecto citopático y replicación viral .....	24
	7.4.2.3 Extracción viral.....	25
	7.4.2.4 RT-PCR.....	25
	7.4.2.4.1 Síntesis de ADN complementario (ANDc).....	25
	7.4.2.4.2 Detección molecular de DENV.....	26
	7.4.2.5 Ensayos de placa.....	27
	7.4.2.5.1 Siembra de células C6/36 .....	27
	7.4.2.5.2 Titulación del virus .....	27
	7.4.2.5.3 Lectura de placas .....	28
	7.4.2.6 Inmunofluorescencia indirecta.....	28
	<i>7.4.3 Transmisión del DENV a ratones BALB/c .....</i>	<i>29</i>

7.5 LUGAR DE REALIZACIÓN .....	30
7.6 FINANCIAMIENTO .....	30
<b>VIII RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
8.1 REPLICACIÓN VIRAL .....	31
8.2 REPRODUCCIÓN DE MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i> .....	31
8.3 TITULACIÓN DE DENV EN LÍNEA CELULAR C6/36 .....	32
8.4 DETECCIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE POR RTqPCR .....	32
8.5 DETECCIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE POR INMUNOFLUORESCENCIA. ....	33
8.6 EFECTO CITOPÁTICO .....	35
8.7 TRANSMISIÓN HORIZONTAL LARVA-LARVA POR EXCRETAS .....	36
8.7.1 <i>Detección del virus del dengue por RTqPCR de excretas</i> .....	36
8.7.2 <i>Detección del virus del dengue en imagos infectados mediante la exposición a excretas     obtenidas de la transmisión horizontal larva-larva.</i> .....	37
8.8 TRANSMISIÓN DEL DENV A RATONES BALB/C .....	38
8.8.1 <i>Control positivo para la transmisión del DENV a ratones BALB/c</i> .....	38
<b>IX DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
<b>X CONCLUSIONES .....</b>	<b>50</b>
<b>XI PERSPECTIVAS .....</b>	<b>51</b>
<b>XII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Conteo leucocitario de los distintos grupos inmunosuprimidos y grupo control.	40
<b>Tabla 2.-</b> Conteo leucocitario del grupo control y grupo de estudio infectados por la picadura del mosquito control. ....	41
<b>Tabla 3.-</b> Conteo leucocitario del grupo control y positivos por medio de la inoculación directa del stock viral.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Estructura del virus del dengue.....	9
<b>Figura 2.-</b> Etapas de la vida de los mosquitos <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> .....	11
<b>Figura 3.-</b> Diferentes etapas del desarrollo del mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	31
<b>Figura 4.-</b> Placa de 24 pocillos utilizada para la titulación del virus tipo 2..	32
<b>Figura 5.-</b> RTqPCR para DENV-2. ....	33
<b>Figura 6.-</b> Inmunofluorescencia de células C6/36 infectadas con DENV-2. ....	34
<b>Figura 7.-</b> Efecto citopático en células C6/36 producido por dengue virus tipo 2. ....	35
<b>Figura 8.-</b> RTqPCR para la presencia de DENV-2 en excretas de larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	36
<b>Figura 9.-</b> RTqPCR para la detección de DENV-2 en Imagos expuestos desde sus etapas larvarias a excretas de larvas infectadas. ....	37
<b>Figura 10.-</b> <i>Aedes aegypti</i> alimentándose con harina de sangre infectada con DENV-2. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Figura 11.-</b> RTqPCR para el control positivo de infección para el DENV-2.....	39
<b>Figura 12.-</b> Mosquitos control positivos <i>Aedes aegypti</i> alimentandose del ratón Balb/C..	40
<b>Figura 13.-</b> RTqPCR para el grupo de estudio infectado por la picadura del control positivo con DENV-2.....	42
<b>Figura 14.-</b> RTqPCR para el grupo de estudio infectado por la inoculación del stock viral con DENV-2. ....	44

## RESUMEN

**Introducción:** El dengue es una enfermedad de etiología viral clasificada como una patología de carácter emergente y reemergente, provocada por el virus del dengue (DENV), un *Flavivirus* perteneciente a la familia *Faviviridae*, transmitido por vía horizontal al humano mediante la picadura de hembras hematófagas del género *Aedes*, principalmente la especie *Aedes aegypti*. Así mismo, se ha documentado que la infección DENV podría transmitirse entre humanos y ocasionar problemas de salud en neonatos (transmisión transplacentaria) independientemente del contacto mosquito-persona, sin embargo, este tipo de infecciones es poco frecuente. En cuanto a la transmisión viral entre mosquitos, se han determinado tres vías: sexual, transovárica y por coprofagia (excreción viral larva-larva), y han sido hipotéticamente relacionadas con el mantenimiento del virus en la naturaleza en bajos periodos de viremias en humanos. En cuanto a este último tipo de transmisión horizontal (larva-larva), se desconoce su implicación como un mecanismo epidemiológico natural y sus consecuencias en salud pública aún no se han dilucidado. Por tal motivo, y en referencia a que la única manera de bajar la incidencia de los casos de dengue en la población mundial es controlando las poblaciones de mosquitos vectores y el contacto con los mismo, es de suma importancia evidenciar y establecer con claridad cuáles son los elementos determinantes que engloban la transmisión del dengue para instaurar mejoras en las medidas de prevención, control y vigilancia de esta etiología.

**Objetivo:** Evaluar la capacidad vectorial de *Aedes aegypti* mediante el mecanismo de infección horizontal del virus del dengue larva-larva.

**Hipótesis:** Los mosquitos infectados con el virus del dengue por la vía horizontal larva-larva, tienen la capacidad de transmitir el virus de forma horizontal al hospedero.

**Materiales y métodos:** Se replicó el virus en células C6/36, titulación del virus con el sobrenadante mediante ensayos de placas, exposición de las heces con partículas virales del dengue para la infección del vector en sus distintas fases (larva, pupa, mosquito adulto), completando el ciclo de transmisión a través de ratas Balb/C y la confirmación de la infección por RT-qPCR.

**Resultados:** Los mosquitos inmaduros al ser expuestos con excretas contaminadas con el virus del dengue al término de su metamorfosis y al convertirse a imagos emergen como potencialmente infecciosos. La dosis de inmunosupresión adecuada para los ratones Balb/C es de 2 mg por cada 20 g de peso, la infección de imagos hembras por medio de sangre desfibrinada y virus es adecuada para la transmisión del virus a un modelo murino, la inoculación directa de DENV a ratones Balb/C inmunosuprimidos hace que se infecten.

**Conclusión:** Los mosquitos *Aedes aegypti* en estadios inmaduros que son expuestos a excretas de larvas infectadas con el DENV al culminar su desarrollo biológico y llegar a su fase de imago son potencialmente infectivos y el ambiente acuático en el que se desarrollaron es un reservorio para el virus del dengue.

**Palabras clave:** Dengue, *Aedes aegypti*, vector, larva, pupa, mosquito adulto, virus, inmunofluorescencia indirecta, RTq-PCR.

## ABSTRACT

**Introduction:** Dengue is a disease of viral etiology classified as an emerging and re-emerging pathology, caused by the dengue virus (DENV), a Flavivirus belonging to the Faviviridae family that is transmitted horizontally to humans through the bite of females. bloodsuckers of the genus *Aedes*, mainly the species *Ae. aegypti*. Likewise, it has been documented that the DENV infection could be transmitted between humans and cause health problems in neonates (transplacental transmission) regardless of mosquito-person contact; however, this type of infection is rare. Regarding viral transmission between mosquitoes, three have been determined: sexual, transovarian and larva-larva viral excretion, and have been hypothetically related to the maintenance of the virus in nature in low periods of viraemia in humans. Regarding this last type of horizontal transition (larva-larva), its implication as a natural epidemiological model is unknown and its consequences for public health have not yet been elucidated. For this reason, and in reference to the fact that the only way to lower the incidence of dengue cases in the world population is by controlling the populations of vector mosquitoes and contact with them, it is extremely important to demonstrate and clearly establish which are the determinant elements that encompass the transmission of dengue to establish improvements in the measures of prevention, control and surveillance of this etiology.

**Objective:** To evaluate the vector capacity of *Aedes aegypti* through the horizontal infection mechanism of the larva-larva dengue virus.

**Hypothesis:** Mosquitoes infected with the dengue virus through the horizontal larva-larva route have the capacity to transmit the virus horizontally to the host.

**Materials and methods:** The virus replicated in C6/36 cells, titration of the virus with the supernatant using plaque assays, exposure of feces with dengue viral particles for infection

of the vector in its different phases (larva, pupa, adult mosquito), completing the transmission cycle through Balb/C rats and confirmation of infection by RTq-PCR.

**Results:** Immature mosquitoes were exposed to excreta contaminated with the dengue virus at the end of their metamorphosis and became emerging imagos as potentially infectious. The appropriate immunosuppression dose for Balb/C mice is 2 mg per 20 g of weight, infection of female imagos through defibrinated blood and virus is suitable for transmission of the virus to a murine model, direct inoculation of DENV causes immunosuppressed Balb/C mice to become infected.

**Conclusion:** *Aedes aegypti* mosquitoes in immature stages that are exposed to excreta from larvae infected with dengue virus at the end of their biological development and reach their imago phase are potentially infective and the aquatic environment in which they developed is a reservoir for the dengue virus.

**Keywords:** Dengue, *Aedes aegypti*, vector, larvae, pupae, adult mosquito, virus, indirect immunofluorescence, RTq-PCR.

# I INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad transmitida a los humanos por la picadura de mosquitos (en mayor medida *Aedes aegypti* y en menor medida *Ae. albopictus*) infectados con cualquiera de los cinco serotipos del virus del dengue (DENV-1, DENV-2, DENV3, DENV4 y DENV-5); y se presenta en todas las regiones tropicales y subtropicales del planeta. En los últimos años ha aumentado el número de casos de dengue y se ha catalogado como una enfermedad emergente y reemergente, considerándose un problema de salud pública tanto a nivel nacional como mundial (Mata et al., 2020).

Se ha referenciado que la configuración epidemiológica de dengue podría estar relacionada al incremento de la población y las actividades antropogénicas como el cambio de uso de suelo para la construcciones de viviendas, propiciando el aumento de los criaderos de los mosquitos vectores y por lo tanto el contacto con los mismos, así mismo, este tipo de actividades aumenta el riesgo de distribución geográfica de los vectores y por ende de los serotipos virales, que en ocasiones pueden ser más virulentos por el marco evolutivo y causar infecciones graves que comprometan la vida de una población en particular (Peña León et al., 2021).

En cuanto a la epidemiología del dengue, se estiman alrededor de 5,2 millones de casos a nivel mundial en el 2019 y se considera que para las Américas ha sido el año de mayor registro de positividad., Respecto a México los casos confirmados por esta patología viral presentó un incremento del 226% en el número de casos con respecto al año 2018, siendo los estados del sur los una mayor prevalencia en la distribución de la enfermedad; por su parte, el estado de Sinaloa también presenta la transmisión de la enfermedad con aparente estacionalidad (Arredondo-García et al., 2020).

El vector *Aedes* cuenta con un ciclo de vida holometábolo que comprende dos fases claramente clasificadas en acuáticas (huevo, larva y pupa) y terrestre o aérea (adulta/imago)

(Aldama, 2001) esta última etapa es la que representa importancia en la transmisión de la enfermedad entre humanos-mosquitos debido a que el contacto mosquito-humano entra en una fase infectiva comúnmente marcada por la ingesta de sangre y alta tasa de picadura (Guerrero et al., 2020). Este ciclo de transmisión del virus del dengue que se encuentra mediado por el vector y el hospedero, se le ha denominado transmisión horizontal.

Aunado a lo anterior, hay otra forma de transmisión en la cual están implicados los humanos denominada transmisión vertical; la cual se puede llevar a cabo cuando una mujer embarazada adquiere la infección y se la transmite al feto, propiciando abortos espontáneos, bajo peso del producto biológico, complicaciones oftalmológicas y muerte, durante su desarrollo o el nacimiento (Evans-Gilbert, 2020).

En los mosquitos la transmisión vertical del DENV se lleva a cabo principalmente en el género *Aedes* y es denominada transovárica. Esto ocurre de forma natural por medio de la transmisión horizontal (mosquito-mosquito) tipo sexual, haciendo posible que las distintas generaciones se desarrollen con la infección desde el inicio de su ciclo biológico, este tipo de transmisión es de vital importancia ya que el virus del dengue puede mantener su replicación hasta la etapa adulta de los mosquitos hembra (Heath et al., 2020).

Recientemente se ha encontrado una nueva transmisión del virus por coprofagia (Hamel et al., 2024; Torres-Montoya et al., 2022), la cual es de tipo horizontal ya que se lleva a cabo por la ingesta de heces infectadas con partículas virales infecciosas, se sabe que este nuevo mecanismo de infección podría contribuir de manera positiva el ciclo de transmisión de la enfermedad, sin embargo, aún no se ha dilucidado si por esta vía el mosquito transmisor del DENV podría transmitir el virus por vía horizontal clásica, por tal motivo es importante dilucidar este mecanismo y establecer este ciclo infectivo ya que contribuiría a establecer medidas de prevención y control vectorial de una manera más efectiva y por ende bajar los

casos de dengue en la población humana. En este contexto, se ha planteado como objetivo determinar la transmisión del DENV en vertebrados tomando como infección primaria la transmisión entre larvas por medio del mecanismo coprofágico previamente establecido.

## **II ANTECEDENTES**

### **2.1 Enfermedad de Dengue**

El dengue es una enfermedad infecciosa sistémica de etiología viral, transmitida por un virus de la familia *Flaviviridae*, el cual es transmitido al ser humano por la picadura de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* en menor medida, siendo la virosis humana más importante transmitida por artrópodos (Mata et al., 2020; Rivera & Rodríguez, 2010).

#### **2.1.1 Clasificación del Dengue**

##### **2.1.1.1 Dengue no grave**

La enfermedad puede cursar de manera asintomática o con síntomas leves, sin embargo, en algunas ocasiones pueden presentarse como una enfermedad grave, en lactantes, niños y adultos mayores, los síntomas pueden presentarse con un promedio de 4 a 10 días después de la picadura del mosquito los cuales representan el periodo de incubación del virus, pueden durar entre 2 a 7 días (A. H. Rivera & Rodríguez, 2010). La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a la enfermedad en dos categorías principales: dengue (con y sin síntomas de gravedad) y dengue grave (Gutiérrez, 2022).

##### **2.1.1.2 Dengue sin signos de alarma**

Se puede considerar como dengue sin signos de alarma a aquella enfermedad en la cual se presenta fiebre de 40 °C con 2 a 7 días de evolución acompañada de al menos dos de los siguientes síntomas: náuseas, vómitos, cefalea, dolor retroorbitario, exantema, mialgia, artralgia, petequias o prueba del torniquete positiva y leucopenia (Organización Panamericana de la Salud, 2022; Tercero & Fernández, 2019).

### **2.1.1.3 Dengue con signos de alarma**

Se clasifica en dengue grave cuando todo caso de dengue cerca a la caída de la fiebre presente uno o más de los siguientes síntomas: dolor abdominal intenso, dolor a la palpación del abdomen, vomito persistente, acumulación de líquido (en cavidad abdominal, pulmones y corazón), hepatomegalia, sangrado de mucosas, aumento del hematocrito, irritabilidad y lipotimia (Tercero & Fernández, 2019).

### **2.1.1.4 Dengue grave**

Se clasifica como dengue grave a aquella enfermedad que presenta uno o más de las siguientes manifestaciones clínicas: daño de órganos (daño hepático, corazón u otros órganos), sangrado grave (melena, hematemesis, metrorragia, sangrado del sistema nervioso central), dificultad para respirar y choque respiratorio (Chanthick et al., 2018; Malavige & Ogg, 2017; Tercero & Fernández, 2019).

## **2.2 Epidemiología**

En las últimas décadas ha aumentado la incidencia del dengue a nivel mundial, según estimaciones basadas en modelos se generan aproximadamente 390 millones de nuevos casos anuales, según la OMS el número de notificados en la última década se ha multiplicado por ocho desde 505,430 casos en el año 2000 a más de 2,4 millones en el 2010 y 5,2 millones en el años 2019, además las muertes notificadas entre los años 2000 y 2015 pasaron de 960 a 4032 (OMS, 2022).

En las Américas, en el año 2019, entre la semana epidemiológica 1 y 40 se notificaron un total de 2,499,034 número de casos, con una incidencia de 251.97 por cada 100,000

habitantes; este año ha sido el de mayor número de casos registrados, con pico máximo en la semana 14, desde el año 1980, además la tasa de crecimiento de la curva entre la semana 1 y la 17 fue del 383% y los países con el mayor número de casos reportados hasta la semana 40 son: Brasil, Nicaragua, Perú, Colombia y México (Gutiérrez, 2022). Para el año 2022 se notificaron un total de 2,812,204 casos de dengue, con una incidencia acumulada de 283.47 casos por 100.000 habitantes, en este año el punto máximo de infección se registró en la semana 18, teniendo una tasa de crecimiento del 482% entre la semana 1 hasta la 18, los mismos países del año 2019 con el mayor número de casos reportados (Brasil, Nicaragua, Perú, Colombia y México) fueron para el año 2022 (PAHO, 2023).

En México se ha observado brotes desde el 2010; los brotes corresponden a los años 2007, 2009, 2012, 2013 y 2019 con 41,505 casos, cerrando con un crecimiento del 226% en comparación con el año 2018, siendo los estados con mayor prevalencia Jalisco, Veracruz, Chiapas, Quintana Roo y Oaxaca (Arredondo-García et al., 2020).

En Sinaloa según la Dirección General de Epidemiología (DGE) del año 2016 al 2018 se notificaron 8,317 y 789 casos probables y confirmados (Torres-Avendaño et al., 2021). El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) para el estado, en el año 2022 se reportaron 2,953 casos confirmados, sin embargo, para el año 2023 bajaron los casos reportados con un total de 1,778, por su parte para la semana epidemiológica 22 para el estado se reportaron 787 con una tasa 24.199 por cada 100,000 habitantes.

### **2.3 Diagnóstico**

El diagnóstico eficaz y preciso del DENV es de vital importancia para la atención oportuna del paciente, detección temprana de los casos más graves, teniendo como el diagnóstico diferencial con otras enfermedades infecciosas, el control y vigilancia de brotes, así como el

desarrollo de investigación académica, el desarrollo de vacunas y ensayos clínicos (Hoyos, 2022).

La elección del método de diagnóstico dependerá de la finalidad para la cual se realiza la prueba, entre los métodos existentes para la confirmación de la infección del virus del dengue se encuentran la detección del virus, el ácido nucleico del virus, anticuerpos u antígenos. Es importante conocer la fecha del inicio de los síntomas para asociarlo a la prueba de diagnóstico necesaria ya que el tiempo de la enfermedad está asociada directamente a la carga viral (presente del día 1 al 7 del inicio de los síntomas) y al título de anticuerpos (de los días 5 al 10 para IgM y después de la primera semana va aumentando de forma gradual IgG siendo detectable en el suero hasta varios meses después de la infección) (Hoyos, 2022; Sati, 2021).

### **2.3.1 Métodos de detección directa del virus**

El virus puede detectarse en sangre durante los primeros días de la infección, entre los métodos se encuentran la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a una reacción de retrotranscripción (RT-PCR), además de pruebas dirigidas a detectar la presencia de una de las proteínas presentes en el virus, la proteína NS1 (Hoyos, 2022).

### **2.3.2 Métodos de detección indirecta (serológicos).**

Entre los métodos serológicos se encuentran la inmunoadsorción enzimática (ELISA), la cual puede confirmar una enfermedad reciente o antigua mediante la detección de inmunoglobulinas contra el DENV. Los anticuerpos de IgM se pueden detectar una semana después del inicio de las manifestaciones clínicas, pero desaparece alrededor de dos meses de presentarse la infección por lo que la presencia de esta inmunoglobulina indica una infección reciente del dengue. Por otra parte, ELISA también puede detectar IgG pero este

anticuerpo tarda más tiempo en aparecer y permanece años en el organismo, lo que resulta que la presencia de esta indicaría una infección antigua (Hoyos, 2022).

## **2.4 Tratamiento**

No se cuenta con un tratamiento específico antiviral para el dengue. Se ha demostrado que el interferón alfa si es suministrado durante el comienzo de la enfermedad es capaz de evitar la evolución de la infección hacia dengue grave, evitando sus complicaciones (Mata et al., 2020).

En el manejo de la enfermedad solo se receta paracetamol al paciente para tratar los síntomas además de evitar la ingesta de AINE (medicamentos antiinflamatorios no esteroideos) por ejemplo, ibuprofeno y aspirina, ya que estos medicamentos son anticoagulantes llevando a empeorar el pronóstico de la enfermedad hemorrágica. Se recomienda a los pacientes guardar reposo y mantenerse hidratados, además de estar en vigilancia médica cuando se clasifica en dengue con signos de alarma y dengue grave (Tercero & Fernández, 2019).

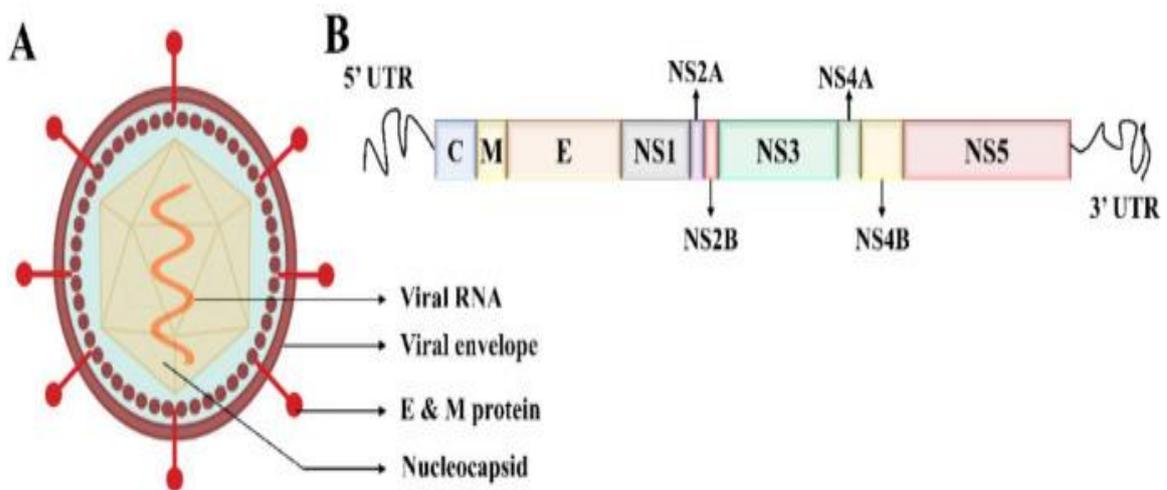
## **2.5 Agente etiológico**

El virus del dengue (DENV) es un arbovirus (abreviación en inglés “arthropod-born” que se traduce como transmitida por artrópodos) y pertenece al género Flavivirus, la partícula del DENV es esférica con un diámetro aproximado de 40 a 50 nm que contiene múltiples copias de las tres proteínas estructurales, la membrana que es derivada del huésped y una copia de RNA de cadena sencilla y sentido positivo (Li & Kang, 2022).

El genoma del virus se encuentra constituido por alrededor de 11 kb que contiene un marco de lectura abierto, codifica para tres proteínas estructurales la proteína de la cápside (C), proteína de membrana (M) y proteína de la cubierta (E) y siete proteínas no estructurales

(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) implicadas en la replicación, el ensamblaje del virión así como también en la evasión de la respuesta inmunitaria a través de las interacciones proteína-proteína y reacciones enzimáticas (Li & Kang, 2022; Songprakhon et al., 2020).

El virus del dengue se clasifica en 5 serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 y DENV-5) bien identificados, los cuales pueden presentar variantes antigénicas y serológicas diferentes, además de presentar variantes genéticas (genotipos y tototipos) dentro de un mismo serotipo lo que conlleva a relacionar estas diferentes variantes con la virulencia y procedencia geográfica de la cepa, donde la primoinfección proporciona inmunidad parcial y temporal para el resto de los serotipo e inmunidad vitalicia para el serotipo en cuestión (Contreras et al., 2021; Tercero & Fernández, 2019).



**Figura 1. Estructura del virus del dengue.** Ilustración tomada de artículo: *detección del dengue: avances en herramientas de diagnóstico desde la tecnología convencional hasta el punto de atención* (Kabir et al., 2021).

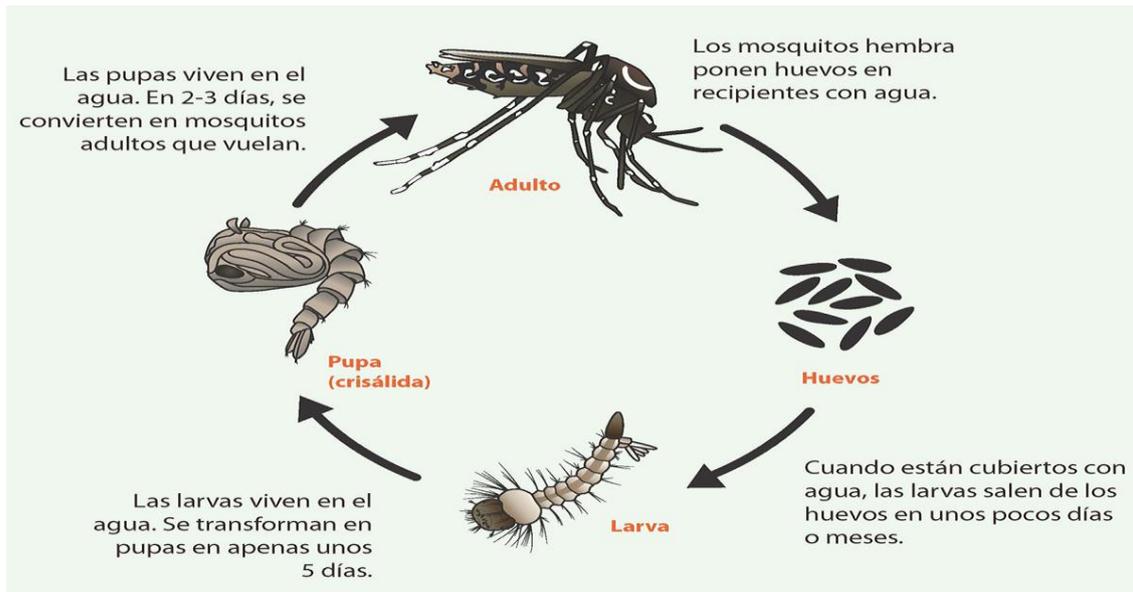
## 2.7 Hospedero

Los humanos son el principal hospedero; el virus que se encuentra circulando en el torrente sanguíneo de las personas virémicas son ingeridos por mosquitas hembras durante su alimentación, el virus infecta el intestino medio de los *Aedes* y posteriormente se distribuye en su sistema durante un periodo de 8 a 12 días, se disemina a través de la lámina basal a las glándulas salivales por medio de la circulación, donde se replica en estas células, tras volver a alimentarse la mosquita hembra regurgita saliva hacia la sangre del hospedero para que el virus vuelva a replicarse en células del sistema fagocítico mononuclear, células de la médula ósea, hígado, tejido linfoide, bazo e histiocitos de la piel (A. H. Rivera & Rodríguez, 2010).

## 2.6 Vector

El principal vector es el mosquito *Aedes aegypti*, el cual es una especie cosmopolita que se presenta en todo el mundo dentro de las isoterms de 20 °C, es originario del continente africano, se conocen tres variantes principales *Ae. aegypti* var. Tipo, *Ae. aegypti* ssp. *formosus* y *Ae. aegypti* var. *queenslandensis* (García, 2018). La variante tipo A es la más distribuida en el mundo, tiene una preferencia doméstica en su ciclo de vida, se encuentra en trópicos y subtropicos a una altura de 1760 metros sobre el nivel del mar, sin embargo se ha demostrado su presencia en alturas de más de 2000 metros sobre el nivel del mar en Colombia y la ciudad de Puebla en México (Dehesa-López & Gutiérrez-Alatorre, 2019).

*Aedes* presenta dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: la fase acuática o inmadura que a su vez se divide en tres estadios (huevo, larval y pupal) y la fase adulta o aérea correspondiente al mosquito maduro o imago (Aldama, 2001; A. H. Rivera & Rodríguez, 2010).



**Figura 2. Etapas de la vida de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.**

Ilustración tomada del Centro para Control de Enfermedades (CDC, 2022).

### 2.6.1 Huevo

Miden aproximadamente 1 mm de longitud, son ovalados de color blanco hasta pasar a negro cuando se desarrolla el embrión, son depositados por encima del nivel del agua en las paredes de los recipientes, si el ambiente es húmedo y cálido favorece su fecundación a las 48 h pero puede prolongarse hasta 5 días después si las temperaturas bajan, además pueden durar hasta un año en periodos de desecación, otros por su parte pueden eclosionar en los primeros 15 minutos después de su postura al ser mojados (Aldama, 2001; A. H. Rivera & Rodríguez, 2010).

### 2.6.2 Larva

La larva es exclusivamente acuática y tiene dos fases: la de alimentación y de crecimiento. Las larvas de *Aedes* se pueden distinguir a simple vista de otras especies ya que se mantienen de manera casi vertical en la superficie del agua y nadan con movimientos serpentinos y

fotofobia, posee dos espinas laterales del tórax y una hilera de siete a doce escamas del peine y en el octavo segmento abdominal; el periodo de la fase larval a pupa depende de la temperatura, disponibilidad de alimento y el número de larvas en el recipiente pero en condiciones óptimas es en promedio de cinco días pero comúnmente la fase completa dura alrededor de siete a catorce días (Aldama, 2001; A. H. Rivera & Rodríguez, 2010).

### **2.6.3 Pupa**

En esta fase la pupa no se alimenta y también es acuática, de esta emerge el adulto con un promedio de dos a tres días en su metamorfosis; en la base del abdomen tiene dos aletas que le sirven para nadar, una trompeta corta respiratoria, tiene la propiedad de flotar y poder mantenerse en la superficie lo que le facilita la salida del mosquito adulto (Aldama, 2001; A. H. Rivera & Rodríguez, 2010).

### **2.6.4 Adulto**

Es un mosquito de color negro con bandas blancas en las patas y una figura blanca-plateada en forma de lira en la sección del tórax (mesonoto), las hembras se distingue por mantener una posición más horizontal en su reposo y tener palpos más cortos, esta es la fase reproductora (Aldama, 2001; A. H. Rivera & Rodríguez, 2010).

## **2.8 Métodos de control vectorial**

Debido a la ausencia de tratamientos y vacunas para curar o prevenir la enfermedad del dengue se ha optado como mediadas más eficiente, el control del vector, principalmente con el manejo de sus fases inmaduras, de criaderos y la aplicación de larvicidas; así como el

manejo y control de su fase adulta con la implementación de la fumigación a gran escala con insecticidas (Barrera, 2015).

En México, con el propósito de combatir el dengue se han empleado diversas acciones llevadas a cabo por la Secretaría de Salud, como lo son la eliminación de criaderos con campañas que alientan a la población con esta labor, al eliminar, tirar, lavar y vaciar todo tipo de objetos en los que se pueda acumular agua; estas campañas están enfocadas a la sensibilización de la población para reducir el número de depósitos de agua que fungen como criaderos de los mosquitos. También se ha centrado en el monitoreo de la resistencia a los insecticidas recomendados para el control de los vectores (Secretaría de Salud, 2022)

Por otra parte, como un método emergente, se ha optado por la inoculación de *Ae. aegypti* con bacterias intracelulares obligadas bloqueadoras del virus, denominadas *Wolbachia pipientis* haciendo posible que los mosquitos infectados con esta cepa al ser liberados copulen con los mosquitos silvestres desplazando a aquellos que no han sido infectados, visualizándose como resultado el apareamiento en aquellos en los que la progenie está infectada con *Wolbachia pipientis* (Guo et al., 2022; Utarini et al., 2021; Walker et al., 2011).

## **2.9 Tipos de transmisión del virus del dengue**

### **2.9.1 Entre humanos (transmisión horizontal y vertical)**

El ciclo biológico de la enfermedad del dengue ésta mediada por el mosquito vector que transmite el virus a través de la picadura a los humanos y en estos a su vez el virus tiene la propiedad de poder ser transmitido al feto en el caso de mujeres embarazadas al momento de adquirir la infección.

Se ha evidenciado la presencia del virus en recién nacidos presentando hemorragias retinianas y preretinianas, opacidad vítrea y manchas algodinosas de un recién nacido,

demostrando transmisión vertical al presentar serologías positivas en ELISA para la proteína estructural 1, tanto la madre con el hijo (Siqueira et al., 2022).

La infección por DENV en mujeres embarazadas puede estar asociada con resultados adversos como mortalidad materna, neonatal y fetal, además de incrementar los partos por cesárea y mayor sangrado posparto, aunado a esto pueden ocurrir complicaciones como parto prematuro y bajo peso al nacer; por lo tanto, las mujeres embarazadas deben ser consideradas como población de riesgo en el manejo de los programas contra el dengue (Rathore et al., 2022; Watanabe et al., 2022). De igual manera existe otro tipo de mecanismo por el cual un neonato puede adquirir la enfermedad, la cual consiste en adquirir las partículas infecciosas al momento del amamantamiento, ya que una vez infectada la madre que se encuentra en lactancia, el virus puede viajar por todo su organismo y llegar a las glándulas mamarias, saliendo por los conductos galactóforos, infectando al neonato al momento de la alimentación con la leche materna (Desgraupes et al., 2021).

Existen más mecanismos de transmisión en los cuales no está involucrado el vector directamente, se han informado numerosos casos de infecciones por arbovirus como Zika, Chikunguña, virus de la fiebre amarilla y entre ellos el virus del dengue al momento de recibir transfusiones sanguíneas, desde el año 2002 (Giménez-Richarte et al., 2022).

Del mismo modo existe la posibilidad de adquirir el virus del dengue al recibir un trasplante de órganos, provocando complicaciones o muerte del paciente por la arbovirosis adquirida y no por las consecuencias propias del trasplante, en Francia se toman en cuenta diversos arbovirus de importancia médica al momento de ser donador de órganos y células madre hematopoyéticas, entre los cuales son virus del río Ross, virus Chikungunya, virus Zika, virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo occidental, virus Usutu, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis japonesa y virus del dengue (Pozzetto et al., 2023).

### **2.9.2 Mosquitos (Transmisión sexual, transovárica y por coprofagia)**

Aparte de la transmisión bien conocida mosquito-humano-mosquito, llamada horizontal existe, otro mecanismo denominado vertical, en el cual están implicados solo los mosquitos y depende de los serotipos de DENV, de la cepa y de la especie del mosquito, este tipo de transmisión tiene importancia para la permanencia del virus cuando las condiciones ambientales y climatológicas no son las adecuadas y la reproducción del vector además del resurgimiento dentro de una región (Heath et al., 2020); por ejemplo, se ha demostrado que los cuatro serotipos del virus del dengue en las especies de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* se transmiten de manera sexual a sus descendientes (transmisión transovárica) (Rúa-Uribe et al., 2020). Una vez que un mosquito macho infectado cópula con un mosquito hembra, el virus se transmite a ésta y durante el desarrollo del folículo o la ovoposición, los huevos adquieren dicho virus manteniéndose en latencia durante todas las fases de su desarrollo biológico hasta la etapa de imago (Heath et al., 2020; Im et al., 2022).

Por lo general la transmisión por esta vía es de tan solo el 1%, sin embargo, diversos estudios han concluido que el virus no pudiera mantenerse en la naturaleza sin la transmisión vertical ya que este fenómeno permite al virus del dengue persistir durante periodos adversos permitiendo que el virus se replique hasta que el mosquito cumple su ciclo biológico y la mosquito hembra adulta emerge infectada (Im et al., 2022; Kirstein et al., 2022).

Recientemente se ha demostrado que los mosquitos *Aedes* pueden adquirir la infección del virus del Zika al desarrollarse en ambientes contaminados con bajas concentraciones de partículas virales provocando que imagos hembras puedan transmitir la infección a ratones AG6 (Du et al., 2019), por su parte, Torres-Montoya y colaboradores en el año 2022, demostraron la transmisión horizontal entre las larvas de la especie *Aedes aegypti* por medio de coprofagia ya que al ser infectadas con el virus del dengue tipo cuatro al analizar las heces se encontraron partículas virales infectivas y al ser ingeridas por larvas sanas se podía

replicar el virus en ellas (Torres-Montoya et al., 2022), por otro lado, se ha utilizado a *Culex* para la demostración de la infectividad de partículas del virus del Nilo Occidental presentes en excrementos de imagos, concluyendo que eran infectivas y que tanto larvas como pupas eran susceptibles a estas (Hamel et al., 2024).

### III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dengue es una enfermedad de etiología viral causada por arbovirus transmitidos por la picadura de mosquitos del género *Aedes*, siendo la virosis humana con mayor prevalencia transmitida por artrópodos.

Se ha demostrado que larvas de mosquitos pueden infectarse con el virus del Zika (ZIKV) al exponerse con aguas contaminadas con presencia de esta partícula viral, derivada de orina de pacientes enfermos, resultando en la infección por ZIKV de hembras adultas, logrando infectar a ratones, además se encontró DENV en excretas, evidenciándose que al ser consumidas por larvas *Aedes aegypti* tienen la capacidad de infectarse, sin embargo, no se ha demostrado la capacidad de transmisión de este mecanismo larva-larva en vertebrados para el virus del dengue; así de este modo las larvas podrían infectarse por las partículas virales disueltas en el agua presentes en las heces fecales y llevar el virus en su organismo hasta su última etapa de su ciclo de vida, por lo tanto, se pudiera inferir con base a los antecedentes anteriores que las partículas virales inmersas en los productos de excreción en las larvas de los *Aedes* propiciarían la infección en todas las etapas de su desarrollo biológico culminando en mosquitos hembra adultas, por lo que es de suma importancia evidenciar si estas partículas excretadas presentan capacidad infectiva al ser ingeridas por larvas *Ae. aegypti* hasta su desarrollo en su fase adulta teniendo como resultado que continúe el ciclo de infección con la transmisión horizontal mosquito-humano.

Por lo anteriormente expuesto la presente investigación pretende dar respuesta a la siguiente interrogante:

¿El virus del dengue puede transmitirse a un modelo vertebrado desde el mecanismo de infección horizontal larva-larva?

## IV JUSTIFICACIÓN

El dengue es considerado como la enfermedad transmitida más común por artrópodos, además presenta una distribución mundial extensa. El cambio climático y el desplazamiento de la población en los últimos años han permitido su propagación rápida a todas las regiones tropicales y subtropicales. La incidencia de esta enfermedad ha aumentado considerablemente, y en la actualidad según la organización mundial de la salud se afirma como dato aproximado que la mitad de la población corre el riesgo de contraer el virus del dengue.

Debido a que no hay medicamentos específicos para tratar el dengue y una vacuna prometedora para la inmunización en humanos, los esfuerzos que se han realizado para disminuir la transmisión del DENV se ha centrado en el control del vector, el controlar las poblaciones de los mosquitos vectores y evitar el contacto con los mismos, son las medidas que se utilizan para bajar los casos de esta patología. Sobre este particular, conocer los mecanismos de transmisión del DENV, podrían ser de utilidad para potencializar los métodos de control integrados.

En este contexto y en referencia a la transmisión del DENV en mosquitos, se ha dilucidado recientemente un nuevo mecanismo de transmisión horizontal larva-larva el cual podría explicar la importancia de la aplicación de estrategias para eliminar los criaderos del mosquito transmisor, sin embargo, en la actualidad se desconoce su implicación en la transmisión horizontal mosquito-humano. Por lo que resulta importante evidenciar y establecer con claridad cuáles son los elementos determinantes que engloban la transmisión del dengue para instaurar mejoras en las medidas de prevención, control y vigilancia, logrando de esta manera mayor eficacia.

Al ser demostrada esta trasmisibilidad la presente investigación pudiera sugerir que las excretas presentes en los ambientes acuáticos podrían ser una fuente natural de dengue y ser

potencialmente transmisible a los mosquitos y de estos a sus fuentes de alimentación incluyendo al humano.

## **V HIPÓTESIS**

Los mosquitos infectados con el virus del dengue por la vía horizontal larva-larva, tienen la capacidad de transmitir el virus de forma horizontal al hospedero.

## VI OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad vectorial de *Aedes aegypti* mediante el mecanismo de infección horizontal del virus del dengue larva-larva.

### 6.2 Objetivos específicos

1. Demostrar la infección del DENV durante el desarrollo biológico de *Ae. aegypti*, transmitida por excretas de larvas infectadas.
2. Evaluar la capacidad infectiva de DENV presentes en *Ae. aegypti* adultos infectados expuestos por transmisión horizontal larva-larva.

## VII MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Lugar de obtención de las muestras

Laboratorio de Biología molecular de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa en la ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

### 7.2 Tipo de estudio

El siguiente estudio emplea el método analítico de tipo descriptivo, transversal y experimental de acuerdo con el problema y objetivos planteados.

### 7.3 Muestra

La muestra comprende a *Aedes aegypti* en sus diferentes estadios del ciclo biológico (larvas, pupas y mosquitos).

#### 7.3.1 Tamaño de la muestra

320 larvas de *Aedes aegypti*.

#### 7.3.2 Tipo de muestreo

Muestreo de tipo estratificado.

#### 7.3.3 Criterios de inclusión

- Larvas de *Ae. aegypti* sin DENV.
- Larvas de *Ae. aegypti* sanas y vivas.
- Larvas de *Ae. aegypti* en estadio 3 y 4.

#### 7.3.4 Criterios de exclusión

- Larvas de *Ae. aegypti*. Infectadas con el DENV.

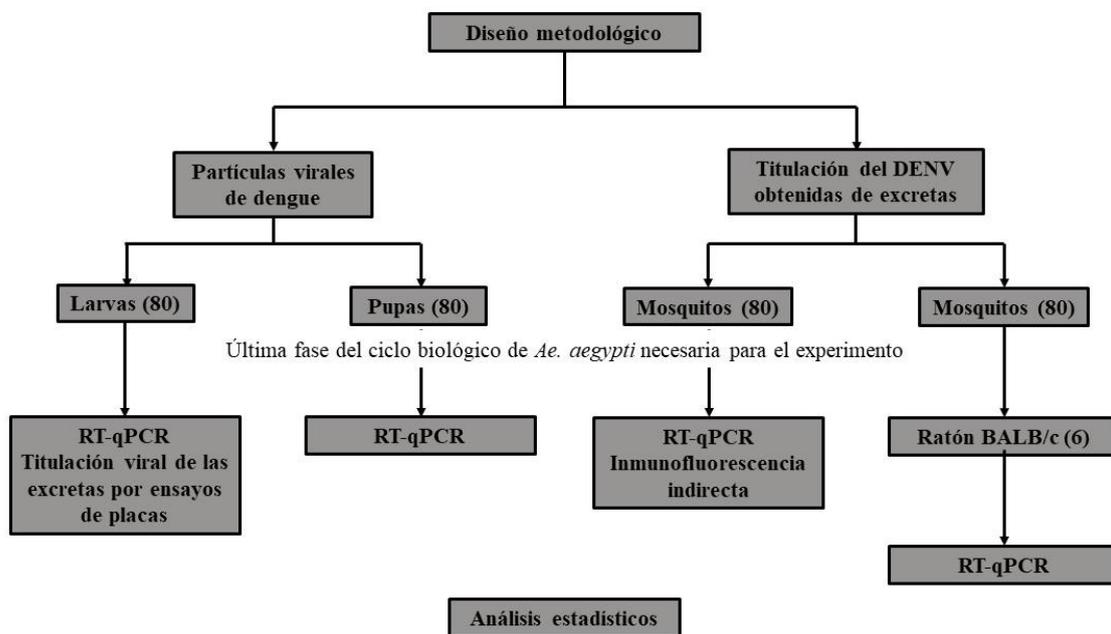
- Larvas de *Ae. aegypti* enfermas y muertas.
- Larvas de *Ae. aegypti*. en estadios menores a 3 y 4.

### 7.3.5 Criterios de eliminación

- Larvas que no sean del género *Ae. aegypti*.

## 7.4 Metodología

### 7.4.1 Diseño metodológico



### 7.4.2 Procedimiento

#### 7.4.2.1 Cría y reproducción de mosquitos *Ae. aegypti*

Se pusieron a eclosionar huevecillos de *Ae. aegypti* en papel filtro en un bidón de 3L cepa Tapachula, Chiapas adquiridas del Centro Regional de Investigación de Salud Pública.

Se humedeció una tira de papel filtro con huevos por espacio de 2h a temperatura ambiente, previa a sumergirlos totalmente. Para lo anterior se tomó un bidón de 5L, se le añadió alrededor de 5 cm de agua purificada a temperatura ambiente y se colocó el papel filtro con los huevecillos. Posteriormente, se esperó de 24 a 48 horas para ver las primeras larvas y se

continuo por un mínimo de 6 días para convertirse a pupa y 14 días para adultos. Las larvas se alimentaron cada 3 días con comida para pescado (1-2 ojuelas). Por su parte para la alimentación de mosquitos macho, se preparó una solución de azúcar mascabada al 5 % con agua purificada, se humedecieron torundas de algodón y se colocaron en las trampas de vuelo. Para la alimentación de los mosquitos hembra se realizó cada 3 días con sangre (cebo humano).

Una vez alimentadas las hembras por primera vez, se colocó un recipiente negro con papel filtro cubriendo las paredes de este, con un nivel de 3 cm de agua, sin dejar que se seque el papel filtro. Después de la ovoposición se retiró del recipiente el papel filtro, se dejó secar a temperatura ambiente y se conservaron en una bolsa de papel para su posterior uso.

#### **7.4.2.2 Efecto citopático y replicación viral**

Se utilizó la línea celular C6/36 pase número 6 y sobrenadante de células de cerebro de ratón infectadas con el DENV-2.

Se sembraron  $5 \times 10^5$  células C6/36 en frasco de cultivo de 75 cm<sup>3</sup> y se incubaron por 24 h a 28 °C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina y 1% de vitaminas (GIBCO), hasta obtener una confluencia de aproximadamente del 80%.

Posteriormente se retiró el medio y las células se incubaron con 1.5 ml de sobrenadante de células de cerebro de ratón infectadas con DENV-2, previamente diluido en medio DMEM (1:10). Se incubaron por 1h a 28 °C con agitación suave cada 5 min. Después, se añadieron 10 ml de medio MEM con 2% de SFB, 1% de penicilina-estreptomicina y 1% de vitaminas. Las células se incubaron por 7 días en mantenimiento y el sobrenadante se almacenó a -70 °C, respectivamente.

### **7.4.2.3 Extracción viral**

Se extrajo el ARN viral con el kit Viral RNA + DNA bajo la metodología establecida por la casa comercial Jena Bioscience como se detalla a continuación: En tubos de 1.5 mL de capacidad se agregó 200  $\mu$ L de sobrenadante de células (C6/36) infectadas con el virus (DENV-4 y DENV-2), así como 200  $\mu$ L de buffer de lisis; se agitó por 15 s. (Select Vortexer, Bioproducts) y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 300  $\mu$ L de buffer de unión y se agitó moderadamente por 10 s. Después, la solución se depositó en columnas de extracción y se centrifugó 13,000 g por 1 min (equipo Centrifugate 5424, eppendorf).

El filtrado fue descartado y se agregaron 500  $\mu$ L de buffer tampón A, se centrifugó por 1 min a 13,000 g. Nuevamente se descartó el filtrado, se añadieron 500  $\mu$ L de buffer B y se centrifugó a 13,000 g por 1 min, respectivamente. Después la columna se transfirió a un colector nuevo (capacidad 1.5 mL) y se añadieron 40  $\mu$ L de agua libre de nucleasas para eluir por 1 min a 13,000 g. El ARN extraído se almacenó a -70 °C. Todo el procedimiento se realizó en frío.

### **7.4.2.4 RT-PCR**

#### **7.4.2.4.1 Síntesis de ADN complementario (ANDe)**

A partir del ARN vírico extraído, se realizó una reacción de retrotranscripción (RT) con el kit SCRIPT cDNA Synthesis (Jena Bioscience) siguiendo el protocolo de la casa comercial. Para el caso de DENV-2, se usó 2  $\mu$ L de ARN y 0.25  $\mu$ L del oligonucleótido D2 (3'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-5'), para cada muestra. En el caso de los controles endógenos para el mosquito y del ratón Balb/C, fueron usados los oligonucleótidos CP-P1B (3'-GTGTTTCGACATGCTTAAATTTAGGGGGTA-5') para ITS-2 y Act  $\beta$  (3'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-5') para  $\beta$ -actina, respectivamente. Por otro lado, se

preparó el mix de reacción de retrotranscripción (RT) en donde se agregó para cada reacción de RT, 2 µl de buffer de reacción GoScript, 0.5 µL de mix de nucleótidos de PCR, 0.25 µL de enzima RNasin recombinante, 0.25 µL de transcriptasa reversa GoScript y 5 µL de agua libre de nucleasas. Las diferentes muestras se calentaron a 70 °C por 5 minutos en un termociclador (BioRad), e inmediatamente después se dejaron reposar los tubos en agua con hielo por 5 minutos. Pasado el tiempo de reposo, se centrifugaron por diez segundos y se les añadió 5.375 µL del mix de RT para la reacción de alineamiento en termociclador a una temperatura de 25 °C por 5 minutos, seguido de un paso de extensión por una hora a 42 °C y se finalizó con la inactivación de la enzima transcriptasa reversa a 70 °C por 15 minutos. Una vez terminado el proceso de retrotranscripción (RT), se almacenó a -70 °C para su posterior uso.

#### **7.4.2.4.2 Detección molecular de DENV**

Se realizó una PCR para la detección de DENV con los oligonucleótidos consenso D1 (5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3') y D2 (3'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-5'), que amplifican una región parcial codificante de la proteína de la cápside y la pre-membrana viral (C/pM) (Lanciotti et al., 1992) con un tamaño de ampliación de 511 pb, como control endógeno para las reacciones del mosquito *Aedes aegypti* CP-P1A (5'-GTGGATCCTGTGAACTGCAGGACACATG-3') y CP-P1B (3'-GTGTTTCGACATGCTTAAATTTAGGGGGTA-5'), que amplifica para el espaciador interno transcrito dos (ITS-2) con un tamaño de banda esperado de 360 pb; como control endógeno para las reacciones del ratón Balb/C ActF β (5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3') y ActR β (3'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-5') que amplifica para el gen de la β-actina con un tamaño de amplicón esperado de 238 pb. Para la mezcla de amplificación por PCR se utilizó el colorante comercial EvaGreen® Plus:

colorante qPCR de próxima generación (Biotium) y consistió en un volumen final de 18.5  $\mu\text{L}$  que contenía 10  $\mu\text{L}$  de EvaGreen, 0.33  $\mu\text{l}$  de cada oligonucleótido (10 pMol), 1.5  $\mu\text{L}$  ANDc y 7.84  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.

La reacción de amplificado se llevó a cabo en un Quant Studio 12K Flex de la marca Applied Biosystems, bajo los parámetros propuestos por Torres-Avendaño et al. (2021), como se describe a continuación: 94°C por 4 min, 35 ciclos (94°C por 1 min, 55°C por 1 min, y 72°C por 1 min), y 2°C por 5 min.

#### **7.4.2.5 Ensayos de placa**

##### **7.4.2.5.1 Siembra de células C6/36**

Se sembraron células C6/36 en un frasco de 75  $\text{cm}^2$  de monocapa completa (5 – 7 días), se decantó el medio y se lavaron las células con PBS 1X, se añadió 1 ml de tripsina, se eliminó el medio e incubaron de 5 a 10 minutos a 28° C. Posteriormente se añadieron 4 ml de medio de crecimiento y se centrifugaron a 1500 RPM a 5 min. Se calculó el número de células necesarias para la prueba con un total de  $2.5 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se incubaron a 28 °C, 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 h.

##### **7.4.2.5.2 Titulación del virus**

Se prepararon 8 disoluciones del virus del dengue en medio DMEM libre de suero; cada tubo contenía 900  $\mu\text{L}$  de medio, al primer tubo se le adicionó 120  $\mu\text{L}$  del virus, se resuspendió y se tomaron de manera seriada 100  $\mu\text{L}$  de la disolución del tubo anterior hasta el último tubo. Una vez preparadas las disoluciones del virus se tomaron las placas de 24 pocillos cultivadas con células C6/36, se aspiró el medio y se lavaron dos veces con PBS 1X y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  por pocillo de cada disolución por duplicado y se incubaron a 28 °C, 5% de  $\text{CO}_2$  durante 1 h moviéndolas ocasionalmente, pasado el tiempo se retiró el DMEM y se les añadió 500  $\mu\text{L}$  de DMEM con carboximetilcelulosa 3%, se dejó temperatura ambiente durante 15 min y

se incubaron a 28 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h. Para su visualización se les añadió paraformaldehído al 4% durante 1 h, se retiró el contenido de las placas y se lavaron con agua destilada, se tiñeron por 5 minutos con cristal violeta al 0.5%.

#### **7.4.2.5.3 Lectura de placas**

Para conocer el título viral resultante de las diluciones se aplicó la siguiente fórmula:

$$P \times 20 \times 10x = \text{ufp/ml}$$

Donde :

P: es el promedio del número de placas obtenido en la dilución en que se contaron las placas.

20: es el factor de corrección para expresar el título en ufp/ml (1000ul/vol inóculo).

10x: representa la dilución en que se contaron las placas (factor de dilución).

#### **7.4.2.6 Inmunofluorescencia indirecta**

##### **7.4.2.6.1 Inmunofluorescencia de células c6/36**

Se cultivaron 90,000 células en cubreobjetos de vidrio redondos en una placa de 24 pocillos. La inmunofluorescencia se realizó 72 h post inoculación. Las células se lavaron con PBS 1X frío y se fijaron con p-formaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron tres veces con PBS 1X por 5 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% durante 10 minutos, se realizaron tres lavados con PBS 1X por 5 minutos. Después de la permeabilización, las muestras se bloquearon con 22,52 mg/ml de glicina, albúmina sérica bovina al 1 %, PBST por 30 minutos. Se retiró el buffer de bloqueo y las muestras se hibridaron con una disolución de anticuerpo primario (anticuerpo contra la glicoproteína E del virus del dengue [DE1] (ab41349)) en buffer de disolución a 1:20 durante 1 h a temperatura ambiente, se retiró el anticuerpo y se lavó tres veces por 5 minutos con

PBS. Posteriormente se lavaron e incubaron con anticuerpo anti-conejo de burro secundario 1:1000 IgG HyL Alexa 488 (Abcam ab150105) durante 1 h a temperatura ambiente, cubiertos de la luz. Finalmente, las muestras fueron lavadas y montadas con Fluoroshield con DAPI (Sigma). Las imágenes se obtuvieron con un aumento de 40x en un Leica LSCM (TCS SP8 Leica Microsystems). La media de la intensidad fluorescente se calculó eligiendo cinco ROI en cada experimento utilizando Leica Application Suite X.

#### **7.4.3 Transmisión del DENV a ratones BALB/c**

Para el control positivo los mosquitos se alimentaron con sangre desfibrinada compuesta por stock viral y suero fetal bovino en una proporción de 5:2:1. Para llevar a cabo lo anterior, los mosquitos se dejaron en inanición por 24 horas y se les alimento por medio de isopos embebidos en la mezcla. Se alimentaron de 2 a 3 h o hasta ver todas las hembras con el vientre hinchado y alimentadas, se dejaron por 10 días para que la infección siguiera su curso natural. Posteriormente se alimentaron con sacarosa al 10% hasta el terminó del ensayo. Una vez demostrada la positividad de DENV en *Aedes aegypti* tanto para el control positivo como para el grupo de ensayo mediante RTqPCR, se dejaron sin alimentación por 24 horas para su alimentación con los ratones Balb/C previamente inmunosuprimidos.

Los ensayos de inmunosupresión de los ratones consistieron en 4 grupos; un grupo control y tres grupos con tratamiento: el primero con acetato de metilprednisolona con una dosis de 5mg/Kg , el segundo con ciclofosfamida con una dosis de 100 mg/Kg y el tercero se hizo una combinación de acetato de metilprednisolona más ciclofosfamida con una dosis disminuida a la mitad por fármaco. Al finalizar los ensayos de inmunosupresión se eligió tratar a los ratones Balb/C con ciclofosfamida a dosis de 100 mg/Kg de peso (dosis: 2 mg/20g) con una inyección intraperitoneal, con dosis cada dos días.

Al cuarto día, posterior a la segunda dosis de inmunosupresión, se colocaron 2 Balb/C de 3 a 8 semanas de vida dentro de la trampa de vuelo, previamente anestesiadas con zoletil®100 (tiletamina y zolazepam) con una dosis de 4 mg/20g de peso. Se permitió que los mosquitos se alimentarán por 1 hora en obscuridad.

Las muestras de sangre se recolectaron al día 0 de la infección y al día 7, tomando una muestra de 20 µL por medió de punción en la cola para hacer conteo de glóbulos blancos, y se realizó detección molecular de la presencia del virus hasta el día 7.

### **7.5 Lugar de realización**

Laboratorio de Microbiología Molecular e Inmunología de la Faculta de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa en la ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

Laboratorios de Biología molecular y Biología de la conservación y Vida Silvestre de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa en la ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

### **7.6 Financiamiento**

Con el folio de beca CONAHCYT 823197

## VIII RESULTADOS

### 8.1 Replicación viral

Como resultado del ensayo de replicación viral en células, se logró obtener alrededor de 50 mL de stock viral de ambos serotipos (dengue tipo 2), y se alicuotaron y etiquetaron para su utilización.

### 8.2 Reproducción de mosquitos *Aedes aegypti*

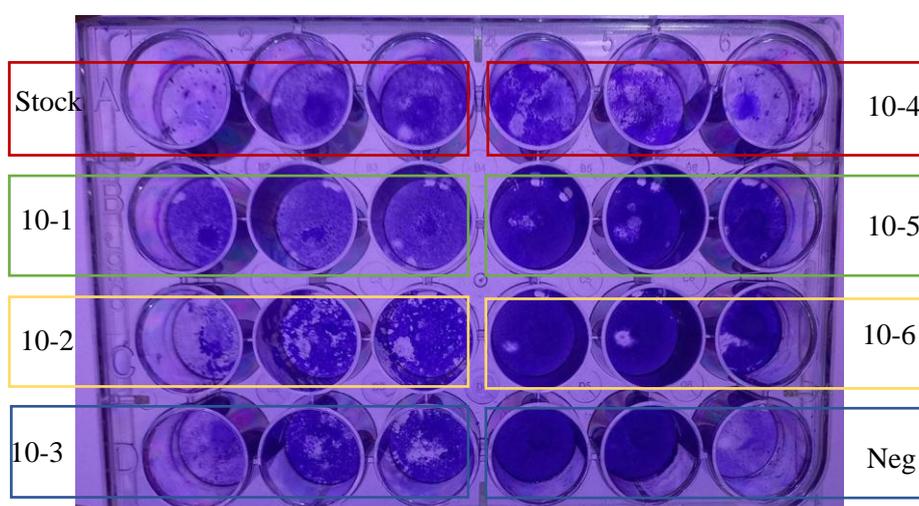
Producto de la activación de huevecillos de moscos cepa Tapachula, Chiapas donadas por el Centro Regional de Investigación de Salud Pública, bajo condiciones controladas de alimentación, tiempo y temperatura ambiente, se logró el desarrollo de los diferentes estadios hasta la fase adulta (Fig. 3). Posterior a la copulación entre mosquitos hembra y machos adultos obtenidos previamente, se produjo un stock de aproximadamente 10,000 huevecillos que serán de utilidad para los estudios subsecuentes (Figura 3A).



**Figura 3.- Diferentes etapas del desarrollo del mosquito *Aedes aegypti*.** En (A) se observa a huevecillos adheridos a papel filtro, en (B) el estadio de larva y en (C) el estadio de pupa.

### 8.3 Titulación de DENV en línea celular C6/36

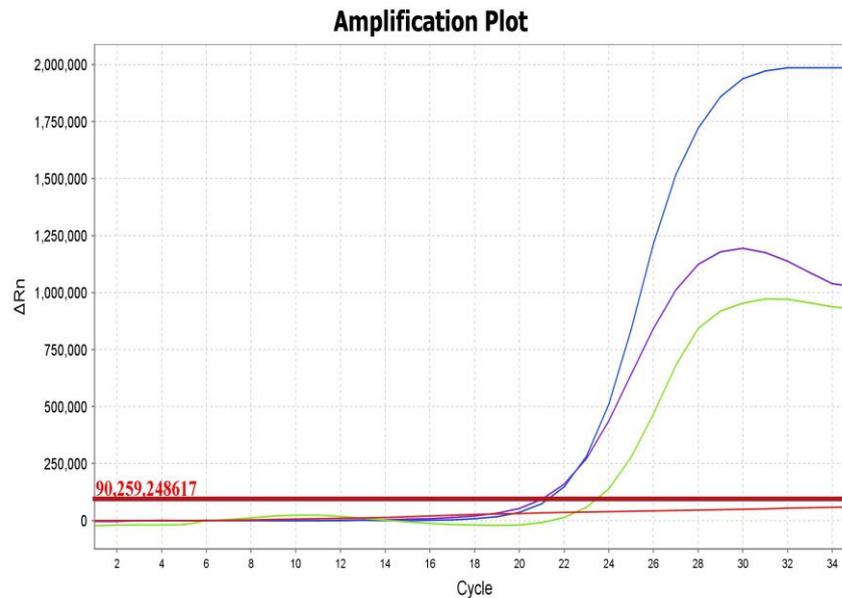
Titulación del virus en la línea celular C6/36 (Fig. 4) se puede observar una monocapa uniforme para el grupo control y destrucción de la monocapa desde el stock hasta la dilución  $10^{-6}$ . A partir de la dilución  $10^{-5}$  se pueden observar la formación de placas teniendo un total de 100000 UFP/mL.



**Figura 4.- Placa de 24 pocillos utilizada para la titulación del virus tipo 2.** Se realizaron repeticiones por triplicado. Los primeros tres pocillos corresponden al control negativo, seguido de las concentraciones seriadas, de mayor a menor concentración. Neg: negativo.

### 8.4 Detección del virus del dengue por RTqPCR

Mediante el ensayo de RTqPCR se pudo demostrar que el título viral fue aumentando con las diferentes repeticiones seriadas del virus, se puede observar un incremento en la concentración con un total de 90259 réplicas, con la curva de amplificación en el ciclo 21 para el stock viral y un poco después la replicación cuatro, por último se puede observar la curva de amplificación de la replicación tres en el ciclo 23 (Fig. 5).

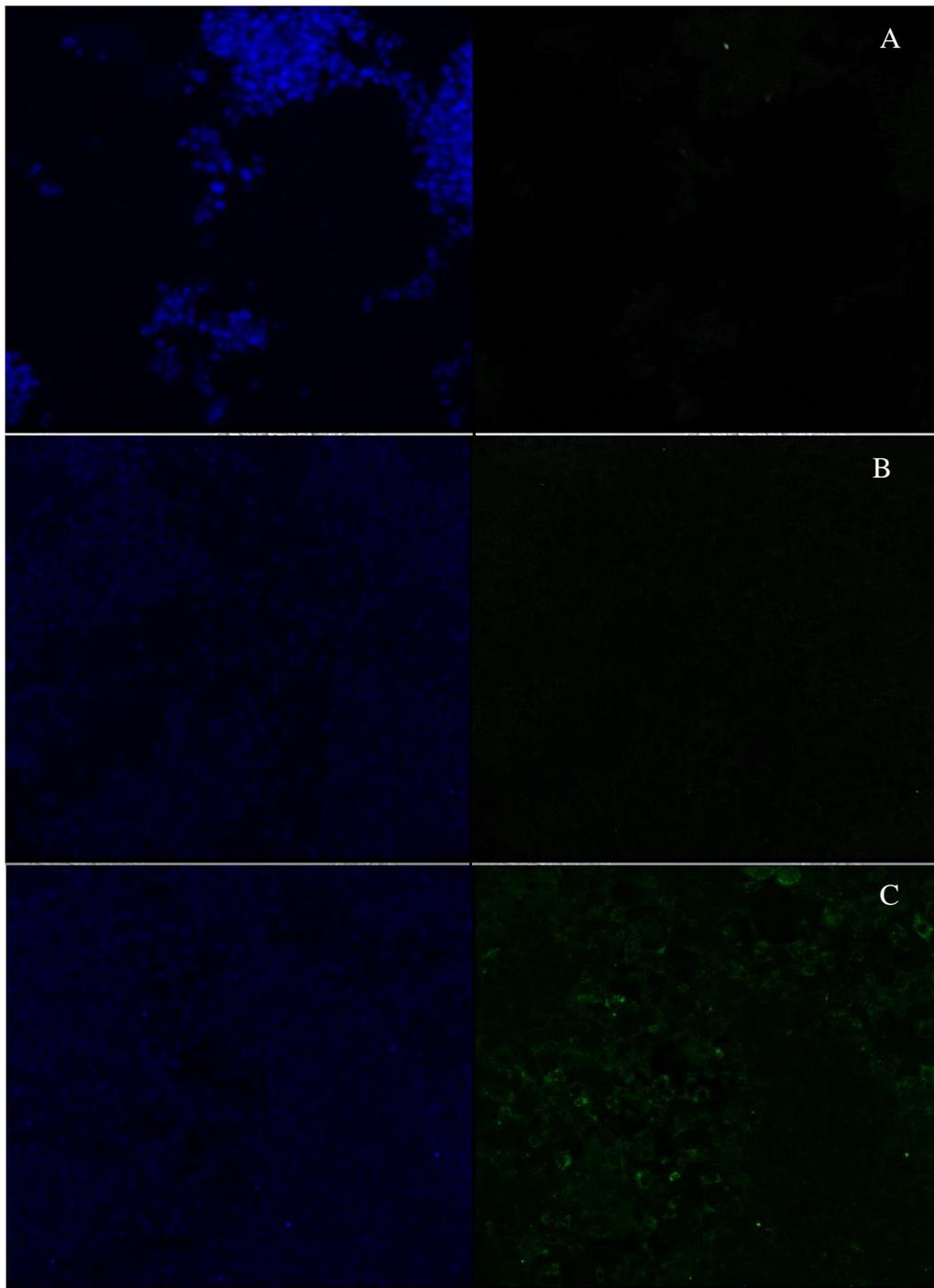


**Figura 5.- RTqPCR para DENV-2.** Se observa de color azul la curva de amplificación para el stock viral, de violeta la curva de amplificación para la replicación cuatro y de color verde la curva de amplificación para la replicación tres.

### 8.5 Detección del virus del dengue por inmunofluorescencia.

Como resultado del ensayo de la inmunofluorescencia con células C6/36, se logró la visualización de los núcleos teñidos de azul y en verde las partículas virales presentes en el citoplasma (Fig. 6).

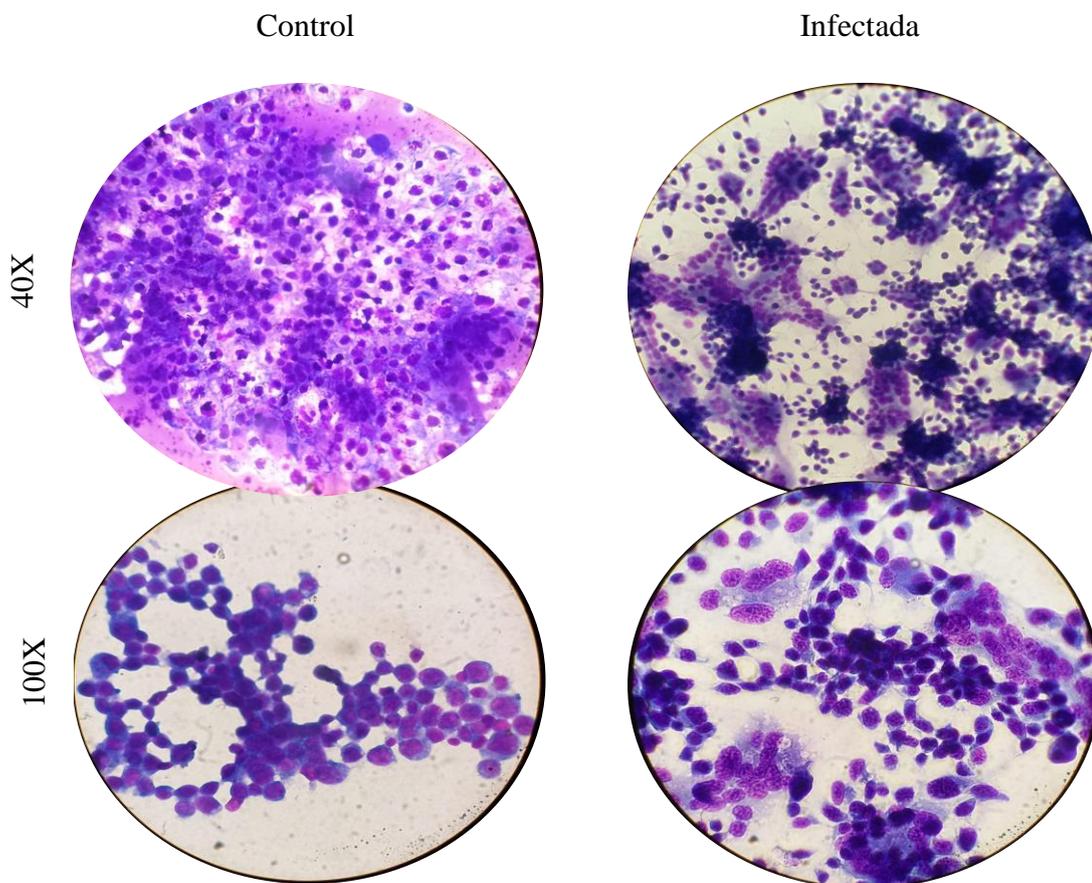
En la imagen A se puede observar al grupo control donde el núcleo de las células está teñido de azul, por su parte en la figura B se observa a células infectadas, pero solo teñidas con el anticuerpo secundario demostrándose la especificidad de este al no observarse fluorescencia en el citoplasma de las células y observándose de azul sus núcleos. Por su parte en la imagen C se observan las células infectadas teñidas de color verde del lado izquierdo y a sus núcleos teñidos de azul del lado derecho, visualizándose que la mayoría de las células se encuentran infectadas por el virus del dengue.



**Figura 6.-Inmunofluorescencia de células C6/36 infectadas con DENV-2.** En la imagen se puede visualizar las células C6/36 teñidas con un color azul los núcleos y de verde el virus. La imagen A representa el control negativo, la imagen B corresponde a células infectadas teñidas solo con el anticuerpo secundario y la imagen C corresponde a las células infectadas y teñidas con ambos anticuerpos.

### 8.6 Efecto citopático.

Al exponer células C6/36 con DENV-2, para detección del efecto citopático, se puede observar en el grupo control la morfología típica de las células de forma redondeada con poco citoplasma. Por su parte las células que se expusieron al virus, se observa que incrementaron su tamaño, el núcleo se ve más grande y definido; así como también su citoplasma es mayor (Fig. 7).

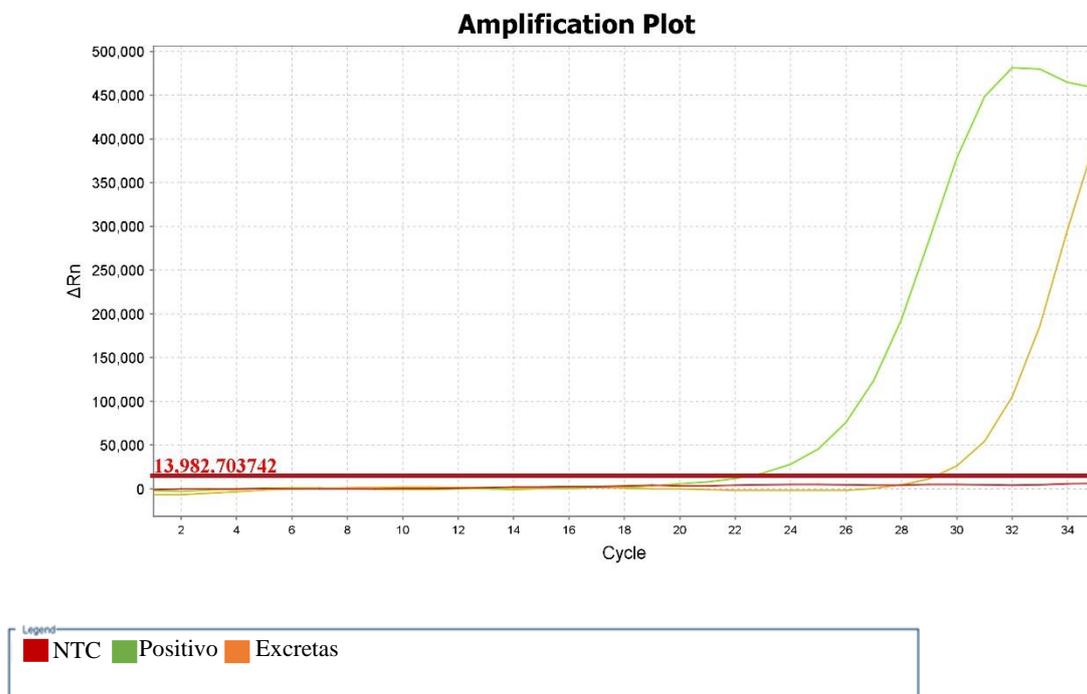


**Figura 7.- Efecto citopático en células C6/36 producido por dengue virus tipo 2.** Se puede observar en las dos primeras imágenes el grupo control y en las últimas dos imágenes las células infectadas con DENV-2. Las fotografías fueron tomadas con los objetivos 40X y 100X de amplificación.

## 8.7 Transmisión horizontal larva-larva por excretas

### 8.7.1 Detección del virus del dengue por RTqPCR de excretas

Una vez infectadas las larvas de *Aedes* con el stock viral establecido, se recogieron las excretas y se detectó el virus del dengue en ellas, dando como resultado, una curva de amplificación en el ciclo 29 con un total de 13982 réplicas por ciclo, por su parte el control positivo amplificó en el ciclo 22 (Fig. 8).

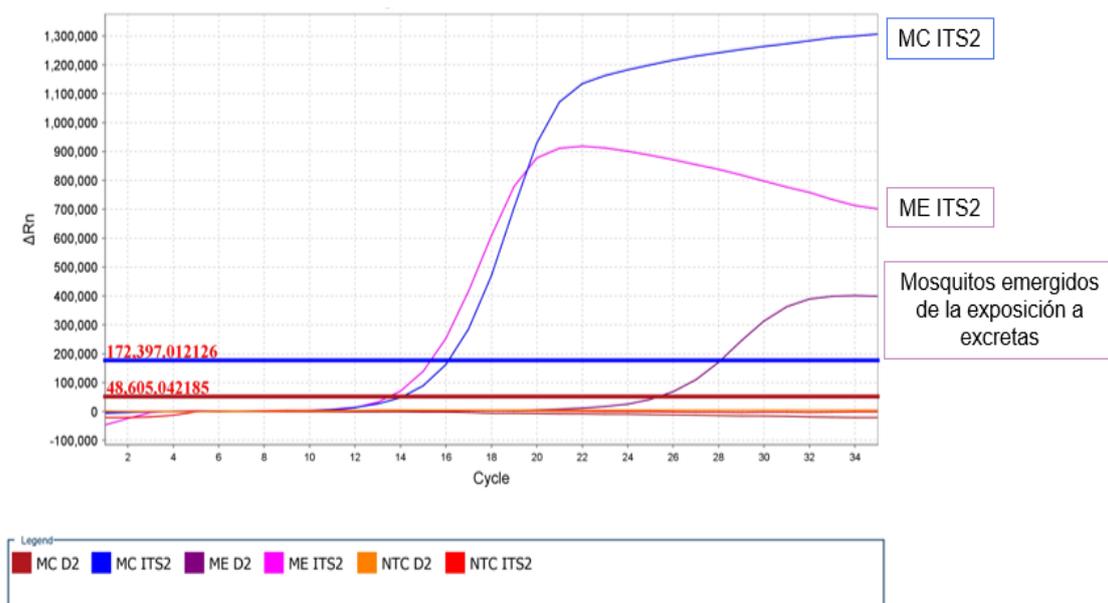


**Figura 8.- RTqPCR para la presencia de DENV-2 en excretas de larvas de *Aedes aegypti*.** Se observa de color verde la curva de amplificación para el control positivo, de color naranja la curva de amplificación para las excretas de larvas infectadas con DENV y de color rojo el control.

### 8.7.1 Detección del virus del dengue en imagos infectados mediante la exposición a excretas obtenidas de la transmisión horizontal larva-larva.

Una vez terminado el tiempo de exposición de las larvas de *Aedes aegypti* por excretas con viriones se esperó a que los mosquitos terminarían su metamorfosis y llegarán a su etapa adulta.

Se realizó una RTqPCR para determinar la positividad de estos, dando como resultado una curva de amplificación a partir del ciclo 19 con 48,605 réplicas por ciclo, por su parte el espaciador transcrito interno dos (ITS2) se obtuvo un total de 172,397 réplicas por ciclo amplificando las curvas a partir del ciclo 11 tanto para el grupo control como para los mosquitos problema (Fig. 9).



**Figura 9.- RTqPCR para la detección de DENV-2 en Imago expuestos desde sus etapas larvarias a excretas de larvas infectadas.** Se observa de color azul la curva de amplificación del control interno ITS2 para el mosquito control; de color rosa la curva de la curva de amplificación del control interno ITS2 para el mosquito experimental y de color morado rosa la curva de la curva de amplificación para DENV para el mosquito experimental.

## 8.8 Transmisión del DENV a ratones BALB/c

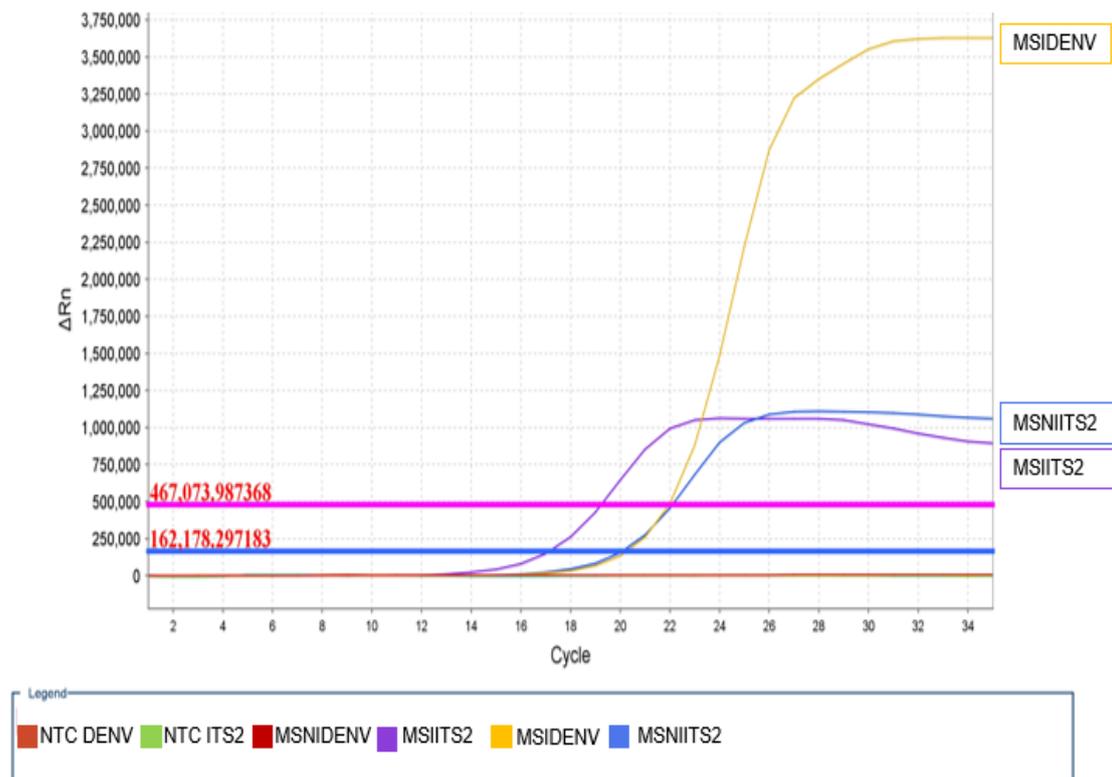
### 8.8.1 Control positivo para la transmisión del DENV a ratones BALB/c

Diez días posteriores a la alimentación de los mosquitos hembra con la harina de sangre combinada con partículas de DENV-2 (Fig. 10), la prueba de RTqPCR resultó positiva, dando como resultado una curva de amplificación a partir del ciclo 22 con un total de 467,073 réplicas. Por otra parte, la amplificación del Espaciador Tanscrito Interno constitutivo ITS-2 para el caso del imago alimentado con harina de sangre en combinación con DENV-2 se observa la curva de amplificación en el ciclo 19 con un total de 162,178 réplicas. Así mismo, para el grupo control alimentado solo con harina de sangre, se obtuvo curva de amplificación de este mismo marcador molecular a partir del ciclo 22 y no se observó curva de amplificación para DENV-2 (Fig. 11).



**Figura 10.- Aedes aegypti alimentándose con harina de sangre infectada con DENV-2.**

En la imagen se puede observar a dos hembras de Aedes aegypti alimentándose de hisopos embebidos con sangre desfibrinada combinada con partículas virales del DENV-2.



**Figura 11.- RTqPCR para el control positivo de infección para el DENV-2.** Se observa de color amarillo la curva de amplificación para los imagos alimentados con la harina de sangre combinada con DENV-2, de color violeta la curva de amplificación para el marcador molecular endógeno ITS-2 en los imagos alimentado con sangre combinada con DENV-2, de color azul la curva de amplificación del mismo marcador molecular en el caso de para los imagos alimentados con sangre sin infectar como grupo control.

Se observó que el grupo tratado con ciclofosfamida fue el que presentó mejor inmunosupresión, ya que se logró disminuir casi a la mitad el conteo de leucocitos con un promedio de  $3,375 \pm 247.487 \text{ mm}^3$  con respecto al grupo control con un promedio de  $5,900 \pm 424.264 \text{ mm}^3$  por lo que para la siguiente etapa se continuó con el grupo tratado con ciclofosfamida (Tabla 1).

**Tabla 1.- Conteo leucocitario de los distintos grupos inmunosuprimidos y grupo control.**

<b>Conteo leucocitario en mm<sup>3</sup></b>				
<b>Día 4</b>				
<b>n</b>	<b>Control</b>	<b>Acetato de metilprednisolona</b>	<b>Ciclofosfamida</b>	<b>Acetato de metilprednisolona + Ciclofosfamida</b>
<b>Ratón 1</b>	5600	4900	3550	4700
<b>Ratón 2</b>	6200	4100	3200	3200
<b>Promedio±SD</b>	<b>5,900±424.264</b>	<b>4,500±565.685</b>	<b>3,375±247.487</b>	<b>3,950±1060.660</b>

SD: Desviación estándar

Una vez elegido el grupo de estudio y al haber sido demostrada la inmunosupresión al cuarto día postratamiento, los ratones tratados fueron infectados mediante la picadura de los imagos positivos a DENV. Se puede observar en la imagen a los mosquitos hebra alimentarse del ratón (Fig. 12).



**Figura 12.- Mosquitos control positivos *Aedes aegypti* alimentándose del ratón Balb/C.**

Dos imagos positivos infectados previamente al alimentarse con harina de sangre y stock viral alimentándose de un ratón Balb/C sedado.

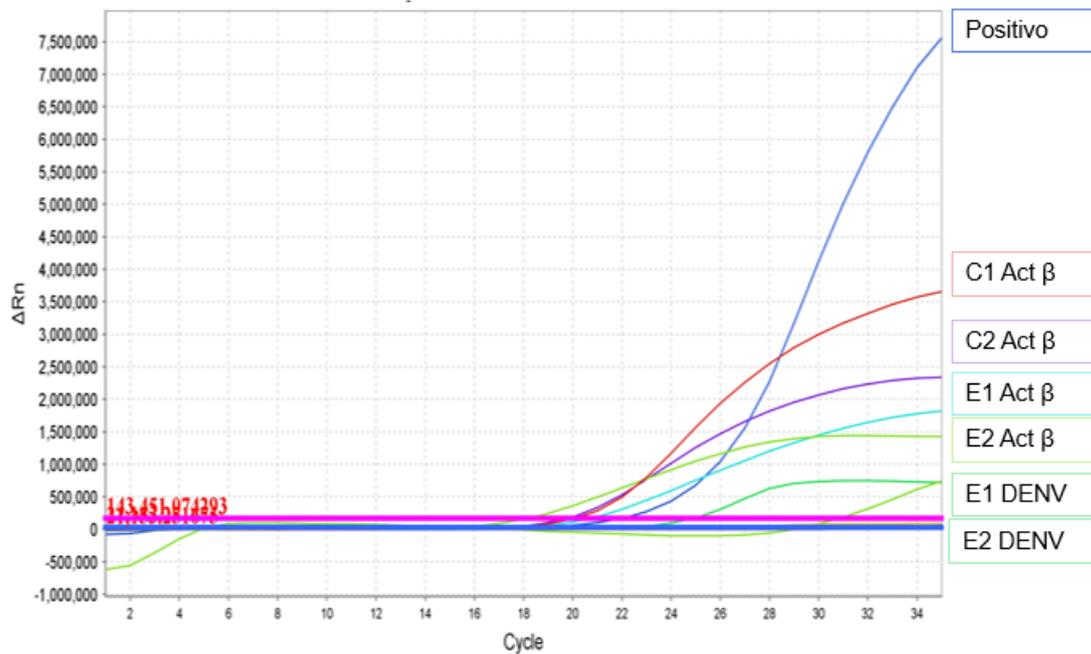
Siete días postinfección, a los ratones del grupo control y al grupo tratado o de estudio se les realizó de nuevo conteo de glóbulos blancos, evidenciándose un incremento de tres veces y media la cantidad de leucocitos con respecto al grupo control, con un promedio de  $21,875 \pm 3146.6 \text{ mm}^3$  (Tabla 2).

**Tabla 2.-** Conteo leucocitario del grupo control y grupo de estudio infectados por la picadura del mosquito control.

<b>Conteo leucocitario en <math>\text{mm}^3</math></b>			
<b>Tiempo</b>	<b>n</b>	<b>Control</b>	<b>Ciclofosfamida</b>
<b>Día 0</b>	Ratón 1	5600	3550
	Ratón 2	6200	3200
	<b>Promedio<math>\pm</math>SD</b>	<b>5900<math>\pm</math>424.264</b>	<b>3375<math>\pm</math>247.49</b>
<b>Día 7</b>	Ratón 1	5800	24100
	Ratón 2	6250	19650
	<b>Promedio<math>\pm</math>SD</b>	<b>6025<math>\pm</math>318.198</b>	<b>21875<math>\pm</math>3146.6</b>

SD: Desviación estándar

Posterior a los siete días de infección, los ratones fueron sacrificados y se evaluó la positividad de la infección por DENV-2 por medio de una RT-qPCR. Se puede observar de color azul, violeta, rojo y azul cielo las curvas de amplificación para los genes endógenos de  $\beta$ -actina correspondientes a los dos ratones del grupo control y a los dos ratones de estudio con ciclos de amplificación entre el 20 y 22 con un total de 143,451 réplicas para el gen  $\beta$ -actina, por su parte las curvas de amplificación que se observan en color verde claro y verde oscuro representan a los dos ratones correspondientes al grupo de estudio con ciclos de amplificación del 18 y 25 respectivamente con 21,153 réplicas registradas para DENV-2. Por su parte para el control positivo se observó su curva de amplificación en el ciclo 30 (Fig. 13).



**Figura 13.- RTqPCR para el grupo de estudio infectado por la picadura del control positivo con DENV-2.** Se observan de color azul, violeta, rojo y azul cielo las curvas de amplificación para el gen endógeno de  $\beta$ -actina y de color verde claro y verde oscuro las curvas de amplificación correspondientes para el DENV-2.

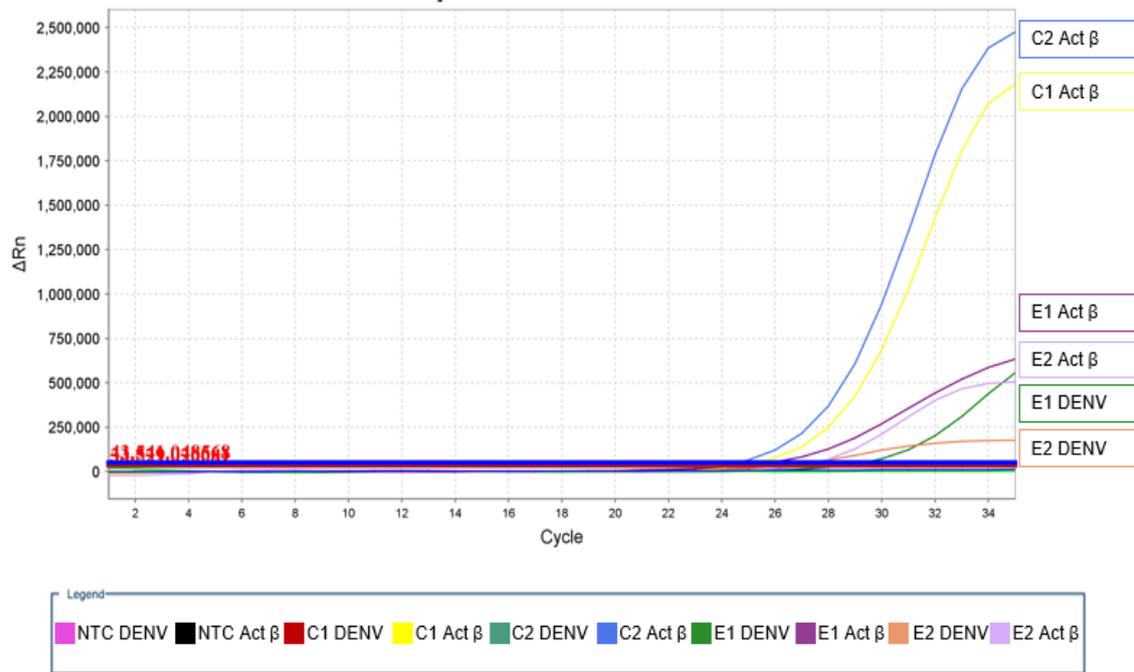
Para el grupo control positivo por medio de la inoculación directa del stock viral, se realizó la inmunosupresión y se realizó un conteo leucocitario al día 0, teniendo como resultado un promedio de  $2,750.0 \pm 435,9$  leucocitos por  $\text{mm}^3$  y para el grupo control no inmunosuprimido un total de  $9,983,3 \pm 354,7$  leucocitos por  $\text{mm}^3$ , al término de la infección (día 7) el control positivo dio un total de  $4,616,7 \pm 838,6$  leucocitos por  $\text{mm}^3$  aumentando aproximadamente 1.6 veces (Tabla 3).

**Tabla 3.- Conteo leucocitario del grupo control y positivos por medio de la inoculación directa del stock viral.**

<b>Conteo leucocitario en mm<sup>3</sup></b>				
	<b>Inmunosupresión</b>		<b>Término de la infección</b>	
	<b>Control</b>	<b>Ciclofosfamida</b>	<b>Control</b>	<b>Ciclofosfamida</b>
	<b>D0</b>	<b>D0</b>	<b>D7</b>	<b>D7</b>
	10,050	2,250	9,900	3,650
	9,600	2,950	9,100	5,050
10,300	3,050	10,150	5,150	
<b>Promedio±SD</b>	<b>9,983,3± 354,7</b>	<b>2,750,0±435,9</b>	<b>9,716,7±548,5</b>	<b>4,616,7±838,6</b>

SD: Desviación estándar

Posterior a los siete días de infección, los ratones fueron sacrificados y se evaluó la positividad de la infección por DENV-2 por medio de una RTqPCR. Se pueden observar las curvas de amplificación para el gen endógeno de  $\beta$ -actina de color azul y amarillo para el grupo control, de color violeta y lila para el grupo experimental con ciclos de amplificación entre el 25 y 28 con un total de 143,451 réplicas por ciclo, por su parte las curvas de amplificación que se observan de color verde y salmón representan al grupo experimental con ciclos de amplificación de 30 y 28 respectivamente con un total de 21,153 réplicas por ciclo (Fig. 14).



**Figura 14.- RTqPCR para el grupo de estudio infectado por la inoculación del stock viral con DENV-2.** Las curvas de amplificación de color azul y amarillo corresponden al gen constitutivo  $\beta$  actina para el grupo control, para el mismo gen de color lila y morado para los grupos experimentales. Los colores verde y salmón corresponden para las curvas de amplificación del DENV para el grupo experimental.

## IX DISCUSIÓN

El control de la enfermedad del dengue se ha vuelto una ardua tarea para los investigadores; acorde con la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud no existe un tratamiento específico para dengue y solo se centra en aliviar el dolor con la utilización de paracetamol, contraindicando el uso de antiinflamatorios no esteroideos, ya que exacerba la sintomatología de la historia natural de la enfermedad aumentando el riesgo de hemorragias (Álvarez Tercero & Vargas Fernández, 2019).

En la actualidad se ha buscado la prevención de la enfermedad del dengue y se optado por el desarrollo de vacunas; una de ellas es dengvaxia® la cuál fue aprobada para la aplicación en población de 9 a 16 años de edad y la vacuna Denvax® en población de 6 a 16 años de edad, sin embargo no han tenido un efecto positivo, ya que al haber un aumento de dengue grave en la población inmunizada esta desarrolló temor dándole la espalda a su implementación (Kariyawasam et al., 2023).

El control de la enfermedad se ha enfocado en el control del vector, siendo uno de los pilares más importantes para el manejo y control de la enfermedad en los países endémicos.

Aun con los hallazgos realizados en los últimos años relacionados a otros arbovirus como los son el virus del Zika, capaz de estar presente en orina e infectar a especies del género *Aedes* (Du et al., 2019), la presencia de virus del Nilo Occidental en excretas de imagos capaces de infectar a larvas, pupas y desarrollar imagos potencialmente infectivos (Hamel et al., 2024), y la primera evidencia de transmisión horizontal entre larvas por excretas con presencia del virus del dengue (Torres-Montoya et al., 2022), dando pie a ampliar los factores que podrían estar implicados en la transmisión del dengue, aún faltan piezas clave para dilucidar todo el panorama presente en los mecanismos de transmisión del virus del dengue.

En el presente estudio se observó un incremento de la replicación viral en la línea celular C6/36, el stock viral presentó mayor respuesta en la curva de replicación con amplificación a partir del ciclo 2, seguido de la curva de amplificación para la replicación 4, sin embargo, no significa que esas réplicas de virus antes de la extracción sean viables o tengan la suficiente virulencia para poder internalizarse en el citoplasma de las células, poder replicarse de manera efectiva y desarrollar una buena infección, pues las partículas virales con el paso del tiempo pueden perder viabilidad o descomponerse por diferentes causas como la intensidad de la luz, no estar en una temperatura adecuada o por las características del medio ambiente (humedad del aire, salinidad, el fómite, etcétera) (Zambrana & Boehm, 2023), además de que múltiples replications pueden conducir a mutaciones que conlleven a una baja tasa de replicación (Teramoto et al., 2019).

La línea celular C6/36 ha sido ampliamente reportada como de las mejores para la replicación del virus del dengue (Kong et al., 2023) además de ser ampliamente utilizada para evidenciar el efecto citopático del virus en ellas (Liu et al., 2023). Los ensayos realizados en esta línea celular, como parte de nuestra investigación se observó un incremento en el tamaño de la célula, un núcleo más grande redondeado, porciones citoplasmáticas más prominentes y agregaciones celulares fusionadas con un efecto citopático característico evidenciado por la formación de sincitios perdiéndose la monocapa, confirmándose lo reportado por diferentes investigaciones (González-Flores et al., 2023; Liu et al., 2023; Teramoto et al., 2019).

De igual manera al observarse la presencia de las partículas virales en el citoplasma por inmunofluorescencia se pudo evidenciar la capacidad infectiva de estas al haberse internalizado en las células y haberse replicado en ellas, al respecto, nuestros resultados coinciden con los reportados por J. A. Rivera et al., (2018) que indican que las partículas

virales se encuentran en el citoplasma, no en los núcleos, lo mismo ocurre, en los núcleos de células sincitiales que mostraron membranas circulares y en algunos casos lisis, pero sin presencia viral. Estos hallazgos tienen explicación ya que el virus del dengue al ser un virus monocatenario de RNA todo su proceso de replicación y maduración lo hace en el citoplasma de la célula utilizando diferentes organelos de la misma, una vez el virus se internalizó en la célula, su replicación lo hace en el retículo endoplásmico rugoso utilizando los ribosomas a su favor, donde ocurre la síntesis y ensamblaje de proteínas para posteriormente madurar en el aparato de Golgi y finalmente liberarse de la célula huésped como múltiples viriones para seguir infectando nuevas células (Zhang et al., 2021).

Para el caso de la infección de *Ae. aegypti* de manera controlada existen múltiples maneras de hacerlo por ejemplo por medio de la ingesta de harina de sangre infecciosa o una solución de sacarosa al 10% por medio un sistema de una membrana denominado hemotek (do Nascimento et al., 2022; Fontaine et al., 2016), por inyecciones intratorácicas (Kong et al., 2023; Uraikova et al., 2020) o por medio de bastoncillos de algodón embebidos con combinaciones de virus, sangre y/o sacarosa (Körsten et al., 2023); al utilizar la técnica del hisopo embebido con sangre desfibrinada y virus en esta investigación se pudo demostrar la positividad de los mosquitos *Aedes aegypti*, diferenciándose de lo reportado por Körsten y colaboradores ya que ellos infectaron a *Culex pipiens* biotipo *molestus* y *Aedes vexans* “Green River” (Körsten et al., 2023), siendo una buena manera de infectar a mosquitos hematófagos.

Por su parte en el caso de modelos murinos para el estudio de enfermedades arbovirales se ha optado por la inoculación de ratones inmunocompetentes con altos niveles de títulos virales, (Du et al., 2019; van Leur et al., 2021). Los ratones Balb/C, han demostrado la susceptibilidad de infección al DENV-2, visualizándose cambios similares y comparables a los observados en los casos fatales producidos por el virus del dengue en el hígado como los

son: microesteatosis, edema, congestión vascular, infiltrado de células inflamatorias, entre otras, con un aumento en el conteo de glóbulos blancos con respecto al control (da Costa Rasinhas et al., 2021; Jácome et al., 2021), en la presente investigación la utilización de ratones Balb/C fue satisfactoria ya que se evidenció que las partículas virales provenientes de un mecanismo de infección larva-larva por coprofagia son infectivas y pueden transmitirse horizontalmente en la relación mosquito-hospedero, al comprobarse positividad y una leucocitosis, al respecto, Vellere et al; (2020) indican que estos efectos son producto de un intento del organismo de eliminar al patógeno, sin embargo de manera habitual en las personas se presenta una leucopenia.

Desde años anteriores se ha mencionado la transmisión horizontal que hay entre vector-humano-vector como el mecanismo más frecuente para la transmisión de arbovirus, sin embargo, no es el único, dando paso a diferentes vías por las cuales se pueden infectar tanto vectores como hospederos. Se ha encontrado evidencias donde se pueden transmitir diferentes arbovirus a vectores en estadios donde los mosquitos como: *Culex quinquefasciatus*, *Toxorhynchites* sp., *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* no se alimentan pero coexisten en ambientes acuáticos contaminados por viriones extraídos de diferentes excreciones como lo son la orina (Du et al., 2019) y heces (Fontaine et al., 2016; Hamel et al., 2024; Torres-Montoya et al., 2022), dando como resultado nuevos mecanismos de transmisión. En nuestra investigación demostramos que las partículas virales presentes en las excretas de las larvas de la especie *Ae. aegypti* son infectivas causando daños citopáticos a las células C6/36 y al estar en convivencia con estas excretas contaminadas con los viriones, las larvas pueden adquirir las partículas virales infecciosas del ambiente acuático y emerger con el virus del dengue, dando positivos los imagos para dicho virus. Estos hallazgos demuestran el potencial de infección existente en excretas y que en el ambiente donde se desarrollan funcionan como reservorio de viriones infectivos capaces de infectar a

nuevas larvas carentes de la infección dando la capacidad de inferir que la excretas aumentan el riesgo de que haya más larvas infectadas por el virus, por ende, la posibilidad de más imagos potencialmente infectivos. Al tener antecedentes de la transmisión horizontal por excretas del virus del dengue tipo 4 en estadios inmaduros de *Toxorhynchites* sp (Torres-Montoya et al., 2022), se puede inferir que toda aquella especie que sea susceptible al virus del dengue que necesita de agua para desarrollarse y está en contacto con una especie infectada por el virus del dengue puede ser un potencial reservorio para este, excretando partículas virales infectivas hasta el término de la infección o muerte de la o las especies infectadas.

Para que exista una buena transmisión de arbovirus en el vector por medio de excretas se requieren de diversas condiciones para la supervivencia del virus por ejemplo el virus del Zika no sobrevive más de media hora en agua con alta demanda química de oxígeno (Dqo) y amoníaco ( $\text{NH}_3$  -N) y pH menores a 6.5 (Du et al., 2019) los cambios de pH de ácido a neutro producen cambios estructurales en las proteínas de la membrana, demostrándose que el pH neutro hace inestable el complejo pr-E del dengue (péptido pr unido a la proteína de la envoltura del virus) (Oliveira et al., 2017), por lo que se puede inferir que la viabilidad del virus arrojados en excretas y existentes en el ambiente en que se desarrollan las especies de mosquitos podría variar dependiendo a las condiciones en las que se encuentran, por lo que al haberse desarrollado esta investigación sobre el mecanismo de transmisión horizontal por excretas en *Aedes*, es limitante para responder cuales son las condiciones del medio acuático que debe de tener el virus para lograr infectar a larvas o pupas y replicarse en estas.

## X CONCLUSIONES

1. Los mosquitos hembra infectados por medio de hisopos embebidos con sangre desfibrinada y virus pueden transmitir el virus del dengue por medio de la picadura a un modelo murino.
2. Los mosquitos *Aedes aegypti* en estadios inmaduros que son expuestos a excretas provenientes de larvas infectadas con virus del dengue al culminar su desarrollo biológico y llegar a su fase de imago son potencialmente infectivos.
3. Los ratones Balb/C son susceptibles a la infección del virus del dengue.

## **XI PERSPECTIVAS**

De acuerdo con los resultados obtenidos será necesario realizar muestreos en campo con el fin de conocer la tasa de infección de los ambientes acuáticos en los que se desarrollan las larvas de *Aedes aegypti*, recoger muestras de agua para ver si existen viriones y determinar las condiciones en las que se encontraban.

Así mismo, será de gran importancia realizar estudios posteriores con el objetivo de evaluar si las especies que se desarrollan y conviven con *Aedes aegypti* fungen como reservorios para el virus del dengue por este mismo mecanismo larva-larva o por alimentarse de larvas infectadas con el virus del dengue.

Finalmente, es necesario trasladar este tipo de estudios a diferentes regiones del estado de Sinaloa con el objetivo de poder dimensionar el impacto de esta transmisión en el carácter epidemiológico de la enfermedad.

## XII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldama, D. P. C. (2001). *Ciclo de vida del Aedes aegypti y manifestaciones clínicas del dengue*. 22(2), 4.
- Álvarez Tercero, A., & Vargas Fernández, R. (2019). Dengue: Presentación e importancia de factor activación de plaquetas en la evolución de la fase crítica. *Revista Medica Sinergia*, 4(11), e294. <https://doi.org/10.31434/rms.v4i11.294>
- Arredondo-García, J. L., Aguilar-López Escalera, C. G., Aguilar Lugo-Gerez, J. J., Osnaya-Romero, N., Pérez-Guillé, G., & Medina-Cortina, H. (2020). Panorama epidemiológico de dengue en México 2000-2019. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 33(2), 78-83. <https://doi.org/10.35366/94418>
- Barrera, R. (2015). Editorial: Control de los mosquitos vectores del dengue y del chikunguña: ¿es necesario reexaminar las estrategias actuales? *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 35(3), 297-299. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i3>.
- CDC. (2022, junio 21). *Ciclo de vida de Aedes aegypti y Aedes albopictus* /CDC. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/mosquitoes/es/about/life-cycles/aedes.html>
- Chanthick, C., Suttitheptumrong, A., Rawarak, N., & Pattanakitsakul, S. (2018). Transcytosis Involvement in Transport System and Endothelial Permeability of Vascular Leakage during Dengue Virus Infection. *Viruses*, 10(2), 69. <https://doi.org/10.3390/v10020069>
- Contreras, M., Rincón, M. A., Vásquez Guillén, A., Moreira, R., & Callejas, D. (2021). *Aspectos genéticos del virus del dengue*. 5(2), 79-88.
- da Costa Rasinhas, A., Cunha Jácome, F., Cardoso Caldas, G., Teixeira de Almeida, A. L., Nunes da Silva, M. A., Dias Coutinho de Souza, D., Carlos Paulino, A., Mendes

- Bandeira, D., Leonardo, R., Conrado Guerra Nunes, P., Mohana-Borges, R., Monika Barth, O., Barreto dos Santos, F., & Ferreira Barreto Vieira, D. (2021). Morphological Aspects and Viremia Analysis of BALB/c Murine Model Experimentally Infected with Dengue Virus Serotype 4. *Viruses*, *13*(10), 1954. <https://doi.org/10.3390/v13101954>
- Dehesa-López, E., & Gutiérrez-Alatorre, A. F. (2019). Dengue: Actualidades y características epidemiológicas en México. *REVMEDUAS*, *9*(3). <http://dx.doi.org/10.28960/revmeduas.2007-8013.v9.n3.006>
- Desgraupes, S., Hubert, M., Gessain, A., Ceccaldi, P.-E., & Vidy, A. (2021). Mother-to-Child Transmission of Arboviruses during Breastfeeding: From Epidemiology to Cellular Mechanisms. *Viruses*, *13*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/v13071312>
- do Nascimento, R. M., Campolina, T. B., Chaves, B. A., Delgado, J. L. F., Godoy, R. S. M., Pimenta, P. F. P., & Secundino, N. F. C. (2022). The influence of culture-dependent native microbiota in Zika virus infection in *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, *15*, 57. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05160-7>
- Du, S., Liu, Y., Liu, J., Zhao, J., Champagne, C., Tong, L., Zhang, R., Zhang, F., Qin, C.-F., Ma, P., Chen, C.-H., Liang, G., Liu, Q., Shi, P.-Y., Cazelles, B., Wang, P., Tian, H., & Cheng, G. (2019). *Aedes* mosquitoes acquire and transmit Zika virus by breeding in contaminated aquatic environments. *Nature Communications*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09256-0>
- Evans-Gilbert, T. (2020). Vertically transmitted chikungunya, Zika and dengue virus infections: The pathogenesis from mother to fetus and the implications of co-infections and vaccine development. *International Journal of Pediatrics & Adolescent Medicine*, *7*(3), 107-111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpam.2019.05.004>

- Fontaine, A., Jiolle, D., Moltini-Conclois, I., Lequime, S., & Lambrechts, L. (2016). Excretion of dengue virus RNA by *Aedes aegypti* allows non-destructive monitoring of viral dissemination in individual mosquitoes. *Scientific Reports*, *6*, 24885. <https://doi.org/10.1038/srep24885>
- Garcia, G. F. G. (2018). *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Diptera: Culicidae) y su importancia en salud humana. *Revista Cubana de Medicina Tropical.*, *70*(1), 16.
- Giménez-Richarte, Á., de Salazar, M. O., Arbona, C., Giménez-Richarte, M. P., Collado, M., Fernández, P. L., Quiles, F., Clavijo, C., Marco, P., & Ramos-Rincon, J.-M. (2022). Prevalence of Chikungunya, Dengue and Zika viruses in blood donors: A systematic literature review and meta-analysis. *Blood Transfusion*, *20*(4), 267-280. <https://doi.org/10.2450/2021.0106-21>
- González-Flores, A. M., Salas-Benito, M., Rosales-García, V. H., Zárata-Segura, P. B., Del Ángel, R. M., De Nova-Ocampo, M. A., & Salas-Benito, J. S. (2023). Characterization of Viral Interference in *Aedes albopictus* C6/36 Cells Persistently Infected with Dengue Virus 2. *Pathogens*, *12*(9), 1135. <https://doi.org/10.3390/pathogens12091135>
- Guerrero, D., Cantaert, T., & Missé, D. (2020). *Aedes* Mosquito Salivary Components and Their Effect on the Immune Response to Arboviruses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 407. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00407>
- Guo, Y., Guo, J., & Li, Y. (2022). Wolbachia wPip Blocks Zika Virus Transovarial Transmission in *Aedes albopictus*. *Microbiology Spectrum*, *10*(5), e02633-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02633-21>
- Gutiérrez, L. A. (2022, noviembre 20). *PAHO/WHO Data—Boletín Anual Arbovirosis 2022 / OPS/OMS*. Pan American Health Organization / World Health Organization.

<https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/boletin-anual-arbovirosis-2022.html>

- Hamel, R., Narpon, Q., Serrato-Pomar, I., Gaudiard, C., Berthomieu, A., Wichit, S., Missé, D., Sofonea, M. T., & Pompon, J. (2024). *West Nile virus is transmitted within mosquito populations through infectious mosquito excreta* (p. 2024.01.29.577888). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2024.01.29.577888>
- Heath, C. J., Grossi-Soyster, E. N., Ndenga, B. A., Mutuku, F. M., Sahoo, M. K., Ngugi, H. N., Mbakaya, J. O., Siema, P., Kitron, U., Zahiri, N., Hortion, J., Waggoner, J. J., King, C. H., Pinsky, B. A., & LaBeaud, A. D. (2020). Evidence of transovarial transmission of Chikungunya and Dengue viruses in field-caught mosquitoes in Kenya. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *14*(6), e0008362. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008362>
- Hoyos, W. D. J. A. (2022). Conceptualización del diagnóstico del Dengue desde una perspectiva de la ingeniería y las nuevas tecnologías. *Computer and Electronic Sciences: Theory and Applications*, *3*(1), Article 1. <https://doi.org/10.17981/cesta.03.01.2022.01>
- Im, S., Ik, S., Lpe, D., Ipd, P., & Ima, W. (2022). Dengue virus transovarial transmission detection in *Aedes aegypti* from dengue hemorrhagic fever patients' residences in Denpasar, Bali. *Veterinary world*, *15*(4). <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.1149-1153>
- Jácome, F. C., Caldas, G. C., Rasinhas, A. da C., de Almeida, A. L. T., de Souza, D. D. C., Paulino, A. C., Leonardo, R., Barth, O. M., dos Santos, F. B., & Barreto-Vieira, D. F. (2021). Comparative analysis of liver involvement caused by two DENV-2 lineages using an immunocompetent murine model. *Scientific Reports*, *11*, 9723. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88502-2>

- Kabir, M. A., Zilouchian, H., Younas, M. A., & Asghar, W. (2021). Dengue Detection: Advances in Diagnostic Tools from Conventional Technology to Point of Care. *Biosensors*, *11*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/bios11070206>
- Kariyawasam, R., Lachman, M., Mansuri, S., Chakrabarti, S., & Boggild, A. K. (2023). A dengue vaccine whirlwind update. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, *10*, 20499361231167274. <https://doi.org/10.1177/20499361231167274>
- Kirstein, O. D., Talavera, G. A., Wei, Z., Ciau-Carrillo, K. J., Koyoc-Cardena, E., Puerta-Guardo, H., Rodríguez-Martín, E., Medina-Barreiro, A., Mendoza, A. C., Piantadosi, A. L., Manrique-Saide, P., & Vazquez-Prokopec, G. M. (2022). Natural Aedes-Borne Virus Infection Detected in Male Adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Collected From Urban Settings in Mérida, Yucatán, México. *Journal of Medical Entomology*, *59*(4), 1336-1346. <https://doi.org/10.1093/jme/tjac048>
- Kong, L., Xiao, J., Yang, L., Sui, Y., Wang, D., Chen, S., Liu, P., Chen, X.-G., & Gu, J. (2023). Mosquito densovirus significantly reduces the vector susceptibility to dengue virus serotype 2 in *Aedes albopictus* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Infectious Diseases of Poverty*, *12*, 48. <https://doi.org/10.1186/s40249-023-01099-8>
- Körsten, C., Vasić, A., AL-Hosary, A. A., Tews, B. A., Răileanu, C., Silaghi, C., & Schäfer, M. (2023). Excretion Dynamics of Arboviruses in Mosquitoes and the Potential Use in Vector Competence Studies and Arbovirus Surveillance. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, *8*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8080410>
- Li, Q., & Kang, C. (2022). Structures and Dynamics of Dengue Virus Nonstructural Membrane Proteins. *Membranes*, *12*(2), 231. <https://doi.org/10.3390/membranes12020231>
- Liu, D., Obwolo, L. A., Cruz-Cosme, R., & Tang, Q. (2023). Syncytial and Congregative Effects of Dengue and Zika Viruses on the *Aedes Albopictus* Cell Line Differ among

- the Viral Strains. *Zoonoses (Burlington, Mass.)*, 3(1), 12.  
<https://doi.org/10.15212/zoonoses-2023-0002>
- Malavige, G. N., & Ogg, G. S. (2017). Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology*, 151(3), 261-269. <https://doi.org/10.1111/imm.12748>
- Mata, G. B., Redondo, S. H., & López, R. G. (2020). Actualización de la fiebre del Dengue. *Revista Medica Sinergia*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.31434/rms.v5i1.341>
- Oliveira, E. R. A., de Alencastro, R. B., & Horta, B. A. C. (2017). New insights into flavivirus biology: The influence of pH over interactions between prM and E proteins. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 31(11), 1009-1019. <https://doi.org/10.1007/s10822-017-0076-8>
- OMS. (2022). *Dengue y dengue grave* [Científica]. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- Organización Panamericana de la Salud. (2022). Síntesis de evidencia: Directrices para el diagnóstico y el tratamiento del dengue, el chikunguña y el zika en la Región de las Américas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 46, e82. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2022.82>
- PAHO. (2023). *Epidemiological Update for Dengue and other Arboviruses*. Pan American Health Organization/ World Health Organization. [https://ais.paho.org/ha\\_viz/Arbo/Arbo\\_Bulletin\\_Es\\_2022.asp?env=pri](https://ais.paho.org/ha_viz/Arbo/Arbo_Bulletin_Es_2022.asp?env=pri)
- Peña León, Y., Herrera López, M., García Orta, E., Peña León, Y., Herrera López, M., & García Orta, E. (2021). Factores socioambientales que facilitan la propagación del dengue. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 58. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1561-30032021000100014&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1561-30032021000100014&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

- Pozzetto, B., Grard, G., Durand, G., Paty, M.-C., Gallian, P., Lucas-Samuel, S., Diéterlé, S., Fromage, M., Durand, M., Lepelletier, D., Chidiac, C., Hoen, B., & Nicolas de Lamballerie, X. (2023). Arboviral Risk Associated with Solid Organ and Hematopoietic Stem Cell Grafts: The Prophylactic Answers Proposed by the French High Council of Public Health in a National Context. *Viruses*, *15*(9), 1783. <https://doi.org/10.3390/v15091783>
- Rathore, S. S., Oberoi, S., Hilliard, J., Raja, R., Ahmed, N. K., Vishwakarma, Y., Iqbal, K., Kumari, C., Velasquez-Botero, F., Nieto-Salazar, M. A., Cortes, G. A. M., Akomaning, E., & Musa, I. elFatih M. (2022). Maternal and foetal-neonatal outcomes of dengue virus infection during pregnancy. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, *27*(7), 619-629. <https://doi.org/10.1111/tmi.13783>
- Rivera, A. H., & Rodríguez, A. P. (2010). Actualización en aspectos epidemiológicos y clínicos del dengue. *Revista Cubana de Salud Pública*, *36*(1), 149-164.
- Rivera, J. A., Rengifo, A. C., Sarmiento, L., Díaz, T., Laiton-Donato, K., Gracia, M., Camacho, S., Velandia-Romero, M., Castellanos, J., & Caldas, M. L. (2018). Nuclei ultrastructural changes of C6/36 cells infected with virus dengue type 2. *Biomédica*, *38*(Sup. 2), Article Sup. 2. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3997>
- Rúa-Uribe, G. L., Giraldo-Jaramillo, T. M., Triana-Chávez, O., Rojo, R., Henao, E., Pérez-Pérez, J., Rúa-Uribe, G. L., Giraldo-Jaramillo, T. M., Triana-Chávez, O., Rojo, R., Henao, E., & Pérez-Pérez, J. (2020). Transmisión vertical de virus dengue en *Aedes* spp. (Diptera: Culicidae) en Medellín, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, *46*(1). <https://doi.org/10.25100/socolen.v46i1.e6973>
- Sati, C. de infectología crítica. (2021). Dengue grave. *Revista Argentina de Terapia Intensiva*, *38*, e707.10102020-e707.10102020.

- Secretaría de Salud. (2022, agosto 26). *México trabaja con mejores estrategias para el control del dengue*. gob.mx. <http://www.gob.mx/salud/prensa/423-mexico-trabaja-con-mejores-estrategias-para-el-control-del-dengue?idiom=es>
- Siqueira, R. C., Coelho, I. N., Braga, J. P. R., Lucena, M. M. de, Bellanda, V. C. F., Agarwal, A., & Jorge, R. (2022). Ocular manifestation of vertical transmission of dengue: Case report. *Arquivos Brasileiros De Oftalmologia*, S0004-27492022005011214. <https://doi.org/10.5935/0004-2749.2022-0107>
- Songprakhon, P., Thaingtamtanha, T., Limjindaporn, T., Puttikhunt, C., Srisawat, C., Luangaram, P., Dechtawewat, T., Uthaipibull, C., Thongsima, S., Yenchitsomanus, P., Malasit, P., & Noisakran, S. (2020). Peptides targeting dengue viral nonstructural protein 1 inhibit dengue virus production. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69515-9>
- Teramoto, T., Huang, X., Armbruster, P. A., & Padmanabhan, R. (2019). Infection of Aedes albopictus Mosquito C6/36 Cells with the wMelpop Strain of Wolbachia Modulates Dengue Virus-Induced Host Cellular Transcripts and Induces Critical Sequence Alterations in the Dengue Viral Genome. *Journal of Virology*, 93(15), e00581-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00581-19>
- Tercero, A. Á., & Fernández, R. V. (2019). Dengue: Presentación e importancia de factor activación de plaquetas en la evolución de la fase crítica. *Revista Medica Sinergia*, 4(11), Article 11. <https://doi.org/10.31434/rms.v4i11.294>
- Torres-Avenidaño, J. I., Apodaca-Medina, A. I., Castillo-Ureta, H., Rendón-Maldonado, J. G., Torres-Montoya, E. H., Cota-Medina, A., Ríos-Tostado, J. J., & Zazueta-Moreno, J. M. (2021). Natural Vertical Transmission of Dengue Virus Serotype 4 in Aedes aegypti Larvae from Urban Areas in Sinaloa, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 21(6), 478-481. <https://doi.org/10.1089/vbz.2020.2748>

- Torres-Montoya, E. H., Ulloa-Urquidy, L., Torres-Avenidaño, J. I., Zazueta-Moreno, J. M., Apodaca-Medina, A. I., Osuna-Ramírez, I., Ramos-Payan, R., Olimón-Andalón, V., Silva-Benítez, E. de L., Gutiérrez, J. A. L., Ramos-Castañeda, J., & Ureta, H. C. (2022). First Evidence of Horizontal Transmission by Fecal Shedding of Dengue Virus 4 Among *Aedes aegypti* Larvae (Diptera: Culicidae) Under Laboratory Conditions. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.  
<https://doi.org/10.1089/vbz.2021.0044>
- Urakova, N., Brustolin, M., Joseph, R. E., Johnson, R. M., Pujhari, S., & Rasgon, J. L. (2020). *Anopheles gambiae* densovirus (AgDENV) negatively affects Mayaro virus infection in *Anopheles gambiae* cells and mosquitoes. *Parasites & Vectors*, *13*, 210.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04072-8>
- Utarini, A., Indriani, C., Ahmad, R. A., Tantowijoyo, W., Arguni, E., Ansari, M. R., Supriyati, E., Wardana, D. S., Metika, Y., Ernesia, I., Nurhayati, I., Prabowo, E., Andari, B., Green, B. R., Hodgson, L., Cutcher, Z., Rancès, E., Ryan, P. A., O'Neill, S. L., ... Simmons, C. P. (2021). Efficacy of Wolbachia-infected mosquito deployments for the control of dengue. *The New England Journal of Medicine*, *384*(23), 2177-2186. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2030243>
- van Leur, S. W., Heunis, T., Munnur, D., & Sanyal, S. (2021). Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence*, *12*(1), 2814-2838.  
<https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996059>
- Vellere, I., Lagi, F., Spinicci, M., Mantella, A., Mantengoli, E., Corti, G., Colao, M. G., Gobbi, F., Rossolini, G. M., Bartoloni, A., & Zammarchi, L. (2020). Arbo-Score: A Rapid Score for Early Identification of Patients with Imported Arbovirosis Caused by Dengue, Chikungunya and Zika Virus. *Microorganisms*, *8*(11), 1731.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8111731>

- Walker, T., Johnson, P. H., Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F. D., McMeniman, C. J., Leong, Y. S., Dong, Y., Axford, J., Kriesner, P., Lloyd, A. L., Ritchie, S. A., O'Neill, S. L., & Hoffmann, A. A. (2011). The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, *476*(7361), Article 7361. <https://doi.org/10.1038/nature10355>
- Watanabe, S., Chan, K. W. K., Tan, N. W. W., Mahid, M. B. A., Chowdhury, A., Chang, K. T. E., & Vasudevan, S. G. (2022). Experimental evidence for a high rate of maternal-fetal transmission of dengue virus in the presence of antibodies in immunocompromised mice. *EBioMedicine*, *77*, 103930. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103930>
- Zambrana, W., & Boehm, A. B. (2023). Occurrence of Human Viruses on Fomites in the Environment: A Systematic Review and Meta-analysis. *ACS Environmental Au*, *3*(5), 277-294. <https://doi.org/10.1021/acsenvironau.3c00025>
- Zhang, X., Zhang, Y., Jia, R., Wang, M., Yin, Z., & Cheng, A. (2021). Structure and function of capsid protein in flavivirus infection and its applications in the development of vaccines and therapeutics. *Veterinary Research*, *52*, 98. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00966-2>